РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

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

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д.х.н., проф. Карпова Галина Георгиевна

Новосибирск – 2020

оглавление

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ6
ВВЕДЕНИЕ
ГЛАВА 1. РОЛЬ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)15
1.1 Общая характеристика рибосомных белков16
1.1.1 Рибосомные белки – конститутивные компоненты аппарата трансляции 16
1.1.2 Участие рибосомных белков в процессе трансляции в качестве компонентов рибосомы 18
1.1.3 Внерибосомные функции рибосомных белков
1.2 Роль рибосомных белков в репликации и репарации клеточного генома 20
1.2.1 Опосредованная роль рибосомных белков в репликации клеточного генома
1.2.2 Роль рибосомных белков в репарации клеточного генома
1.3 Роль рибосомных белков в процессе регуляции транскрипции 24
1.3.1 Рибосомные белки как регуляторы экспрессии генов, транскрипция которых контролируется онкопротеином с-Мус
1.3.2 Рибосомные белки как регуляторы сигнального пути NF-kB 29
1.3.3 Рибосомные белки как регуляторы сигнального пути MDM2-p53 33
1.4 Роль рибосомных белков в процессинге РНК
1.5 Роль рибосомных белков в процессе регуляции трансляции
1.5.1 Взаимодействия рибосомных белков, обеспечивающие сборку 60S и 40S субчастиц 42
1.5.2 Рибосомные белки в составе рибосомы как участники регуляции трансляции специфических мРНК
1.5.3 Рибосомные белки в составе рибосомы как участники контроля качества мРНК и рибосом 47
1.5.4 Роль рибосомных белков в трансляционном контроле 48
1.5.5 Рибосомные белки как регуляторы трансляции собтвенных мРНК 51
1.5.6 Рибосомные белки как регуляторы трансляции специфических мРНК 51
1.6 Взаимодействия рибосомных белков с компонентами вирусов 57
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ63
2.1 Материалы 63
2.2 Методы
2.2.1 Дизайн и создание генетических конструкций 66
2.2.1.1 Создание генетического вектора для получения стабильных клеточных линий 66
2.2.1.2 Создание вектора pAG-1 со вставкой минигена FLAGeS1 67

2.2.1.3 Создание вектора pAG-1 со вставкой минигена FLAG иS19	67
2.2.1.4 Создание вектора pET15b со вставкой минигена ^{His6-FLAG} eS1	67
2.2.1.5 Получение плазмид со вставками, кодирующими специфические siPHK против мPHK	-
eS1	67
2.2.1.6 Синтез олигонуклеотидов для создания siPHK против мPHK eL29	68
2.2.2 Методы, связанные с клеточными культурами	68
2.2.2.1 Получение стабильных клеточных линий на основе клеток НЕК293	68
2.2.2.2 Получение и характеризация клеток НЕК293, дефицитных по eL29	69
2.2.2.3 Анализ содержания рибосомных белков в лизате и во фракциях полисомного профиля клеток НЕК293, дефицитных по eL29	я 70
2.2.2.4 Анализ полисомных профилей клеток, продуцирующих FLAGeS1 и FLAGuS19	70
2.2.3 Методы, основанные на высокопроизводительном секвенировании РНК	71
2.2.3.1 Внутриклеточное сшивание РНК с eS1 с использованием метода PAR-CLIP	71
2.2.3.1.1 Подготовка клеток и облучение	71
2.2.3.1.2 Обработка лизата клеток РНКазой Т1 и иммунопреципитация сшитых фрагментов Р	РНК 71
2.2.3.1.3 Обработка сшитых РНК-фрагментов РНКазой Т1 на магнитных частицах, их дефосфорилирование и ³² Р-мечение	72
2.2.3.1.4 Очистка сшитых фрагментов РНК	73
2.2.3.1.5 Приготовление ДНК-библиотек и их высокопроизводительное секвенирование	73
2.2.3.2 Внутриклеточное сшивание мРНК с ^{FLAG} uS19 в рибосомах с остановленной трансляци с использованием метода PAR-CLIP	лей 74
2.2.3.3 Рибосомный профайлинг клеток, продуцирующих ^{FLAG} uS19 и клеток, выращенных на культуральной среде в присутствии s ⁴ U	75
2.2.3.4 Анализ клеток НЕК293, дефицитных по eS1, с помощью РНК-сек	75
2.2.3.5 Анализ клеток НЕК293, дефицитных по eL29, с помощью РНК-сек	76
2.2.4 Биоинформатический анализ данных	76
2.2.4.1 Биоинформатический анализ данных PAR-CLIP на клетках, продуцирующих FLAGeS1, данных PHK-сек на клетках, дефицитных по eS1	и 76
2.2.4.2 Биоинформатический анализ данных PAR-CLIP на клетках, продуцирующих FLAGuS19	9 77
2.2.4.3 Биоинформатический анализ данных РНК-сек, полученных на клетках, дефицитных г eL29	10 78
2.2.5 Методы, примененные для изучения РНК-белковых взаимодействий in vitro	80
2.2.5.1 Получение рекомбинантного eS1 в системе E.coli	80
2.2.5.2 Синтез РНК-транскриптов, соответствующих различных формам U11 мяРНК, <i>in vitro</i>	. 80
2.2.5.3 Оценка связывания eS1 с PHK-транскриптами методом фильтрования через нитроцеллюлозные фильтры	80

2.2.5.4 Анализ связывания eS1 с PHК-транскриптами с помощью метода задержки в геле	81
2.2.5.5 Химический пробинг U11 мяРНК-транскрипта, связанного в комплекс с eS1	81
2.2.5.6 Иммунопреципитация eS1-содержащих комплексов из ядерного и цитоплазматическо экстрактов НЕК293 и анализ PHK	ого 82
2.2.5.7 Установление участка белка eS1, сшивающегося с U11 мяРНК	82
2.2.5.8 Оценка уровня U11 пре-мяРНК в клетках, дефицитных по eS1, с помощью ПЦР в реальном времени	83
2.2.5.9 Валидация результатов анализа данных РНК-сек для клеток, дефицитных по eL29, с помощью ПЦР в реальном времени	84
2.2.5.10 Аффинное сшивание s ⁴ U-содержащих аналогов мРНК с 80S рибосомами	84
2.2.6 Анализ структурных моделей 40S рибосомных субчастиц и моделей U1 мяРНК	85
ГЛАВА 3. НОВЫЕ ФУНКЦИИ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ eS1, uS19 И eL29 ЧЕЛОВЕКА, ВЫЯВЛЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ, ОСНОВАННЫХ НА ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОМ СЕКВЕНИРОВАНИИ РНК (РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ	96
ОВСУЖДЕНИЕ)	00
	80
3.1.1 Определение клеточных РНК-партнеров рисосомного селка eS1	8/
3.1.1.1.1 Предсказание участка связывания в еS1 для клеточных PHK	89
3.1.1.2 Характеризация стабильной клеточной линий, продуцирующей ^{22.5} eS1, и внутриклеточное сшивание РНК с этим белком	90
3.1.1.3 Анализ данных высокопроизводительного секвенирования ДНК-библиотек на основе фрагментов клеточных РНК, сшивающихся с FLAGeS1	92
3.1.1.4 Функциональная роль взаимодействия eS1 с U11 мяРНК	95
3.1.1.5 Связывание eS1 с U11 мяРНК <i>in vitro</i>	97
3.1.1.6 Химический пробинг структуры U11 мяРНК, связанной с eS1	99
3.1.1.7 Определение участка eS1, контактирующего с U11 мяРНК	102
3.1.2 Взаимодействие рибосомного белка uS19 как компонента декодирующего центра рибосомы с клеточными мPHK	107
3.1.2.1 Проверка способности uS19 сшиваться с аналогами мРНК, несущими остатки s ⁴ U, в кодоне, находящемся в А- или Р-участках	108
3.1.2.2 Характеризация стабильной клеточной линии, продуцирующей ^{FLAG} uS19, и внутриклеточное сшивание РНК с этим белком	111
3.1.2.3 Анализ данных высокопроизводительного секвенирования ДНК-библиотек на основе фрагментов мРНК, сшивающихся с ^{FLAG} uS19	114
3.1.2.4 Последовательности регионов мРНК, сшивающихся с FLAGuS19	116
3.1.3 Влияние снижения уровня рибосомного белка eL29 в клетках HEK293 на профиль их транскриптома	120
3.1.3.1 Ноклаун еL29 в клетках НЕК293	121

3.1.3.2 Анализ данных РНК-сек для клеток НЕК293 с пониженным уровнем eL29 3.1.3.3 Клеточные процессы, ассоциированные с генами, экспрессия которых изменяется при снижении уровня eL29			
3.2 Обсуждение результатов	130		
3.2.1 Роль рибосомного белка eS1 в процессинге U11 пре-мяРНК и функционировании минорной сплайсосомы	131		
3.2.2 Паузирование рибосом в процессе элонгации трансляции и функциональная роль рибосомного белка uS19 в А-участке	134		
3.2.3 Рибосомный белок eL29 как возможный регулятор экспрессии генов	139		
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	143		
ВЫВОДЫ	145		
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	146		
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	165		
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	168		

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- ИПТГ изопропил-β-D-тиогалактопиранозид
- Крио-ЭМ криоэлектронная микроскопия
- мРНК матричная РНК
- мяРНК малая ядерная РНК
- мяРНП малый ядерный рибонуклеопротеин
- НТО нетранслируемая область
- ОТ-ПЦР обратная транскрипция полимеразная цепная реакция (от англ. reverse transcription
- polymerase chain reaction)
- ПААГ полиакриламидный гель
- ПЦР полимеразная цепная реакция
- Рибо-сек рибосомный профайлинг
- рРНК рибосомная РНК
- РСА рентгеноструктурный анализ
- Трис 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол
- тРНК транспортная РНК
- УФ ультрафиолет
- ЦГИ циклогексимид
- ЭДТА этилендиаминтетраацетат, 2-[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил-(карбоксиметил)-
- амино]уксусная кислота
- 40S и 60S малая и большая субчастицы эукариотической рибосомы
- 80S эукариотическая рибосома
- ArgC эндопротеиназа, расщепляющая после остатков Arg
- BzCN бензоилцианид
- CNBr бромциан
- СМСТ 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)-карбодиимид мето-р-толуолсульфонат
- СТD С-концевой домен (от англ. C-terminal domain)
- DEGs дифференциально экспрессируемые гены (от англ. differentially expressed genes)
- DMEM модифицированная по способу Дульбекко среда Игла (от англ. Dulbecco's Modified
- Eagle Medium)
- DOX доксициклин
- FBS сыворотка эмбриональная бычья (от англ. Fetal bovine serum)
- DTT дитиотреитол
- EBV вирус Эпштейна-Барр

EBER1 – РНК 1, кодируемая EBV

FLAG – эпитоп для иммунопреципитации

GAIT – комклекс, ингибирующий трансляцию мРНК церулоплазмина, активируемый

интерфероном-гамма, (от англ. IFNγ-activated inhibitor of translation)

НЕК293 – клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека (от англ. Human Embryonic Kidney 293)

HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

- IRES внутренний участок входа рибосомы (от англ. Internal Ribosome Entry Site)
- IOBz йодозобензойная кислота
- miR микроРНК
- NMD нонсенс-опосредованный распад мРНК (от англ. nonsense mediated decay)
- NTP рибонуклеозид-5'-трифосфат
- dNTP дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфат
- ddNTP дидезоксирибонуклеозид-5'-трифосфат
- ORF открытая рамка считывания (от англ. open reading frame)

PBS – натрий-фосфатный буфер (от англ. phosphate buffered saline)

siRNA (siPHK) – малые интерферирующие PHK

SDS – додецилсульфат натрия

ТР40 – суммарный белок 40S рибосомных субчастиц

введение

Экспрессия генов – это процесс последовательной передачи генетической информации, хранящейся в молекулах ДНК, приводящий к образованию белков или функциональных молекул РНК (рРНК, тРНК, микро РНК и т.д.). Заключительный этап этого процесса, биосинтез белков или трансляция, происходит на рибосомах – одних из самых сложно организованных макромолекулярных машин. Рибосома представляет собой комплекс высокомолекулярных рРНК и нескольких десятков различных рибосомных белков, собранных в две субчастицы – большую и малую. Молекулы рРНК служат каркасом рибосомных субчастиц, с которым связываются рибосомные белки, заряженные преимущественно положительно. В субчастицах рибосомные белки поддерживают специфическую пространственную структуру рРНК и, кроме того, участвуют в формировании функциональных центров рибосомы, где происходит связывание её лигандов – мРНК, тРНК, факторов трансляции и других. Субчастицы рибосом эукариот в дополнение к белкам, консервативным у всех доменов жизни, содержат большой набор эукариот/архей-специфичных белков, а в белках этих субчастиц, гомологичных бактериальным рибосомным белкам, часто встречаются протяжённые районы, специфичные для эукариот и архей. Несмотря на то, что структурные мотивы белков, вовлекаемые в формирование функциональных центров рибосом млекопитающих, хорошо известны (см. [1-3]), их роль в трансляции у большинства рибосомных белков до конца не выяснена. Среди них оказался компонент декодирующего центра 80S рибосомы, расположенный на её малой (40S) субчастице, - универсальный белок uS19 (ранее известный как S15). Показано, что аналоги мРНК, фиксированные в мРНК-связывающем канале 80S рибосом посредством взаимодействия с тРНК в их пептидильном (P) участке, сшиваются с этим белком, когда триплет, несущий остаток фотоактивируемого нуклеотида или его производного, находится в аминоацильном (А) участке (см. [4-6]). В экспериментах с перфторарилазидо-содержащими аналогами мРНК установлено, что эукариот/архей-специфичный фрагмент в положении 131-145 рибосомного белка uS19, входящий в состав его неструктурированного С-концевого хвоста, участвует в этом центре рибосом взаимодействии [7]. Присутствие этого хвоста в декодирующем млекопитающих лишь сравнительно недавно подтверждено с помощью крио-электронной микроскопии (крио-ЭМ) высокого разрешения при исследовании их комплексов с мРНК и тРНК [8]. Сделано предположение, что uS19 взаимодействует с антикодоновыми шпильками тРНК в А- и Р- участках рибосомы, стабилизируя тем самым связывание тРНК в этих участках. Тем не менее, вопрос о роли C-хвоста uS19 в реальной белоксинтезирующей системе оставался открытым.

К настоящему времени накоплено большое количество данных о том, что, помимо участия в работе трансляционного аппарата в качестве его компонентов, рибосомные белки вовлекаются в различные клеточные процессы, в том числе те, что ассоциированы с канцерогенезом, где они функционируют вне рибосомы, выполняя так называемые внерибосомные функции [9-13]. Будучи способными к связыванию с РНК, рибосомные белки оказываются причастными к регуляции разных уровней экспрессии генов, включая транскрипцию, процессинг пре-мРНК и трансляцию [14]. Некоторые из них принимают участие в регуляции экспрессии своих собственных генов по принципу обратной связи, тогда как другие – в регуляции трансляции специфических мРНК. Однако большинство рибосомных белков в этом плане остались практически не изученными. Например, эукариот-специфичный рибосомный белок eS1 (ранее классифицируемый как S3A) вовлекается в формирование участка связывания IRES-элемента вируса гепатита С на 40S субчастице [15-17] и в её связывание с фактором инициации трансляции eIF3 [18]. Кроме этого, eS1 замечен как участник ряда процессов, не относящихся к трансляции, в которых он функционирует вне рибосомы. Показано, что этот белок способен связываться с PARP [19] и транскрипционным фактором СНОР, ответственным за дифференцировку клеток эритроидного ряда [20]. Связывание eS1 с РАПР способствует тому, что регулятор апоптоза Bcl-2 ингибирует активность PARP, предотвращая апоптоз [19], тогда как связывание eS1 с СНОР приводит к ингибированию активности последнего, тем самым препятствуя дифференцировке клеток под действием эритропоэтина [20]. 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 гепарингепаран связывающий белок, поскольку он впервые обнаружен на поверхности эпителиальных клеток, где он с высокой аффинностью связывался с гепарин/гепаран-сульфат протеогликаном [21-25]. Отмечают причастность eL29 к различным клеточным процессам, таким как межклеточные взаимодействия, адгезия, пролиферация и дифференцировка [26-32]. Кроме того, мыши, нокаутные по гену, кодирующему eL29, хотя и оставались жизнеспособными, имели меньший вес, повышенную ломкость костей и ряд других дефектов [23, 33]. Однако клеточные партнёры eL29 и механизмы, посредством которых выключение гена этого белка приводило к подобным дефектам, остались не установленными.

Развитие технологий высокопроизводительного секвенирования РНК в сочетании с их удешевлением привело к появлению ряда мощных инструментов, которые дают возможность изучать РНК-белковые взаимодействия в живых клетках на полногеномном уровне. К ним относятся HITS-CLIP (от англ. High-throughput sequencing of RNA isolated by cross-linking immunoprecipitation) [34] и его модификации, такие как iCLIP (от англ. Individual-nucleotide resolution UV cross-linking and immunoprecipitation) [35] и PAR-CLIP [36] (от англ. photoactivatable ribonucleoside-enhanced cross-linking and immunoprecipitation). Примечательно, что iCLIP и PAR-CLIP позволяют определять, помимо набора PHK, сшивающихся с целевым белком, участки сшивки в PHK с нуклеотидным разрешением. Эти методы успешно примечены для идентификации PHK-мишеней ряда PHK-связывающих белков: AGO, PUM2, QKI, hnRNP C и других [35, 36]. Однако информации о контактах между изучаемым белком и его PHK-партнерами не всегда достаточно, чтобы понять функциональное назначение соответствующих PHK-белковых взаимодействий. Для получения полного представления о роли этих взаимодействий могут быть дополнительно привлечены другие методы, основанные на высокопроизводительном секвенировании, – метод полногеномного секвенирования PHK (PHK-cek) [37] и рибосомный профайлинг (Рибо-сек) [38]. Эти методы позволяют на полногеномном уровне изучать состояние 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.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы являлось выявление функций рибосомных белков eS1 и uS19 человека, опосредованных их взаимодействиями с PHK 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 PHK-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 PHK, кодируемые генами RNU11 и RNU5A-1 как клеточные партнёры eS1. Установлено, что в клетках eS1 ассоциирован с U11 пре-мяРНК в ядре и цитоплазме и со зрелой U11 мяРНК в составе U11/U12 мяРНП в ядре. Установлено, что неструктурированный лизин-богатый N-концевой участок 9-29 eS1 взаимодействует с Sm-сайтом U11 пре-мяРНК и с апикальной петлей I U5 мяРНК. С помощью РНК-сек продемонстрировано, что дефицит eS1 в клетках приводит к увеличению доли незрелой U11 пре-мяРНК и снижению эффективности вырезания минорных интронов из премРНК, что указывает на вовлечение этого белка в биогенез U11 мяРНК 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/А-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 HEK293 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 с-Мус, 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 НЕК293, индуцибельно продуцирующие FLAG-меченые рибосомные белки eS1 и uS19 человека, пригодны для исследования взаимодействий целевых белков с PHK с помощью метода PAR-CLIP.

• Партнёрами рибосомного белка eS1 в клетках являются PHK, кодируемые генами *RNU11* и *RNU5A-1*, которые связываются с eS1 через U-богатые последовательности, соответствующие району Sm-сайта в U11 мяPHK и апикальной петле I в U5 мяPHK.

• В клетках белок eS1 ассоциирован с U11 пре-мяРНК в ядре и цитоплазме и со зрелой U11 мяРНК в составе U11/U12 мяРНП 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 c 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 с-Мус.

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 2016 Новосибирск; июля г., 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.

ГЛАВА 1. РОЛЬ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Рибосомные белки являются неотъемлемой частью рибосом – клеточных органоидов, ответственных за биосинтез белков. Однако их роль в функционировании клетки не сводится только к пассивному участию в структурной организации рибосом в качестве их компонентов. Сегодня хорошо известно, что рибосомные белки выполняют ряд важнейших функций, как в составе аппарата трансляции, так и находясь в индивидуальном состоянии. Как структурные компоненты рибосом эти белки вовлекаются практически во все этапы трансляции через непосредственное взаимодействие с участниками этого процесса: мРНК, тРНК, факторами трансляции и другими лигандами белоксинтезирующей машины. Они играют важную роль в структурных перестройках рибосом, сопровождающих трансляцию. Вместе с тем к настоящему времени накоплено большое количество данных, свидетельствующих об участии рибосомных белков в клеточных процессах, не сопряженных с трансляцией, где они функционируют, будучи вне рибосом. Оказывается, изолированные рибосомные белки могут участвовать в репарации ДНК, регулировать сплайсинг пре-мРНК, влиять на трансляцию специфических мРНК, участвовать в процессе апоптоза и т.д. Кроме того, в последнее время появляется всё больше доказательств того, что рибосома является не просто макромолекулярной машиной, конститутивно транслирующей все мРНК, а важнейшим звеном в цепи передачи генетической информации, осуществляющим трансляционный контроль экспрессии генов. Во многом такая способность рибосомы определяется её составом, в частности, наличием или отсутствием тех или иных белков, а также присутствием в них пост-трансляционных модификаций.

В обзоре представлены данные, касающиеся функций рибосомных белков млекопитающих в процессе регуляции экспрессии генов на всех его этапах, с кратким рассмотрением тех функций, которые связаны с их участием в процессе трансляции в качестве компонентов белоксинтезирующей машины. Детально рассмотрены функциональные аспекты молекулярных взаимодействий индивидуальных рибосомных белков с различными клеточными компонентами, а также с компонентами клеточных паразитов – вирусов, которые являются потенциальными агентами, участвующими в жизнедеятельности клеток. Особое внимание уделено внерибосомным функциям рибосомных белков, в основе которых лежит их взаимодействие с разными видами РНК (помимо рРНК), в том числе их роли в регуляции экспрессии собственных генов на уровне сплайсинга и трансляции через взаимодействия с собственными пре-мРНК и мРНК.

1.1 Общая характеристика рибосомных белков

1.1.1 Рибосомные белки – конститутивные компоненты аппарата трансляции

В состав цитоплазматических рибосом эукариот входит около 80-ти различных белков [39, 40]. Гены рибосомных белков расположены диспергированно в геноме [41-43] и транскрибируются РНК-полимеразой II [44]. На транскрипцию генов рибосомных белков в активно делящихся клетках приходится до 50% активности РНК-полимеразы II, а сами рибосомные белки составляют до 5 – 10% всех белков эукариотической клетки [41]. Однако экспрессия генов рибосомных белков может сильно варьировать в зависимости от типа клеток, от фазы клеточного цикла и от условий среды [45]. Рибосомные белки в составе рибосомы представлены одной копией. Исключение составляют лишь эукариотические белки Р1 и Р2, входящие в состав рибосомы в виде комплекса P0·(P1)₂·(P2)₂, гомологом этого комплекса у Escherichia coli является комплекс uL10·(bL12)₄ [46]. Являясь РНК-связывающими белками, большинство рибосомных белков имеют высокий положительный заряд и pI>10. Исключение составляют лишь кислые фосфопротеины bL12 у прокариот, а также P0 и P2 у эукариот [46]. В большинстве случаев рибосомные белки не специфичны к определенной последовательности РНК, а узнают вторичную и третичную структуры. Выравнивание аминокислотных последовательностей рибосомных белков с последовательностями известных ДНК- и РНКсвязывающих белков, имеющих канонические домены и мотивы для связывания нуклеиновых кислот, не выявило никакого сходства [47, 48]. Появление трехмерных структур рибосомных белков позволило сравнить их с имеющимися моделями ДНК- и РНК-связывающих белков. В настоящее время в нескольких из рибосомных белков найдены канонические РНКсвязывающие домены: КН-домен, специфический по отношению к одноцепочечным нуклеиновым кислотам, в uS3 [49]; РНК-связывающий домен, подобный гомеодомену ДНКсвязывающих белков, в uL11 [48, 50, 51]; RRM домен в прокариотическом bS6 [48]; OB-fold в прокариотическом bS1 [52, 53] и универсальном для всех доменов жизни uS17 [54, 55]. Аминокислотные последовательности рибосомных белков очень консервативны, но ещё более консервативны их третичные структуры [46, 56], при этом наибольшая степень гомологии прослеживается для рибосомных белков внутри определенных доменов жизни. Например, идентичность аминокислотных последовательностей между рибосомными белками дрожжей и млекопитающих составляет порядка 60%, а степень сходства между рибосомными белками крысы и человека доходит до 90% и более [46, 56].

Идентификация рибосомных белков началась в 1960-е годы, когда не были известны ни аминокислотные последовательности белков, ни их третичная структура. Со временем были

выделены и охарактеризованы рибосомные белки из представителей разных доменов жизни, и, в связи с этим возникла задача их систематизации. Современная номенклатура рибосомных белков описана в [57]. Эта номенклатура используется в данной работе (с единичными случаями, где в скобках приведены названия рибосомных белков согласно старой номенклатуре). Белки малой субчастицы имеют индекс «S» (от англ. small), белки большой субчастицы имеют индекс «L» (от англ. large). Рибосомные белки, имеющие гомологов во всех трёх доменах жизни (бактерии, археи, эукариоты) имеют префикс «u» (от англ. universal). Бактериальные белки, не имеющие гомологов среди эукариот и архей, имеют префикс «b» (от англ. bacterial). Для белков, специфичных только для архей, предлагают использовать префикс «а» (от англ. archaeal), хотя таковые на сегодняшний день не найдены. Наконец, рибосомные белки, не имеющие прокариотических гомологов, имеют в названии префикс «е» (от англ. eukaryotic). Нумерация рибосомных белков основана на расположении белковых пятен на электрофореграмме после разделения суммарного белка рибосомных субчастиц двумерным гель-электрофорезом, где первое направление соответствует разделению белков в слабощелочной среде, а второе – в кислой [46, 56]. Таким образом, наиболее тяжелые и наименее основные рибосомные белки имеют меньший номер, а наиболее легкие и наиболее основные белки – больший. Некоторые рибосомные белки имеют «неноменклатурные» названия: это относится к кислым белкам P0, P1, P2 60S субчастицы и относительно недавно открытому белку RACK1 [58, 59], входящему в состав 40S субчастицы.

В 1970-е годы преобладала точка зрения, что рибосомные белки составляют функционально активную часть рибосомы, тогда как pPHK это лишь каркас, удерживающий белки в наиболее оптимальной для функционирования конформации [46]. Позже, в 1980-е годы, после открытия рибозимов – каталитически активных PHK [60] и благодаря накопившейся к тому времени информация о том, что pPHK напрямую участвует в функционировании рибосомы, например, во взаимодействии с последовательностью Шайна-Дальгарно в мPHK при инициации трансляции у бактерий [61], стало превалировать мнение, что рибосомные белки – это «scaffold» для pPHK. Кристаллические структуры субчастиц рибосом прокариот (а позже, начиная с 2010-х, и эукариот) и разнообразных комплексов рибосом с лигандами, а также множество биохимических исследований подтвердили преобладающую роль pPHK в организации ключевых функциональных центров рибосомы, таких как декодирующий и пептидилтрансферазный. Однако вместе с тем обнаружено, что некоторые белки расположены в функционально-активных участках рибосом, и, наряду с pPHK, принимают участие во всех этапах трансляции [2, 3]. Следовательно, как pPHK, так и рибосомные белки важны для функционирования белоксинтезирующей машины.

1.1.2 Участие рибосомных белков в процессе трансляции в качестве компонентов рибосомы

Поскольку данной теме посвящено множество обзоров (см., например, [2, 3]), в этом разделе приведено лишь краткое описание эукариот-специфичных взаимодействий рибосомных белков, в которые они вовлекаются в качестве компонентов рибосомы, формирующих её функциональные центры, в частности мРНК- и тРНК-связывающие центры. Участие рибосомных белков в организации этих центров впервые установлено с помощью сайтнаправленного сшивания рибосом с аналогами мРНК и тРНК, несущими реакционноспособные группы в заданных положениях, и позже подтверждено с использованием криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) [1-3]. Среди компонентов, формирующих мРНК-связывающий канал 40S субчастицы, обнаружены рибосомные белки eS28, eS26, uS19, uS7, uS5 и uS3 (Рисунок 1А). Эти белки относятся к разным участкам этого канала, находящимся с 5'- и 3'сторон относительно кодона мРНК в рибосомном Р-участке. Одним из участков мРНК-связывающего центра является декодирующий сайт, где кодоны мРНК распознаются антикодонами соответствующих аминоацил-тРНК в рибосомном А-участке. С-концевой пентадекапептидный фрагмент uS19, относящийся к его неструктурированному хвосту, не имеющему гомологичных последовательностей в бактериальных рибосомных белках, участвует в формировании этого сайта (Рисунок 1Б) [7]. Часть мРНК с 5'-стороны от кодона в Р-участке, связывается с регионом 40S субчастицы, в формировании которого принимают участие eS28 и eS26. Эукариотспецифичный мотив 62-YxxPKxYxK-70 белка eS26 непосредственно вовлекается в это связывание [62]. С помощью крио-ЭМ показано, что, наряду с С-хвостом uS19, к декодирующему сайту простирается и N-концевая часть eS30 [63]. Сшивку с этой частью eS30 наблюдали при аффинной модификации рибосом человека аналогом мРНК – производными гептарибонуклеотида с окисленной рибозой на 3'-конце, тогда как сшивка с С-концевой частью напоминала сшивки с белком uS3, которые происходили вне мРНК-связывающего канала (см. выше) [64].

Большая часть данных, касающихся контактов между рибосомными белками и тРНК в эукариотических рибосомах, относится к молекулам тРНК, связанным в Р- и Е-участках. В 40S субчастице только uS9 контактирует с антикодоновой петлёй тРНК в Р-участке посредством своего С-концевого фрагмента [63, 65, 66]. В 60S субчастице с молекулами тРНК взаимодействуют белки uL5, uL16 и eL42 (L36A), [63, 65, 66].



Рисунок 1. Рибосомные белки, которые соседствуют или контактируют с нуклеотидными основаниями мРНК в определенных положениях согласно данным по аффинному сшиванию рибосом с аналогами мРНК [5, 6, 62, 67-71]. (А) Репрезентация данных, касающихся контактов рибосомных белков с мРНК, предложенная в [3]. (Б) Модель взаимодействия эукариот-специфичного С-концевого участка uS19 с мРНК в процессе трансляции, предложенная в [7].

Примечательно, что eL42, контактирующий с 3'-концом тРНК в P-участке, является единственным рибосомным белком, который содержит мотив GGQ, идентичный мотиву факторов терминации трансляции класса 1, ответственному за гидролиз сложноэфирной связи в пептидил-тРНК. На основании данных о том, что аналог тРНК с окисленной 3'-концевой рибозой сшивался с eL42 вблизи этого мотива, сделано предположение о вовлечении этого мотива в гидролиз пептидил-тРНК при транспептидации [64]. Данные, поддерживающие это предположение, недавно получены в дрожжевой системе [72].

1.1.3 Внерибосомные функции рибосомных белков

Помимо функций, связанных с работой системы трансляции, рибосомные белки могут быть участниками клеточных процессов, не имеющих отношение к этой системе. Концепция наличия так называемых «внерибосомных» функций у рибосомных белков берет своё начало с обнаружения в 1974 году того, что репликаза бактериофага $Q\beta$, паразитирующего на клетках *E*. Coli, ответственная за репликацию его РНК, состоит, помимо полипептида, закодированного в его геноме, ещё из 3 полипептидов: EF-Tu и EF-Ts (факторы элонгации трансляции E.coli) и bS1 (белок 30S субчастицы рибосомы E.coli) [73]. С тех пор накопилось множество данных, демонстрирующих участие рибосомных белков в клеточных процессах, не сопряженных с трансляцией. Все эти данные рассмотрены и обобщены в многочисленных обзорах, опубликованных в течение последних десятилетий (см., например, [74-81]). В одном из них предложен ряд критериев, которые позволили бы отличить действительно внерибосомные функции рибосомных белков от их канонических функций в составе рибосом [77]. В частности, для отнесения той или иной функции к внерибосомной должно быть доказано взаимодействие рибосомного белка с клеточными компонентами, особенно с РНК и белками, показано влияние этого взаимодействия на жизнедеятельность клетки и различные клеточные процессы и продемонстрировано, что это взаимодействие происходит вне рибосомы.

1.2 Роль рибосомных белков в репликации и репарации клеточного генома

1.2.1 Опосредованная роль рибосомных белков в репликации клеточного генома

В литературе описаны единичные примеры вовлечения рибосомных белков в процессы, связанные с репликацией клеточного генома. Так, в работе [82] выявлена косвенная роль uS3 в репликации ДНК. Оказалось, что uS3 непосредственно взаимодействует с геликазой RECQL4 (от англ. Human RecQ like helicase 4), являющейся ключевым участником процесса инициации репликации. Установлено, что N-концевой домен RECQL4 (аминокислотные остатки 1-320) и С-концевая часть uS3 (аминокислотные остатки 94-244), в состав которой входит APэндонуклеазный домен, вовлекаются в эти взаимодействия, приводя к ингибированию ATPазной, ДНК-связывающей и геликазной активностей RECQL4. С использованием клеточной линии U2OS показано, что оксидативный стресс и облучение ультрафиолетом усиливают взаимодействие между uS3 и RECQL4. По мнению авторов, uS3 через ингибирование вышеуказанных активностей RECQL4 мог бы играть роль в модулировании репарации ДНК при оксидативном стрессе и облучении ультрафиолетом. Белок uS3 причастен также к процессу митотического деления клеток. Показано, что в процессе митоза, которому всегда предшествует репликация ДНК, uS3 специфически локализуется в веретене деления (митотическом веретене) [83]. Деплеция uS3 приводила к митотическому аресту во время метафазы, а форма веретена деления и характер движения хромосом становились при этом атипичными. Авторы сделали вывод, что uS3 ассоциирован с микротрубочками и что его роль может состоять в регуляции динамики формирования веретена деления в процессе митоза.

Не менее интересным примером является также тот факт, что рибосомный белок eL22 взаимодействует с hRT (от англ. Human telomerase RNA) – PHK, входящей в состав человеческой теломеразы [84], специализированной обратной транскриптазы, участвующей в поддержании структуры теломер, которые естественным образом укорачиваются при репликации линейных молекул ДНК. Теломераза использует hRT как матрицу при достраивании теломер с помощью обратной транскрипции. Основываясь на данных биохимических исследований, согласно которым масса теломеразы >1000 кДа [85, 86], авторы работы [84] предположили, что теломераза, помимо hRT, включает дополнительные компоненты. С использованием трёхгибридной системы установлено, что этими компонентами являются белки eL22 и hStau, которые взаимодействуют с hRT [84]. Кроме того, показано, что hRT копреципитируется с этими белками и что преципитат проявляет активность, присущую теломеразе. Учитывая, что оба белка могут находиться как в цитоплазме, так и в ядре, авторы выдвинули гипотезу о важной роли eL22 и hStau в процессинге hRT, сборке теломеразы и её локализации в клетке. Однако эта гипотеза до сих пор не подкреплена какими-либо экспериментальными данными.

1.2.2 Роль рибосомных белков в репарации клеточного генома

Примеров участия рибосомных белков в процессе репарации не много, но лучше всего в этом плане изучен uS3 (см, например, [49]). К настоящему времени накоплено большое количество данных, свидетельствующих об участии этого белка в защите генетической информации. Несмотря на то, что это, пожалуй, одна из наиболее всесторонне изученных функций данного белка, точный механизм этой активности пока не выяснен, однако вся плеяда полученных к настоящему моменту данных говорит о том, что этот процесс связан с процессом репарации.

Во-первых, uS3 – это единственный рибосомный белок, в состав которого входит ярко выраженный ДНК/РНК-связывающий КН-домен, обеспечивающий его способность к взаимодействию с одноцепочечными участками РНК и ДНК. Во-вторых, uS3 человека обладает АП-лиазной активностью (обеспечивает только β-элиминацию) и УФ-эндонуклеазной

фосфодиэфирных связей внутри циклобутановых активностью (обеспечивает разрыв пиримидиновых димеров) [87]. Человеческий uS3 способен катализировать реакцию βэлиминации апуриновых/апиримидиновых (АП) сайтов, однако не обладает ДНКгликозилазной активностью и не может проводить реакцию б-элиминиции [88], которая характерна для uS3 дрозофилы. Последний преимущественно взаимодействует с ДНК, облученной УФ светом, и ДНК, содержащей 8-оксогуанин или АП-сайты [88]. Интересно также отметить, что человеческий uS3 способен делать одноцепочечные разрывы в УФ-облученной ДНК, содержащей тимин-гликольные остатки и циклобутановые пиримидиновые димеры без предварительного удаления основания (как эндонуклеаза) [89]. Помимо этого, данный белок взаимодействует с hOGG1 и AП-эндонуклеазой APEX, конкурируя с ними за связывание с субстратом [90, 91], и с человеческой урацил-ДНК-гликозилазой (hUNG), активируя её, что приводит к увеличению частоты диссоциации hUNG с АП-сайта, и в конечном итоге – удалению остатка урацила [92].

Во многих работах участие uS3 в процессе репарации продемонстрировано in vivo. Например, эктопическая экспрессия гена, кодирующего uS3, в клетках НЕК293 повышала их чувствительность К генотоксическому противораковому препарату N.N'.N''триэтиленэтиофосфорамиду [93]. Как полагают авторы, этот эффект мог быть вызван прочным связыванием uS3 с поврежденными участками ДНК, возникающими в результате действия этого препарата, что препятствовало их нормальной репарации. С другой стороны, понижение уровня мРНК uS3 посредством РНК-интерференции приводило к сильному повышению устойчивости клеток к H₂O₂ и метилметансульфонату [93]. Мышиные эмбриональные фибробласты, полученные из трансгенных животных, несущих дополнительные копии гена *RPS3*, были более чувствительны к обработке H₂O₂ [94]. Трансдукция очищенного рекомбинантного uS3 в культуру человеческих фибробластов или кожу мышей повышала их выживаемость после облучения ультрафиолетом [95]. Однако, по мнению авторов, данный эффект мог быть обусловлен возможной УФ-эндонуклеазной активностью этого белка [89] или ингибированием высвобождения провоспалительных цитокинов вследствие его трансдукции [96]. Интересные данные представлены в работе [97], где изучено взаимодействие изолированного рибосомного белка uS3 человека с одно- и двухцепочечными ДНК, несущими АП-сайты. Оказалось, что S3 проявляет значительно более высокую АП-лиазную активность по отношению к одноцепочечным ДНК (оцДНК). Эксперименты, выполненные in vivo с помощью ChIP-Seq, показали, что uS3 преимущественно взаимодействует с ядрышко-ассоциированными доменами хроматина [97], указывая на то, что uS3 может быть участником процесса репарации в ядрышке, как предполагалось ранее [98]. С использованием модельных ДНК-олигомеров, несущих АП-сайт, недавно показано, что АП-лиазная активность uS3 мало зависит от

последовательности ДНК, содержащей АП-сайт, и положения АП-сайта в ней [99]. Эти данные, в общем, подтверждают предположение о том, что uS3 не специфически связывается в участках геномной ДНК, наиболее доступных для связывания белка, которые являются в основном одноцепочечными [97]. Вероятно, благодаря повышенному содержанию АП-сайтов в таких участках, uS3 принимает непосредственное участие в репарации соответствующих поврежденных регионов ДНК. Следует отметить, что *in vitro* uS3 способен взаимодействовать с оцДНК, будучи в составе 40S субчастицы рибосомы [97]. Оказалось, что это свойство uS3 не имеет функционального значения, а лишь отражает его способность взаимодействовать с АПсайтами, которые могут возникать в мРНК, указывая на возможную роль 40S субчастиц в контроле качества мРНК в процессе трансляции [99].

Молекулы ДНК, содержащиеся в клеточных органоидах, также являются частью клеточного генома, поэтому целесообразно упомянуть об участии uS3 в репарации митохондриальной ДНК. Повышение клеточного уровня активных форм кислорода - ROS (от англ. Reactive oxygen species) приводит к тому, что митохондриальная ДНК становится более подверженной повреждениям, что сопровождается накоплением uS3 в митохондриях и значительным снижением уровня этого белка в клетках [100]. Попадание uS3 в митохондрии регулируется его взаимодействиями с белками-шаперонами HSP90, HSP70 и TOM70. Обработка клеток антибиотиком гельданамицином, связывающимся с АТР-карманом HSP90, значительно ослабляет взаимодействие этого шаперона с uS3 и стимулирует накопление последнего в митохондриях. Повышение уровня uS3 в митохондриях приводит к понижению уровня ROS в клетке, а также нивелирует повреждения в митохондриальной ДНК. Как предполагают авторы, когда вследствие повышения клеточного уровня ROS в митохондриальной ДНК накапливаются повреждения, uS3 аккумулируется в митохондриях, где он принимает участие в репарации поврежденной ДНК. Такое поведение белка, по-видимому, обусловлено ослаблением взаимодействия uS3 с HSP90 в цитозоле.

Совсем недавно найден еще один рибосомный белок, участвующий в процессе репарации ДНК, им оказался eL6 (L6 по старой классификации) [101]. С помощью иммунопреципитации установлено, что этот белок напрямую взаимодействует с гистоном H2A. Оказалось, что eL6 участвует в клеточном ответе на повреждения ДНК, так называемом DDR (от англ. DNA damage response), через рекрутирование к сайтам повреждения посредством PARP-опосредованного механизма. Вместе с тем, понижение уровня eL6 в клетках вызывало нарушение взаимодействия между MDC1 (от англ. Mediator of DNA damage checkpoint 1) и γH2AX (от англ. H2A histone family member X). Это, в свою очередь, приводило к накоплению MDC1 в сайтах повреждения ДНК и привлечению E3 убиквитин лигазы RNF168 (о чем судили по уровню убиквитинилирования лизина в положении 15 гистона H2A). Все эти события

препятствовали привлечению других белков, участвующих в репарации, – TP53BP и BRCA1 (Рисунок 2).



Рисунок 2. Возможная модель вовлечения рибосомного белка eL6 в клеточный ответ на повреждения ДНК [101]. При повреждениях ДНК eL6 рекрутируется к сайтам повреждения, способствуя связыванию MDC1 с γH2AX, благодаря которому MDC1 запускает RNF8-RNF168-промотируемое убиквитинилирование и усиливает тем самым привлечение белков системы репарации – 53BP1 и BRCA1 к этим сайтам. Снижение уровня eL6 в клетке приводит к нарушению накопления MDC1 в сайтах повреждения ДНК и, соответственно, всего последующего сигнального каскада.

1.3 Роль рибосомных белков в процессе регуляции транскрипции

В литературе встречается масса примеров участия рибосомных белков в регуляции транскрипции (см. обзоры [74, 75, 77, 78, 81, 102]), но все эти примеры по большей части свойственны рибосомным белкам прокариот, реже низших эукариот. Что касается рибосомных белков млекопитающих, то существует небольшое количество наглядных примеров, когда они вовлечены в регуляцию транскрипции опосредованно через взаимодействие с различными регуляторными белками, являющимися, в частности, факторами транскрипции, например, с-Мус, NF-kB и p53. Именно о них преимущественно пойдёт речь в данном разделе.

1.3.1 Рибосомные белки как регуляторы экспрессии генов, транскрипция которых контролируется онкопротеином с-Мус

Онкопротеин с-Мус является транскрипционным фактором, регулирующим экспрессию множества генов [103] посредством связывания с определенными регуляторными участками ДНК или посредством повышения активности ацетилтрансфераз гистонов. Известно, что с-Мус стимулирует клеточный рост и дифференцировку, участвует в контроле клеточного цикла и апоптоза и, кроме того, регулирует биогенез рибосом, контролируя экспрессию генов рибосомных белков [104]. Гиперпродукция с-Мус и пертурбации в биогенезе рибосом приводят к нарушениям клеточного роста и злокачественной трансформации, поэтому уровень и активность данного белка должны строго регулироваться (Рисунок 3).

Одними из регуляторов активности сигнального пути с-Мус оказались некоторые рибосомные белки, гены которых в свою очередь также являются мишенями с-Мус. Так, в работах [9, 105, 106] установлено, что рибосомный белок uL5 (по старой классификации L11) регулирует с-Мус-опосредованную транскрипцию генов по механизму обратной связи. Транскрипция гена uL5 индуцируется с-Мус, тогда как повышенный уровень uL5 в клетке приводит к ингибированию активности с-Мус и останавливает клеточную пролиферацию. И наоборот, понижение уровня uL5 посредством PHK-интерференции в клетках приводит к возрастанию активности с-Мус. Оказывается, uL5 способен связываться с доменом Myc box II (MB II) с-Мус при локализации этих белков на промоторах генов, транскрипция которых контролируется с-Мус, что приводит к ингибированию связывания ко-активатора TRRAP с этими промоторами (от англ. Transformation/transcription domain-associated protein) и последующего ацетилирования гистона H4, локализованного на них.

Кроме того, uL5 участвует также в с-Мус-опосредованной регуляции транскрипции генов 5S pPHK и тPHK [105], по механизму, сходному с таковым, описанным выше для генов, транскрипцию которых осуществляет PHK-полимераза II. При связывании с с-Мус в районе промоторов генов 5S pPHK и тPHK рибосомный белок uL5 существенно ингибирует рекрутирование TRRAP к соответствующим промоторам. Нокдаун эндогенного uL5 усиливает с-Мус-зависимую транскрипцию указанных генов. В ответ на рибосомный стресс, вызванный, например, обработкой клеток малыми дозами актиномицина D, усиливается связывание uL5 с генами 5S pPHK и тPHK, при этом уровень связывания TRRAP с их промоторами уменьшается обратно-пропорционально уровню связывания uL5 с данными генами.



26

Позитивная обратная связь

Рисунок 3. Схема участия с-Мус в регуляции биогенеза рибосом и трансляции. Зеленые линии обозначают положительную обратную связь, красные – отрицательную. Зеленые стрелки показывают активацию, символ (**1**)– супрессию [9, 106].

В работе [106] обнаружено, что повышение уровня uL5 в клетках не влияет на количество с-Мус, связанного с промоторами генов, транскрипцию которых он контролирует, хотя уровень свободного с-Мус при этом падает. Последнее, как выяснилось позже [107], вызвано тем, что uL5 регулирует уровень мРНК с-Мус через связывание с 3'-НТО его мРНК, в которое также вовлекаются белок аргонавт (Ago2) – центральный компонент комплекса miRISC (от англ. miRNA-induced silencing) и микроРНК miR-24. Направляя последние к 3'-НТО мРНК с-Мус, uL5 тем самым способствует уменьшению уровня мРНК с-Мус в клетках. Действительно, при уменьшении уровня uL5 посредством нокдауна наблюдали повышение уровня и стабильности мРНК с-Мус [107]. Деплеция Ago2 нивелировала эффект uL5опосредованной деградации мРНК с-Мус. Кроме того, отмечено, что обработка клеток агентами, вызывающими рибосомный стресс, актиномицином D или 5-флюороурацилом, приводит к значительному uL5- и Ago2-зависимому уменьшению уровня мРНК с-Мус. Кроме того, показано, что при обработке клеток обоими агентами связывание uL5 с Ago2, miR-24 и мРНК с-Мус усиливается. Такой же эффект на связывание свободного uL5 с мРНК с-Мус оказывала обработка клеток актиномицином D. Все это свидетельствует о важности регуляции мРНК с-Мус с участием uL5 для клеток в состоянии рибосомного стресса.

Известно, что уровень с-Мус в клетке снижается при различных типах стресса, в частности при повреждении ДНК вследствие УФ облучения. В работе [108] показано, что повышение уровня uL5 в клетках стимулирует связывание микроPHK miR-130a с 3'-HTO мPHK с-Мус, приводя тем самым к снижению уровня экспрессии гена с-Мус. Повышение уровня miR-

130a усиливает связывание белка Ago2 с мРНК с-Мус, что сопровождается существенным снижением как уровня самой мРНК, так и уровня белка с-Мус и, в конечном итоге, вызывает остановку пролиферации клеток. Облучение клеток посредством УФ стимулирует связывание uL5 с miR-130a и мРНК с-Мус, а также с белком Ago2. Авторы делают вывод, что в ответ на повреждение ДНК вследствие облучения УФ uL5 способствует усилению связывания miR-130a с комплексом miRISC, направляя загруженный микроРНК комплекс к 3'-НТО мРНК с-Мус и обеспечивая тем самым деградацию последней (Рисунок 4).



Рисунок 4. Схематическая модель miRISC-опосредованной регуляции уровня мРНК с-Мус рибосомным белком uL5 (L11) в ответ на стресс [106-108]. На рисунке рибосомные белки обозначены согласно старой номенклатуре. В нормальных условиях (верхняя панель) рибосомные субчастицы собираются в ядре, затем экспортируются в цитоплазму, где принимают участие в трансляции мРНК, в том числе и мРНК с-Мус. В цитоплазме uL5 обеспечивает рекрутирование miR-24 и miR-130a-содержащего miRISC

комплекса к 3'-НТО мРНК с-Мус, приводя к деградации последней. В условиях рибосомного стресса (нижняя панель), вызванного, например, добавлением актиномицина D, либо при повреждении ДНК путем обработки клеток с помощью УФ uL5, импортированный в ядро, высвобождается в нуклеоплазму, где связывается с онкопротеином с-Мус, нивелируя его способность активировать транскрипцию контролируемых генов.

Как оказалось, в регуляции активности с-Мус принимает участие и рибосомный белок uL18 (L5), действующий кооперативно с uL5 [109]. Эксперименты по иммунопреципитации показали, что uL18 связывается с 3'-HTO мPHK с-Мус, а также с двумя субчастицами комплекса miRISC-TRBP (от англ. HIV-1 TAR RNA-binding protein) и Ago2. Это связывание направляет микроPHK к мPHK с-Мус и, тем самым, приводит к деградации последней. Еще одним рибосомным белком, принимающим участие в регуляции активности с-Мус, является uS11 (S14) [110]. Этот белок, как и uL5, взаимодействовует с с-Мус через его домены MBII (от англ. Myc homology box II) и bHLH-LZ (от англ. helix-loop-helix leucine zipper). Таким образом, связываясь с с-Мус, uS11 препятствует взаимодействию с-Мус вместе с ко-фактором TRRAP с промоторами генов, транскрипция которых контролируется с-Мус, тем самым нивелируя способность последнего активировать транскрипцию этих генов.

Рибосомный белок uL14 (L23) участвует в регуляции функций с-Мус, связанных с апоптозом и клеточной пролиферацией [111, 112]. В работе [111] продемонстрировано, что uL14 выступает в роли негативного регулятора апоптоза, подавляющего активацию транскрипции генов-ингибиторов клеточного цикла, индуцированную с-Мус-ассоциированным белком Miz1, который является негативным регулятором клеточной пролиферации. Авторы выяснили, что uL14 связывается с нуклеофозмином, который, в свою очередь, является важным ко-активатором Miz1, необходимым для запуска ареста клеточного цикла, опосредуемого Miz1, индуцирующим экспрессию генов, кодирующих белки p15^(lnk4b) и p21^(Cip1) – ингибиторы клеточного цикла. Следует отметить, что повышенный уровень мPHK uL14 наблюдали в клетках пациентов с высокорисковым миелодиспластическим синдромом [113]. Помимо этого, у пациентов с данным синдромом выявлена взаимосвязь между повышенным уровнем мPHK uL14 и устойчивостью CD34-позитивных клеток костного мозга к апоптозу [114].

В последующих исследованиях с использованием клеточных линий SKM-1/K562 [114] удалось показать, что деплеция uL14 приводит к снижению выживаемости клеток, активации апоптоза и аресту клеточного цикла в фазе G1-S. Анализ изменения уровней экспрессии генов в клетках с пониженным содержанием uL14 по сравнению с контрольными клетками выявил апрегуляцию гена белка Miz1 и трансактивацию ингибиторов клеточного цикла – p15^(Ink4b) и p21^(Cip1), в то время как уровень экспрессии гена *с-Мус* был снижен.

Принимая во внимание тот факт, что транскрипция гена, кодирующего uL14, апрегулируется транскрипционным фактором с-Мус, а уровень экспрессии гена белка с-Мус коррелирует с содержанием uL14 в клетках, можно предполагать существование так называемой петли положительной обратной связи между этими генами. С другой стороны, повышенный клеточный уровень uL14, по всей видимости, может приводить к Miz1опосредованному снижению экспрессии ингибиторов клеточного цикла – p15^(Ink4b) и p21^(Cip1) и, соответственно, к повышению способности с-Мус промотировать прогрессию клеточного цикла. В этой связи, можно полагать, что данная петля положительной обратной связи является важным механизмом регуляции клеточного цикла. (Рисунок 5).



Рисунок 5. Схематическое представление возможной роли uL14 в регуляции Miz1/с-Мусопосредованной транскрипции генов [112]. На рисунке ген, кодирующий uL14, обозначен как *RPL23*, согласно старой номенклатуре. Повышенный уровень uL14 может приводить к снижению уровня Miz1опосредованной экспрессии генов, кодирующих белки p15^(lnk4b) и p21^(Cip1) – ингибиторы циклинзависимых киназ, что увеличивает активность с-Мус и приводит к продолжению клеточного цикла. С другой стороны, активация с-Мус приводит к повышению уровня экспрессии гена белка uL14, что. в свою очередь, также стимулирует активность с-Мус, т.е. формируется так называемая петля положительной обратной связи.

1.3.2 Рибосомные белки как регуляторы сигнального пути NF-kB

Основным компонентом сигнального пути NF-kB является мультикомпонентный транскрипционный фактор NF-kB (от англ. Nuclear factor kB). Данный фактор транскрипции

контролирует экспрессию генов, участвующих в иммунном ответе и регуляции клеточного цикла и апоптоза (для обзора см. [115, 116]). Сигнальный каскад NF-kB активируется в ответ на различные внешние стимулы, такие как молекулы патогенов, различные цитокины и факторы стресса. Семейство NF-kB представлено белками NF-kB1 (p50), NF-kB2 (p52), RelA (p65), RelB и RelC, которые, формируя различные комбинации димеров, образуют функционально активный NF-kB (Рисунок 6).

В 2007 году обнаружено, что одним из компонентов NF-kB является рибосомный белок uS3 (S3) [117]. Авторы данной работы, используя метод аффинной очистки с последующим масс-спектрометрическим анализом, установили, что uS3 взаимодействует с гомодимерным комплексом p65 и гетеродимерным комплексом p65-p50. В этой же работе [117] показано, что во взаимодействие вовлекаются N-концевой участок (1-111) uS3, содержащий КН-домен, и N-концевой участок (21-186) или так называемый *Rel Homology* домен p65, консервативный у белков семейства NF-kB. Эксперименты по нокдауну uS3 выявили, что понижение уровня uS3 приводит к нарушениям NF-kB-опосредованной транскрипции генов-мишеней p65, однако никак не сказывается на импорте пре-40S-рибосомных субчастиц в цитоплазму и глобальной трансляции. Кроме того, установлено, что стимулы, вызывающие активацию лимфоцитов, способствуют транслокации uS3 в ядро параллельно с p65, приводя к формированию части NF-kB, связывающейся со специфическими регуляторными участками хроматина [117].

Как и другие компоненты иммунной системы, NF-kB может подвергаться воздействию патогенов при их проникновении в клетки. В работе [118] показано, что так называемые T3SSэффекторы secretion продуцируемые (от англ. Type III system), патогенным энтерогеморрагическим штаммом E.coli 0157:H7 (EHES), связываются с uS3 как компонентом NF-kB [117]. Данный штамм бактерий вызывает тяжёлую форму диареи, а также потенциально смертельное заболевание почек – гемолитико-уремический синдром. Для этих заболеваний на текущий момент отсутствует терапия или методы профилактики. Эффекторы T3SS представляют собой систему секреции, которая обеспечивает проникновение бактериальных в эукариотическую клетку, запуская инфекционный белков процесс. В случае вышеупомянутого штамма бактерий секретируются два эффекторных белка – NleH1 и NleH2, серин/треонин являющихся аутофосфорилированными протеин-киназами, которые связываются с uS3 в цитоплазме независимо от их киназной активности. Белок NleH1, но не NleH2, уменьшает количество uS3 в ядре, но не оказывает подобного влияния на другие компоненты NF-kB – p50 и p65. Установлено, что NleH1 ингибирует uS3/NF-kBопосредованную транскрипцию репортерной плазмиды, тогда как NleH2 стимулирует uS3опосредованную транскрипцию. Кроме того, авторам удалось установить, что участок 40-45

белка NleH1 частично ответственен за эффект ингибирования uS3-опосредованной транскрипции.

Как показали последующие исследования, участие uS3 в работе NF-kB регулируется различными факторами. В частности, фосфорилирование uS3 по остатку серина в положении 209 необходимо для транслокации uS3 в ядро в ответ на внешние стимулы [119]. Более того, продемонстрировано, что упомянутый выше эффекторный белок NleH1 ингибирует фосфорилирование этого аминокислотного остатка, нарушая NF-kB-ассоциированные функции uS3. Предполагают, что именно этот механизм способствует колонизации бактерий и приводит к развитию тяжелой диареи. В другой работе [120] показано, что N-концевой фрагмент рб5 (21-186) может связываться с полноразмерным рб5, таким образом, конкурируя с uS3. Известно, что в цитоплазме действительно присутствуют фрагменты рб5, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга пре-мРНК рб5 или специфического расщепления этого белка протеазами при определенных условиях [121, 122]. Следовательно, находясь в цитоплазме, фрагмент 21-186 рб5 может мешать связыванию uS3 с рб5 и, тем самым, тормозить обусловленную внешними стимулами транслокацию uS3 в ядро.

Следует отметить, что активность сигнального каскада NF-kB контролируется белками семейства IkB, являющимися его негативными регуляторами, а также посредством убиквитинилирования компонентов NF-kB в ядре, приводящего к остановке работы данного каскада [123] (Рисунок 6). В покоящихся клетках НЕК293, uS3 напрямую взаимодействует с одним из представителей IkB, а именно с IkBα (от англ. nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha), цитоплазматическим белком, который маскирует сигналы ядерной локализации белков семейства NF-kB, препятствуя их попаданию в ядро и выполнению свойственных им функций [124]. Отмечено, что эффективная ко-преципитация р65 с uS3 происходит только в присутствии IkBa, что дало основания полагать, что IkBa может служить неким мостом, обеспечивающим взаимодействие данных белков [124]. Эксперименты *in vitro* с использованием рекомбинантных белков uS3, IkBa и p65 также подтвердили, что uS3 способен образовывать прочные комплексы с ІкВа, тогда как его взаимодействия с р65 оказались слабыми. Кроме того, IkBα стимулировал образование комплекса p65 с uS3 [124]. Авторы данной работы делают заключение о том, что IkBa способствует депонированию в цитоплазме как p65, так и uS3. В чем биологический смысл данной функции? Белок uS3 в первую очередь является рибосомным белком, участвующим в процессе биогенеза рибосом, и для этого он импортируется из цитоплазмы в ядро, где включается в состав созревающих 40S субчастиц. Помимо этого, uS3 обладает рядом внерибосомных функций, которые он осуществляет в ядре. Соответственно, эти процессы являются конкурентными по отношению к процессу вовлечения uS3 в состав NF-kB. Следовательно, IkBa обеспечивает наличие

дополнительного пула uS3 в цитоплазме, который может быть высвобожден в случае влияния на клетку стимулов, активирующих NF-kB сигнальный путь (Рисунок 6).



Рисунок 6. Регуляция сигнального пути NF-kB [115]. После того как NF-kB попадает в ядро, его транскрипционная активность подчинена строгой регуляции со стороны множества факторов, в том числе и за счёт uS3, находящегося в комплексе NF-kB. На рисунке представлены два возможных пути деактивации NF-kB (показаны красным): (I) IkB-обусловленный возврат NF-kB в цитоплазму и (II) убиквитин-опосредованная деградация в ядре.

Следует отметить, что uS3 не единственный рибосомный белок, участвующий во взаимодействии с NF-kB. Например, повышение уровня eS1 (S3a) в клетках гепатоцеллюлярной карциномы, ассоциированной с вирусом гепатита В, приводило к усилению сигналинга NF-kB, индуцированного вирусным белком X (HBx), играющим важную роль в прогрессировании гепатоцеллюлярной карциномы. Показано, что этот эффект вызван взаимодействием HBx с eS1 [125]. Оказалось, что повышенный уровень eS1 способствовал большей растворимости склонного к агрегации HBx. Следовательно, можно полагать, что eS1 выступал в качестве шаперона по отношению к HBx. Исследования с использованием мутантных форм eS1 показали, что за это свойство ответственен N-концевой участок 1-50. В литературе встречаются

также упоминания о рибосомном белке eS27 (S27) как важном регуляторе активности сигнального пути NF-kB [126]. С помощью микроэррей анализа показано, что нокдаун eS27 приводит к снижению активности NF-kB, что обусловлено снижением эффективности фосфорилирования p65 и IkBα по положениям Ser536 и Ser32 соответственно. В отсутствие данных модификаций эти белки оказываются неспособными транслоцироваться в ядро и связываться с ДНК.

1.3.3 Рибосомные белки как регуляторы сигнального пути MDM2-p53

На сегодняшний день роль рибосомных белков в регуляции клеточного сигнального пути MDM2-p53 является наиболее широко освещенной. Данной тематике посвящено множество публикаций, в том числе ряд крупных обзоров (см., например, [80, 127-132]), поэтому казалось целесообразным привести в данной части обзора лишь основные концепции и устоявшиеся взгляды, касающиеся роли рибосомных белков в регуляции данного каскада.

Белок р53 является онкосупрессором. В клетках различных опухолей частота мутаций в гене ТР53, кодирующем этот белок, достигает 50% [133]. Эти мутации влияют на функциональную активность p53. Помимо этого, сигнальный путь p53 в раковых клетках может быть инактивирован и посредством ряда других механизмов. В частности, повышенный уровень MDM2 – основной ЕЗ-убиквитин лигазы приводит к усилению убиквитинилирования p53 и его последующей деградации 26S протеасомой [134]. Белок p53 является транскрипционным фактором, регулирующим клеточный цикл. В нормальных условиях содержание р53 в клетках поддерживается на очень низком уровне, что связано с работой вышеупомянутой ЕЗ убиквитин-лигазы MDM2 [135, 136]. Последняя может ингибировать транскрипционную активность р53 через непосредственное связывание с ним [137]. Следует также отметить, что экспрессия MDM2 контролируется p53 посредством механизма негативной обратной связи [138]. Активация же p53 в норме происходит в ответ на различные стимулы, которые могут приводить к повреждениям ДНК в клетках и делать их потенциально опасными для популяции остальных делящихся клеток. Соответственно, основной функцией р53 является элиминация клеток, которые потенциально могут стать онкогенными ввиду, например, нерепарабельных повреждений ДНК. Активация р53 в определенных ситуациях может привести к остановке клеточного цикла, чтобы дать возможность клетке нивелировать эффект стресса, либо же к запуску апоптоза, когда повреждения, вызванные стрессом, невозможно исправить. Поскольку р53 отводится столь серьезная роль в жизненно важном цикле клетки, активность сигнального пути MDM2-p53 находится под строгим контролем и регулируется

множеством различных факторов [139]. Одними из таких факторов как раз и являются рибосомные белки.

В отличие от регуляции с-Мус и NF-kB, где замечены лишь единичные рибосомные белки, в контроле активности p53 участвует целая плеяда рибосомных белков (см. обзоры, цитированные выше). На момент написания данного обзора в группу рибосомных белков, участвующих в регуляции MDM2-p53, входили uS3 [140], eS7 [141], uS11 [142], uS19 [143], uS10 [143], eS25 [144], eS26 [145], eS31 [146], eS27L [147, 148], uL4 [149], uL18 [150-152], eL6 [153], uL5 [154-156], uL14 [157, 158], uL24 [159] и eL37 [143], и скорее всего, этот список будет расширяться.

Рибосомные белки могут регулировать активность p53 несколькими основными путями (Рисунок 7). Один из них – это супрессия убиквитин-лигазной активности MDM2 по отношению к p53, которая предотвращает протеасомно-опосредованную деградацию последнего. Второй путь – усиление трансляции мРНК p53 (данный пример будет детально рассмотрен в главе 1.5.6, посвященной регуляции трансляции специфических мРНК рибосомными белками) [160]. Наконец, третий путь – рибосомные белки могут стимулировать контролируемую p53 экспрессию генов, кодирующих белки, обеспечивающие арест клеточного цикла и запуск апоптоза [131].



Рисунок 7. Пути регуляции активности p53 рибосомными белками [131]. При ядрышковом стрессе, который может возникать вследствие повреждений ДНК, мутаций в генах рибосомных белков, недостатка питательных веществ, воздействия химических агентов, активации онкогенеза, белки 60S и 40S рибосомных субчастиц (RPL и RPS соответственно) могут высвобождаться из ядрышка и активировать p53 посредством нижеперечисленных механизмов. (I) Рибосомные белки могут

связываться с MDM2, ингибируя её E3-убиквитин-лигазную активность, что в конечном итоге приводит к накоплению в клетках p53. (II) Рибосомный белок uL24 может связываться с 5'-HTO мPHK p53, стимулируя её трансляцию. (III) Рибосомный белок uL5 может рекрутировать ко-активаторы p53 – p300/CBP, которые способствуют активированию p53 посредством его ацетилирования по остатку лизина в положении 382. Активированный таким образом p53 участвует в трансактивации подконтрольных ему генов, чьи продукты запускают арест клеточного цикла и апоптоз, препятствуя тем самым онкогенной трансформации клеток. Названия рибосомных белков приведены согласно старой номенклатуре.

Следует также упомянуть, что в работе [131] предложено классифицировать рибосомные белки, участвующие в регуляции активности p53, в зависимости от характера их взаимодействия с MDM2 и p53 и способа активации последнего (см. Таблицу 1).

Таблица 1. Классификация рибосомных белков, участвующих в регуляции сигнального пути MDM2p53, предложенная в [131].

Характер взаимодействия рибосомных белков с MDM2 и р53	Рибосомные белки	Как происходит взаимодействие
«Прямые эффекторы»	uL18, uL5	Рибосомные белки напрямую связываются с MDM2 и необходимы для активации p53; нокдаун одного из этих белков приводит к тому, что p53 не активируется в условиях рибосомного стресса
«Непрямые активаторы»	eS6, uS4, eS19, uS12, eL8, eL24, eL29, eL30, eL37	Рибосомные белки не связываются напрямую с MDM2 и не ингибируют её E3 убиквитин- лигазной активности, а способствуют связыванию MDM2 с uL18 и uL5
«Прямые субстраты»	eS7, eS31, eS27L, uL24	Рибосомные белки напрямую связываются с MDM2 и являются субстратами для MDM2- опосредованного убиквитинилирования и последующей деградации.
«Прямые гены-мишени p53»	eS31, eS27L, eS27, eS25	Гены этой группы рибосомных белков являются мишенями для p53. Экспрессия генов, кодирующих eS27 и eS25, транскрипционно супрессируется p53, тогда как экспрессия генов eS31 и eS27L транскрипционно активируется.

Возникает логичный вопрос – зачем для регуляции системы MDM2-p53 требуется участие такого большого количества рибосомных белков? Интересно также, насколько критична их роль в регуляции данного сигнального пути? В ряде работ предпринята попытка систематизации накопленных данных по взаимодействию рибосомных белков с MDM2-p53. В работе [161] детально проанализировано влияние четырех белков: eS7, uL18, uL5 и uL14 на активность p53. Оказалось, что ни uL18, ни uL5 поодиночке не могут супрессировать MDM2 и активировать p53, т.е. их работа взаимосвязана. Более того, продемонстрировано, что активация p53 в ответ на деплецию eS7 или uL14 обусловлена uL18 и uL5, поскольку понижение уровня одного из них приводило к нивелированию эффекта активация р53. Понижение уровней других рибосомных белков не влияло на активацию p53, вызванную деплецией eS7 или uL14, что является доказательством специфичности данного эффекта по отношению к uL18 и uL5. Центральная роль этих белков в активации р53 подтверждена в [162], где продемонстрировано также, что uL18 и uL5 регулируют уровень p53 совместно с 5S pPHK. В частности, установлено, нарушении биогенеза рибосом трёхкомпонентный что при формируется рибонуклеопротеидный комплекс, состоящий из 5S pPHK, uL18 и uL5. В нормальных условиях uL18 и 5S pPHK существуют в виде комплекса в ядре, тогда как uL5 присутствует и в цитоплазме, и в ядре как отдельный компонент. При обработке клеток актиномицином D, приводящим к остановке синтеза рибосом, uL5 перелоцируется из цитоплазмы в ядро, где происходит его ассоциация с комплексом uL18.5S pPHK. Именно такой тройной РНП осуществляет контроль уровня p53, связываясь с MDM2. В другой работе [163], посвященной исследованию роли вышеописанного тримерного 5S РНП, показано, что этот комплекс участвует также в индукции активности р53 при репликативном и онкогенном стрессе, приводя к клеточному старению.

В 2016 году вышла в свет работа [129], где авторы провели анализ влияния деплеции каждого из 80 рибосомных белков человека на процессинг пре-pPHK, структуру ядрышка и уровень p53. Согласно данным этой работы деплеция большинства рибосомных белков (50 из 80) не оказывала влияния на структуру ядрышка, но приводила к увеличению уровня p53. Для 8 рибосомных белков обнаружено, что понижение их содержания в клетках влияет либо на уровень p53, либо на структуру ядрышка. Среди всех этих белков выделены два – uL5 и uL18, поскольку их деплеция значительно нарушала структуру ядрышка и не приводила к повышению уровня p53. Более того, деплеция любого другого рибосомного белка одновременно с uL5 или uL18 не влияла на уровень p53. Эти данные свидетельствуют о том, что влияние рибосомных белков на гомеостаз p53 происходит опосредованно через uL5 и uL18, что находится в соответствии с классификацией, предложенной в [131]. Однако ни в одной из вышеупомянутых работ не показана способность uL5 и uL18 напрямую связываться с p53.

Интересно отметить, что uL5 и uL18 могут усиливать и активность гомолога p53 – белка TAp73, но по механизму, отличному от того, посредством которого они регулируют активность p53 [152]. Эти белки связываются с трансактивационным доменом TAp73 независимо от MDM2 в ответ на рибосомный стресс. Это связывание делает TAp73 неспособным к ассоциации с
MDM2 на промоторах генов, контролируемых TAp73. Более того, повышение уровня uL5 и uL18 приводит к значительному повышению транскрипционной активности TAp73 посредством супрессии активности MDM2.

Некоторые рибосомные белки, например uL4, стимулируют образование комплекса MDM2 с uL5 и uL18, тогда как другие белки, например eS7, eS27L, uL24 и eS26, являются как регуляторами, так и субстратами MDM2 [149]. Кроме того, ряд рибосомных белков участвует в регуляции p53-MDM2 по принципу обратной связи. На сегодняшний день, известно, что экспрессия генов, кодирующих eS25, eS27 и S27L, контролируется p53 на этапе транскрипции – p53 напрямую взаимодействует с промоторами этих генов и снижает эффективность их транскрипции [144, 147, 148]. Более того, деградация eS27L обеспечивается MDM2, т.е. фактически eS27L конкурирует с p53 за связывание с RING-доменом MDM2.

Совсем недавно показано, что в регуляцию каскада p53-MDM2 вовлекается также eS26 [145]. Как и многие другие рибосомные белки, eS26 стабилизирует p53 через uL5опосредованный механизм. Кроме того, eS26 способен связываться с MDM2 и ингибировать его активность по отношению к p53. Было обнаружено, что снижение уровня eS26 приводит к снижению способности p53 активировать транскрипцию контролируемых генов в ответ на повреждение ДНК, но данный эффект не связан со снижением стабильности p53. Более того, в этих условиях снижается эффектиность рекрутинга p53 к промоторам его таргентных генов вместе с уровнем ацетилирования p53. Оказалось, что eS26 способен напрямую контактировать с p53 независимо от MDM2 и существовать в комплексе с p53 и p300 [145].

Существуют и более экзотические примеры uL5/uL18-опосредованной регуляции сигнального пути MDM2-p53. Так, было показано что PICT1 (также известный как GLTSCR2) регулирует MDM2-p53 и рост опухолей опосредованно через uL5 [164]. PICT1 является ядерным белком, необходимым для эмбриогенеза и выживания эмбриональных стволовых клеток. Даже при отсутствии повреждений ДНК, потеря PICT1 приводит к p53-зависимому аресту клеточного цикла в фазе G1 и апоптозу. В клетках, дефицитных по PICT1, накапливается p53, что связано с нарушениями в работе MDM2. Установлено, что PICT1 связывается с uL5, а при недостатке PICT1 uL5 высвобождается из ядрышек и связывается с MDM2, нарушая его убиквитин-лигазную активность, что в конечном итоге приводит к накоплению p53. Ещё один интересный пример связан с онкопротеином SRSF1, являющимся фактором сплайсинга, который также участвует в регуляции активности p53 опосредованно через взаимодействия с uL18 [151]. Кроме того, выяснилось, что данное взаимодействие приводит к клеточному старению.

Помимо участия в сигнальных путях с-Мус, NF-kB и MDM2-p53, в единичных случаях встречаются упоминания о взаимодействии рибосомных белков с другими белками, принимающими непосредственное участие в регуляции транскрипции. Так, рибосомный белок uL5, уже неоднократно замеченный как участник множества процессов, не связанных с трансляцией, оказался способным связываться с РРАR α (от англ. Peroxisome proliferatoractivated receptor alpha-peцептор, активируемый пероксисомными пролифераторами, альфа) [165]. РРАR α – это представитель суперсемейства ядерных рецепторов, функционирующих в качестве факторов транскрипции. Он играет важную роль в процессе дифференцировки клеток, развития и обмена веществ. Связывание РРАR α с uL5 подтверждено в двугибридных системах млекопитающих и дрожжей. Во взаимодействие с uL5 вовлекается так называемый D-домен РРАR α , однако близкородственные изоформы РРАR α – РРАR β и РРАR γ не способны к этому взаимодействию, что указывает на высокую специфичность связывания РРАR α с uL5. Установлено, что оверэкспрессия гена белка uL5 приводит к снижению транскрипционной активности РРАR α . Это объясняется тем, что связывание uL5 с РРАR α снижает способность последнего взаимодействовать с РРRЕ-последовательностями (от англ. РРАR-гевропse element) в ДНК и активировать транскрипцию генов, содержащих эти элементы.

Еще одним белком, для которого свойственно взаимодействие с факторами транскрипции, оказался eS1. В работе [20] при поиске клеточных партнеров фактора транскрипции CHOP (GADD153) с использованием двугибридной системы, авторы обнаружили, что он взаимодействует с eS1. Эксперименты по связыванию *in vitro* также подтвердили наличие взаимодействий между CHOP и eS1. Повышение уровня eS1 в клетках лейкоза Раушера, обработанных эритропоэтином или диметилсульфоксидом, ингибировало их дифференцировку, но этот эффект частично нивелировался, если в клетках одновременно оверэксперссировался ген, кодирующий CHOP. В данной работе авторы делают заключение, что eS1, взаимодействуя с транскрипционным фактором CHOP, может играть важную роль в процессе эритропоэза.

1.4 Роль рибосомных белков в процессинге РНК

Принимая во внимание тот факт, что рибосомные белки имеют высокий положительный заряд, обусловленный наличием в их составе большого числа заряженных аминокислотных остатков, и присутствуют в ядре и цитоплазме, можно ожидать, что в клетках они взаимодействуют с разными РНК, помимо рРНК. Действительно, ряд рибосомных белков принимают участие в процессинге пре-мРНК, специфически связываясь с определенными последовательностями [14, 75, 77]. Многие из рибосомных белков регулируют сплайсинг собственных пре-мРНК, участвуя тем самым в контроле биогенеза рибосом; некоторые из них взаимодействуют с пре-мРНК факторов транскрипции, которые управляют экспрессией целой

плеяды генов [166, 167]. Множество таких примеров известно для рибосомных белков бактерий и низших эукариот [76, 81], и лишь несколько – для рибосомных белков млекопитающих (возможно, их функции в процессинге РНК остались не изученными). Именно о них пойдёт речь в данной части обзора.

Первым человеческим рибосомным белком, для которого показана возможная роль в регуляции экспрессии собственного гена на уровне сплайсинга, является eS26 [168-171]. В работе [168] с использованием РНК-фрагментов, транскрибированных с разных участков гена eS26, и суммарного белка 40S субчастиц рибосом человека выявлено, что eS26 и в меньшей степени uS12, связываются с первым интроном пре-мРНК eS26. В последующей работе [169] с помощью метода фильтрования на нитроцеллюлозных фильтрах были определены величины кажущихся констант ассоциации (Ка) eS26 с фрагментом собственной пре-мPHK ($\sim 5.0 \times 10^7 M^{-1}$), соответствующим первому интрону, и фрагментом мРНК (~2.0×10⁷M⁻¹), которые оказались одного порядка. О специфичности связывания свидетельствовал тот факт, что другой рекомбинантный белок, eS19, связывался с первым интроном пре-мPHK eS26 с Ка на порядок ниже, чем у eS26, а с мРНК eS26 практически не связывался. Методом иммунопреципитации с использованием антител, специфичных к eS26, продемонстрировано, что эндогенный eS26 в составе ядерного экстракта клеток HeLa способен связываться с первым интроном своей премРНК и в меньше степени с фрагментом своей мРНК. В присутствии рекомбинантного eS26 количество связавшихся фрагментов пре-мРНК и мРНК значительно увеличивалось. Сплайсинг фрагмента пре-мРНК eS26, содержащего первый экзон, первый интрон, второй экзон и часть второго интрона, в ядерном экстракте клеток HeLa приводил к образованию двух продуктов: один соответствовал фрагменту зрелой мРНК eS26, а другой – 19-ти 3'-концевым нуклеотидам первого интрона [170, 171]. При добавлении в экстракт рекомбинантного eS26 происходило ингибирование образования обоих продуктов. Оказалось, что eS26, будучи связанным с вышеупомянутым фрагментом своей пре-мРНК, экранировал нуклеотидные остатки, расположенные в регионе З'-сайтов классического и альтернативного сплайсинга первого интрона. Всё вышеизложенное позволило авторам этого цикла работ прийти к заключению, что eS26 может регулировать экспрессию собственного гена на уровне сплайсинга пре-мРНК по механизму обратной связи. Согласно этому механизму, появление в клетке избытка eS26 приводит к его связыванию с собственной пре-мРНК, ингибированию её сплайсинга и, соответственно, снижению уровня зрелой мРНК eS26, что в конечном итоге способствует нормализации баланса eS26. Следует отметить, что совсем недавно получены данные о возможном существовании дополнительного механизма регуляции уровня eS26 в клетке [172]. Оказалось, что ко-экспрессия минигена eS26, меченого FLAG-эпитопом по С-концу, в клетках HEK293 приводит к уменьшению уровня эндогенного белка, при этом уровень

соответствующей эндогенной мРНК остаётся неизменным [172]. Как полагают авторы, это может быть объяснено способностью eS26 ингибировать трансляцию собственной мРНК по механизму обратной связи, подобному описанному ранее для рибосомных белков uL30 [173] и uS3 [174] (подробно см. в разделе 1.5.5), учитывая ранее выявленную возможность связывания eS26 со своей мРНК [168]

Аналогичные данные получены *in vitro* с рекомбинантными рибосомными белками человека, uS9 (S16) и uS15 (S13), которые также специфично связывались с фрагментами собственной пре-мPHK, содержащими те же структурные элементы, что и вышеупомянутый фрагмент пре-мPHK eS26, что приводило к ингибированию вырезания первого интрона из этих фрагментов [175-177]. Эти данные свидетельствовали о том, что uS9 и uS15, как и eS26, могут вовлекаться в сплайсинг кодирующих их пре-мPHK по принципу обратной связи. Для обоих белков определены нуклеотидные остатки, которые оказывались экранированными от воздействия PHKаз в их комплексах с соответствующими фрагментами пре-мPHK. В частности, uS9 экранировал остатки, расположенные вблизи точки ветвления и 3'-сайта сплайсинга первого интрона [175], а uS15 – остатки вблизи 5'- и 3'-сайтов сплайсинга первого интрона [176, 177]. Таким образом, для всех трех рибосомных белков, для которых выявлена способность ингибировать вырезание первого интрона из фрагментов кодирующих их премPHK, характерно наличие участков связывания в области 3'-сайта сплайсинга первого интрона. Это указывает на сходные черты в механизмах регуляции сплайсинга данных премPHK по принципу обратной связи.

Выравнивание последовательностей первого интрона генов, кодирующих uS15 у человека, мыши и крысы, показало, что первый интрон является эволюционно консервативным у млекопитающих [177], что позволило авторам сделать вывод о важности этого интрона в регуляции экспрессии гена uS15 на стадии сплайсинга. Данный вывод подтвержден результатами экспериментов *in vivo*, которые показали, что если трансфицировать клетки конструкциями, экспрессирующими мини-ген uS15 с первым интроном и без него, с последующим измерением уровня мPHK в клетках, то во втором случае уровень зрелой мPHK оказывается в 4 раза выше [176]. На основании полученных данных авторы предложили возможный путь авторегуляции экспрессии гена, кодирующего uS15, на стадии сплайсинга, согласно которому при избытке в клетке uS15 он связывается со своей пре-мPHK в районе сайтов сплайсинга первого интрона и блокирует вырезание последнего, что в конечном итоге приводит к деградации пре-мPHK (Рисунок 8).

Таким образом, можно думать, что для отдельных групп рибосомных белков существует некий универсальный механизм авторегуляции экспрессии собственных генов на уровне процессинга пре-мРНК. Наличие такого механизма крайне важно для координированной тонкой регуляции экспрессии генов рибосомных белков, которых в клетках млекопитающих насчитывается до 80. В то же время, этот универсальный механизм обеспечивает регуляцию экспрессии генов конкретных рибосомных белков, так как в его основе лежат специфичные взаимодействия белков с последовательностями интронов собственных пре-мРНК, которые также являются уникальными. С другой стороны, прослеживается аналогия данного механизма с регуляцией экспрессии генов рибосомных белков у бактерий [178], сгруппированных в опероны, транскрипция с которых, как правило, регулируется одним из белков, закодированных в них, что необходимо для координированной сборки рибосомных субчастиц, требующей стехиометрических количеств всех участников сборки.



Рисунок 8. Схематическое представление возможных путей авторегуляции экспрессии гена uS15 на стадии сплайсинга [176, 177].

Как оказалось, рибосомные белки участвуют в сплайсинге не только своих пре-мРНК. В одной из работ показано, что eL22 и его высокогомологичный паралог eL22-L1 играют важную роль в эмбриогенезе [167], участвуя в регуляции сплайсинга пре-мРНК, кодирующей smad2, важный транскрипционный эффектор сигнального каскада Nodal/TGF. Оказывается, оба белка работают как антагонисты в одной из фаз эмбриогенеза, а именно гаструляции: eL22 связывается с интронной последовательностью пре-мРНК smad2 и вместе с hnRNP-A1 стимулирует вырезание 9-го экзона, а eL22-L1, наоборот, способствует сохранению этого экзона в составе зрелой мРНК smad2.

Как уже отмечалось, клеточные механизмы ответа на повреждение ДНК очень разнообразны, что обусловлено необходимостью чёткой регуляции данного процесса. Важным координатором клеточного ответа на подобного рода стресс является белок p53, о регуляции активности которого посредством рибосомных белков говорилось ранее. Обнаружено, что uL24 участвует в регуляции экспрессии гена p53 на уровне сплайсинга его пре-мРНК [166]. Показано, что при ионизирующем облучении (IR) клеток снижается активность hSMG1 – белка, являющегося представителем семейства PIKK (от англ. Phosphoinositide-3-kinase-like kinase), что выражалось в снижении способности hSMG1 связываться со специфическим участком пре-мРНК p53 вблизи 9-ого экзона. Помимо этого, воздействие с помощью IR стимулировало связывание пре-мРНК p53 с uL24, который, в свою очередь, необходим для рекрутинга серин/аргинин-богатого фактора сплайсинга, SRSF7, что приводило к образованию альтернативной формы p538 мРНК. Кроме того, было показано, что селективный нокаут p538 с использованием CRISPR/Cas9 или снижение уровня участников данного каскада приводит к снижению уровня IR-опосредованных маркёров клеточного старения, а деплеция p538 – к транскрипционной репрессии негативных регуляторов клеточного старения.

1.5 Роль рибосомных белков в процессе регуляции трансляции

1.5.1 Взаимодействия рибосомных белков, обеспечивающие сборку 60S и 40S субчастиц

Биогенез рибосом – это один из важнейших процессов в жизнедеятельности клетки. У эукариот в нем задействованы всё три РНК-полимеразы, более 200 вспомогательных факторов, десятки малых ядрышковых РНК. Этот процесс требует колоссальных затрат энергии и высокой координации в работе всего комплекса факторов, участвующих в нём. Биогенез рибосом имеет очень сложную регуляцию и сопряжен с такими процессами как клеточная пролиферация, дифференцировка и клеточный рост [179]. Образование рибосом происходит в ядрышке – специальном отделе ядра, где локусы рДНК сгруппированы в несколько сотен тандемных повторов в ядрышковом организаторе (Рисунок 9). Изначально три из четырёх зрелых pPHK (18S, 5.8S и 28S) транскрибируются PHK-полимеразой I в виде предшественника 47S-пре-РНК; четвёртая (5S) рРНК транскрибируется РНК-полимеразой III отдельно [180]. Процессинг пре-рРНК, включающий её разрезание в определенных позициях и химические модификации нуклеотидных остатков, происходит ко-транскрипционно [181]; C/D-box snoRNP H/ACA-box snoRNP соответственно 2'-О-метилирование И отвечают за И псевдоуридинилирование. Вовлечение рибосомных белков в собирающиеся субчастицы происходит также ко-транскрипционно. Для участия в процессе сборки, рибосомные белки,

синтезированные в цитоплазме, должны импортироваться в ядро. Их транспорт в ядро обеспечивается специальными белками импортинами (преимущественно β-кариоферинами), узнающими так называемые сигналы ядерной локализации – NSL (от англ. nuclear localization signals) – специальные аминокислотные последовательности, содержащиеся в рибосомных белках. После попадания в ядро рибосомные белки высвобождаются из комплекса с β-кариоферинами за счёт взаимодействия с Ran-GTP.



Рисунок 9. Обобщенная схема биогенеза рибосом у эукариот [79].

На данный момент детали процесса узнавания β-кариоферинами рибосомных белков и их транспорта в ядро остаются мало изученными. Также описаны особые примеры транспорта рибосомных белков в ядро: например, у дрожжей, белки uL18 и uL5 транспортируются вместе с симпортином Syo1, ассоциированным с β-кариоферином Kap104 [182]. В ядре комплекс Syo1-uL18-uL5 освобождается от Кар104 за счет взаимодействия с Ran-GTP; этот процесс uL18·и **5**S рРНК сопровождается связыванием белков uL5 с формированием И соответствующего рибонуклеопротеида, который взаимодействует с факторами сборки Rpf2 и Rps1, рекрутирующими его в соответствующие прерибосомные субчастицы. Ещё одним примером специфического транспорта рибосомного белка в ядро является белок uL3, который транспортируется белком Rrb1, содержащим WD-повторы [183]. Считается, что Rrb1, связываясь с uL3 в цитоплазме, доставляет его к созревающим пре-60S субчастицам, где последний встраивается в них. Ещё одним специфическим импортером является Yar1,

содержащий анкириновые повторы. Он участвует в переносе белка uS3 и функционирует как молекулярный шаперон, поддерживая uS3 в растворимой форме [184]. Комплекс Yar1•uS3 импортируется в ядро за счёт NLS-сигнала, содержащегося в N-концевом домене uS3. В ядре Yar1 способствует встраиванию uS3 в пре-40S субчастицы.

Для некоторых рибосомных белков показана определенная роль в процессе биогенеза рибосом. Так, например, у дрожжей присутствие uS5 в пре-40S субчастицах абсолютно необходимо для их экспорта из ядра [185]. Деплеция гена этого белка приводит к практически полной остановке синтеза 40S субчастиц. Утрата uS5 приводит к снижению эффективности разрезания пре-pPHK в A₂-сайте: происходит накопление 21S предшественника pPHK и уменьшение количества 27S пре-pPHK. Тем не менее, некоторое количество пре-40S субчастиц всё-таки образуется, однако они остаются в ядрышке. Эти данные позволяют предположить, что присутствие uS5 в пре-40S субчастицах является маркером их пригодности к экспорту в цитоплазму и вовлечению в пул активных рибосом. В работе [186] с использованием малых интерферирующих PHK против мPHK uS19 показано, что понижение уровня uS19 не приводит к нарушениям процессинга пре-pPHK, однако полностью ингибирует процесс экспорта пре-40S субчастиц из ядра.

1.5.2 Рибосомные белки в составе рибосомы как участники регуляции трансляции специфических мРНК

Экспрессия генов подвержена сложному и многоуровневому контролю. Существует множество пост-транскрипционных механизмов, обеспечивающих eë регуляцию. Завершающим этапом экспрессии генов является трансляция, осуществляемая рибосомой. Долгое время считалось, что рибосома является «машиной», которая конститутивно транслирует мРНК, синтезируя функциональные полипептиды, и сама по себе не обеспечивает контроля над тем, какие мРНК и с какой эффективностью должны в данный момент транслироваться. Исследования последних двух десятков лет показали, что это не совсем так. Оказывается, активность рибосом подвержена сложной регуляции. Разная представленность рибосомных белков в клетке, множество их различных пост-трансляционных модификаций и гетерогенность рРНК в разных тканях одного и того же организма обеспечивают возможность синтеза «специализированных рибосом», которые определяют где, когда и каким мРНК транслироваться в функциональный белок. Кроме того, некоторые конститутивные компоненты рибосомы более специализированные функции, обусловленные могут иметь ИХ взаимодействиями с различными специфическими структурами мРНК. Такими структурами могут быть, например, участки внутренней посадки рибосомы, IRES (от англ. Internal Ribosomal

Entry Site), или короткие открытые рамки считывания, uORF (от англ. upstream open reading frame), находящиеся в 5'-нетранслируемой области (НТО) мРНК [79]. В 2002 году предложена так называемая гипотеза «рибосомного фильтра» [187], смысл которой заключается в том, что рибосома сама может осуществлять селективный контроль трансляции. Взаимодействия компонентов рибосомы с регуляторными элементами в мРНК фактически обеспечивают дополнительный уровень контроля экспрессии генов на уровне трансляции. Основные вехи исследований в данном направлений отражены на рисунке 10.



Рисунок 10. Основные открытия, доказывающие роль гетерогенности рибосом в трансляционном контроле, а также ключевые методы, приведшие к этим открытиям [188]. Цвета прямоугольников отражают следующее разделение: зеленый – открытия, связанные с ролью рибосомных белков; оранжевый – открытия, связанные с ролью модификаций в рРНК; голубой – ключевые методы.

Одной из наиболее важных предпосылок существования различных типов рибосом (гетерогенность рибосом) является существование так называемых рибосомопатий – генетических заболеваний, обусловленных гаплонедостаточностью ключевых факторов биогенеза рибосом или рибосомных белков [189, 190]. Например, анемия Даймонда-Блэкфана ассоциирована с гетерозиготными мутациями в генах ряда рибосомных белков, таких как eS19, uL18 и uL5, а так называемый 5q-синдром обусловлен соматической делецией фрагмента 5q хромосомы 5, которая приводит к гаплонедостаточности uS11. Следует отметить, что факт того, что мутации в генах рибосомных белков, приводящие к изменению представленности данных

белков в клетке, обуславливают развитие рибосомопатий, не является строгим доказательством существования гетерогенных рибосом, а лишь указывает на такую возможность.

В 2011 году получено первое свидетельство того, что мутация в гене рибосомного белка, приводящая к тканеспецифичному снижению уровня экспрессии гена данного белка, приводит к изменению трансляции целого набора мРНК [191]. В этой работе показано, что мутации в гене белка eL38 ассоциированы с тканеспецифичными дефектами, в том числе нарушениями в развитии осевого скелета. Оказалось, что в клетках мутантных по eL38 эмбрионов мышей не происходит изменений в глобальном уровне трансляции, но нарушается трансляция мРНК группы Нох генов, контролирующих процессы роста и дифференцировки. Эти гены кодируют транскрипционные факторы, которые синтезируются в разных частях развивающегося эмбриона в определенные промежутки времени его развития и, тем самым, определяют программу развития разных частей организма [192, 193]. Авторы показали, что eL38 способствует формированию 80S комплекса на этих мРНК, что является одним из свидетельств в пользу транскрипт-специфичного контроля трансляции, осуществляемого самой рибосомой. Более того, установлено, что экспрессия гена eL38 в норме повышена в тех частях эмбриона, в развитии которых наблюдали аномалии, при наличии мутаций в гене, кодирующем данный белок. Не выясненными оставались следующие вопросы: каким образом eL38 узнаёт мРНК *Hox* генов, взаимодействует ли он с ними напрямую или опосредовано через другие РНКсвязывающие белки и имеются ли в этих мРНК какие-либо специфичные последовательности или структуры? Ответы на эти вопросы появились в работе [194], где авторы утверждают, что мРНК *Нох* генов в 5'-НТО содержат IRES-подобные структуры, которые обеспечивают эффективную трансляцию этих мРНК. К тому же оказалось, что eL38 необходим для узнавания этих структур. Остался открытым вопрос, зачем клеточным мРНК, которые являются кэпированными, нужны IRES-подобные структуры в 5'-НТО? Можно предположить, что эти структуры могут усиливать трансляцию содержащих их мРНК в условиях стресса, когда кэпзависимая инициация трансляции подавлена. Однако следует отметить, что в вышеописанных работах отсутствуют надлежащие доказательства того, что мРНК Нох генов действительно содержат именно IRES-подобные структуры.

Позднее, в ряде других исследований также обнаружено, что деплеция некоторых рибосомных белков приводит к нарушениям трансляции определенных групп мРНК. Так, в работе [195] проведено сравнение фракций мРНК в полисомах нормальных и eS19деплетированных эритробластов. Оказалось, что при деплеции eS19 изменяется формирование полисом на 130 мРНК, причем, как утверждают авторы данной работы, в ряде этих мРНК содержатся IRES-подобные структуры. В другой работе [196] продемонстрировано, что деплеция eL40 приводит к изменениям содержания мРНК в составе полисом тех генов, которые ассоциированы с клеточным ответом на стресс.

Некоторые рибосомные белки участвуют в контроле трансляция, обеспечивая сигнальную трансдукцию напрямую к рибосоме. Примером такого белка является RACK1 (от англ. Receptor of activated C-kinase), который идентифицирован как рибосомный белок 40S субчастицы относительно недавно [58, 59]. Согласно крио-ЭМ данным [39, 40] RACK1 располагается в голове 40S субчастицы в непосредственной близости от входа в мРНКсвязывающий канал. Известно, что он связывается с протеинкиназами и рецепторами, ассоциированными с мембраной. RACK1 рекрутирует протеинкиназу С к рибосоме, обеспечивая тем самым фосфорилирование фактора инициации трансляции 6 (eIF6). Фосфорилирование eIF6 приводит к его диссоциации от 60S субчастиц, которые далее могут принимать участие в формировании активных рибосом, что в конечном итоге приводит к общей интенсификации трансляции [197]. Таким образом, можно утверждать, что RACK1 является связующим звеном, обеспечивающим сигнальную трансдукцию напрямую к рибосоме в ответ на различные стимулы, воздействующие на клетку. В работе [198] показано, что связывание RACK1 с рибосомами является необходимым для трансляции кэпированных мРНК и привлечения фактора инициации eIF4E. Помимо этого, авторы данной работы установили, что свободный RACK1 влияет на клеточный фенотип, хотя он и менее стабилен, чем когда находится в 40S субчастице. Как оказалось, накопление свободного RACK1 в клетках приводит к нарушению клеточного цикла и репрессии глобальной трансляции. Предполагают, что через связывание с мембранными рецепторами RACK1 может обеспечивать доккинг рибосом в тех районах мембраны эндоплазматической сети, где в данный момент требуется интенсификация трансляции [199].

1.5.3 Рибосомные белки в составе рибосомы как участники контроля качества мРНК и рибосом

Поскольку неправильно синтезированные белки зачастую опасны для клеток и могут приводить к различным дефектам, все белки и кодирующие их мРНК подвергаются так называемому контролю качества. Сущестуют несколько различных механизмов контроля качества мРНК и белков, которые осуществляются на рибосомах в процессе трансляции. Системы контроля качества мРНК включают такие механизмы как NMD (от англ. nonsensemediated decay), NGD (от англ. No-go mediated decay) и NSD (от англ. Non-stop decay), которые обеспечивают обнаружение преждевременных стоп-кодонов, отсутствия естественных стопкодонов и застрявших в процессе трансляции рибосом соответственно и приводят в итоге к деградации мРНК, содержащих такие дефекты (см, например, [200, 201]). Некорректно сложенные полипептидные цепи или укороченные белки деградируют посредством рибосомоассоциированных систем контроля качества [200, 201].

Рибосомные белки также замечены в работе данных систем. Так, совсем недавно открыта функция RACK1, связанная с его участием совместно с убикитин-лигазой ZNF598 в рибосомо-опосредованном контроле качества мРНК, ассоциированном с убиквитинилированием 40S субчастиц [202]. Оказывается, RACK1 и ZNF598 помогают рибосомам, которые застревают при элонгации трансляции на поли-А последовательностях, кодирующих поли-лизины, разрешить данное состояние посредством диссоциации 80S рибосом на субчастицы. При этом ZNF598 связывается с 40S субчастицей в районе её головы, приводя к убиквитинилированию рибосомных белков eS10 (положения K138 и K139) и uS10 (положения K4 и K8), тогда как RACK1, расположенный в этом же районе в непосредственной близости к мишеням ZNF598, регулирует убиквитинилирование uS5, uS3 и uS10 [202].

В контроле качества мРНК в процессе трансляции мог бы быть задействован также и рибосомный белок uS3 [99]. Это предположение основано на способности этого белка сшиваться с АП сайтами в мРНК через экспонированный на поверхности 40S субчастицы пептид 55-64 в его КН-домене, расположенный недалеко от входа в мРНК-связывающий канал [99]. Кроме того, недавно представлены данные о причастности uS3 к ликвидации нефункциональных рибосом [203]. Оказалось, что С-концевой фрагмент uS3 играет центральную роль в так называемом процессе NRD (от англ. non-functional rRNA decay), связанном с элиминацией нефункциональной 18S рРНК с мутациями в участках, формирующих декодирующий центр. Предварительным этапом этого процесса является диссоциация нефункциональных 80S рибосом на 40S и 60S субчастицы. Необходимым условием для диссоциации является последовательное убиквитинилирование 80S рибосом по остатку лизина 212 положении белка uS3. Авторы данной работы В полагают, что именно полиубиквитинилирование uS3 запускает диссоциацию субчастиц с последующей деградацией аберрантной 18S рРНК.

1.5.4 Роль рибосомных белков в трансляционном контроле

Упомянутая выше «гипотеза рибосомного фильтра», согласно которой рибосомы могут осуществлять трансляционный контроль, породила гипотезу специализированной трансляции. Поскольку специализация рибосом имеет прямое отношение к их гетерогенности, обусловленной рядом факторов, в том числе разным белковым составом, можно ожидать, что в различных клетках и тканях уровень экспрессии генов рибосомных белков отличается.

48

Широкое развитие омиксных технологий, сопровождающееся существенным повышением их доступности в области транскриптомики и протеомики, вместе с аккумуляцией результатов исследований с применением этих технологий в общедоступных базах данных, позволили провести глобальный анализ экспрессии генов рибосомных белков в различных клеточных культурах и тканях человека. Результаты такого исследования представлены в [204], где анализируя уровни экспрессии генов рибосомных белков в наборах 28 видов человеческих тканей, 300 первичных культур клеток и 16 типах раковых опухолей, авторы показали, что порядка четверти генов рибосомных белков имеют выраженный тканеспецифичный характер экспрессии. Наиболее сложный характер экспрессии генов рибосомных белков оказался у клеток гемопоэтического ряда. В данной работе, как и в ряде других [10, 11, 205], продемонстрировано, что уровень экспрессии единичных генов рибосомных белков варьирует в различных опухолевых клетках. И это неудивительно, поскольку изменения в клеточных уровнях ряда рибосомных белков, как описано выше, могут приводить к дисрегуляции различных сигнальных каскадов, включая те, что могут играть важную роль в процессе канцерогенеза. Однако остаётся открытым вопрос, являются ли изменения в экспрессии генов рибосомных белков первичными по отношению к злокачественной трансформации клеток или онкогенное состояние клеток определяет паттерн их экспрессии.

Приведённые выше факты являются косвенными доказательствами возможности существования рибосом с разным белковым составом. Прямые же доказательства наличия различных популяций рибосом получены относительно недавно благодаря использованию методов масс-спектрометрии [206, 207]. Анализ белкового состава рибосом, выделенных из мышиных эмбриональных стволовых клеток (далее mESC), находящихся в разных условиях, с помощью метода высокопроизводительной ТМТ масс-спектрометрии (ТМТ, от англ. Tandem mass tag) выявил определённые отличия в стехиометрии рибосомных белков [206]. Кроме того, также продемонстрированы отличия между стехиометриями рибосомных белков из фракций лёгких и тяжёлых полисом. Дальнейшее развитие технологий масс-спектрометрического анализа позволило измерить абсолютную представленность белков в составе рибосом. С применением так называемой технологии SRM (от англ. Selected reaction monitoring), в работе [207] проведен количественный анализ 15-ти рибосомных белков в составе полисом, выделенных из mESC, и установлено, что 4 их них – uL1, eL38, eS7 и eS25 находятся в нестехиометрических количествах. С помощью технологии ТМТ авторы сравнили представленность всего набора рибосомных белков в полисомах и свободных 40S и 60S субчастицах и обнаружили, что eL40, eS26 и uL16 значительно больше представлены во фракции полисом из mESC по сравнению с остальными белками. Кроме того, для рибосом с разной представленностью коровых белков с помощью рибосомного профайлинга выявлены различия в эффективностях трансляции определенных групп мРНК. В частности, с использованием клеточных линий мышиных эмбриональных стволовых клеток, способных продуцировать FLAG-меченые рибосомные белки uL1 и eS25 (FLAG-uL1 и FLAG-eS25 соответственно), авторы сравнили паттерны трансляции рибосом, содержащих эти белки, с общим паттерном трансляции клеток mESC. Оказалось, что рибосомы, содержащие FLAG-uL1, способствовали трансляции мРНК, кодирующих белки внеклеточного матрикса, а рибосомы, содержащие FLAG-eS25, координировали трансляцию мРНК белков, участвующих в сигнальном каскаде витамина B12.

Пост-трансляционные модификации рибосомных белков и пост-транскрипционные модификации нуклеотидов в pPHK обеспечивают дополнительный уровень гетерогенности рибосом [208, 209]. Несмотря на то, что изучение пост-трансляционных модификаций рибосомных белков началось в начале 2000-х [210, 211], этот аспект является ещё недостаточно изученным, и поэтому функциональная роль многих модификаций до сих пор не установлена [208]. Тем не менее, следует сказать, что на текущий момент известно до 2500 различных модификаций рибосомных белков [212]. Для многих из рибосомных белков характерны такие модификации как ацетилирование, метилирование, убиквитинилирование, фосфорилирование, O-GlcN-ацилирование [212]. Христоматийным примером является фосфорилирование eS6, связанное с различными состояниями клеток [213]. В одном из исследований показано, что фосфорилированный eS6 стимулирует трансляцию особого класса мPHK, содержащих 5'-TOP последовательности в ответ на mTOR-сигналинг [213].

Среди модификаций в рРНК рибосом человека встречаются метилирование и ацетилирование, псевдоуридинилирование и 2-О-метилирование [214-216]. Данные модификации участвуют в модулировании трансляционной активности рибосом в различных физиологических и патологических контекстах [214-216], однако полное понимание их функциональной значимости требует дополнительных исследований.

Таким образом, вышеизложенные данные показывают, что состав рибосом может отличаться не только среди различных клеток и тканей, но и в пределах одной клетки и что именно эти отличия обеспечивают селективный контроль трансляции. Однако, несмотря на обширную доказательную базу, для полного понимания всего разнообразия механизмов, лежащих в основе трансляционного контроля, необходимо проведение огромного количества исследований, в рамках которых определяющую роль могут сыграть методы, основанные на высокопроизводительном секвенировании.

1.5.5 Рибосомные белки как регуляторы трансляции собтвенных мРНК

Как упомяналось выше, рибосомные белки участвуют в регуляции экспрессии кодирующих их генов, взаимодействуя со своими собственными пре-мРНК, контролируя таким способом их сплайсинг. Однако это не единственный вариант регуляции по принципу обратной связи – некоторые рибосомные белки способны взаимодействовать со своими мРНК, ингибируя их трансляцию. Так, в работе [173] авторы показали, что рибосомный белок uL30 (L7 по старой номенклатуре) способен связываться со своей собственной мРНК и ингибировать её трансляцию в бесклеточной системе. Кроме того, авторы продемонстрировали, что трансфекция линии Т-клеточной лимфомы с использованием кДНК белка uL30 приводит к ингибированию экспрессии двух генов, кодирующих ядерные белки, которые остались в данной работе неидентифицированными. В другой работе [174] подобный механизм регуляции показан для рибосомного белка uS3. С использованием клеток HEK293T, транзиентно трансфицированных конструкцией, обеспечивающей продукцию FLAG-меченого uS3, авторы показали, что при иммунопреципитации с использованием анти-FLAG антител в преципитированной фракции содержится мРНК uS3. В данной работе установлено, что за связывание uS3 с собственной мРНК в основном отвечают С-концевой домен данного белка независимо от присутствия КН-домена в его N-концевом домене и 3'-НТО мРНК uS3 и что именно свободный uS3 вовлекается в это связывание. Было также отмечено, что экспрессия минигена FLAG-меченого uS3 в клетках НЕК293Т приводит к снижению уровня эндогенного uS3. Аналогичный эффект наблюдали при экспрессии минигена FLAG-меченого eS26 в клетках НЕК293 (см. раздел 1.4) Описанные выше данные позволяют предположить, что ряд рибосомных белков регулируют экспрессию кодирующих их генов на уровне трансляции собственных мРНК.

1.5.6 Рибосомные белки как регуляторы трансляции специфических мРНК

Как говорилось выше, белковый состав рибосомы играет важную роль в определении паттерна транслируемых мРНК, что указывает на важность рибосомных белков в трансляционном контроле. Однако рибосомные белки могут контролировать трансляцию не только находясь в составе рибосомы, но и будучи вне её, что обусловлено их природой: они обладают повышенным положительным зарядом и способны связываться с клеточными РНК. В данном разделе будут рассмотрены примеры участия свободных рибосомных белков в регуляции трансляции специфических мРНК. Одним из таких примеров является вовлечение рибосомного белка uL24 в регуляцию трансляции мРНК вышеупомянутого белка p53 (Рисунок 11). В работе [160] показано, что в клетках, ДНК которых повреждена вследствие УФ облучения, уровень p53 повышается из-за усиления трансляции его мРНК, что обусловлено взаимодействием её 5'-НТО с uL24. Количество p53 в клетке увеличивалось при повышении уровня экспрессии гена uL24, тогда как нокдаун этого гена оказывал обратное действие. Установлено, что повышение уровня uL24 в клетке способствует включению мРНК p53 во фракцию тяжелых полисом, что собственно и приводит к повышению уровня p53 и в конечном итоге к аресту клеточного цикла на стадии G1 и усилению апоптоза УФ-облученных клеток. С 5'-НТО мРНК p53 взаимодействует также нуклеолин, что вызывает ингибирование её трансляции [160]. Оказалось, что 5'-НТО и 3'-НТО мРНК p53 содержат взаимно комплементарные участки, образующие дуплекс, который абсолютно необходим для усиления трансляции этой мРНК через взаимодействие связанной в дуплекс 5'-НТО с uL24 [217].





Замены всего лишь трёх нуклеотидных остатков в одном из комплементарных участков полностью нивелировали способность uL24 связываться с мРНК p53. Одноцепочечные

олигонуклеотиды, комплементарные участкам в 5'-НТО и 3'-НТО мРНК р53, также снижали способность uL24 взаимодействовать с этой мРНК. Обнаружено, что с тем же самым дуплексом связывается и нуклеолин [219]. Домен нуклеолина, ответственный за это связывание, обеспечивает как его димеризацию, так и взаимодействие с uL24. В этой же работе показано, что избыток uL24 нивелирует олигомеризацию нуклеолина, а точечные мутации в домене uL24, участвующем во взаимодействии с нулеолином, приводят не только к нарушению этого взаимодействия, но и лишают его способности связываться с мРНК p53. Эти наблюдения позволили авторам предложить модель регуляции трансляции мРНК p53, где комплементарные взаимодействия между 5'-НТО и 3'-НТО этой мРНК вовлечены как в репрессию, так и в индукцию её трансляции благодаря связыванию образующегося дуплекса либо с нуклеолином, либо с uL24 соответственно (Рисунок 12). Согласно данной модели нарушение димеризации нуклеолина вследствие его взаимодействия с uL24 может служить переключателем между репрессией трансляции мРНК p53 и её активацией в условиях стресса.



Рисунок 12. Модель регуляции трансляции мРНК p53 с участием uL24 (L26 по старой номенклатуре) и нуклеолина [219]. В отсутствие стресса трансляция мРНК p53 находится на низком уровне вследствие связывания гомодимеров нуклеолина с дуплексами, образованными взаимно комплементарными участками в её 5'-НТО и 3'-НТО. В условиях стресса уровень свободного uL24 повышается, и он взаимодействует с нуклеолином, связанным с мРНК p53, приводя к разрушению его гомодимеров и последующей активации трансляции мРНК p53.

Механизм регуляции трансляции мРНК p53 с участием uL24 существенно дополнен в paбoте [220], где обнаружено, что белок Six1 способен повышать уровень микроРНК-27а и понижать уровень белка uL24. Как оказалось, uL24 ингибирует связывание этой микроРНК с 3'-НТО мРНК p53, тем самым препятствуя снижению уровня p53. Сайт посадки микроРНК-27а находится в непосредственной близости от региона 3'-НТО мРНК p53, участвующего в формировании дуплекса с её 5'-НТО, с которой взаимодействует uL24. Исходя из этого, высказано предположение, что микроРНК-27а и uL24 конкурируют за связывание с данным дуплексом (Рисунок 13). Кроме того, авторы выяснили, что в различных опухолевых клетках уровень белка uL24 понижен, что указывает на возможную онкосупрессорную функцию этого белка [220].



Рисунок 13. Модель регуляции трансляции мРНК p53 с участие uL24 и miR-27a [220]. В отсутствии Six1 (панель A) uL24 связывается с 5'-НТО мРНК p53 в составе дуплекса с её 3'-НТО, приводя тем самым к повышению эффективности трансляции данной мРНК. Вновь синтезированная порция p53 запускает транскрипцию генов, ответственных за онкосупрессию. MDM2 обеспечивает убиквитинилирование p53, что приводит к его протеасомо-опосредованной деградации, и, кроме того, ингибированию его транскрипционной активности. Nutlin-3a ингибирует обе активности MDM2 по отношению к p53. В

присутствии Six1 (панель Б) количество uL24, связанного с вышеупомянутым дуплексом, снижается, что позволяет miR-27a, чей уровень в клетке контролируется Six1, связываться с 3'-НТО мРНК p53, приводя к снижению эффективности её трансляции.

Совсем недавно установлено, что uL24 регулирует не только трансляцию мРНК p53, но и мРНК р73 [221, 222]. Белок р73, представитель семейства р53, также является онкосупрессором, и экспрессия его гена контролируется посредством различных механизмов на уровнях транскрипции, процессинга пре-мРНК, трансляции и стабильности самого белка. Показано, что uL24 связываясь с MDM2, ингибируюет его убиквитин-лигазную активность по отношению к р73, повышая стабильность последнего, аналогично механизму регуляции, свойственному p53 [159], [221]. Однако в клетках, нокаутных по MDM2, где время полужизни р73 значительно увеличивалось по сравнению с таковым в нормальных клетках, uL24 также способен, хоть и в меньшей степени, контролировать уровень р73, что указывало на существование альтернативного регуляторного механизма. Оказалось, что uL24 способствует формированию полисом на мРНК р73 [221]. Более того, выяснилось, что uL24 напрямую связывается с 3'-НТО этой мРНК. Результаты экспериментов с использованием eGFPассоциированной репортерной конструкции, несущей 3'-НТО мРНК р73, позволили сделать вывод, что uL24 необходим для эффективной трансляции мРНК p73. Показано, что uL24 взаимодействует также с кэп-ассоциированным фактором инициации eIF4E, усиливая его связывание с мРНК р73 [221], что в конечном итоге повышает эффективность трансляции данной мРНК (Рисунок 14). Кроме того, обнаружено, что снижение уровня uL24 в клетках приводит к усилению их роста, а повышение – к ингибированию клеточного роста предположительно посредством ТАр73-опосредованного механизма.



Рисунок 14. Гипотетическая схема регуляции трансляции мРНК р73. Рибосомный белок uL24 (RPL26) обуславливает повышение уровня p73 за счёт усиления трансляции его мРНК, а также за счёт ингибирования MDM2-опосредованного убиквитинилирования [221, 222].

Возможно, одним из самых интересных примеров внерибосомных функций, связанных с контролем трансляции, является функция рибосомного белка uL13, которая связана с регуляцией трансляции мPHK церулоплазмина – белка, характерного для острой фазы воспаления, в составе так называемого GAIT-комплекса (от англ. IFNγ-activated inhibitor of translation) [223] (Рисунок 15). Так, замечено, что после обработки γ-интерфероном в моноцитах повышается уровень мPHK церулоплазмина, хотя синтез самого белка через 16 ч после обработки останавливается [224]. Оказалось, что специальный комплекс GAIT связывается с 3'-HTO мPHK церулоплазмина, где содержится так называемый GAIT-элемент, представляющий собой шпильку длиной порядка 29 нуклеотидов [225]. У человека GAIT-комплекс является гетеротетрамером, состоящим из глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH), глютамилпролил-тPHK-синтетазы (EPRS), NS1-ассоциированного белка 1 (NSAP1) и uL13 [226, 227]; мышиный GAIT-комплекс является гетеротримером, в нём отсутствует NSAP1 [228].



Рисунок 15. Схема подавления трансляции мРНК церулоплазмина с участием GAIT-комплекса, включающего uL13 [79]. GAIT-комплекс связывается со специальной структурой в 3'-НТО мРНК церулоплазмина, что приводит к ингибированию трансляции данной мРНК. М₇G, метилгуанозин; Met, инициаторная тРНК; ORF, открытая рамка считывания; PABP, поли(A)-связывающий белок.

Сборка GAIT-комплекса происходит в два этапа; важнейшую роль в этом процессе играет фосфорилирование компонентов комплекса. На первой стадии, которая длится в течение 2 ч после воздействия на клетки γ -интерферона, EPRS фосфорилируется по двум положениям: сначала Cdk5 (от англ. cyclin-dependent kinase 5) присоединяет фосфат к Ser⁸⁸⁶, а затем к Ser⁹⁹⁹ [229, 230]. В таком состоянии EPRS высвобождается из тРНК-мультисинтетазного комплекса и объединяется с NSAP1, формируя неактивный пре-GAIT-комплекс, не способный к связыванию мРНК-мишеней и ингибированию трансляции [227]. На втором этапе, спустя 12–16 ч, под действием γ -интерферона активируется также киназный каскад, где протеинкиназа DAPK (от англ. death-associated protein kinase 1) активирует протеинкиназу ZIPK (от англ. zipper-

interacting protein kinase), которая в свою очередь фосфорилирует uL13 по положению Ser⁷⁷. Фосфорилированный uL13 высвобождается из 60S рибосомных субчастиц и соединяется сначала с GAPDH, а затем и с пре-GAIT-комплексом, формируя функциональный GAITкомплекс. При связывании GAIT-комплекса с 3'-НТО мРНК церулоплазмина EPRS узнает GAIT-элемент, а фосфорилированный uL13 прочно связывается с кэп-связывающим фактором инициации eIF4G и блокирует образование 48S инициаторного комплекса [231].

Позже с помощью полногеномного полисомного профайлинга показано, что фосфорилированный uL13 в составе GAIT-системы ингибирует также трансляцию мPHK ряда других генов, ассоциированных с клеточным ответом на воспаление, которые содержат мотивы, подобные GAIT-элементу в 3'-НТО мPHK церулоплазмина [232]. Исследования на мышах с макрофаг-специфичным нокаутом гена uL13 выявили, что у таких мышей в макрофагах нарушен контроль трансляции некоторых хемокинов [233]. Оказалось, что в этих клетках не происходило формирования GAIT-комплекса, и, соответственно, осуществлялась неконтролируемая экспрессия генов, характерных для воспаления.

В течение последнего времени удалось достичь значительного прогресса в понимании функционирования GAIT-системы. В частности, установлены компоненты GAIT-комплекса и их взаимодействия, а также выявлены пути активации GAIT-комплекса и контролируемые им мРНК-мишени. Однако по-прежнему остаются не решенными вопросы, касающиеся идентификации специфических доменов компонентов комплекса, вовлеченных в белокбелковые и РНК-белковые взаимодействия, установления функции GAPDH, выяснения возможной роли фосфатаз в инактивации комплекса и т.д. Полное понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе функционирования этой системы может оказать помощь в разработке терапевтических средств для лечения воспалительных заболеваний, в основе которых лежат генетические дефекты, нарушающие работу GAIT-комплекса.

1.6 Взаимодействия рибосомных белков с компонентами вирусов

Экстрарибосомные функции рибосомных белков млекопитающих не ограничиваются лишь участием в регуляции клеточной машины как таковой. Рибосомные белки могут принимать участие в регуляции жизненных циклов клеточных паразитов – различных вирусов. В данной части обзора будут рассмотрены взаимодействия некоторых рибосомных белков с компонентами вирусов, причём акцент будет сделан на взаимодействие с вирусными РНК.

В этом плане наиболее детально изучено взаимодействие eL22 с малой PHK вируса Эпштейна-Барр, называемой EBER1 (от англ. Epstein–Barr virus-encoded small RNA). Вирус Эпштейна-Барр – это представитель семейства герпесвирусов. Геном данного вируса

представлен двуцепочечной ДНК, он хорошо размножается в различных культурах клеток, в частности способен реплицировать в В-лимфоцитах, но в отличие от остальных представителей герпесвирусов, он не убивает клетки, а приводит к усилению их пролиферации [234, 235]. В инфицированных клетках вирус продуцирует высокоструктурированные малые некодирующие РНК, в том числе EBER1 и EBER2 [236, 237]. Эти РНК не полиаденилируются; они синтезируются посредством клеточной РНК-полимеразы III, их длина составляет примерно 170 нуклеотидов (Рисунок 16).

Молекулы EBER накапливаются в ядре в количестве примерно 1 миллион копий на клетку, где они формируют специфические рибонуклеопротеидные комплексы. Биологические функции EBER на сегодняшней день остаются до конца невыясненными. В двух независимых исследованиях показано, что EBER1/2-деплетированные штаммы EBV способны инфицировать лимфоциты без каких-либо изменений [238, 239]. С другой стороны, в ряде других исследований продемонстрировано, что деплеция этих PHK приводит к нарушению способности вируса трансформировать лимфоциты [240]. Более того, в пользу этого свидетельствуют также результаты исследований [241, 242], где было установлено, что экспрессия EBER1 в клеточных линиях может способствовать злокачественной трансформации. Интересно отметить, что последовательность и вторичная структура EBER1 высоко консервативны среди штаммов EBV, и, кроме того, данная PHK встречается у двух представителей лимфокриптовирусов – лимфокриптовирусе макаки-резус (MHV4) и герпесвирусе бабуинов (CeHV12). Идентичность последовательностей EBER1 у данных представителей с таковой у EBV составляет 57.3% и 68.9%, соответственно.

Факт наличия взаимодействий между eL22 и EBER1 впервые обнаружен в 1991 году [243], однако изначально eL22 был идентифицирован как EAP (от англ. EBER associated protein – ассоциированный с EBER1 белок). В последующей работе [244] показано, что белок с молекулярной массой 15 кДа, названный ранее EAP и связывающийся с EBER1, является на самом деле рибосомным белком eL22. Установлено, что в клетках, пораженных EBV, примерно половина всего пула eL22 оказывается ассоциированной в PHП-комплексе с EBER1, тогда как оставшаяся часть находится в моносомах и полисомах. С использованием антител против eL22 показано, что в неинфицированных человеческих клетках eL22 локализован и в цитоплазме, и в ядре, тогда как в EBV-положительных клетках он преимущественно обнаруживается в нуклеоплазме. Эти данные также нашли подтверждение в экспериментах по *in situ* гибридизации, которые показали, что релокализация eL22 в нуклеоплазму коррелирует со связыванием этого белка с EBER1. Следует отметить, что EBER1 не способствует диссоциации eL22 из рибосом, однако её связывание со свободным eL22 может приводить к нарушениям в биогенезе рибосом. С помощью экспериментов *in vitro* с использованием рекомбинантного

eL22 и очищенной EBER1 установлено, что эта РНК имеет 3 сайта связывания для eL22 (Рисунок 16) [245], что подтверждено с помощью УФ сшивок, генерируемых *in vivo*.



Рисунок 16. Вторичная структура малой некодирующей РНК EBER1 [236]. Петли SLI, SLIII и SLIV являются сайтами связывания eL22 согласно данным [245].

В работе [246] высказано предположение, что экспрессия EBER1 в EBV-негативных Вклетках запускает формирование злокачественного фенотипа и что этот процесс может быть связан с ингибированием проапоптического эффекта протеинкиназы PKR (от англ. protein kinase R). Известно, что EBER1 связывается с PKR, которая является проапоптотическим фактором, ингибирующим рост опухолей, и блокирует активацию последней посредством дцРНК. Авторы [246] установили, что eL22, конкурируя с PKR за связывание с одним из сайтов на EBER1, ослабляет способность последней ингибировать активацию PKR. Транзиентная трансфекция EBER1 в фибробласты мыши стимулировала экспрессию репортерного гена и частично обращала ингибиторный эффект EBER1. Однако EBER1 оказывала стимулирующий эффект и при трансфекции в нокаутные по PKR клетки, что указывает на наличие PKRнезависимого действия этой PHK. Транзиентная экспрессия гена eL22 предотвращала как PKRзависимый, так и PKR-независимый эффекты EBER1. На основании полученных данных авторы пришли к заключению, что ассоциация eL22 с EBER1 в EBV-инфицированных клетках может ослаблять биологические эффекты вирусной PHK, посредством которых EBER1 активирует экспрессию генов.

Для определения аминокислотных остатков eL22, участвующих в связывании с EBER1 в работе [242] создали генетические конструкции, продуцирующие мутантные формы eL22, и

исследовали способность каждой из мутантных форм белка связываться с EBER1. Было обнаружено, что участок 80-93 eL22, содержащий кластер положительно заряженных аминокислотных остатков и необходимый для специфического связывания с 28S pPHK, вовлекается также и в связывание с EBER1. Более того, с использованием химерных мутантных форм eL22, сцепленных с GFP-белком, удалось установить, что этот же участок имеет критическое значение как для ядерной локализации eL22, так и для его включения в рибосомы. Авторы полагают, что накопление eL22 в ядре не обусловлено наличием в его последовательности сигнала ядерной локализации, а происходит за счёт его специфических взаимодействий с таким ядерным компонентом как 28S pPHK.

Чтобы проверить гипотезу о том, что EBER1-опосредованная релокализация eL22 в нуклеоплазму в EBV-инфицированных клетках критична для EBER-специфичных функций в работе [242] сделана попытка ответить на вопрос, является ли связывание с EBER1 необходимым и достаточным условием для удержания eL22 в нуклеоплазме. С использованием метода флюоресцентной локализации авторы показали, что мутации в сайтах связывания eL22 на EBER1 нивелируют её связывание с eL22 и ингибируют EBER1-опосредованную релокализацию eL22 в нуклеоплазму. В данной работе также обнаружено, что BL-клетки (от англ. Burkitt's lymphoma), экспрессирующие ген мутантной EBER1, которая неспособна связываться с eL22, имели значительно меньший потенциал к росту, чем клетки, экспрессирующие ген EBER1 дикого типа.

Взаимодействие с компонентами вируса Эпштейна-Барр свойственно не только eL22. Так, в работе [247] показано, что рибосомный белок eS1 является клеточным партнёром EBNA-5 (от англ. Epstein-Barr virus nuclear antigen 5), одного из ранних вирусных белков, продуцируемых в инфицированных В-клетках. В данной работе также продемонстрировано, что EBV-опосредованная трансформация В-клеток в иммортализованные иммунобласты приводит к значительной ап-регуляции экспрессии гена eS1. Авторы работы полагают, что связывание EBNA-5 с eS1 может влиять на функции последнего, связанные с усилением клеточного роста, ингибированием дифференцировки клеток, а также регуляцией апоптоза. В другой работе [248] обнаружено, что еще один компонент EBV, а именно EBNA-1 (от англ. Epstein-Barr virus nuclear antigen 1) связывается с рибосомным белком uL4. Этот вирусный белок, необходимый для поддержания EBV в клетках человека, играет важную роль в EBVопосредованной злокачественной трансформации клеток. Известно, что EBNA-1, связываясь с oriP-участком (от англ. origin of viral replication), представляющим собой регион генома вируса, с которого начинается репликация вирусной эписомы, участвует в поддержании генома EBV в клетке и, кроме того, обеспечивает экспрессию вирусных генов с эписомы. С использованием клеток лимфобластомы показано, что дефицит uL4, достигнутый с помощью РНК-

интерференции, приводит к ингибированию EBNA-1-опосредованной активации oriP-участка в составе люцеферазного репортера, что проявляется в снижении как уровня связывания EBNA-1 с ДНК, так и количества копий генома EBV в клетках. Инфекция EBV усиливает экспрессию гена uL4 и приводит к передислокации данного белка в ядро. Установлено, что uL4, а также ещё один ядерный белок – нуклеолин, формируя комплексы с EBNA-1, стабилизируют связывание последней с oriP-регионом в инфицированных клетках. Выяснилось, что взаимодействие N-концевого участка uL4 с остатком лизина в положении 429 нуклеолина необходимо для связывания EBNA-1 с регионом и поддержания эписомы. В то же время, С-концевые остатки лизина в положениях 380 и 393 нуклеолина обуславливают метилирование гистона H3K4me2 в районе oriP-участка, что приводит к EBNA-1-опосредованной трансактивации этого участка.

Ещё одним интересным примером является взаимодействие рибосомного белка eL18 с белком NS1 вируса Денге, играющим ключевую роль в репликации и патогенезе этого вируса. Рибосомный белок eL18 обнаружен среди 64 белков, иммунопреципитированных вместе с NS1 из клеток линии Huh-7 (от англ. human hepatic cells), инфицированных данным вирусом [249]. Показано, что eL18 передислоцируется в перинуклеарное пространство, спустя 48 ч после инфекции. Понижение уровня eL18 в инфицированных клетках не влияло на эффективность клеточной трансляции и клеточную выживаемость, однако приводило к значительному уменьшению уровней вирусной репликации и трансляции, а также к понижению продукции вирусных частиц, указывая на важность eL18 в жизненном цикле вируса Денге [249].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Совокупность представленных в обзоре данных позволяет заключить, что отдельные рибосомные белки млекопитающих как компоненты белоксинтезирующей машины играют критическую роль в процессе трансляции. Это утверждение соответствует данным о существовании связи между заболеваниями, именуемыми рибосомопатиями, и нарушениями генах рибосомных трансляции, вызванными мутациями В белков, формирующих функциональные центры рибосом. Кроме того, для ряда рибосомных белков доказано, что они могут вовлекаться в регуляцию экспрессии генов, будучи в свободном состоянии. Некоторые из этих белков способны осуществлять регуляцию экспрессии собственных генов преимущественно по механизму обратной связи на уровнях сплайсинга и трансляции. Отдельные рибосомные белки, взаимодействуя с факторами транскрипции, могут модулировать их активность, оказывая тем самым влияние на экспрессию многих генов, в том числе и тех, которые участвую в биогенезе рибосом. Помимо этого, некоторые рибосомные белки способны

модулировать трансляцию мРНК через связывание с их нетранслируемыми областями, приводя к интенсификации синтеза белка, кодируемого данной мРНК. Данные о роли рибосомных белков и их пост-трансляционных модификаций в специализированной трансляции, накопленные за два последних десятилетия, свидетельствуют о том, что рибосома осуществляет трансляционный контроль экспрессии генов. Наконец, широкая представленность в клетке, способность находиться как в цитоплазме, так и в ядре, и наличие большого положительного заряда создали предпосылки для того, чтобы рибосомные белки могли участвовать в различных клеточных процессах, зачастую не имеющих отношения к трансляции, в том числе злокачественной трансформации клеток. Все вышеизложенное свидетельствует о важности исследования экстрарибосомных и канонических функций рибосомных белков для выявления процессов, вовлекающих свободные рибосомные белки, и понимания молекулярных рибосомопатий, вызванных нарушениями работе соответствующих механизмов в функциональных центров рибосом.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

В данной работе использованы следующие материалы.

(AppliChem), ампициллин (AppliChem). Реактивы: агароза бензоилцианил (BzCN) (AppliChem), бромистый этидий (AppliChem), дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты (dNTP) (AppliChem), (AppliChem), дидезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты (ddNTP) триптон (AppliChem), дитиотреитол (DTT) (AppliChem), дрожжевой экстракт (AppliChem), изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (AppliChem), 2-меркаптоэтанол (AppliChem), рибонуклеозид-5'-трифосфаты (NTP) (AppliChem), 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)-карбодиимид мета-*n*толуолсульфонат (CMCT) (AppliChem), циклогексимид (AppliChem), акриламид (AppliChem), N,N'-метиленбисакриламид (бисакриламид) (AppliChem), додецилсульфат нария (SDS) (AppliChem), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES) (AppliChem), 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол (Трис) (AppliChem), TRIzol reagent (Invitrogen), Tween-20 (Ferak), Triton-X100 (Sigma Aldrich), РНК poly(U) (Reanal), флуоресцентный краситель SYTO 9 (5 мМ) (Thermo Fischer Scientific), GlycoBlue (15мг/мл0) (Thermo Fischer Scientific), таблетки для приготовления PBS (Amresco). Все остальные реактивы, использованные в работе, были марки ХЧ или ОСЧ.

Материалы и наборы: нитроцеллюлозная мембрана Amersham Protran Premium 0,45 мкм NC и хроматографическая бумага Whatman Grade 3mm CHR (GE Healthcare Life Sciences), набор для выделения плазмид Plasmid Midi (QIAGEN), микроколонки Illustra MicroSpin G-25 (GE Healthcare), концентраторы Centricon-3 (Amicon), Western Blotting Substrate kit (Thermo Fisher Scientific).

Аффинные сорбенты: StrataClean Resin (Agilent Technologies), Dynabeads Protein G (Thermo Fisher Scientific).

Красители: пиронин G и Кумасси бриллиантовый синий R250 и G250 (Serva), бромфеноловый синий (Reanal), Понсо S, Stains all и ксиленцианол (Fluka).

Ферменты: Таq ДНК-полимераза, обратные транскриптазы AMV и MMLV, щелочная фосфатаза из кишечника теленка 10000 ед.акт./мл (NEB), полинуклеотидкиназа (ПНК) Т4 10000 ед.акт./мл (NEB), эндонуклеазы рестрикции Sal I, Xho I, EcoRI, NdeI и BamHI и T4 ДНК-лигаза (Thermo Fisher Scientific), ингибитор рибонуклеаз RiboLock (Thermo Fisher Scientific), ингибитор рибонуклеаз RiboLock (Thermo Fisher Scientific), ингибитор рибонуклеаз SuperScript IV (Thermo Fisher Scientific), пирофосфатаза, лизоцим, протеиназа К (Sigma Aldrich), PHKaзa I (Ambion), PHKaзa

T1 (Thermo Fisher Scientific), ДНКаза I (Ambion), РНК-полимераза фага T7 любезно предоставлена проф. И. Эпероном (Лестерский университет, Великобритания).

Антитела и антисыворотки: моноклональные анти-FLAG антитела (M2 и M5, Sigma Aldrich), поликлональные антитела кролика против рекомбинантного рибосомного белка eL29 человека (Thermo Fisher Scientific), конъюгированные с перексидазой хрена антитела против антител мыши и кролика (Sigma); антисыворотки против рибосомных белков человека получены в Лаборатории структуры и функции рибосом (ИХБФМ СО РАН), а антисыворотки против рибосомных белков крысы любезно предоставлены др. И. Шталем; антитела мышиные моноклональные против GAPDH и антитела кроличьи поликлональные против рибосомного белка uL5 (RPL11) (Proteintech).

Меченые рибонуклеозидтрифосфаты: [α-³²P]-GTP (1000 Ки/ммоль) и [γ-³²P]-ATP (3000 Ки/ммоль) синтезированы в Лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН.

Генетические конструкции: pET-15b (Novagen), pCI-neo (Promega), FUdeltaGW-rtTA (Addgene), TetO-FUW-OSKM (Addgene), pSUPER (OligoEngine).

Составы стандартных растворов и буферов: буфер электродный ТАЕ (40 мМ Трис, 20 мМ уксусная кислота и 1 мМ ЭДТА, pH 7.6), буфер электродный ТВЕ (89 мМ Трис, 89 мМ борная кислота и 2 мМ ЭДТА, pH 8.3), буфер TBS (50 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 150 мМ NaCl и 0.05% Tween-20).

Культивирование линий клеток человека: культуральная среда DMEM (Thermo Fisher Scientific), FBS (Gibco), антибиотик пенициллин-стрептомицин (10000 U/ml) (Gibco), трансфектанты TurboFect и Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific), Lipofectamine LTX (Invitrogen), антибиотик G418 (Thermo Fisher Scientific), антибиотик доксициклин (DOX) (Sigma Aldrich), 4-тиоуридин (s⁴U) (Sigma Aldrich), 6-тиогуанозин (s⁶G) (Sigma Aldrich), трипсин (0.25%) (Gibco), кульутарльный пластик (TPP).

Культивирование клеток *E.coli*: Среда LB (триптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л и NaCl 10 г/л), ампициллин (Applichem), IPTG (Sigma Aldrich).

В работе использованы компьютерные программы: Vector NTI 10 (Invitrogen), QuantityOne (BioRad), Prism 5 (GraphPad Software), PyMOL 0.99 (DeLano Scientific LLC), GW CLC 12 (Qiagen), различные пакеты R (ggplot2, xlsx, Stat), в том числе пакеты платформы Bioconductor (Rsubread, DESeq2, bioMart, GenomicFeatures, GenomicAlignments).

Подготовка библиотек кДНК и их высокопрозиводительное секвенирование проведено в Центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН, функционирующего на базе Объединенного центра геномных, протеомных и метаболомных исследований ИХБФМ СО РАН. Олигодезоксирибонуклеотиды, используемые в работе, синтезированы в Группе олигонуклеотидного синтеза Лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН (Таблица 2), siPHK синтезированы в Лаборатории химии PHK ИХБФМ СО РАН (Таблица 3).

Название	Последовательность (5'-3')
1F	5'-acgtgtcgacatgtctagactggacaagagc-3'
1R	5'-acgtctcgagttacccggggagcatgtc-3'
2F	5'-acgtggatccgatccagtttggttatcgag -3'
2R	5'-ctcgagatctgagtccggacttgtaaggctggatcggtccc-3'
3F	5'-gtaccgtcgactgcagaattcgaagcttgagctcgagatctgagtccggacttgtaaggctggatcggtccc-3'
3R	5'-gggaccgatccagccttacaagtccggactcagatctcgagctcaagcttcgaattctgcagtcgacggtac-3'
4F	5'-ctgcagtcgacggtacccagacatgataagatacattgatgag-3'
4R	5'-acgtggatcctaccacatttgtagaggttttac-3'
5F	5'-acgtctcgagatggtggactacaaagacgatgacgacaaggcggttggcaagaacaag-3'
5R	5'-acgtgaattettaaacagattettggaetgg-3'
6F	5'-acgtcatatggactacaaagacgatgacgacaaggcggttggcaagaacaag-3'
6R	5'-ccggaattcggatccttaaacagattcttggactggt-3'
9F	5'-agataggtaatacgactcactatagggatactctggtttctcttcagatcg-3'
9R	5'-ttaaccctcactaaagggaagtagccttgccaaagcaaggcct-3'
11F	5'-agataggtaatacgactcactatagggaaaaagggcttctgtcgtgagtg-3'
11R	5'-ttaaccctcactaaagggaagaaagggcgccgggacc-3'
T3	5'-ttaaccctcactaaagggaag-3'
12F	5'-agataggtaatacgactcactatagggtgccttaaacttatgagtaaggaa-3'
12R	5'-ttaaccctcactaaagggaagcgggcagatcgcaactc-3'
19F	5'-gatccccgcacctgctatgttcaatattcaagagatattgaacatagcaggtgcttttta-3'
19R	5'-agettaaaaageacetgetatgtteaatatetettgaatattgaacatageaggtgeggg-3'
20F	5'-gatccccgccaaatccggaagaagatttcaagagaatcttcttccggatttggcttttta-3'
20R	5'-agettaaaaagecaaateeggaagaagattetettgaaatettetteeggatttggeggg-3'
21F	5'-gatccccgcagacaaatgacttgaaattcaagagatttcaagtcatttgtctgcttttta-3'
21R	5'-agettaaaaageagacaaatgacttgaaatetettgaattteaagteatttgtetgeggg-3'
22F	5'-gatecececaagtigaatigggaaatteaagagatticecaatteaaaetiggtitta-3'
ZZR	5' agentiadadecaagiiigaaligggaaaleleligaalieeeaalieaaaeliggggg-5
KINUII_FIL	5' geteetteggteegetgeg 2'
U11SmMinusPov	5' ttatactteegeestetetta 3'
	5' hastanettentastasetennessetennessestennessessessessessessessessessessessesse
uS19-1 uS10 P	5' acgtgaattettaettaagaggaatgaagaggaggaggaggaggaggaggagga
E Ass	5' -acgigaanchactagaagggalgaage-5
P Asp	5' ttettttetttettettettetteettetteetteataata
E Dho Asn	5' nottente de la constance de
P PheAsp	5' tttttetttategaattetttetteeetatagtgagtagtagtagtagtagtagtagtagtagtagt
E DhoVol	5' - initientialegaaliettietteetaaggaagaagaagaagaagaagaagaagaagaagaagaa
P PheVal	5' tittetittaegaattettetteeetaaggaagaaagaattegttaattaa
$F_{\rm PheVal}(C_{\rm rich})$	5'-cnattaatacgaatecteactatagggageegtattaati-5
R-PheVal(C-rich)	5'-eganaataegaeteactatagggaageeaceanegaetaetaetea-5
RAD23A-F	5'-gtgggggtgtacgaatggtggetteeetatagtgagtegtattaateg-5
RAD23-R	5'-goggaggatotagaggat-3'
TFAM-F	5'-cgctcccccttcagttttgt-3'
TFAM-R	5'-acgagettegteetettagea-3'
CHCHD3-F	5'-ccaaagagctggaccgagag-3'
CHCHD3-R	5'-agcatttgagggtctggtgg-3'

Таблица 2. Список олигодезоксирибонуклеотидов, использованных в данной работе.

G3BP1-F	5'-caccacaagacctcagcgg-3'
G3BP1-R	5'-ccccttcccaatc-3'
CLIC4-F	5'-aatgaagcactggagagggg-3'
CLIC4-R	5'-tcactgggacaggtattggt-3'
RPL29-F	5'-cgacttgcctacattgcc-3'
RPL29-R	5'-cctgagctggaactgaag-3'
GAPDH-F	5'-gtgaaccatgagaagtatgacaac-3
GAPDH-R	5'-catgagtccttccacgatacc-3'

Таблица 3. Список олигорибонуклеотидов, использованных в данной работе для создания дуплексов siPHK.

Номер дуплекса и	Последовательность	Источник
название		
олигонуклеотида		
I.α-rpl29-F	5'-gcgugcucgugcccguauudTdT-3'	[32, 250]
I.α-rpl29-R	5'-phosphate-aauacgggcacgagcacgcdTdT-3'	[32, 250]
II.α-rpl29-F	5'-ggccaaggccaaggaucaadTdT-3'	[32]
II.α-rpl29-R	5'- phosphate-uugauccuuggccuuggccdTdT-3'	[32]
III. контроль-F	5'-uucuccgaacgugucacgudTdT-3'	[32, 251]
III. контроль-R	5'- phosphate-acgugacacguucggagaadTdT-3'	[32, 251]

2.2 Методы

2.2.1 Дизайн и создание генетических конструкций

2.2.1.1 Создание генетического вектора для получения стабильных клеточных линий

Плазмидный вектор pCI-neo (Promega) использован в качестве основы для создания кассетной плазмидной конструкции, обеспечивающей индуцибильную экспрессию целевого гена в клетках млекопитающих. Последовательность гена rtTA (от англ. Reverse tetracycline trans-activator) получена в ходе ПЦР с использованием в качестве матрицы вектора FUdeltaGW-rtTA (Addgene) и специфичной пары праймеров 1F и 1R (Таблица 2). Полученный ПЦР-продукт клонирован в плазмиду pCI-neo по сайтам SalI и XhoI, в результате чего получена плазмида pCI-neo-rtTA. Последовательность TRE-CMVmin амплифицирована в ходе ПЦР с использованием в качестве матрицы и пары специфичных праймеров 2F и 2R (Таблица 2); последовательность поли(А)-сигнала амплифицирована с использованием pCI-neo в качестве матрицы и пары специфичных праймеров 4F и 4R (Таблица 2); новый множественный сайт клонирования (MCS, от англ. Multicloning site) создан с использованием комплементарных дезоксиолигорибонуклеотидов 3F и 3R (Таблица 2). ДНК-конструкция, состоящая из последовательно соединенных последовательностей TRE-CMVmin

MCS и поли(A)-сигнала, создана в ходе перекрывающейся ПЦР с дальнейшим добавлением праймеров 2F и 4R (Таблица 2). Получившийся ПЦР-продукт гидролизован эндонуклеазой рестрикции BamHI и клонирован в плазмиду pCI-neo-rtTA по сайту рестрикции BglII (BglII и BamHI являются изомерами, которые узнают разные последовательности, но оставляют одинаковые липкие концы). В результате получен плазмидный вектор pAG-1.

2.2.1.2 Создание вектора pAG-1 со вставкой минигена FLAGeS1

Миниген FLAG-меченого eS1 (^{FLAG}eS1) амплифицировали при помощи ПЦР с использованием кДНК из клеток НЕК293 в качестве матрицы и пары специфических праймеров 5F и 5R (Таблица 2). Полученный в ходе ПЦР ДНК-продукт клонировали в плазмиду pAG-1 по сайту EcoRI. В результате получен рекомбинантный плазмидный вектор pAG-1-FLAG-eS1, наличие вставки мини-гена ^{FLAG}eS1 в котором верифицировано с помощью секвенирования.

2.2.1.3 Создание вектора pAG-1 со вставкой минигена FLAG uS19

Вектор pAG-1-FLAGuS19 получен и верифицирован на наличие соответствующей вставки, как описано в пункте 2.2.1.2. Миниген FLAG-меченого uS19 (^{FLAG}uS19) получали в ходе ПЦР с использованием специфичных праймеров uS19-F и uS19-R (Таблица 2).

2.2.1.4 Создание вектора рЕТ15b со вставкой минигена ^{His6-FLAG}eS1

Последовательность, кодирующая eS1, содержащий остаток His₆ и FLAG-эпитоп на Nконце (^{His6-FLAG}eS1), получена в ходе ПЦР с использованием кДНК клеток HEK293 в качестве матрицы и специфической пары праймеров 6F и 6R (Таблица 2). Полученный ПЦР-продукт клонировали в плазмиду pET15b по сайтам NdeI и BamHI. Наличие вставки, кодирующей ^{His6-FLAG}eS1, в результирующем векторе pET15b-FLAG-rpeS1 верифицировали, как описано выше.

2.2.1.5 Получение плазмид со вставками, кодирующими специфические siPHK против мPHK eS1

Дизайн siPHK против мPHK eS1 проводили с помощью программы Block-iT[™] RNAi Designer tool (Thermo Fisher Scientific). Четыре дуплекса смоделированы и получены посредством отжига комплементарных олигодезоксирибонуклеотидов (19-22F/R) (Таблица 2) с

последующим клонированием в плазмидный вектор pSUPER [252]. В результате получены рекомбинантные плазмиды pSUPER eS1 (#1-4).

2.2.1.6 Синтез олигонуклеотидов для создания siPHK против мPHK eL29

Список siPHK, использованных в работе, представлен в Таблице 3. Соответствующие олигорибонуклеотиды синтезированы с использованием фосфорамидов (Glen Research, Sterling, VA, USA) и протокола синтеза для автоматического синтезатора ДНК/РНК ASM-800 (Bioset, Новосибирск, Россия). После очистки в 20%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии 8М мочевины они были обессолены с использованием Step-Pac C18 картриджей (Millipore, Temecula, CA, USA) и выделены в виде солей лития.

2.2.2 Методы, связанные с клеточными культурами

2.2.2.1 Получение стабильных клеточных линий на основе клеток НЕК293

Плазмиду pAG-FLAG-eS1 линеаризовали с помощью эндонуклеазы рестрикции BamHI согласно протоколу производителя и использовали для трансфекции одной лунки 12-луночного планшета адгезионных клеток НЕК293 (АТСС CRL-1573). Трансфекцию проводили с использованием липофектамина LTX (Invitrogen) согласно протоколу производителя. Через 48 ч после трансфекции клетки снимали с планшета, ресуспендировали в PBS с добавлением трипсина, после чего высаживали на чашку Петри диаметром 15 см. Клетки культивировали в среде DMEM (Invitrogen) с 10% FBS (Gibco) в присутствии антибиотика пецициллинстрептомицин (100 ед./мл) с добавлением селектирующего антибиотика G-418 (1000 мкг/мкл). Селекцию проводили в течение 4-6 недель, пока единичные клетки не формировали колонии. После селекции клетки из разных колоний выращивали в 12-луночном планшете, и затем тестировали их способность продуцировать FLAGeS1 или FLAGuS19 в ответ на добавление DOX (2 мкг/мл). Тестирование проводили с помощью вестерн-блот анализа лизатов клеток с использованием антител против FLAG-эпитопа (M5) или антисывороток против eS1 и uS19 в качестве первичных антител, и конъюгатов белка G-HRP в качестве вторичных антител. Для детекции результатов вестерн-блот анализа использовали Western Blotting Substrate kit (Thermo Fisher Scientific) с последующим экспонированием мембраны на ChemiDoc XRS system (BioRad).

2.2.2.2 Получение и характеризация клеток НЕК293, дефицитных по eL29

Клетки НЕК293 выращивали в культуральной среде DMEM с добавлением 10% FBS в СО2-инкубаторе при температуре 37°С. Когда клетки достигали примерно 60% конфлюентности, их трансфицировали siPHK против мPHK eL29, с использованием Lipofectamine 3000 согласно протоколу производителя. В контрольном эксперименте клетки были трансфицированы несмысловой siPHK. Спустя 2 дня после трансфекции культуральную среду удаляли, клетки смывали ледяным PBS и собирали центрифугированием в течение 5 мин при 500 g и 4°C. Снижение уровня eL29 подтверждали с помощью вестерн-блот анализа лизатов клеток с использованием поликлональных антител против eL29. Клеточный осадок (см. выше) лизировали в буфере, содержащем 20 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 150 мМ NaCl, 1% NP-40 и 5% глицерина, инкубировали во льду в течение 10 мин и затем осветляли центрифугированием при 20000 g и 4°С в течение 10 мин. Супернатант смешивали с буфером нанесения Леммли и инкубировали при 80 °С в течение 10 мин. Белки разделяли в 12−15%-ном ПААГ в присутствии SDS (SDS-ПААГ) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (0.45 мкм), которую затем последовательно инкубировали с первичными антителами (см. выше) и вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, с последующей обработкой реагентами ИЗ ECL Western Blotting Substrate Kit (Thermo Fisher Scientific). Детекцию хемилюминисцентного сигнала проводили с помощью ChemiDoc XRS system (Bio-Rad).

Для оценки влияния нокдауна eL29 на паттерн pPHK клетки HEK293 выращивали в 12луночном планшете и обрабатывали siPHK, как описано выше. Клетки лизировали в 200 мкл реагента TRIzol, и выделяли фракции PHK и белков согласно протоколу производителя. Образцы тотальной PHK анализировали в 0.5%-ном агарозном геле с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией с помощью системы ChemiDoc XRS system (Bio-Rad).

Для оценки влияния нокдауна eL29 на жизнеспособность клеток HEK293 проводили так называемый MTT-тест (реагентом 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолиум бромид, чувствительным к свету) с использованием Cell proliferation assay (Biomedica) согласно протоколу производителя. Для детекции флюоресценции использовали Polarstar Optima (BMG Labtech). Клетки HEK293 выращивали и трансфицировали siPHK, как описано выше, MTT-тест проводили сразу после трансфекции и через 1 и 2 дня.

2.2.2.3 Анализ содержания рибосомных белков в лизате и во фракциях полисомного профиля клеток НЕК293, дефицитных по eL29

Анализ полисомных профилей проводили, как описано в [253], с незначительными изменениями. В типичном эксперименте лизат клеток НЕК293 (см. выше 2.2.2.2), центрифугировали в градиенте плотности сахарозы 7%-47% при 100000 g в течение 4 ч при 4°C с использованием ротора Beckman SW40, и затем градиент фракционировали, измеряя оптическую плотность фракций при длине волны 260 нм в режиме реального времени. Суммарный белок, выделенный из фракций градиента, соответствующих 80S рибосомам и полисомам, с помощью StrataClean (Stratagene), подвергали электрофорезу в денатурирующем SDS-ПААГ. По окончании электрофореза белки с геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану с последующим вестерн-блот анализом содержания рибосомных белков, в котором использовали антитела против eL29 и uS2 и антисыворотку против uL18. Анализ содержания GAPDH и рибосомных белков в лизате проведен таким же способом с использованием мышиных моноклональных антител против GAPDH, поликлональных антител против uL5 и поликлональных антисывороток против uS15 и eS10. Детекцию флюоресцентного сигнала проводили с помощью VersaDoc Imaging System (Bio-Rad). Полученные изображения анализировали с помощью программного обеспечения Quantity One v. 4.6.3 (Bio-Rad). Расчёт стандартной ошибки и тест Стьюдента проводили с помощью GraphPad Prism 8.3.0.

2.2.2.4 Анализ полисомных профилей клеток, продуцирующих FLAGeS1 и FLAGuS19

Полисомные профили анализировали согласно протоколу [254] с незначительными изменениями. Для анализа использовали стабильные клеточные линии, продуцирующие FLAGeS1 и FLAGuS19. В типичном эксперименте клетки выращивали на одной чашке Петри диаметром 15 см в культуральной среде DMEM в присутствии 10% FBS и антибиотика пенициллин-стрептомицин (100 ед./мл) в CO₂-инкубаторе (5% CO₂) при 37°C. Когда клетки достигали 40–50% конфлюентности, в культуральную среду добавляли DOX до концентрации 2 мкг/мл. Через 48 ч в культуральную среду добавляли циклогексимид (100 мкг/мл), и клетки инкубировали 15 мин при 37°C. Затем клетки аккуратно смывали ледяным PBS и осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 1000 g и 4°C. Клеточный осадок лизировали в буфере лизиза, содержащем 20 мМ HEPS-KOH, pH 7.5, 15 мМ MgCl₂, 200 мМ KCl, 1% Triton-X100, 2 мМ DTT, 100 мкг/мл циклогексимида и 0.025 ед.акт./мкл ингибитора PHKазы Ribolock (Thermo Fisher Scientific), пропускали примерно 10 раз через шприц (1 мл) с иглой G29 и инкубировали во льду в течение 10 мин. Лизат осветляли центрифугированием в течение

10 мин при 20000 g и 4°C и затем наносили на линейный градиент плотности сахарозы (7–47%) в буфере 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), содержащем 50 мМ NH₄Cl, 12 мМ MgCl₂ и 1 мМ DTT, с последующим ультрацентрифугированием в течение 4.5 ч при 100000 g и 4°C (ротор SW40), по окончании которого градиент фракционировали, измеряя оптическую плотность при 260 нм. Тотальный белок из каждой фракции выделяли с помощью Strata-Clean beads (Stratagene) и анализировали с помощью вестерн-блоттинга с использованием антител против FLAG-эпитопа (M5). Эксперимент воспроизводили три раза.

2.2.3 Методы, основанные на высокопроизводительном секвенировании РНК

2.2.3.1 Внутриклеточное сшивание РНК с eS1 с использованием метода PAR-CLIP

2.2.3.1.1 Подготовка клеток и облучение

Эксперименты проводили согласно методике, описанной в [36], с некоторыми изменениями в трех биологических повторах. Для типичного эксперимента адгезионные клетки стабильной линии на основе HEK293, способные индуцибельно продуцировать ^{FLAG}eS1, выращивали в культуральной среде DMEM с добавлением 10% FBS в присутствии антибиотика пенициллин-стрептомицин (100 ед./мл). Когда клетки достигали 70–80% конфлюентности, культуральную среду меняли, с последующим добавлением в нее DOX (2 мкг/мл), а также s⁴U или s⁶G (250 мкМ). После 48 ч инкубации (37°С, 5% CO₂) культуральную среду удаляли, клетки промывали ледяным PBS. Далее чашки Петри с клетками помещали на лед и облучали мягким УФ (с длиной волны выше 312 нм) с помощью Bio-Link (Vilber Lourmat), доза облучения составляла 0.15–0.5 J/см². После облучения клетки смывали ледяным PBS и осаждали затем центрифугированием при 1000 g и 4°C в течение 15 мин. Клеточный осадок лизировали примерно в 3-х объёмах буфера лизиса (по отношению к осадку), содержащего 25 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 150 мM NaCl, 1% NP-40, 0.5 мM DTT, 5% глицерина, 1 мМ ЭДТА, ингибитор протеаз Protease Inhibitor Cocktail (Sigma Aldrich) (1/100 от объема лизата) и ДНКазу I (20 ед.акт./мкл).

2.2.3.1.2 Обработка лизата клеток РНКазой Т1 и иммунопреципитация сшитых фрагментов РНК

Клеточный лизат инкубировали во льду в течение 10 мин, затем примерно 10 раз пропускали через шприц (1 мл) с иглой G29, после чего осветляли центрифугированием в течение 10 мин при 20000 g и 4°C и пропускали через 0.22 мкм фильтр (TPP). Супернатант

далее переносили в пробирку (1.5 мл) с non-stick покрытием (Ambion), после чего к нему добавляли РНКазу T1 (1 ед.ак./мкл) (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. На всех последующих этапах данного эксперимента использовали такие пробирки. После обработки РНКазой T1 лизат осветляли центрифугированием при 20000 g и 4°C в течение 10 мин. Параллельно проводили иммобилизацию анти-FLAG антител (M2) на магнитных частицах с ковалентно-присоединенным белком G (Dynabeads Proteing G Magnetic beads, далее по тексту магнитные частицы). Для этого 10 мкг антител добавляли к 40 мкг магнитных частиц, ресуспендированных в 200 мкл раствора PBS, содержащего 0.05% Tween-20 (PBS-0.05% Tween 20), и смесь выдерживали при 4°C в течение 1 ч. Полученные конъюгаты промывали 3 раза по 1 мл ледяным PSB-0.05%-Tween-20 и добавляли к клеточному лизату, обработанному PHКазой T1. Смесь выдерживали в течение 4 ч при 4°C при постоянном перемешивании. Затем супернатант удаляли, и конъюгаты 3 раза промывали 1 мл ледяного буфера, содержащего 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 300 мМ KCl, 0.05% NP-40 и 0.5 мМ DTT, после чего их ресуспендировали в 50 мкл того же самого буфера.

2.2.3.1.3 Обработка сшитых РНК-фрагментов РНКазой Т1 на магнитных частицах, их дефосфорилирование и ³²Р-мечение

К суспензии конъюгатов добавляли РНКазу Т1 до концентрации 20 ед.акт./мкл, и смесь инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре при активном перемешивании на шейкер-инкубаторе. После этого конъюгаты промывали трижды по 1 мл раствором, содержащим 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 500 мМ КСl, 0.05% NP-40 и 0.5 мМ DTT, и дважды по 1 мл раствором, содержащим 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 100 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂ и 1 мМ DTT, а затем ресуспендировали в 50 мкл этого же буфера, и добавляли к ним щелочную фосфатазу до концентрации 0.5 ед.акт./мкл. Суспензию конъюгатов инкубировали в течение 10 мин при 37°С при активном перемешивании на шейкер-инкубаторе, после чего супернатант удаляли. Далее конъюгаты промывали дважды по 1 мл раствором, содержащим 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 20 мМ ЭДТА и 0.5% NP-40 и дважды по 1 мл раствором, содержащим 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 50 мМ NaCl и 10 мМ MgCl₂. После промывания конъюгаты ресуспендировали в 50 мкл буферного раствора, содержащего 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl2, 5 мМ DTT, 0.5 мкСі/мкл ү-³²Р-АТР и 1 ед.акт./мкл Т4 ПНК, и смесь инкубировали в течение 30 мин при 37°С при интенсивном перемешивании на шейкер-инкубаторе. Затем в реакционную смесь добавляли ATP до концентрации 1 мМ и инкубировали еще 5 мин в тех же условиях с последующим удалением супернатанта. Конъюгаты промывали 5 раз по 1 мл 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), содержащим 50 мМ NaCl и 10 мМ MgCl₂, и ресуспендировали в 50 мкл буфера
нанесения для электрофореза по Лэммли (10% глицерина, 50 мМ Трис-HCl (pH 6.8), 2 мМ ЭДТА, 2% SDS, 100 мМ DTT и 0.1% бромфенолового синего).

2.2.3.1.4 Очистка сшитых фрагментов РНК

Суспензию конъюгатов инкубировали на шейкер-инкубаторе в течение 5 мин при 95°С, после чего магнитные частицы удаляли с помощью магнита, а супернатант переносили в новую пробирку и дополнительно осветляли центрифугированием, как описано выше. Раствор наносили на 15%-ный SDS-ПААГ, после разделения РНК-белковые сшивки переносили на нитроцеллюлозную мембрану и радиоавтографировали с использованием FX Pro Plus MultiImager (Bio-Rad). Перед электрофорезом из раствора отбирали аликвоту для вестерн-блот анализа с использованием антител против eS1. Для выделения фрагментов PHK, сшитых с eS1, кусочки нитроцеллюлозной мембраны, несущие ³²Р-радиоактивную метку, инкубировали в 100 мкл буферного раствора, содержащего 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 75 мМ NaCl, 6 мМ ЭДТА, 1% SDS и 1 мг/мл протеиназы К, в течение 30 мин при 37°С. После этого к кусочкам мембраны добавляли 400 мкл буфера протеиназы К и элюировали РНК в течение 4 ч при комнатной температуре. Далее элюат подвергали фенол-хлороформной экстракции, к водной фазе добавляли 2 мкл GlycoBLue и NaOAc (pH 5.0) до концентрации 0.3 М, и осаждали РНК добавлением 500 мкл изопропанола с последующим вымораживанием при температуре -80°С в течение 15 ч и центрифугированием при 20000 g и 4°С в течение 30 мин. Полученный осадок РНК ресуспендировали в 10 мкл воды свободной от РНКаз (RNAse free water, Ambion).

2.2.3.1.5 Приготовление ДНК-библиотек и их высокопроизводительное секвенирование

ДНК-библиотеки на основе фрагментов РНК, сшивающихся с eS1, получены с помощью NEBNext Small RNA Library Prep Set for Illumina (NEB) согласно протоколу производителя. Для фрагментов ДНК подходящей длины библиотеки фракционировали с выделения использованием набора BluePippin (2% Agarose Dye Free Gel Cassettes) (Sage Science). Фрагменты длиной 125-180 п.о. выделяли с помощью Blue Pippin DNA size selection system (Sage Science) согласно протоколу производителя. Секвенирование ДНК-библиотек проводили на платформе Illumina MiSeq с использованием Reagent Kit v3 (150 циклов, Illumina). Сырые данные высокопроизводительного секвенирования депонированы на платформе GenBank (номер исследования (study accession) PRJNA337889, номер образца (sample accession) SRP080974).

2.2.3.2 Внутриклеточное сшивание мРНК с ^{FLAG}uS19 в рибосомах с остановленной трансляцией с использованием метода PAR-CLIP

Эксперименты проводили согласно методике, описанной в [36], с некоторыми изменениями в трёх биологических повторах. Для типичного эксперимента четыре чашки Петри (диаметром 15 см) адгезионных клеток стабильной линии на основе НЕК293, продуцирующих ^{FLAG}uS19, выращивали и последовательно инкубировали с DOX и s⁴U, как описано выше (см. раздел 2.2.3.1.1). Затем к культуральной среде добавляли циклогексимид (100 мкг/мл), и клетки помещали на лёд на 10 мин, после чего культуральную среду удаляли, клетки промывали ледяным PBS и облучали их мягким УФ, как описано выше (см. раздел 2.2.3.1.1). Клеточный осадок лизировали, как описано в разделе 2.2.3.1.1, в трёх объёмах буфера, содержащего 20 мМ Трис-HCl (рН 7.5), 150 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT, 1% Triton-X100, 0.02 ед.акт./мкл Turbo DNase I (Ambion) и 100 мкг/мл циклогексимида. Осветленный клеточный лизат переносили в чистую пробирку и добавляли РНКазу I (Ambion) до концентрации 1.3 ед.акт./мкл. Реакционную смесь инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре, после чего добавляли SUPERase In RNAse inhibitor (Thermo Fosher Scientific) до концентрации 0.35 ед.акт./мкл. Обработанный лизат (~750 мкл) осветляли, как описано в разделе 2.2.3.1.2, и наносили на 1 мл 30%-ной сахарозной подушки, содержащей 20 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 150 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT, 1% Triton-X100, 100 мкг/мл циклогексимида и 0.02 ед.акт./мкл SUPERase In RNAse inhibitor. Свободный объём пробирки заполняли буфером, содержащим 20 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 150 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂ и 1 мМ DTT. Центрифугирование проводили при 25000 об./мин (~64200 g) в течение 16 ч при 4°C (ротор SW60 Ti). Осадок растворяли в 10 мМ ЭДТА, содержащей 1% SDS, и раствор инкубировали в течение 30 мин при 37°С, после чего его разбавляли в 20 раз IP буфером (20 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 150 мМ NaCl, 0.1% Nonidet P40 и коктейль ингибиторов протеаз (Sigma)). Раствор осветляли с помощью центрифугирования. К супернатанту добавляли конъюгаты антител анти-FLAG (10 мкг), связанные с магнитными частицами (40 мкл) (см. раздел 2.2.3.1.3). Иммунопреципитацию проводили в течение 3 ч при 4°С при перемешивании. Все последующие манипуляции аналогичны тем, что описаны в разделах 2.2.3.1.3 и 2.2.3.1.4. ДНК-библиотеки получали по протоколу, описанному в [255], и секвенировали на платформе MiSeq (Illumina) $(2 \times 75 \text{ bp paired-ends reagents})$.

2.2.3.3 Рибосомный профайлинг клеток, продуцирующих ^{FLAG}uS19 и клеток, выращенных на культуральной среде в присутствии s⁴U

Для рибосомного профайлинга, выполненного в трёх биологических повторах, использовали клетки стабильной линии НЕК293, продуцирующие ^{FLAG}uS19 и выращенные, как описано в разделе 2.2.3.2, и клетки НЕК293, выращенные так же, как указано выше, в присутствии или в отсутствие s⁴U в 10-см чашках. Последующие манипуляции, включая клеточный лизис, обработку РНКазой I и центрифугирование через сахарозную подушку, проводили, как описано выше (см. раздел 2.2.3.2). Осадок, полученный при использовании клеток, продуцирующих ^{FLAG}uS19, растворяли в 200 мкл буфера, содержащего 100 мМ КСІ, 13 мМ MgCl₂ и 0.5 мМ ЭДТА и инкубировали с 15 мкл Protein-G Dynabeads, предварительно связанных с анти-FLAG антителами (M2) в течение 3 ч при 4°С. Из супернатанта, содержащего фракцию рибосом с эндогенным uS19, и из фракции FLAG uS19-содержащих рибосом, связавшихся с антителами, выделяли тотальную РНК с использованием TRIzol (Ambion) согласно протоколу производителя. Тотальную РНК из рибосомных осадков, полученных из клеток НЕК293, выращенных в присутствии s⁴U и без него, выделяли сходным образом. Дальнейшие стадии протокола, включая селекцию фрагментов РНК подходящего размера и их очистку, проводили согласно [38, 256]. ДНК-библиотеки на основе очищенных РНКфрагментов приготовлены и секвенированы, как описано выше. Сырые данные высокопроизводительного секвенирования, соответствующие описанным экспериментам, депонированы на платформе GenBank (номер исследования (study accession) PRJNA563539, номер образца (sample accession) SRP220276).

2.2.3.4 Анализ клеток НЕК293, дефицитных по eS1, с помощью РНК-сек

Клетки НЕК293 (по одной чашке Петри диаметром 6 см на эксперимент) культивировали в среде DMEM с 10% FBS в присутствии антибиотика пецициллинстрептомицин (100 ед./мл). Когда клетки достигали 70–80% конфлюентности, их трансфицировали плазмидами pSUPER eS1 (#1-4) или пустым вектором pSUPER (контроль) с помощью TurboFect transfection reagent (Thermo Fisher Scientific). Спустя 2 дня после трансфекции, клетки смывали с помощью ледяного PBS и осаждали в течение 5 мин при 1000 g и 4°С. Из клеточного осадка, ресуспендированного в 1 мл TRIzol (Thermo Fisher Scientific), выделяли тотальную PHK и тотальный белок согласно протоколу производителя. Тотальную PHK обрабатывали ДНКазой I с использованием препарата On-Column DNAse I Digestion Set (Sigma) с последующей деплецией pPHK с помощью Globin-Zero Gold kit (Epicenter). Качество РНК проверяли с помощью Agilent 2010 Bioanalyzer с использованием RNA 6000 Pico kit (Agilent Technologies). ДНК-библиотеки получали с использованием SOLiD Total PHK-сек Kit и RNA Barcoding kit (Life Technologies) согласно протоколу производителя. Секвенирование ДНК-библиотек проводили на платформе SOLiD 5500XL (Life Technologies). Данные PHK-сек выложены на платформу GenBank (см. раздел 2.2.3.1.5).

2.2.3.5 Анализ клеток НЕК293, дефицитных по eL29, с помощью РНК-сек

Эксперименты проводили в трех биологических повторах. Для этого клетки НЕК293, выращенные в 10-см чашках Петри, трансфицировали siPHK, как описано выше (см. пункт 2.2.2.2). Через 2 дня после трансфекции получали клеточные осадки (см. выше) и лизировали в pearente TRIzol (Invitrogen). Тотальную РНК выделяли из лизатов с помощью Purelink RNA Micro Scale Kit (Invitrogen) и обрабатывали ДНКазой (DNASE70, Sigma). Индекс целостности РНК оценивали с помощью RNA 6000 Pico Kit на Bioanalyzer 21009 (Agilent). Измерение количества РНК проводили с помощью NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) и Qubit (Invitrogen). По 1 мкг тотальной РНК из каждого образца использовали для поли-А-обогащения с использованием NEBNext Poly(A) mRNA magnetic isolation Module (NEB). ДНК-библиотеки на основе полученных препаратов мРНК получали с использованием набора NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB). Анализ качества библиотек проводили с помощью Bioanalyzer 2100 с использованием набора High Sensitivity DNA Kit (Agilent). После анализа ДНК-библиотек с помощью количественной ПЦР (CFX96 Touch, Bio-Rad), библиотеки в эквимолярных количествах отсеквенированы на платформе HiSeq 2500 (Illumina), в формате 2 х 100 bp. Сырые данные, сгенерированные после секвенирования, депонированы на платформе GenBank (номер исследования (study accession) PRJNA611889).

2.2.4 Биоинформатический анализ данных

2.2.4.1 Биоинформатический анализ данных PAR-CLIP на клетках, продуцирующих ^{FLAG}eS1, и данных PHK-сек на клетках, дефицитных по eS1

Процессинг сырых ридов проводили с использованием программного обеспечения CLC GW 9.0 (Qiagen). Риды фильтровали по качеству (ambiguous limit, 2; quality limit, 0.031), удаляя последовательности адаптеров, а также те риды, которые были картированы (length fraction, 0.8; similarity fraction, 0.8; other parameters by default) на последовательности 45S пре-pPHK (NR 046235) и 5S pPHK (NR 0223363). Риды, оставшиеся после фильтрации, были картированы на

геном человека (hg38) с использованием Ensemble annotation GRCh38.88 с помощью RNASeq analysis tool из пакета CLC GW 9.0 (length fraction, 0.8; similarity fraction, 0.8; strand specific, forward, and other parameters by default). При обработке данных PAR-CLIP пики ридов найдены с помощью ChIP-Seq analsyis tool (CLC GW 9.0) с использованием стандартных параметров (максимальное значение p-value = 0.1). Сайты сшивания FLAG eS1 в PHK идентифицировали по положениям T/C (A/G для минус цепей)-транзиций. T/C (A/G)-транзиции в пиках находили с использованием basic variant detection tool со следующими параметрами (ploidy, 2; ignore broken reads, no; ignore non-specific matches, no; minimum coverage, 10; minimum count, 2; frequency, 1–95%; relative read direction filter, no; other parameters by default). Пики с транзициями, которые имели место также и в контрольном образце (без облучения), были удалены из рассмотрения.

При анализе данных РНК-сек для минимизации ошибок секвенирования проведена коррекция ошибок с использованием SOLiD Accuracy Enhancement Tool v.2.4 (Life Technologies). После коррекции данные анализировали с помощью программного обеспечения CLC GW 9.0 (Qiagen) с параметрами по умолчанию (см. выше). Результирующие риды картировали с помощью RNASeq analysis tool на человеческий геном GRCh38.93 из базы данных Ensembl (см. выше). Координаты минорных интронов взяты из базы данных U12DB [257]. Минорные интроны, пересекающиеся с положениями экзонов, исключены из анализа.

2.2.4.2 Биоинформатический анализ данных PAR-CLIP на клетках, продуцирующих ^{FLAG}uS19

Демультипликацию ридов проводили с помощью CEL-Seq script [258]. Удаление адаптеров и ридов с низким качеством осуществляли с помощью TrimGalore v.0.5.0 (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trimgalore). Картирование ридов выполняли с помощью STAR (v. 2.6.1) с использованием человеческого генома GRCh38.93 (см. раздел 2.2.4.1). Дедуплекацию ридов по уникальным молекулярным индексам осуществляли с помощью dedup скрипта из UMItools [259]. Сайты сшивания ^{FLAG}uS19 в PHK идентифицировали по положениям T/C-транзиций в плюс цепях (или A/G -транзиций в минус цепях). Поиск положений T/C (A/G)-транзиций осуществляли с помощью Basic Variant Detection tool из CLC GW v.12.0 software (Qiagen), фильтрацию осуществляли пользовательскими скриптами. Сырые данные секвенирвоания депонированы на платформе GEO (GSE128265). Положения T/C (A/G)-транзиций учитывали при дальнейшем рассмотрении, если они удовлетворяли следующим параметрам: минимальное покрытие = 5, минимальная частота = 1%, минимум ридов с транзицией = 1. Получаемые VCF-файлы использовали для дальнейшего анализа с помощью различных пакетов платформы Bioconductor. Названия генов и транскриптов, соответствующих

геномных положениям T/C (A/G)-транзиций, аннотированы с использованием пакета biomaRt и аннотации ensembl GRCh38.93. Координаты Т/С (A/G)-транзиций, не соответствующие белоккодирующим регионам генома, а также тех, что относятся к митохондриальному геному, исключали из рассмотрения. Геномные координаты транзиций переводили во внутренние координаты кодирующих частей соответствующих генов согласно аннотации ensembl GRCh38.93. Идентификацию пиков проводили с помощью пакетов chipseq и coverageview. В дальнейшем анализе использовали только пики, пересекающиеся с положениями T/C (A/G)транзиций. Внутри пика, содержащего Т/С (A/G)-транзиции, положение транзиций с наибольшим покрытием рассматривали как положение, соответствующее основному месту сшивки ^{FLAG}uS19 с мРНК. Последовательности кодирующих частей (CDS) мРНК взяты с FTP Ensembl (www.ensembl.org/info/data/ftp/). Из Downdload _ них были извлечены последовательности триплетов, фланкирующих положения транзиции. С учётом рамки считывания эти последовательности были использованы для построения LOGO с помощью WebLogo tool (https://weblogo.berkeley.edu/). Кластеры ридов отсортированы по суммарному покрытию сиквесными ридами и топ-100 кластеров также использовали для построения LOGO. Гистограммы и графики построены с помощью интегрированных в программную платформу R инструментов и функций. Корреляция между повторами экспериментов оценена с помощью функции cor, и соответствующие графики построены с помощью пакета ggplot2. Для обнаружения всех белков, содержащих мотив (Е/К)₁₂, их аминокислотные последовательности, взятые из FTP Downdload – Ensembl (www.ensembl.org/info/data/ftp/), просканированы на наличие любого из 2¹² (E/K)₁₂ мотива с помощью пакета Biostrings с использованием функции *vcount-Pattern* (максимальное количество допустимых мисматчей = 4).

2.2.4.3 Биоинформатический анализ данных РНК-сек, полученных на клетках, дефицитных по eL29

Демультипликсированные fastq-файлы проанализированы на предмет качества с помощью FastQC tool (v.0.11.9), результаты анализа представлены с помощью MultiQC tool (v.1.8). Сиквенсные риды в fastq формате пре-процессированы с использованием CLC GW 12.0 software (Qiagen), то есть была произведена фильтрация ридов по качеству (настройки по умолчанию) и, кроме того, были удалены адаптерные последовательности. После этого риды были картированы на человеческий геном GRCh38.93 с помощью инструмента RNA-seq analysis tool из CLC GW (настройки: Strand specific = Reverse, остальные настройки – по умолчанию). Полученные в результате bam-файлы были использованы для дальнейшего анализа. Паттерн распределения ридов между различными функциональными участками

генома получен с помощью пакета systemPipeR (v.1.20.0). Подсчёт количества сырых ридов (read counting), относящихся к каждому гену, выполнен с помощью функции featureCounts (isGTFAnnotationFile = TRUE, isPairedEnd=TRUE, strandSpecific = 2 (reverse stranded)) из пакета Rsubread (v.1.22.2). Полученная в результаты таблица, содержащая информацию о количестве сырых ридов для каждого гена, использована для анализа дифференциально экспрессируемых генов с помощью пакета DESeq2 (v.1.26.0). Параметры запуска DESeq2: design formula = ~batch + condition, batch – день проведения эксперимента, batch = I для повтора 1, batch = 2 для повторов 2 и 3, condition – «норма» или «eL29 нокдаун», где «норма» относится к клеткам НЕК293, трансфицированным контрольной неспецифичной siPHK, а «eL29 нокдаун» - к клеткам НЕК293, трансфицированным siPHK против eL29 siPHK. Параметр «batch» добавлен в формулу для того, чтобы учесть возможные batch-эффекты [260], которые могли возникнуть изза того, что разные повторы эксперимента приготовлены в разное время. Анализ главных компонент (PCA, от англ. principle component analysis) проведен с использованием функции plotPCA (ntop = 500) из пакета DESeq2 после удаления «batch-эффектов» с помощью функции removebatchEffect из пакета Limma (v.3.42.0). Тепловая карта с иерархической кластеризацией, основанная на эвклидовых расстояниях, рассчитанных с помощью функции dist из пакета R Stats для каждого образца, построена с помощью функции pheatmap из пакета Pheatmap (v.1.0.12). Расчёт параметров скорректированной величины p-value (p.adj) проведен с помощью DESeq2 (метод Benjamini – Hochberg, по умолчанию). Полученная с помощью DESeq2-анализа таблица генов сужена путем селекции из нее генов с параметрами p.adj < 0.01 и |Log2FoldChange| > 0.322, которые были отнесены к дифференциально экспрессируемым генам (DEGs, от англ. differentially expressed genes). График МА сгенерирован с помощью функции plotMA из DESeq2. Анализ обогащения по функциональной принадлежности ап-регулируемых и даун-регулируемых DEGs выполнен на платформе Gene Ontology (GO) [261]; аналогичный анализ путей, в которые могут быть вовлечены найденные DEGs, выполнен с помощью функции enrichPathway (pvalueCutoff = 0.1) из пакета ReactomePA (v.1.30.0). GO анализ выполнен со следующими параметрами: the analysis type: PANTHER Overrepresentation Test (Released 20190711, Annotation Version and Release Date: GO Ontology database Released 2019-12-09, Reference List: Homo sapiens (all genes in the database)), Test Type:FISHER, Correction: FDR. Для анализа пересечений DEGs с наборами генов-мишеней p53 и с-Мус использованы наборы из 343 и 1469 генов соответственно, описанные в [262, 263]. Все остальные манипуляции с данными выполнены с использованием пользовательских скриптов.

2.2.5 Методы, примененные для изучения РНК-белковых взаимодействий in vitro

2.2.5.1 Получение рекомбинантного eS1 в системе E.coli

Клетки *E. coli* BL21(DE3) были трасформированы плазмидой pET15b-FLAG-eS1 и выращены при 37°C в культуральной среде LB. Синтез рекомбинантного белка индуцировали путем добавления к трансфицированным клеткам IPTG (1 мМ), после чего их инкубировали при 18°C в течение 6 ч. Рекомбинантный белок выделяли с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе. Полученный элюат затем диализовали против буферного раствора, содержащего 20 мМ HEPES-KOH (pH 7.5), 100 мМ KCl, 0.05% Tween-20 и 1 мМ 2-меркаптоэтанол, и концентрировали с помощью центрифугирования на концентрирующих колонках. К препарату белка добавляли глицерин до концентрации 50%.

2.2.5.2 Синтез РНК-транскриптов, соответствующих различных формам U11 мяРНК, *in vitro*

ДНК-матрицы для синтеза РНК-транскриптов *in vitro* получали в ходе ПЦР с использованием специфических праймеров – 11F и 11R для синтеза матрицы для U11 мяРНК и 11F и 11 Δ SmR для синтеза U11 Δ Sm мяРНК (Таблица 2). ДНК-матрицы содержали последовательность T7-промотора. Полученные ПЦР-продукты клонировали в плазмидный вектор pUC19 по сайту SmaI и верифицировали с помощью секвенирования. ³²P-меченые PHК-транскрипты получали T7-транскрипцией с использованием вышеуказанных ДНК-матриц, как описано в [264], и очищали электрофорезом в денатурирующем ПААГ с последующей элюцией из геля и осаждением этанолом. PHK-транскрипты со статистически включенными остатками s⁴U получали при добавлении в реакционную смесь s⁴UTP в соотношении 1 к 5 к нормальному UTP.

2.2.5.3 Оценка связывания eS1 с PHK-транскриптами методом фильтрования через нитроцеллюлозные фильтры

Связывание ³²Р-меченых РНК-транскриптов с белком eS1 проводили в объеме 20 мкл в буфере связывания, содержащем 20 мМ HEPES-KOH (pH 7.5), 100 мМ KCl, 2.5 мМ MgCl₂, 0.05% Triton-X100 и 1мМ 2-меркаптоэтанол, при 25°C в течение 30 мин. Концентрацию eS1 варьировали в пределах 0.1–1 мМ при постоянной концентрация PHK-транскрипта (<0.1 нМ). Степень связывания PHK-транскриптов с eS1 определяли с помощью фильтрования

соответствующих смесей через нитроцеллюлозные фильтры с диаметом пор 0.45 мкМ (GE Healthcare). Радиоактивность, оставшуюся на фильтрах, измеряли, как описано в [265].

2.2.5.4 Анализ связывания eS1 с PHК-транскриптами с помощью метода задержки в геле

Связывание eS1 и ³²P-меченых PHK-транскриптов проводили, как описано выше (раздел 2.2.5.3), с небольшим изменением, касающимся присутствия в смеси 5% глицерина. Свободную PHK и PHK, связанную в комплекс с eS1, разделяли электрофорезом в 6%-ном ПААГ в нативных условиях (25 мМ Трис-HCl (pH 7.5) и 200 мМ глицин). Электрофорезную камеру предварительно охлаждали до 4°C и при проведении электрофореза помещали в лёд. После разделения гель высушивали и радиоавтографировали.

2.2.5.5 Химический пробинг U11 мяРНК-транскрипта, связанного в комплекс с eS1

Связывание РНК-транскрипта с eS1 проводили в объеме 20 мкл в буфере связывания, содержащем 20 мМ HEPES-KOH (pH 7.5), 100 мМ KCl, 2.5 мМ MgCl₂, 0.05% Triton-X100, 5% глицерина и 1мМ 2-меркаптоэтанол, в течение 30 мин при 25°С; концентрация РНК была 1 мМ, концентрация белка – 2 мМ. Пробинг РНК с использованием СМСТ проводили, добавляя к раствору РНК одну треть объема свежеприготовленного раствора, содержащего 200 мМ СМСТ и 50 мМ HEPES-КОН (рН 8.0), с последующей инкубацией реакционной смеси при 37°С в течение 15 мин. Реакцию останавливали добавлением 2-меркаптоэтанола до концентрации 100 мМ, РНК выделяли с помощью метода фенол-хлороформной экстракции с последующим осаждением этанолом. Пробинг РНК BzCN проводили при добавлении BzCN к раствору РНК до концентрации 80 мМ. После инкубации в течение 2 мин при комнатной температуре реакцию останавливали посредством добавления одного объема воды с последующим выделением РНК, как указано выше. Гидроксил-радикальный пробинг проводили, как описано в [266]. Реакцию обратной транскрипции на модифицированных РНК проводили в объеме 10 мкл при 42°С в течение 30 мин. Реакционная смесь содержала 1–2 пмоль РНК, 5 пмоль 5'-³²Рмеченого ТЗ-праймера (Таблица 2), 0.5 мМ dNTP и 1 ед. обратной транскриптазы AMV (Invitrogene) в буферном растворе 50 мМ Трис-HCl (pH 8.3), 75 мМ KOAc, 8 мМ Mg(OAc)₂ и 10 мМ DTT. Продукты реакции осаждали с помощью этанола, растворяли в формамиде, содержащем 0.1% бромфенолового синего и 0.1% ксилен-цианола, и разделяли в денатурирующем 8%-ном ПААГ. Гель высушивали и радиоавтографировали.

2.2.5.6 Иммунопреципитация eS1-содержащих комплексов из ядерного и цитоплазматического экстрактов HEK293 и анализ PHK

Для типичного эксперимента выращивали 10⁸ адгезионных клеток HEK293. Клеточный осадок ресуспендировали в 3 мл буфера лизиса, содержащего 25 Мм Трис-HCl (pH 7.5), 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0.5% NP-40 и 30 мкл ингибитора протеаз (Sigma). Ядра клеток осаждали с помощью центрифугирования при 1800 g и 4°С в течение 1 мин. Цитоплазматический экстракт после осаждения ядер осветляли центрифугированием при 20000 g и 4°C в течение 10 мин. Ядерный экстракт получали ресуспендированием ядер в 3 мл вышеупомянутого буфера лизиса, содержащего 1% NP-40 и 5% глицерина. Суспензию 10 раз пропускали через шприц (1мл) с иглой 29G и затем осветляли с помощью центрифугирования в течение 10 мин при 20000 g и 4°С. К 1 мл ядерного или цитоплазматического экстракта добавляли 30 мкл конъюгатов Protein G, связанных с антителами анти-eS1. Иммунопреципитацию Dynabeads рибонуклеопротеидных комплексов, содержащих eS1, проводили при 4°C в течение 4 ч при перемешивании. После этого конъюгаты трижды промывали (по 1 мл) буферным раствором, содержащим 20 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 500 мМ КСl и 0.5% NP-40. Для извлечения PHK конъюгаты ресуспендировали в 50 мкл раствора, содержащего 20 мМ Трис-HCl (рН 7.5) и 1% SDS, и инкубировали в течение 5 мин при 95°С, после чего выделили РНК методом фенолхлороформной экстракции с последующим осаждением этанолом. Полученные препараты РНК служили матрицами при приготовлении кДНК с помощью обратной транскрипции с использованием random-праймера n(N)₆ и ревертазы SuperScript IV reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific), которую проводили согласно протоколу производителя. На синтезированных препаратах кДНК проводили ПЦР с использованием в качестве праймеров RNU11 Frt и preRNU11 Rrt, RNU11 Frt и 11R, а также 12F и 12R для амплификации U11 пре-мяРНК, U11 мяРНК и U12 мяРНК соответственно, а также 9F и 9R для амплификации U5 мяРНК (Таблица 2). Полученные ПЦР-продукты разделяли в 3%-ном агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией с помощью Chemi-Doc XRS (BioRad).

2.2.5.7 Установление участка белка eS1, сшивающегося с U11 мяРНК

Связывание ³²Р-меченого РНК-транскрипта, соответствующего U11 мяРНК и содержащего статистически включенные остатки s⁴U, с ^{(His)6-FLAG}eS1 проводили, как описано выше в разделе 2.2.5.3. Реакционную смесь облучали мягким УФ-светом, как описано в разделе 2.2.3.1.1, и затем обрабатывали РНКазой T1 (50 ед./мкл) в течение 10 мин при 37°С с последующей очисткой фрагметов РНК, сшитых с ^{(His)6-FLAG}eS1, в 15%-ном SDS-ПААГ.

Кусочки геля, соответствующие аддуктам, вырезали, высушивали и использовали для обработки протеолитическими агентами. При обработке CNBr кусочек геля инкубировали в 100 мкл 70%-ной муравьиной кислоты, содержащей 0.25 М CNBr, в течение 15 ч при комнатной температуре. Продукты гидролиза элюировали из геля в процессе реации, полученный раствор испаряли на вакуумной сушилке. Для обработки IOBz кусочки геля помещали в 100 мкл раствора, содержащего 60 мг/мл IOBz, 80% уксусной кислоты и 1.5 М гуанидин-HCl, и инкубировали при 37°С в течение 15 ч. Продукты гидролиза осаждали из реакционной смеси, добавляя 1 мл этанола, с последующим центрифугированием в течение 30 мин при 20000 g и 4°C. Обработку эндопептидазой ArgC проводили, инкубируя кусочек геля в 100 мкл раствора, содержащего 25 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 5 мМ CaCl₂, 2 мМ ЭДТА, 5 мМ DTT и 0.01 мкг/мкл Arg-C, в течение 16 ч при 37°C. По окончании инкубации этот раствор испаряли на вакуумной сушилке. Полученные в результате описанных выше реакций пептидные фрагменты, сшитые с фрагментами РНК, разделяли в 16.5%-ном трис-трициновом SDS-ПААГ. В качестве маркера молекулярных масс использовали Ultra-low molecular weight marker (MW 1.1-26.6 кДа, Sigma Aldrich). Гель высушивали и радиоавтографировали. Для проведения последовательных реакций расщепления кусочки из геля, полученные после первого раунда протеолитических реакций, подвергали обработке реагентов второго раунда, как описано выше, и далее также разделяли в 16.5%-ном трис-трициновом SDS-ПААГ с последующим высушиванием геля и радиоавтографией.

Для анализа участков U11 мяРНК, сшивающихся *in vitro* с eS1, проводили связывание ³²P-меченого PHK-транскрипта, соответствующего U11 мяРНК и содержащего статистически включенные остатки s⁴U, с ^{(His)6-FLAG}eS1 с последующим облучением, как описано выше. После этого в реакционную смесь добавляли протеиназу К (0.01 мг/мл), и смесь инкубировали в течение 10 мин при 37°C. PHK выделяли методом фенол-хлороформной экстракции и использовали в качестве матрицы в реакции обратной транскрипции (аналогично тому, как описано в разделе 2.2.5.5). Продукты реакции разделяли в 8%-ном денатурирующем ПААГ после чего гель высушивали и радиоавтографировали.

2.2.5.8 Оценка уровня U11 пре-мяРНК в клетках, дефицитных по eS1, с помощью ПЦР в реальном времени

Реакционная смесь содержала 1 мкг тотальной клеточной РНК из клеток HEK293, дефецитных по eS1 (см. раздел 2.2.3.4), 2.5 мМ random-праймер $d(N)_6$ (Thermo Fisher Scientific) и 200 ед. акт. обратной транскриптазы Superscript IV (Thermo Fisher Scientific). Реакцию обратной транскрипции проводили согласно протоколу производителя фермента. Реакции ПЦР

в реальном времени проводили на CFX96 thermal cycler (Bio-Rad) с использованием SYTO82 в качестве флюоресцентного реагента. В качестве праймеров использовали пару RNU11 Frt и preRNU11 Rrt для оценки уровня U11 пре-мяРНК и пару GAPDH-F и GAPDH-R (Таблица 2) для оценки уровня мРНК GAPDH, относительно которого проводили нормализацию уровня U11 пре-мяРНК. Эксперименты воспроизведены в четырех биологических повторах, каждый в четырех технических повторах.

2.2.5.9 Валидация результатов анализа данных РНК-сек для клеток, дефицитных по eL29, с помощью ПЦР в реальном времени

Реакционная смесь содержала 5 мкг тотальной клеточной РНК, выделенной из клеток НЕК293, трансфицированных контрольными и специфичными против eL29 siPHK (см. раздел 2.2.2.2), 100 пмоль random-праймера d(N)₆ (Thermo Fisher Scientific) и 100 ед. акт. обратной транскриптазы Maxima H Minus reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific). Реакцию обратной транскрипции проводили согласно протоколу производителя фермента. Полученные кДНК служили в качестве матриц для ПЦР в реальном времени, которую проводили на приборе LightCycler 96 (Roche) с использованием флюоресцентного красителя, упоминавшегося в разделе 2.2.5.8, и набора специфичных праймеров для оценки уровней мРНК генов HYRRAD23, TFAM, CHCHD3, G3BP1, CLIC4, RPL29 и GAPDH (Таблица 2). Уровни экспрессии первых шести генов нормализованы относительно уровня экспрессии гена GAPDH. Эксперимент проводили в трёх биологических повторах. Количественную оценку относительного уровня экспрессии целевых генов проводили путем нормализации уровней их экспрессии к уровню экспрессии GAPDH с помощью интегрированного в LightCyler 96 программного обеспечения. Анализ полученных данных проведён с помощью GraphPad Prism (версия 8.3.0) с использованием статистического критерия Манна-Уитни. Корреляционный тест Пирсона между значениями Log2Fold change, полученными на основании анализа данных PHK-сек и оцененными с помощью количественной ПЦР, выполнен с помощью функции cor.test из пакета R Stats.

2.2.5.10 Аффинное сшивание s⁴U-содержащих аналогов мРНК с 80S рибосомами

Рибосомные 40S и 60S субчастицы выделяли из плаценты человека, как описано в [267]. Очищенные тРНК^{Phe} (~80%) и тРНК^{Val} (~70%) из *E. coli* были любезно предоставлены В.И. Катуниным (Санкт-Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра Курчатовский институт, Гатчина, Россия). Дрожжевая тРНК^{Аsp} получена с помощью Т7-транскрипции *in vitro*, как описано в [268]. ДНКматрицы для синтеза *in vitro* мРНК-аналогов I-IV со статистически встроенными остатками s^4U получены с помощью гибридизации олигодезоксирибонуклеотидов F-Asp и R-Asp, F-PheAsp и R-PheAsp, F-PheVal и R-PheVal, а также F-PheVal(C-rich) и R-PheVal(C-rich) соответственно. Реакцию Т7-транскрипции проводили, как описано в [266]. Концентрация UTP и s⁴UTP в реакционных смесях была 0.5 мМ. По окончании реакции синтезированные РНК-транскрипты очищали электрофорезом в денатурирующем 12%-ном ПААГ и использовали в качестве аналогов мРНК. Метку ³²Р по 5'-концам тРНК или аналогов мРНК, если было необходимо, вводили с использованием [у-³²P]-АТР и Т4 ПНК после их дефосфорилирования с помощью FastAP щелочной фосфатазы (Thermo Fisher Scientific). Комплексы 80S рибосом с мРНК и тРНК, с кодон-антикодоновыми взаимодействиями в Р-участке или одновременно в А- и Ручастках получены, как описано в [70]. Степень связывания с 80S рибосомами ³²P-меченых тРНК^{Аsp} или тРНК^{Phe}, а также ³²Р-меченых мРНК измеряли с помощью фильтрования комплексов через нитроцеллюлохный фильтры, как описано в [70]. Для фотоаффинного сшивания аналогов мРНК I-IV в тройном комплексе с кодон-антикодоновым взаимодействием в Р-участке в реакционную смесь добавляли 80S рибосомы (0.83 мкМ), ³²Р-меченые аналоги мРНК (2 мкМ) и тРНК (7 мкМ) в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl (рН 7.5), 100 мМ КСl, 13 мМ MgCl₂ и 0.5 мМ ЭДТА. Для сшивания аналогов мРНК II и III в четверных комплексах с кодон-антикодоновыми взаимодействиями одновременно в А- и Р-участках в реакционую смесь добавляли соответствующие тРНК до концентрации 13 мкМ. После инкубации в условиях связывания реакционные смеси облучали мягким УФ светом (см. раздел 2.2.3.1.1) с последующим разделением продуктов сшивок электрофорезом в 12%-ном денатурирующем SDS-ПААГ. Идентификацию рибосомных белков, сшитых с аналогами мРНК, проводили, принимая во внимание установленные ранее эффекты олигонуклеотидных фрагментов, ковалентно связанных с рибосомными белками, на электрофоретическую подвижность последних по сравнению с таковой соответствующих немодифицированных белков [5, 64, 70, 269].

2.2.6 Анализ структурных моделей 40S рибосомных субчастиц и моделей U1 мяРНК

Для анализа PDB-файлов моделей рибосомных субчастиц использовали PyMol и Chimera [270]. Для анализа аминокислотной последовательности eS1 использовали онлайн-платформу BindN+ [271] с параметром специфичности 90%.

ГЛАВА З. НОВЫЕ ФУНКЦИИ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ eS1, uS19 И eL29 ЧЕЛОВЕКА, ВЫЯВЛЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ, ОСНОВАННЫХ НА ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОМ СЕКВЕНИРОВАНИИ РНК (РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ)

3.1 Результаты

Накопление данных об участии рибосомных белков в составе рибосомы и вне её во множестве клеточных процессов стимулировало интерес к выявлению неизвестных ранее функций рибосомных белков млекопитающих. В литературе описано много примеров внерибосомных функций рибосомных белков, в основе которых лежит их взаимодействие с клеточными РНК (помимо рРНК) [15, 171, 175, 219, 220]. Ряд других примеров касается их функций, опосредованных белок-белковыми взаимодействиями [125, 272]. Однако в большей части подобных работ авторы ограничиваются лишь описанием эффектов на клеточные культуры или модельные организмы, возникающих в результате дефицита определенного рибосомного белка или наличия мутации в кодирующем его гене [23, 32]. Имеются лишь проясняют единичные работы, которые конкретную роль определенных мотивов, предоставляемых отдельными рибосомными белками в качестве структурных элементов функциональных центров рибосом [253, 273]. В данной работе с помощью современных клеточных технологий, включающих высокопроизводительное секвенировании РНК, была предпринята попытка выявить новые функции рибосомных белков eS1, uS19 и eL29 и идентифицировать клеточные процессы или события, происходящие с их участием.

Метод PAR-CLIP использован для идентификации неизвестных ранее взаимодействий клеточных PHK с белками eS1 и uS19. Этот метод основан на сшивании PHK и белков в живых клетках, выращенных в культуральной среде, содержащей фотоактивируемые аналоги нуклеозидов (s⁴U или s⁶G) с последующей иммунопреципитацией продуктов сшивки и определением последовательностей сшитых PHK с помощью высокопроизводительного секвенирования [36]. Добавление в культуральную среду s⁴U или s⁶G приводит к статистическому включению соответствующих нуклеотидных остатков в синтезируемые молекулы PHK, что обеспечивает их эффективное сшивание с белками при облучении клеток мягким УФ светом (365 нм). К преимуществам PAR-CLIP по сравнению с другими CLIP-методами (HITS-CLIP [34] или iCLIP [35]), где PHK-белковые сшивки генерируются с помощью прямого УФ облучения тканей или клеток, относится тот факт, что остатки фотоактивируемых аналогов нуклеотидов, будучи встроенными в PHK, значительно повышают эффективность их сшивания с белками. Кроме того, присутствие таких остатков в PHK позволяет определять

сайты сшивки в их последовательностях по появлению характеристических транзиций T/C или G/A в сиквенсных ридах от образцов клеток, выращенных в присутствии s⁴U или s⁶G соответственно (A/G или C/T для сиквенсных ридов, соответствующих PHK, кодируемых минус цепями ДНК). Эти транзиции возникают вследствие того, что при приготовлении ДНК библиотек из фрагментов PHK, сшитых с остатками пептидов целевого белка, с помощью обратной транскрипции напротив остатков s⁴U или s⁶G, участвующих в сшивках, чаще оказываются остатки G или T [36, 274], потому что ревертаза распознает эти сшитые остатки как C или A соответственно.

Метод РНК-сек, основанный на полногеномном секвенировании РНК, применен для изучения влияния дефицита рибосомного белка eL29 на транскриптом клеток HEK293. Данный метод позволяет оценить содержание всех клеточных РНК, обеспечивая тем самым возможность определения тех генов, чья экспрессия изменяется на уровне транскриптома вследствие какого-либо воздействия на клетки [37]. Под изменениями можно рассматривать как изменения внешней среды (состав культуральной среды, изменение температуры, отсутствие кислорода и т.д.), так и изменения в качестве и количестве внутренних компонентов самих клеток (например, снижение уровня белка в клетке, наличие мутации в его последовательности и т.д.). Искусственно создавая определенные условия, например, снижая уровень определенного (изучаемого) белка в клетке посредством РНК-интерференции, с помощью РНК-сек можно увидеть, каким образом клетка ответит на данное изменение и как изменится при этом экспрессия генов на уровне транскриптома. Полученные данные позволяют сделать заключения о том, экспрессия каких генов зависит от баланса данного белка в клетке и в какие клеточные процессы он вовлечен.

3.1.1 Определение клеточных РНК-партнеров рибосомного белка eS1

Рибосомный белок eS1 (ранее классифицируемый как S3a) – один из самых больших белков 40S субчастицы, его молекулярная масса ~31 кДа, а длина – 243 аминокислотных остатка. Этот белок не имеет гомологов среди рибосомных белков бактерий – он специфичен для эукариот и архей. В составе 40S субчастицы eS1 принимает участие в работе трансляционной машины; в частности, он взаимодействует с фактором трансляции eIF3 и участвует в формировании сайта связывания для IRES-элемента вируса гепатита С [15, 16, 266, 275]. Однако о его функционировании вне рибосомы известно достаточно мало. Тем не менее, в ряде работ встречается упоминание о том, что eS1 может быть вовлечен в определенные клеточные процессы, помимо трансляции. В работах начала 1990 годов сообщалось, что ген, кодирующий eS1, идентичен гену белка Fte-1 (эффектор трансформации v-fos) и TNF-αиндуцированному мышиному гену TU-11 [276] и что его экспрессия нарушается в v-fosтрансформированных и опухолевых клетках крысы [277, 278]. Позже показано, что eS1 вовлекается в такие клеточные процессы, как регуляция клеточного цикла и развитие [278], клеточная трансформация [278, 279] и апоптоз [279]. Например, eS1 взаимодействует с транскрипционным фактором CHOP (от англ. CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein), ингибируя его способность ускорять дифференцировку клеток эритроидного ряда [20]. Кроме того, установлено, что eS1 через связывание с анти-апоптотическим фактором Bcl-2 (от англ. B-cell lymphoma 2) подавляет активность PARP, приводя к остановке апоптоза [19, 280].

Ядерный eS1 способен связываться с фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфатом, важным вторичным посредником в передаче клеточного сигнала при ответе на различные стимулы, что послужило основанием для предположения о вовлечении PI-3-киназы в сигнальные каскады, апоптоз опосредованно eS1 способности промотирующие через [281]. Кроме взаимодействовать в составе рибосомы с IRES-элементом вируса гепатита C, eS1 проявляет сродство к специфическим структурным элементам некоторых других вирусов вне аппарата трансляции. Так, в человеческих В-клетках, трансформированных вирусом Эпштейн-Барр, eS1 связывается с EBNA-5 – белком, кодируемым вирусом. что приводит к увеличению уровня eS1 в трансформированных В-лимфоцитах [247] Относительно недавно показано, что повышение уровня eS1 в клетках гепатоцеллюлярной карциномы, ассоциированной с вирусом гепатита В, НВх-индуцированного обусловленного приводит к усилению NF-kB сигналинга, взаимодействием eS1 с HBx – белком X, кодируемым геномом этого вируса и известным как важный участник прогрессирования этого вида рака [125]. Интересен тот факт, что повышенный уровень eS1 в клетках гепатоцеллюлярной карциномы способствует большей растворимости склонного к агрегации HBx, поэтому в данном контексте он может рассматриваться как шаперон [125]. В работе [272] схожая активность выявлена у дрожжевого eS1, которая связана с предотвращением агрегации α-синуклеина. При болезни Паркинсона накопление агрегатов α-синуклеина в тельцах Леви считают маркером, связанным с гибелью нейронов [282, 283]. Исследования с использованием мутантных форм eS1 показали, что за шапероноподобную активность ответственен его N-концевой участок 1-50 [125, 272]. Встречаются также работы, в которых изучен эффект снижения уровня eS1 в живых организмах, вызванного с помощью РНК-интерференции. В частности, показано, что дефицит eS1 приводит к нарушениям развития яичников у Drosophila melanogaster [284] и может вносить определенный вклад в арест цикла развития яичников у москитов *Culex pipiens* [285].

3.1.1.1 Предсказание участка связывания в eS1 для клеточных PHK

Анализ крио-ЭМ моделей рибосом [40, 286], доступных на момент выполнения данной работы, показал, что eS1 расположен в так называемой «платформе» 40S субчастицы недалеко от участка выхода мРНК. Согласно этим моделям, центральная часть eS1, являющаяся глобулярной, представлена слабо контактирующими С- и N-терминальными доменами (СТD и NTD соответственно), тогда как его длинные N- и C-концевые участки остались не разрешенными, что позволяет предполагать, что они не структурированы и лабильны (Рисунок 17 А). Кроме того, из данных моделей следовало, что большинство контактов этого белка с 18S рРНК осуществляется за счёт его СТD. Анализ аминокислотной последовательности eS1 с помощью программы BindN+ [271], позволяющей предсказать остатки белка, потенциально способные принимать участие в связывании РНК, выявил в дополнение к остаткам, которые в основном соответствуют участку eS1, контактирующему с 18S PHK в 40S субчастице, дополнительный РНК-связывающий участок в его не структурированном N-концевом хвосте (Рисунок 17 Б). Поскольку этот участок eS1 не вовлекается во взаимодествие с 18S рРНК, следовательно, он не участвует в формировании структуры 40S субчастицы. Обнаружение этого участка в первичной структуре eS1 позволило предположить, что данный белок может участвовать во взаимодействиях с клеточными РНК, будучи вне рибосомы.



Рисунок 17. РНК-связывающие участки человеческого рибосомного белка eS1. (А) Слева – расположение eS1 (выделен красным) в 40S субчастице рибосомы согласно крио-ЭМ модели её

пространственной структуры (PDB ID: 4V6X [40]), где 18S pPHK показана серым цветом, а рибосомные белки – зелёным. Справа – увеличенное изображение структуры eS1, вычлененной из структуры 40S субчастицы. (Б) Аминокислотная последовательность eS1 человека. Красным выделены аминокислотные остатки, способные к участию во взаимодействии с PHK, согласно предсказанию программы BindN+. Светло-голубые и фиолетовые точки над последовательностью обозначают аминокислотные остатки eS1, которые вовлечены во взаимодействие с 18S pPHK согласно двум различным крио-ЭМ моделям 40S субчастицы (PDB ID: 4V6X [40] и PDB ID: 5AJ0 [286] соответственно). Участки белка, не разрешенные на этих моделях, обозначены синей пунктирной линией.

3.1.1.2 Характеризация стабильной клеточной линии, продуцирующей ^{FLAG}eS1, и внутриклеточное сшивание РНК с этим белком

Для поиска РНК, взаимодействующих с eS1, с помощью метода PAR-CLIP использована стабильная клеточная линия на основе НЕК293, полученная с использованием плазмидной конструкции, обеспечивающей способность клеток продуцировать FLAG-меченый eS1 (FLAGeS1) человека в ответ на добавление DOX (Рисунок 18 А). С помощью вестерн-блот анализа с использованием антител против eS1 показано, что FLAGeS1 нарабатывается в клетках этой линии в количестве, не превышающем количество соответствующего эндогенного белка, не влияя заметно на уровни других белков домашнего хозяйства клетки (Рисунок 18 А). Функциональная активность ^{FLAG}eS1 проверена посредством вестерн-блот анализа фракций полисомного профиля, полученного центрифугированием соответствующего цельноклеточного лизата в градиенте плотности сахарозы, с использованием антител против FLAG-эпитопа. Из Рисунка 18 Б видно, что FLAGeS1 присутствует во всех фракциях градиента, включая те, что соответствуют активным в трансляции 80S рибосомам. Кроме того, сравнение полисомных профилей нормальных клеток НЕК293 и соответствующей линии клеток, стабильно продуцирующих ^{FLAG}eS1, не выявило каких-либо существенных различий между этими профилями. Все это свидетельствует о том, что N-концевой FLAG-эпитоп не влияет на функциональную активность eS1 и на трансляцию в целом. В то же время следует отметить, что уровень ^{FLAG}eS1 во фракции легких полисом несколько выше, чем во фракции тяжелых полисом, что может указывать на то, что рибосомы, содержащие FLAGeS1, менее активны в трансляции, чем нормальные рибосомы. Тем не менее, полученная стабильная линия клеток НЕК293, продуцирующая FLAGeS1, является вполне подходящей для выявления PHK-партнеров рибосомного белка eS1 с помощью метода PAR-CLIP.

Общая схема проведения эксперимента с помощью метода PAR-CLIP выглядит следующим образом. Клетки, продуцирующие ^{FLAG}eS1 и выращенные в культуральной среде с



Рисунок 18. Продукция ^{FLAG}eS1 стабильной линией клеток на основе HEK293 и проверка его способности встраиваться в 40S рибосомные субчастицы и участвовать в качестве её компонента 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 $^{His6-GLAG}eS1$, используемому в качестве маркера. Стрелками справа указаны положения $^{FLAG}eS1$ и eS1, а также uS2 и тубулина, взятых в качестве референсных белков. (Б) Полисомные профили клеток до (DOX-) и после (DOX+) обработки DOX, полученные центрифугированием соответствующих цельноклеточных лизатов в градиенте плотности сахарозы, и вестерн-блот анализ градиентных фракций с использованием антител: анти-FLAG, анти-eS1 и анти-eS4 на содержание $^{FLAG}eS1$ и eS4 (в качестве контроля). Гистограммы ниже панелей вестерн-блота отражают относительные уровни $^{FLAG}eS1$ и eS4 (слева) и eS1 и eS4 (справа). Неокрашенные столбики соответствуют относительному уровню eS1 (или $^{FLAG}eS1$), чёрные столбики – относительному уровню eS4.

добавлением s⁴U или s⁶G, после облучения мягким УФ подвергали лизису с последующей обработкой лизата РНКазой Т1. Сшитый с фрагментами РНК ^{FLAG}eS1 вместе со свободным ^{FLAG}eS1 извлекали из обработанного лизата с помощью иммунопреципитации с использованием анти-FLAG антител, иммобилизованных на магнитных частицах, с последующим ³²P-мечением фрагментов РНК, ковалентно связанных с ^{FLAG}eS1. Фрагменты РНК, сшитые с ^{FLAG}eS1, очищали с помощью электрофореза в денатурирующем SDS-ПААГ с последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану. Этот перенос проводили во избежание контаминации целевых продуктов сшивки фрагментами РНК, не специфически связавшимися с ^{FLAG}eS1 и имеющими электрофоретическую подвижность, сходную с таковой у целевых продуктов. Из радиоавтографа мембраны (Рисунок 19) видно, что наиболее интенсивное сшивание происходит в клетках, выращенных в присутствии s⁴U. Поэтому этот аналог нуклеозидов использован в последующем эксперименте, выполненном в трех биологических повторах.

Фрагменты РНК, сшитые с остатками пептидов ^{FLAG}eS1, элюированы из соответствующих фрагментов мембраны после обработки последних протеиназой К, и на основе этих фрагментов приготовлены ДНК-библиотеки для последующего высокопроизводительного секвенирования.



Рисунок 19. Внутриклеточное сшивание ^{FLAG}eS1 с PHK, обнаруженное с помощью PAR-CLIP. Радиоавтограф мембраны, на которую перенесены целевые продукты сшивки после их предварительной очистки электрофорезом в SDS-ПААГ (верхняя панель), и вестерн-блот анализ той же мембраны с (нижняя панель). использованием анти-eS1 антител Стрелки указывают положения немодифицированного (FLAGeS1) и сшитого с фрагментами РНК (FLAGeS1*) целевого белка. Первые две дорожки слева соответствуют облученным клеткам, выращенным на культуральной среде с добавлением s^4U или s^6G , а остальные две дорожки, обозначенные (–), относятся к клеткам, выращенным без добавления фотоактивируемых аналогов нуклеозидов, с последующим облучением УФ (+) или без облучения (-).

3.1.1.3 Анализ данных высокопроизводительного секвенирования ДНК-библиотек на основе фрагментов клеточных РНК, сшивающихся с ^{FLAG}eS1

Анализ данных высокопроизводительного секвенирования фрагментов клеточных РНК, сшивающихся с eS1, выявил, наряду с большим количеством сиквенсных ридов, относящихся к pPHK (что было ожидаемо), также риды, соответствующие другим клеточным PHK. Поскольку контакты между eS1 и 18S pPHK известны благодаря вышеупомянутым крио-ЭМ моделям рибосом, риды, относящиеся к pPHK, исключены из последующего анализа. После картирования оставшихся ридов на геном человека идентифицированы кластеры ридов, содержащие характеристические T/C-транзиции, при этом из рассмотрения удалены риды, наблюдаемые в контрольном эксперименте с клетками, выращенными в присутствии s⁴U, но не облученными УФ. Таким образом, удалось идентифицировать две основные мишени eS1, которыми оказались PHK, кодируемые генами *RNU11* и *RNU5A-1*. Продукты этих генов, U11 мяPHK и U5 мяPHK, являются компонентами сплайсосомы, рибонуклеопротеидного комплекса, участвующего в сплайсинге интронов, созревающих пре-мРНК. Существует два типа сплайсосом – мажорная (U2-зависимая) и минорная (U12-зависимая), которые осуществляют сплайсинг мажорных (GT-AG) и минорных (AT-AC) интронов соответственно [287-289]. U5 мяРНК входит в состав как мажорной, так и минорной сплайсосом, тогда как U11 мяРНК является компонентом только минорной сплайсосомы, и её уровень в клетке на несколько порядков ниже, чем уровень U5 мяРНК [289-291]. Анализ распределения T/C-транзиций в ридах, соответствующих генам этих мяРНК, показал, что они расположены в T-богатых последовательностях без очевидного консенсуса (Рисунок 20 А). Картирование положений наиболее часто встречающихся транзиций на вторичные структуры U11 и U5 мяРНК позволило установить, что в сшивки с ^{FLAG}eS1 вовлекались одноцепочечный уридин-богатый участок U11 мяРНК, соответствующий так называемому Sm-сайту, и апикальная петля I U5 мяРНК (Рисунок 20 Б).



Рисунок 20. Идентификация основных мишеней рибосомного белка eS1. (A) Репрезентация из геномного браузера IGV регионов генома с сиквенсными ридами, соответствующими генам *RNU11* и *RNU5A-1*, полученными при высокопроизводительном секвенировании ДНК-библиотек на основе фрагментов клеточных PHK, сшивающихся с ^{FLAG}eS1. T/C транзиции, обнаруженные с помощью биоинформатического анализа данных секвенирования, обозначены синими черточками над остатками тимидина (T), выделенными красным в референсной последовательности. (Б) Вторичные структуры U11

мяРНК и U5 мяРНК человека (согласно [289]) с указанием остатков уридина (выделены красным), соответствующих характеристическим Т/С-транзициям. Положения с наибольшей частотой встречаемости Т/С-транзиций (частота >5%) выделены большими буквами.

Известно, что Sm-caйт присутствует практически во всех U мяPHK. Однако следует отметить, что в зрелых мяPHK этот участок упакован так называемым кором Sm-белков [292-294], которые связываются в процессе созревания предшественников мяPHK в течение цитоплазматической фазы. Упакованные Sm-белками зрелые мяPHK импортируются в ядро, где подвергаются различным пост-транскрипционным модификациям. В свете этого можно предположить, что eS1 взаимодействует с предшественником U11 мяPHK в ядре до момента выхода последнего в цитоплазму. Чтобы проверить это предположение, проведена иммунопреципитация комплексов PHK с eS1, из ядерного и цитоплазматического экстрактов клеток НЕК293 с помощью антител к eS1, иммобилизованных на магнитных частицах, с последующим извлечением PHK, образцы которых использованы в OT-ПЦР с праймерами, специфичными к U11 пре-мяPHK. Один из этих праймеров соответствовал участку зрелой U11 мяPHK, а другой – участку 3'-удлиненной части U11 пре-мяPHK, которая удаляется при её процессинге. Результаты этого эксперимента (Рисунок 21 А, Б), указывают на то, что eS1 связывается с U11 пре-мяPHK в ядре и затем в таком состоянии экспортируется в цитоплазму.

Однако использование праймера, специфичного к U11 мяРНК, не позволило дискриминировать зрелую РНК от её предшественника, поэтому из результатов ОТ-ПЦР с этим праймером (Рисунок 21 Б) было не ясно, остается ли eS1 связанным со зрелой U11 мяРНК. Чтобы ответить на этот вопрос, ОТ-ПЦР была проведена также с праймерами, специфичными к U12 мяРНК, которая, как известно [289, 295], существует в виде димерного U11/U12 мяРНП, включающего зрелую U11 мяРНК. Оказалось, что U12 мяРНК, как и U11 мяРНК, коиммунопреципитируется с eS1 из ядерного экстракта клеток (Рисунок 21 В), что свидетельствует о том, что eS1 остается связанным со зрелой U11 мяРНК после её ре-импорта в ядро. Примечательно, что ОТ-ПЦР с праймерами, специфичными к U5 мяРНК/U5 пре-мяРНК, не выявила последних среди РНК, которые ко-иммунопреципитируются с eS1 (Рисунок 21 Г). Данный факт можно объяснить тем, что в клетке, возможно, не существует стабильного комплекса eS1•U5 мяРНК, который бы сохранялся в условиях иммунопреципитации. Соответственно дальнейшая часть работы была сфокусирована на изучении взаимодействия eS1 с U11 мяРНК в системе *in vitro*.



Рисунок 21. Иммунопреципитация разных мяРНК из клеточного экстракта клеток НЕК293 с использованием анти-eS1 антител. ОТ-ПЦР анализ РНК, ко-иммунопреципитированных (IP) с eS1 из ядерного (NE) или цитоплазматического (CE) экстрактов 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 специфичных праймеров для U11 пре-мяРНК (панель A), U11 мяРНК (панель Б), U12 мяРНК (панель B) и U5 мяРНК (панель Г), обозначены стрелками. Input – кДНК, приготовленная на основе препаратов РНК, выделенных из ядерного или цитоплазматического экстрактов.

3.1.1.4 Функциональная роль взаимодействия eS1 с U11 мяРНК

К настоящему времени нет данных о том, что U11 мяРНК существует в виде комплекса с eS1 или, что этот рибосомный белок является компонентом мажорной сплайсосомы, которые могли бы указывать на то, что eS1 связывается со зрелыми U11 и U5 мяPHK. С другой стороны, eS1 мог быть не обнаружен в таком виде из-за того, что был утерян в ходе выделения или очистки соответствующих комплексов [296, 297]. Чтобы установить функциональную роль взаимодействия eS1 с U11 мяРНК, получены клетки НЕК293, в которых уровень eS1 был понижен в 2-3 раза с помощью РНК-интерференции. Затем было проведено сравнение профилей транскриптомов клеток с пониженным уровнем eS1 и нормальных клеток с помощью РНК-сек. Анализ полученных данных показал, что для клеток с пониженным уровнем eS1 увеличивается доля ридов, приходящихся на участок генома, кодирующий непроцессированный 3'-конец U11 пре-мяРНК, тогда как доля ридов, соответствующих участку генома, кодирующему зрелую U11 мяРНК, снижается, по сравнению с нормальными клетками (Рисунок 22). Каких-либо значимых изменений в экспрессии других генов, включая те, что кодируют U5 мяРНК, не обнаружено. Кроме того, с помощью количественной ПЦР показано, что в клетках с пониженным уровнем eS1 уровень U11 пре-мяРНК примерно в 2 раза выше, чем

в нормальных клетках. Все эти данные свидетельствуют в пользу того, что eS1 участвует в процессинге 3'-конца U11 пре-мяРНК.

Принимая во внимание тот факт, что в клетках с пониженным уровнем eS1 повышается количество непроцессированой U11-пре-мяРНК и снижается уровень зрелой U11 мяРНК, логично ожидать изменений в уровне сплайсинга минорных интронов. В связи с этим с использованием вышеупомянутых данных РНК-сек 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 НЕК293 с пониженным уровнем eS1 соотношение количества ридов, относящихся к минорному интрону, и количества ридов, приходящихся на все интроны, для одного и того же гена 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.



Рисунок 22. Эффект снижения уровня eS1 в клетках HEK293. (А) Вестерн-блот анализ с использованием антител к eS1 и eS26 (взятого в качестве контроля) лизатов нормальных клеток HEK293 (трансфицированных вектором pSuper без вставки) и клеток HEK293 с пониженным уровнем eS1

(трансфицированных плазмидами pSuper анти eS1 против мРНК eS1). Использованные антитела указаны слева. (Б) На верхней панели фрагмент изображения из геномного браузера IGV, содержащий участок генома, соответствующий U11 пре-мяРНК. Показаны сиквенсные риды, полученные из анализа данных РНК-сек с образцами суммарной РНК из нормальных клеток НЕК293 (нижняя часть) и клеток с пониженным уровнем eS1 (верхняя часть). На нижней панели показан график, отражающий нормализованное относительное покрытие ридами участка генома (на основании двух биологических повторов), соответствующего U11 пре-мяРНК. Синяя линия – нормальные клетки НЕК293, красная линия – клетки с пониженным уровнем eS1. Синий прямоугольник под осью X указывает на координаты зрелой U11 мяРНК. (В) Анализ с помощью количественной ПЦР уровня U11 пре-мяРНК в нормальных клетках НЕК293 и клетках с пониженным уровнем eS1. Величина стандартной ошибки указана с учетом 4 биологических повторов (**p < 0.005). (Γ) Отношение покрытия минорных интронов к общему покрытию всех интронов для конкретного гена, рассчитанное на основании анализа данных РНК-сек с образцами суммарной РНК из нормальных клеток НЕК293 и клеток с пониженным уровнем eS1. Приведены результаты для 9 генов, содержащих минорные интроны, с самым высоким покрытием (наибольшим значением RPKM). Величина ошибки – стандартное отклонение на основании трех биологических повторов (**p < 0.01).

3.1.1.5 Связывание eS1 с U11 мяРНК in vitro

Для исследования связывания eS1 с U11 мяРНК использованы рекомбинантный ^{His6-} FLAGeS1, полученный в системе *E.coli*, и ³²Р-меченый U11 мяРНК-транскрипт (здесь и далее называемый U11 мяРНК), синтезированный с помощью T7 PHК полимеразы, а также 40S субчастицы рибосом человека. Кажущаяся константа ассоциации (Ka) U11 мяРНК с eS1, рассчитанная из соответствующей изотермы связывания, полученной с помощью стандартного метода фильтрования на нитроцеллюлозных фильтрах (Рисунок 23 A), составляет $3.8 \pm 1.2 \times 10^7$ М⁻¹, тогда как связывания U11 мяРНК с 40S субчастицами не наблюдали. Вместе с тем известно, что рибосомные белки склонны к агрегации из-за наличия в их первичных структурах большого количества положительно заряженных аминокислотных остатков [298, 299], что может приводить к образованию неспецифичных нерастворимых комплексов. Следовательно, из-за возможного присутствия такого рода комплексов в смеси, содержащей специфические комплексы U11 мяРНК с ^{His6-FLAG}eS1, величина *Ка*, рассчитанная из соответствующей изотермы связывания, может быть несколько завышенной. Для более точной характеризации связывания U11 мяРНК с eS1 применен метод задержки в геле (гель-ретардация). Важной особенностью этого метода является то, что тяжелые нерастворимые агрегаты остаются в карманах геля, и только растворимые комплексы способны мигрировать сквозь его поры. С помощью метода задержки в геле установлено, что eS1, связываясь с U11 мяРНК, способен уменьшать её электрофоретическую подвижность вследствие формирования двух типов комплексов с разной электрофоретической подвижностью, которые, вероятно, различаются по своей структуре, о чем свидетельствует появление на радиоавтографе двух отчетливых хорошо разрешенных полос (Рисунок 23 Б).



Рисунок 23. Связывание ³²Р-меченых мяРНК-транскриптов с ^{His6-FLAG}eS1 и 40S рибосомными субчастицами. (А) Изотермы связывания U11 мяРНК с ^{His6-FLAG}eS1 (1) и 40S рибосомными субчастицами (3), а также U11 (Δ Sm) мяРНК с ^{His6-FLAG}eS1 (2), полученные методом фильтрования через нитроцеллюлозные фильтры. (Б и В) Анализ образования комплексов ^{His6-FLAG}eS1 (в различных концентрациях) с U11 мяРНК и U11 (Δ Sm) мяРНК соответственно методом задержки в геле. Справа от панелей буквами обозначены положения свободной РНК (R), её комплекса с ^{His6-FLAG}eS1 (C) и агрегатов (A). (Г) Ингибирующий эффект (рU)₈ на связывание ³²Р-меченой U11 мяРНК с ^{His6-FLAG}eS1 (0.15 М), оцененный с помощью метода фильтрования через нитроцеллюлозные фильтры. (Д и Е) Анализ образования комплексов ^{His6-FLAG}eS1 (0.15 М) с U11 мяРНК и U11 (Δ Sm) мяРНК и U11 (Δ Sm) мяРНК и U11 (Δ Sm) мяРНК терез нитроцеллюлозные фильтры. (Д и Е) Анализ образования комплексов ^{His6-FLAG}eS1 (0.15 М) с U11 мяРНК и U11 (Δ Sm) терез нитроцеллюлозные фильтры. (Д и Е) Анализ образования комплексов ^{His6-FLAG}eS1 (0.15 М) с U11 мяРНК и U11 (Δ Sm) мяРНК) соответственно в присутствии (pU)₈ с помощью метода задержки в геле. Буквы справа от панелей обозначают то же самое, что в панелях Б и В.

Для установления вклада Sm-сайта в связывание U11 мяРНК с eS1 получен ³²P-меченый T7 транскрипт, соответствующий её усеченной с 3'-конца форме без Sm-сайта (U11(ΔSm) мяРНК), и с ним проведены те же самые эксперименты, что с U11 мяРНК. Величина *Ка*,

рассчитанная из изотермы связывания U11(Δ Sm) мяРНК с eS1, полученной с помощью фильтрования на нитроцеллюлозных фильтрах (Рисунок 23 A), составляет 1.3±0.4 х 10⁷ M⁻¹, что в три раза меньше, чем соответствующая величина для полноразмерной U11 мяРНК. Кроме того, анализ этого связывания с помощью метода задержки в геле показал, что при ассоциации U11(ΔSm) мяРНК с белком eS1 формируются комплексы, мигрирующие в геле одной полосой (Рисунок 23 В), вместо двух, наблюдаемых при связывании этого белка с U11 мяРНК (Рисунок 23 Б). Результаты, полученные с U11(∆Sm) мяРНК, свидетельствуют о том, что на U11 мяРНК существует дополнительный сайт связывания для eS1, отличный от U-богатого Sm-сайта, и, по всей видимости, он является основным участком связывания, что согласуется с данными по ингибированию связывания U11 мяРНК с ^{His6-FLAG}eS1 в присутствии (pU)8. Как показывает соответствующая изотерма адсорбции (Рисунок 23 Г), (pU)₈ лишь частично замещает этот белок в связывании с U11 мяРНК. Кроме того, на радиоавтографе геля (Рисунок 23 Д) видно, что при связывании U11 мяРНК с ^{His6-FLAG}eS1 в присутствии (pU)8 доля комплексов, соответствующих верхней полосе, т.е. с меньшей электрофоретической подвижностью, заметно сокращается по сравнению с таковой в отсутствие (pU)8, тогда как доля других комплексов практически не меняется. В то же время, (pU)₈ не оказывал никакого влияния на связывание U11(ΔSm) мяРНК с ^{His6-FLAG}eS1 (Рисунок 23 В, Е). В соответствии с этими данными верхняя полоса на радиоавтографе (Рисунок 23 Б, Д) отнесена к комплексам, в которых имеет место взаимодействие eS1 с U-богатым Sm-сайтом, тогда как нижняя полоса (из группы полос C) – к комплексам, где Sm-сайт не вовлечен в связывание с eS1. Совокупность полученных данных привела к заключению, что U-богатый Sm-сайт не является первичным сайтом связывания eS1 на U11 мяРНК, хотя и важен для этого связывания. (Рисунок 23 А). Отсутствие у 40S субчастиц способности связываться с U11 мяРНК может быть объяснено тем, что участок eS1, ответственный за это связывание, либо скрыт внутри субчастицы, либо имеет неподходящую для связывания конформацию.

3.1.1.6 Химический пробинг структуры U11 мяРНК, связанной с eS1

Для исследования структуры U11 мяРНК, связанной с eS1, использован набор химических зондов разной специфичности. Этот набор включал СМСТ, взаимодействующий с N3-атомом уридина, когда он не спарен, и в меньшей степени с N1-гуанозина [300], гидроксилрадикалы (OH•), которые атакуют C4`-атомы рибозы [301], а также BzCN, селективно реагирующий с 2`-OH группами рибозы [302]. Положения нуклеотидов U11 мяРНК, модифицированных СМСТ и BzCN, а также положения, по которым происходил разрыв под воздействием гидроксил-радикалов, в отсутствие или присутствии ^{His6-FLAG}eS1, определяли с помощью обратной транскрипции с использованием ³²Р-меченого праймера и модифицированной U11 мяРНК в качестве матрицы с последующим электрофоретическим разделением образующихся продуктов в денатурирующем полиакриламидном геле.

Анализ полученных данных показал, что связывание ^{His6-FLAG}eS1 с U11 мяРНК приводит к защитам нуклеотидных остатков шпильки SLI (G14, U15, U18), шпильки SLII (C62, C65, U67, C68), одноцепочечного участка с Sm-сайтом (U18, G96, U97, A98) и петли H (C94) от атаки гидроксил-радикалов (Pucyhok 24 A). Нуклеотидные остатки, относящиеся к шпильке SLI (U18 и U22) и к петле H (G83, C84 и U86), оказались защищены от модификации CMCT (U18, U22 и U86) и от атаки бензоилцианидом (U18, G83 и C84) (Pucyhok 24 Б). Защитный эффект eS1 по отношению к остаткам U11 мяРНК, перечисленным выше, указывает на то, что соответствующие регионы U11 мяРНК либо непосредственно вовлечены в связывание с eS1, либо находятся вблизи участков, ответственных за это связывание. Вместе с тем связывание ^{His6-FLAG}eS1 с U11 мяРНК приводило к существенному увеличению доступности её U-богатого участка в положении 87-100 для атаки бензоилцианида (Рисунок 24 Б), что свидетельствует о значительных структурных перестройках в U11 мяРНК, индуцируемых этим связыванием.



Рисунок 24. Химический пробинг структуры U11 мяРНК в комплексе с ^{His6-FLAG}eS1. Радиоавтограф геля после разделения продуктов обратной транскрипции при использовании в качестве матриц свободной

U11 мяРНК (–) и ^{Нізб-FLAG} eS1-связанной U11 мяРНК (+), обработанных гидроксил-радикалами (A) или BzCN и CMCT (Б). U, G, C, C – сиквенсные дорожки; К – свободная необработанная РНК. Справа от панелей приведены данные денситометрического анализа: сплошная линия (+eS1), пунктирная линия (– eS1). Справа от радиоавтографов обозначены положения нуклеотидных остатков U11 мяРНК, на которых наблюдали ослабление (закрашенные символы) или усиление (пустые символы) радиоактивного сигнала в присутствии ^{His6-FLAG} eS1 по сравнению со свободной U11 мяРНК, что обусловлено модификацией нуклеотида, находящегося в 5'-положении. Для всех реагентов вышеобозначенные символы соответствуют нуклеотиду, находящемуся в 3'-положении от того, который подвергался модификации. Указаны только те положения, для которых радиоактивный сигнал изменился более чем в 1.5 раза по сравнению с таковым в свободной U11 мяРНК: ромбики соответствуют обработке U11 мяРНК гидроксил радикалами, квадратики – СМСТ, кружки – BzCN; положения нуклеотидных остатков, относящихся к Sm-сайту, подчеркнуты. (В) Картирование результатов химического пробинга на вторичную структуру U11 мяРНК. Символы идентичны таковым на панелях A и Б и соответствуют модифицированным нуклеотидам (для всех реагентов), находящимся в 5'-положении от тех, что обозначены на панелях A и Б.

На основании данных химического зондирования структуры U11 мяРНК в комплексе с ^{His6-FLAG}eS1 была предпринята попытка сравнить сайт связывания eS1 на U11 мяРНК с его сайтом на 18S рРНК в 40S субчастице, где этот белок располагается в углублении между спиралями (h) 22 и 26, контактирующими с ним [40, 286] (Рисунок 25). Поскольку пространственная структура U11 мяРНК неизвестна, в качестве модели была использована структура ее гомолога – U1 мяРНК в составе U1 мяРНП [303]. Примечательно, что пространственная структура U1 мяРНК также имеет углубление между шпильками SLI и SLIII, хотя SLI у U1 мяРНК значительно длиннее, чем SLI у U11 мяРНК. Однако, в целом, пространственная структура шпилек SLI и SLIII U1 (U11) мяРНК схожа со структурой h22 и h26 18S рРНК. Следует отметить, что хотя Sm-сайт, содержащий одноцепочечный участок, на модели U1 мяРНП несколько удален от SLI и SLIII, в свободной U1 мяРНК, он достаточно подвижен и, потенциально, может сближаться с SLI и SLIII.

Таким образом, сопоставление данных химического пробинга структуры ^{His6-FLAG}eS1связанной U11 мяРНК с пространственной структурой её вышеупомянутого гомолога позволило предположить, что участок связывания eS1 на U11 мяРНК расположен в углублении между SLI и SLIII. Этот участок мимикрирует под регион 18S рРНК в 40S субчастице, формирующий участок связывания eS1 (h22 и h26) и, по всей вероятности, является первичным сайтом связывания eS1.

101



Рисунок 25. Сравнение пространственной структуры сайта связывания eS1 на 18S pPHK и на U1 мяPHK, гомологе U11 мяPHK. Слева, фрагмент структуры 40S субчастицы рибосомы человека, содержащий спирали (h) 22 и 26 и eS1 (выделен фиолетовым цветом) (PDB ID: 4UG0) [39]. Справа, фрагмент структуры U1 мяPHK в составе U1 мяPHП (PDB ID: 3CW1) [303]. Фрагмент eS1, участвующий в связывании с U11 мяPHK показан бледно-фиолетовым цветом. Участок SLI, не имеющий гомологичного региона в U11 мяPHK, бесцветный. Совпадающие спирали показаны зеленым и светло-голубым цветами. Участок Sm-сайта и спирали H показаны красным и синим цветами соответственно.

3.1.1.7 Определение участка eS1, контактирующего с U11 мяРНК

Для определения участка eS1, взаимодействующего с U11 мяPHK, использован ковалентный аддукт, образующийся в результате сшивки ^{His6-FLAG}eS1 с ³²P-меченой U11 мяPHK, содержащей статистически встроенные остатки s⁴U. Этот аддукт был обработан PHKазой T1, чтобы фрагменты PHK, сшитые с белком, были минимальной длины и не вносили существенного вклада в его электрофоретическую подвижность, и очищен с помощью электрофореза в SDS-ПААГ с последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану. Фрагмент мембраны, соответствующий 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 отдельном эксперименте с помощью удлинения ³²P-меченого праймера в реакции обратной транскрипции показано, что при облучении мягким УФ светом полученного *in vitro* комплекса s⁴U-содержащей U11 мяPHK с ^{His6-FLAG}eS1 с шивки белка по большей части происходят с теми же участками U11 мяPHK, что и *in vivo* (Рисунок 26 A, Б). На этом основании сделан вывод, что ковалентный аддукт, образующийся с использованием данной системы *in vitro*, является

релевантным для определения участка белка eS1, участвующего в сшивании с U11 мяРНК *in vivo*.



Рисунок 26. Спивание ^{His6-FLAG}eS1 с s⁴U-содержащей U11 мяРНК в составе соответствующего бинарного комплекса. (А) Радиоавтографы геля после разделения продуктов обратной транскрипции при использовании в качестве матриц образцов РНК из облученного (+) и необлученного (–) комплекса. U, G, C, A – сиквенсные линии; нумерация нуклеотидных положений последовательности U11 мяРНК дана слева. Положения нуклеотидных остатков, на которых происходят остановки обратной транскрипции, находятся в 3'-положении от остатков, с которыми сшивается ^{His6-FLAG}eS1, и обозначены зелёными точками. (Б) Картирование положений нуклеотидных остатков, спивающихся с ^{His6-FLAG}eS1 (обозначены зелеными точками) согласно данным на панели A (со сдвигом на один остаток в 5'-сторону), на вторичную структуру U11 мяРНК. Положения остатков уридина U11 мяРНК, с которыми eS1 сшивается *in vivo* согласно данным РАR-CLIP, обозначены красным цветом.

В качестве протеолитических агентов использованы бромциан (CNBr), йодозобензойная кислота (IOBz), и эндопротеаза ArgC, которые специфично расщепляют белок после остатков метионина, триптофана и аргинина соответственно. Карта расщепления ^{His6-FLAG}eS1 (с учётом массы N-концевых His-taq и FLAG-пептида) этими агентами представлена на Рисунке 27 Д. Электрофоретический анализ продукта сшивки ^{His6-FLAG}eS1 с s⁴U-содержащей U11 мяPHK после гидролиза PHKазой T1 показал, что его электрофоретическая подвижность (Pисунок 27 A) сопоставима с таковой у продуктов, образующихся при s⁴U-зависимом сшивании PHK с ^{FLAG}eS1 *in vivo* (см. Рисунок 19, стр. 92). Пептидные фрагменты с ковалентно связанными остатками

U11 мяРНК, образующиеся при расщеплении сшитого ^{His6-FLAG}eS1, движутся в геле широкими полосами с кажущейся электрофоретической подвижностью примерно 10, 8 и 6 кДа для IOBz, CNBr и ArgC соответственно (Рисунок 27 Б). Это может быть объяснено неполным гидролизом PHKазой T1 остатка U11 мяPHK, сшитого с ^{His6-FLAG}eS1, вследствие чего ^{His6-FLAG}eS1 оказывается ковалентно связанным с различными по длине фрагментами PHK, которые остаются присоединенными к пептидным фрагментам, образующимся при расщеплении белка, по-разному влияя на их электрофоретическую подвижность в геле.



Рисунок 27. Идентификация фрагмента ^{His6-FLAG}eS1, сшивающегося с ³²P-меченой s⁴U-содержащей U11 мяРНК 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-трицинового 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-эпитопу, – жёлтым; участки, соответствующие сшитым пептидным фрагментам ^{His6-FLAG}eS1*, подчёркнуты красной линией. Пунктирными линиями выделен участок, соответствующий результирующей последовательности сшитого фрагмента ^{His6-FLAG}eS1, указанной внизу.

Белок eS1 содержит два остатка триптофана; следовательно, обработка сшитого ^{His6-} FLAGeS1 IOBz должна привести к образованию трех фрагментов с массами – 6489 Да, 9884 Да и 16765 Да (Рисунок 27 Д). Поскольку средняя кажущаяся масса сшитого пептидного фрагмента составляет 10 кДа (Рисунок 27 Б), то ему могут соответствовать фрагменты 6489 Да или 9884 Да. С этими фрагментами могут перекрываться два крупных продукта гидролиза нізб-FLAGeS1 CNBr с массами 5071 Да и 7285 Да (Рисунок 27 Д). Чтобы дискриминировать между продуктами гидролиза CNBr, фрагмент, образующийся при гидролизе сшитого ^{His6-FLAG}eS1 этим агентом, был дополнительно обработан IOBz, что привело к появлению пептидного фрагмента с более высокой электрофоретической подвижностью, чем у исходного фрагмента (Рисунок 27 В). Это, в свою очередь, позволило исключить из рассмотрения продукт гидролиза ніs6-FLAGeS1 CNBr с массой 7285 Да (Рисунок 27 Д), который не имеет внутри сайтов гидролиза IOBz и поэтому его электрофоретическая подвижность не должна изменяться при обработке данным агентом. Следовательно, сшитый пептидный фрагмент может быть отнесен к вышеуказанному фрагменту 5071 Да, полученному при расщеплении ^{His6-FLAG}eS1 с помощью CNBr. В таком случае единственно возможным продуктом гидролиза ^{His6-FLAG}eS1 ArgC является фрагмент 3853 Да (Рисунок 27 Б, Г и Д), поскольку только он перекрывается с фрагментом 5071 Да, полученным при гидролизе CNBr. Соответственно, можно заключить, что сшитый фрагмент eS1 находится в пределах 8-42 аминокислотных остатков (Рисунок 27 Д). Чтобы сузить регион ^{His6-FLAG}eS1, участвующий в сшивке, проведены дополнительные эксперименты по гидролизу продукта расщепления сшитого ^{His6-FLAG}eS1, полученного при его обработке ArgC, с помощью либо CNBr, либо IOBz (Рисунок 27 Г). После гидролиза этого продукта с помощью CNBr электрофоретическая подвижность образовывался продукт, которого несущественно повышалась по сравнению с подвижностью исходного продукта (Рисунок 27 Г), тогда как после IOBz гидролиза с помощью появлялся продукт co значительно **v**величенной электрофоретической подвижностью (Рисунок 27 Г). Различие в подвижностях пептидных фрагментов, появляющихся в результате обработки продукта гидролиза ^{His6-FLAG}eS1 ArgC данными агентами, отражает разные количества аминокислотных остатков, отщепляемых ими

от исходного фрагмента: 12 и 4 при пост-обработке IOBz и CNBr соответственно. Это означает, что пептид ^{His6-FLAG}eS1, сшивающийся с s⁴U-содержащей U11 мяPHK *in vitro*, может относиться к участку между аминокислотными остатками 8–30 (Рисунок 27 Д). Если бы он относился к участку 30–38, последовательная обработка продукта сшивки с помощью CNBr и IOBz, привела бы к ещё более существенному повышению электрофоретической подвижности образующегося продукта (Рисунок 27 В). Таким образом, сопоставление полученных результатов (Рисунок 27 Б-Г) с соответствующими картами расщепления (Рисунок 27 Д) привело к заключению, что в ^{His6-FLAG}eS1 мишенью для s⁴U-содержащей U11 мяPHK являлся пептидный фрагмент 9-LTKGGKKGAKKKVVDPFSKKD-29, обогащенный лизином, который расположен в неструктурированном N-концевом хвосте белка (см. Рисунок 17 А, стр. 89).

Примечательно, что идентифицированный фрагмент перекрывается с регионом 5–20 eS1, где расположены нуклеотидные остатки, выявленные с помощью программы BindN+ как потенциально способные к участию в связывании PHK (дополнительно к тем, что обеспечивают связывание eS1 c 18S pPHK в 40S субчастице) (см. Рисунок 17 Б, стр. 89). Учитывая, что положения нуклеотидных остатков в U11 мяPHK, участвующих в её взаимодействии с $^{\text{His6-}}$ FLAG eS1 *in vitro*, и с $^{\text{FLAG}}$ eS1 *in vivo*, по большей части перекрываются (Рисунок 27 Б), можно полагать, что внутриклеточные сшивки $^{\text{FLAG}}$ eS1 с PHK, кодируемыми генами *RNU11* и *RNU5A-1*, также происходили с участием фрагмента 9–29.

В отдельном эксперименте показано, что 40S рибосомные субчастицы не образуют сшивок с s⁴U-содержащей U11 мяРНК (Рисунок 28), что было ожидаемо, поскольку, как упоминалось в разделе 3.1.1.5, оказываясь в составе 40S субчастицы, eS1 становится недоступным для взаимодействия с U11 мяРНК (см. Рисунок 23 A, стр. 98). Всё вышеизложенное однозначно свидетельствует о том, что во внутриклеточные взаимодействия как с U11 мяРНК, так и с U5 мяРНК вовлекается свободный eS1.



Рисунок 28. Сшивание ³²Р-меченой s⁴U-содержащей U11 мяРНК с ^{His6-FLAG}eS1 и 40S субчастицами рибосомы человека. (А) Радиоавтограф геля после очистки продуктов сшивки производного U11 мяРНК

с ^{His6-FLAG}eS1 или 40S субчастицами. (Б) Вестерн-блот анализ нитроцеллюлозной мембраны, соответствующей данному гелю, с использованием анти-eS1 антител. Справа указаны положения нативного eS1 и рекомбинантного ^{His6-FLAG}eS1, визуализируемого на мембране вместе с белками 40S субчастицы, положения которых известны [304], после её окрашивания *Ponceau S*. Слева указаны положения маркеров молекулярных масс белков.

Таким образом, с использованием метода PAR-CLIP удалось впервые выявить внерибосомные PHK-партнёры рибосомного белка eS1 – PHK, кодируемые генами *RNU11* и *RNU5A-1*, и определить в них области, контактирующие с eS1, которые соответствовали Uбогатому участку, содержащему Sm-сайт, в U11 мяPHK и району апикальной петли I в U5 мяPHK. За взаимодействие с данными областям PHK, как следует из экспериментов *in vitro*, ответственен N-концевой лизин-богатый участок 9–29 eS1. Установлено, что eS1 является связанным с U11 пре-мяPHK как в ядре, так и цитоплазме, где происходит её процессинг, а со зрелой U11 мяPHK в составе U11/U12 PHП в ядре. Показано, что снижение уровня eS1 в клетках приводит к увеличению доли незрелой U11 пре-мяPHK и снижению эффективности сплайсинга минорных интронов. Полученные данные свидетельствуют о существовании у eS1 неканонической функции, связанной с биогенезом и функционированием малой сплайсосомы, что существенно расширяет понимание роли рибосомных белков в клетках.

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

Рибосомный белок uS19 (S15 по старой классификации [57]) принадлежит соответствующему семейству консервативных белков, присутствующих в рибосомах всех царств. Эукариотический uS19 имеет неструктурированный С-концевой хвост, не имеющий гомологичных последовательностей в бактериальных рибосомных белках данного семейства, который простирается к декодирующему рибосомному центру [8]. Ранее с использованием фотоактивируемых аналогов мРНК, несущих в определенных положениях остаток s⁴U или перфторарилазидо-производного нуклеотида, установлено, что uS19 способен сшиваться с кодоном мРНК в А-участке, если он не занят соответствующим рибосомным лигандом [5, 6, 67-69]. С помощью аналогов мРНК – перфторарилазидо-производных олигорибонуклеотидов идентифицирован регион uS19, вовлекающийся во взаимодействие с кодоном в А-участке, которым оказался его С-концевой пентадекапептидный фрагмент [7]. Совсем недавно с использованием мутантной формы uS19 с делетированным С-концевым фрагментом (аминокислотные остатки 131-145) продемонстрировано, что последний имеет критическое значение для элонгации трансляции. Делеция указанных остатков uS19 полностью лишала рибосомы способности к трансляции, не влияя значительно на сборку и созревание 40S субчастиц и инициацию трансляции. Кроме того, эта делеция не нарушала способности рибосом связывать аминоацил-тРНК в А-участке, что послужило основанием для предположения о вовлечении пептидного фрагмента 131-145 белка uS19 в аккомодацию аминоаци-тРНК в этом участке [273].

3.1.2.1 Проверка способности uS19 сшиваться с аналогами мРНК, несущими остатки s⁴U, в кодоне, находящемся в А- или Р-участках

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 s⁴U в определенных положениях (Рисунок 29). 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 Ручастке. В комплексах 1-3 и 6 А-участок был свободен, а в комплексах 4 и 5 он был занят молекулой тРНК, соответствующей находящемуся в нем кодону. Все используемые аналоги мРНК способны эффективно связываться с рибосомами в присутствии тРНК^{Аsp} или тРНК^{Phe}, которые направляли соответствующий кодон в Р-участок. Анализ белков, выделенных из облученного комплекса 1, показал, что паттерны сшивки, генерируемой аналогом мРНК I, не отличаются от таковых, наблюдаемых для соответствующей бинарной смеси, где данный аналог мРНК не фиксирован на рибосомах кодон-антикодоновым взаимодействием в мРНКсвязывающем канале (Рисунок 29 А). Эти паттерны отнесены к сшивкам аналога мРНК I с рибосомными белками uS3 и eS30, которые, как известно [64, 70], предоставляют свои специфические структурные мотивы, расположенные перед входом в канал, как мишени для сшивок, независимо от нуклеотидной последовательности аналогов мРНК и присутствия тРНК в соответствующих комплексах. Из этого следует, что остаток s⁴U в кодоне, расположенном в Р-участке не образует сшивки с uS19. Поскольку лабильные бинарные комплексы, где происходят сшивки аналогов мРНК с белками uS3 и eS30, обычно присутствуют в соответствующих реакционных смесях, наряду с комплексами, где аналоги мРНК фиксированы в рибосомном канале [64, 70], паттерны, относяшиеся к этим сшивкам, можно наблюдать и для облученных комплексов 2-5 с аналогами мРНК II и III (Рисунок 29 Б). Вместе с тем, как и ожидалось, в комплексах 2, 3 и 6 uS19 сшивался с остатком s⁴U в положении +5 или +6.
Уровень сшивки аналогов мРНК II и III с uS19 в комплексах 4 и 5 был примерно на 40% ниже, чем в комплексах 2 и 3, что указывает на наличие защитного эффекта тРНК, связанной в А-участке. Ранее подобный эффект обнаружен у фактора терминации трансляции eRF-1 [64], который, связываясь с рибосомой в А-участке, запускает гидролиз пептидил-тРНК в Р-участке при завершении синтеза полипептидной цепи белка.



Рисунок 29. Аффинное сшивание *in vitro* аналогов мРНК I–IV, несущих остатки s⁴U, с 80S рибосомами человека. (А) Сверху – последовательность аналога мРНК I, где выделен триплет GAU, кодирующий

Asp и направляемый в Р-участок. Снизу слева – изотермы связывания 80S рибосом с 5'-Р³²-мечеными тРНК^{Аsp} в присутствии мРНК I (комплекс 1) (1) и без мРНК (2), а также с 5'-Р³²-меченой мРНК I в присутствии тРНК^{Аsp} (комплекс 1) (3) и без тРНК (4). Символ v обозначает уровень связывания 5'-Р³²меченого лиганда (моль лиганда на 1 моль 80S рибосом), нормализованный на фракцию активных рибосом (доля активных рибосом составляла примерно 75%). Снизу справа – радиоавтограф. Анализ в денатурирующем SDS-ПААГ продуктов сшивок рибосомных белков с 5'-Р³²-меченой мРНК I в комплексах с 80S рибосомами без тРНК (дорожка 1) и в присутствии тРНК^{Аsp} (комплекс 1) (дорожка 2). (Б) Сверху, последовательности аналогов мРНК II и III, в которых выделены триплеты, кодирующие Phe (UUC), Val (GUA) и Asp (GAU). Все остатки U статистически замещены на s⁴U. Остатки U, находящиеся внутри триплетов, кодирующих Val и Asp, замещенные на s⁴U, обозначены как s⁴U. Снизу слева – изотерма связывания 5'-Р³²-меченой тРНК^{Val} с тройным комплексом 80S рибосом с мРНК II и тРНК^{Phe} в Р-участке (комплекс 2), приводящего к образованию комплекса 4. Изотерма связывания тРНК^{Аsp} в Аучастке аналогична изотерме связывания тРНК^{Val}. Изотермы связывания мРНК II и III с 80S рибосомами в присутствии тРНК^{Рhe} и без тРНК аналогичны таковым для мРНК І. Изотермы связывания тРНК^{Phe} в присутствии мРНК II и мРНК III или без мРНК аналогичны изотермам для мРНК I (панель А). Снизу справа – радиоавтограф. Анализ в денатурирующем SDS-ПААГ продуктов сшивок рибосомных белков с 5'-Р³²-мечеными мРНК II и мРНК III в различных комплексах 80S рибосом. Комплексы с аналогом мРНК II: без тРНК (дорожка 4) и с тРНК^{Рhe} в Р-участке (комплекс 2) (дорожка 5), или с тРНК^{Phe} в Ручастке и тРНК^{Val} в А-участке (комплекс 4) (дорожка 6). Комплексы с аналогом мРНК III: без тРНК (дорожка 1) и с тРНК^{Рhe} в Р-участке (комплекс 3) (дорожка 2) или тРНК^{Phe} в Р-участке и тРНК^{Asp} в Аучастке (комплекс 5) (дорожка 3). Результаты денситометрического анализа радиоактивных сигналов, соответствующих продукту сшивки аналогов мРНК II и III с uS19, на дорожках 2, 3, 5 и 6 приведены внизу от радиоавтографа. Значения интенсивностей сигналов для дорожек 3 и 6 нормализованы к соответствующим значениям для дорожек 2 и 5. Рибосомные белки, сшивающиеся с аналогами мРНК, обозначены звёздочками справа от радиоавтографа. Слева от радиоавтографа приведен фрагмент электрофореграммы окрашенного геля после разделения тотального белка 40S субчастиц. Полосы на радиоавтографе, соответствующие положениям сшитых рибосомных белков, обозначены стрелками. Идентификация сшитых белков проведена с учётом того, что присоединенные к ним олигомеры, снижают их электрофоретическую подвижность в SDS-ПААГ. Величины соответствующих сдвигов хорошо известны и описаны в ряде предыдущих работ [5, 64, 67, 68, 70]. (В) Сверху, последовательность С-богатого аналога мРНК IV, в котором выделены кодоны, кодирующие Phe (UUC) и Val (GUA). Изотермы связывания с 80S рибосомами аналога мРНК IV в присутствии и отсутствие тРНК^{Phe} сходны с таковым для аналога мРНК I, а изотермы связывания тРНК^{Рhe} в присутствии и отсутствие аналога мРНК IV – с таковым для тРНК^{Азр} в присутствии и отсутствие аналога мРНК I (панель А). Снизу – радиоавтограф. Анализ в SDS-ПААГ продуктов сшивок рибосомных белков с 5'-Р³²-меченой мРНК IV в комплексе с 80S рибосомами в присутствии тРНК^{Рhe} (комплекс 6), подобном комплексам 2 и 3, а также без тРНК. Описание такое же, как для панели Б.

На самом деле величина защитного эффекта у тРНК существенно выше, чем указано, если принять во внимание тот факт, что в комплексах 4 и 5 до трети 80S рибосом имели свободный А-участок, что следует из сравнения изотерм связывания тРНК в А- и Р-участках (Рисунок 29 А, Б). Примечательно, что паттерны сшивок, полученные для комплексов 2 и 3 с пурин-богатыми аналогами мРНК II и III (Рисунок 29 Б), идентичны паттернам для комплекса 6 с пиримидин-богатым аналогом мРНК IV (Рисунок 29 В), из чего следует, что нуклеотидный контекст вокруг кодона в А-участке не влияет на его контакт с uS19. Таким образом, можно заключить, что uS19 специфически сшивается с остатком s⁴U в триплете 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.

3.1.2.2 Характеризация стабильной клеточной линии, продуцирующей ^{FLAG}uS19, и внутриклеточное сшивание РНК с этим белком

Для исследования с помощью метода PAR-CLIP взаимодействий транслируемых мPHK с uS19 как компонентом рибосомного декодирующего центра создана стабильная клеточная линия на основе клеток HEK293 с использованием плазмидного вектора, описанного в разделе 3.1.1.2, которая индуцибельно продуцировала uS19, меченый FLAG по N-концу (^{FLAG}uS19). Следует отметить, что N-концевое расположение FLAG-эпитопа выбрано в связи с тем, что, как уже упоминалось, именно C-концевой фрагмент uS19 вовлечен в формирование декодирующего центра рибосомы. 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 (Рисунок 30). 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, находящимся в составе рибосом, с помощью метода PAR-CLIP проведены согласно протоколу, описанному в [36] с включением определенных стадий из протокола рибосомного профайлинга [38] в трех биологических повторах. В частности, в ^{FLAG}uS19-продуцирующих клетках, выращенных в присутствии s⁴U, перед их облучением мягким УФ светом (365 нм), индуцирующим образование PHK-белковых сшивок, трансляция остановлена циклогексимидом.



Рисунок 30. Продукция ^{FLAG}uS19 клетками соответствующей стабильной линии на основе HEK293 и проверка его способности встраиваться в функционально активные рибосомы. (А) Вестерн-блот анализ лизата клеток стабильной клеточной линии, продуцирующих ^{FLAG}uS19 в отсутствие и присутствии DOX. (Б) Полисомный профиль клеток, продуцирующих ^{FLAG}uS19, полученный центрифугированием соответствующего лизата в градиенте плотности сахарозы (верхняя панель), и вестерн-блот анализ градиентных фракций на содержание ^{FLAG}uS19 с использованием антител против FLAG-эпитопа (нижняя панель). Фракции градиента пронумерованы снизу-вверх.

Этот антибиотик связывается с рибосомой в кармане Е-участка на её 60S субчастице и тем самым блокирует транслокацию тРНК из Р-участка в Е-участок [7, 8, 305]. Необходимость в обработке клеток циклогексимидом была вызвана тем, что их облучение при не остановленной трансляции привело бы к тому, что все мРНК, чей s⁴U-содержащий кодон оказался в этот момент в А-участке, сшились бы с uS19 в постранслокационных состояниях рибосом, присутствующих в клетках наряду со многими другими состояниями. Образование таких сшивок значительно осложнило бы или даже сделало бы невозможным биоинформатичекий анализ данных секвенирования соответствующей ДНК-библиотеки. В то же время в рибосомах, арестованных циклогексимидом, А-участок должен быть занят молекулой пептидил-тРНК, которая может защищать uS19 от сшивания с s4U-содержащим кодоном мРНК в соответствии с данными по экранированию этого белка молекулой тРНК в Аучастке (см. раздел 3.1.2.1). Однако, учитывая возможное паузирование рибосом во время элонгации трансляции [306, 307], можно ожидать, что обработка клеток циклогексимидом приведет к появлению комплексов с различными состояниями пептидил-тРНК, включая те, в которых кодон мРНК, оказавшийся в А-участке, не вовлекается в образование мРНК-тРНК дуплекса и способен взаимодействовать с ^{FLAG}uS19.

После облучения клеточный лизат обрабатывали РНКазой I, для того чтобы гидролизовать участки мРНК, не защищенные рибосомами. Полученные в результате моносомы, включая те, в которых произошли сшивки ^{FLAG}uS19 с мРНК, очищали с помощью центрифугирования через сахарозную подушку с последующим извлечением фрагментов мРНК, сшитых с ^{FLAG}uS19, с помощью иммунопреципитации с использованием анти-FLAG антител. После введения ³²Р-метки фрагменты мРНК, сшитые с ^{FLAG}uS19, очищали электрофорезом в SDS-ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Две основные группы РНК-белковых сшивок, чья электрофоретическая подвижность ниже, чем у FLAGuS19 (Рисунок 31), элюированы из мембраны после её обработки протеиназой К. Полученные фрагменты мРНК использованы для приготовления ДНК-библиотек для высокопроизводительного секвенирования.



Рисунок 31. Внутриклеточные сшивки ^{FLAG}uS19 в составе рибосомы, обнаруженные с помощью метода PAR-CLIP. Радиоавтограф мембраны, на которую перенесены после разделения в SDS-ПААГ фрагменты мРНК, сшитые с ^{FLAG}uS19, извлеченные из рибосом клеток соответствующей стабильной линии на основе HEK293, выращенных в присутствии s⁴U или без него (–), с последующим УФ облучением (+) или без облучения (–) (верхняя панель). Вестерн-блот анализ той же мембраны с использованием анти-FLAG антител (нижняя панель). Стрелки указывают на положение свободного немодифицированного ^{FLAG}uS19. Скобками справа отмечены участки мембраны, использованные для элюирования фрагментов мРНК, сшитых ^{FLAG}uS19.

3.1.2.3 Анализ данных высокопроизводительного секвенирования ДНК-библиотек на основе фрагментов мРНК, сшивающихся с ^{FLAG}uS19

Шесть ДНК-библиотек были приготовлены из фрагментов мРНК, входящих в верхнюю и нижнюю группы согласно их электрофоретической подвижности (Рисунок 31), т.е. по две ДНКбиблиотеки для каждого биологического повтора. Анализ данных высокопроизводительного секвенирования этих ДНК-библиотек, показал высокую степень корреляции между повторами (0.727≤r≤0.795 и 0.694≤r≤0.821 для библиотек из фрагментов мРНК, относящихся к верхней и нижней группам соответственно) (Рисунок 32 А), что позволило объединить данные, полученные с каждого из трех повторов, для последующего анализа. Картирование сиквенсных ридов на человеческий геном показало, что они в основном группируются в специфические кластеры, содержащие характеристические Т/С-транзиции.



Рисунок 32. Корреляция между данными высокопроизводительного секвенирования ДНК-библиотек, созданных на основе фрагментов РНК, соответствующих продуктам сшивки uS19 с мРНК, из верхней и

нижней групп (см. Рисунок 31). (А) Корреляция между количествами сырых ридов (log2), полученных для образцов от трех повторов. (Б) Анализ пересечения положений Т/С-транзиций для образцов верхней и нижней групп фрагментов. Цифрами показано количество идентифицированных положений Т/С-транзиций, пересекающихся между образцами и являющихся уникальными для каждой из групп. (В) Корреляция общего покрытия (log2) пересекающихся кластеров, содержащих Т/С-транзиции, для образцов из верхней и нижней групп фрагментов.

Кластер ридов рассматривался как специфичный участок генома, соответствующий региону сшивания FLAG uS19 с мРНК, только в том случае, если он удовлетворял ряду критериев: 1) кластер ридов пересекается хотя бы с одной позицией T/C-транзиций; 2) одна из позиций T/C-транзиций имеет как минимум 2 рида, содержащих T/C транзиции; 3) покрытие положения с транзицией ≥ 5 ; 4) общая частота T/C-транзиций больше 1%. Данному набору критериев соответствовало 2256 и 565 положений T/C-транзиций для образцов от верхней и нижней групп фрагментов (Supplementary, Table S1, Babaylova, Gopanenko et al., Nucleic Acids Res. 2020; 10.1093/nar/gkz1145). Среди них, 440 позиций совпадали, а значение корреляция в суммарном покрытии пересекающихся кластеров ридов составило 0.859 (Рисунок 32 Б, В). Дальнейший анализ, в котором эти два набора данных были объединены, показал, что отобранные кластеры ридов с T/C-транзициями соответствуют 580 уникальным белок-кодирующим генам. Примечательно, что эти кластеры ридов практически полностью пересекались с регионами генов, соответствующими кодирующим участкам мРНК, которые могли сшиться с ^{FLAG}uS19 только тогда, когда они находились в мРНК-связывающем канале рибосомы.

В контрольных экспериментах, выполненных с помощью рибосомного профайлинга, 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 (Приложение 1, Рисунок П1). Следовательно, T/Странзиции в отобранных кластерах ридов появились, главным образом, вследствие сшивки FLAG uS19 с остатками s⁴U в соответствующих положениях мРНК. Как правило, эти кластеры ридов покрывали лишь небольшие участки генов, соответствующие кодирующим частям мРНК (Рисунок 33), и длина этих участков была различной у разных генов, но большинство из них имели ширину в пределах 30–100 нуклеотидов (Приложение 1, Рисунок П2).



Рисунок 33. Локализация участков сшивки ^{FLAG}uS19 в мРНК. Репрезентация из геномного браузера IGV в качестве примера регионов генома, соответствующих генам *PTMS*, *HSP90AB1*, *SREK1* и *NCL* с сиквенсными ридами, полученными в результате высокопроизводительного секвенирования ДНК-библиотек, полученных на основе PHK-фрагментов, сшивающихся с ^{FLAG}uS19. Экзон-интронная структура гена и идентификационный номер транскрипта по номенклатуре ensembl (ensemble transcript id) приведены ниже панелей браузера. Серые гистограммы покрытия сверху каждой панели отражают плотность сиквенсных ридов на соответствующих участках экзонов.

3.1.2.4 Последовательности регионов мРНК, сшивающихся с FLAGuS19

Поскольку эксперименты *in vitro* показали (см 3.1.2.1), что uS19 сшивается с аналогами мРНК, только когда остаток s⁴U находится в триплете, расположенном А-участке рибосомы, можно полагать, что T/C-транзиции, обнаруженные в ходе эксперимента PAR-CLIP,

соответствуют остаткам s⁴U, входящим в состав кодонов мРНК, оказавшимся в А-участке при остановке трансляции в клетках циклогексимидом. Анализ последовательностей, фланкирующих положения T/C-транзиций, выявил высокое содержание в них остатков G и A (Рисунок 34 A), что особенно ярко выражено для топ-100 кластеров ридов с наибольшим покрытием (Рисунок 34 Б), из чего следовало, что ^{FLAG}uS19 сшивался с G/A-богатыми регионами в кодирующих частях мРНК.



Рисунок 34. LOGO нуклеотидных последовательностей, соответствующих положениям кластеров ридов, содержащих Т/С-транзиции. 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 (A) LOGO, рассчитанное для всего набора идентифицированных кластеров. (Б) LOGO, рассчитанное для топ-100 кластеров с наибольшим покрытием.

Примечательно, что данные кластеры ридов сформированы только на тех участках генов, которые содержат остатки тимина, чьи положения соответствуют положениям T/Cтранзиций, и практически отсутствовали в участках, не содержащих таких остатков (Рисунок 35). Это подтверждает, что сшивки FLAG uS19 с мРНК, соответствующие этим T/C-транзициям, являются действительно s⁴U-зависимыми. Распределение положений транзиций внутри координат кластеров является практически равномерным. (Приложение 1, Рисунок ПЗ). Поскольку длина фрагмента мРНК, находящегося в мРНК-связывающем канале рибосомы, составляет порядка 28–34 нуклеотидов [38], на участках мРНК, соответствующих кластерам ридов, покрывающим участки большего размера (см. выше), могли находиться несколько транслирующих рибосом. Анализ нуклеотидных положений кодонов, из которых остаток s⁴U сшивался с FLAG uS19, показал, что сшивка могла происходить из любого положения триплета в А-участке, при этом третье положение является наиболее предпочтительным (Приложение 1, Рисунок П4). Однако нельзя исключить, что данное наблюдение является следствием того, что остаток Т чаще встречается именно в третьем положении триплетов, содержащих Т/С-транзиции, в участках генов, соответствующих кодирующим частям мРНК, сшивающимся с ^{FLAG}uS19.



Рисунок 35. Репрезентация из геномного браузера IGV в качестве примера региона генома, соответствующего G/A-богатым участкам гена *UPF3A* с сиквенсными ридами, полученными в результате высокопроизводительного секвенирования ДНК-библиотек на основе фрагментов PHK, сшивающихся с ^{FLAG}uS19. T/C-транзиции обозначены синими черточками над остатками тимина (T), выделенными красным, в референсной последовательности. Аминокислотная последовательность, соответствующая данному участку, приведена под референсной геномной последовательностью. G/A-богатые участки гена, содержащие остатки тимина и не содержащие их, обведены красными овалами и выделены красными скобками.

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 последовательностей, фланкирующих сайты сшивки мРНК в A-участке, показал, что они кодируют преимущественно Lys и Glu, остатки Arg встречаются реже, а остатки Gly практически отсутствуют (Рисунок 36). Следует отметить, что в этих последовательностях остатки Lys и Glu в основном чередуются между собой, не формируя каких-либо периодических и регулярных последовательностей. Таким образом, можно заключить, что регионы мРНК, содержащие часто встречающиеся чередующиеся кодоны Lys (реже Arg) и Glu, эффективно сшивались с ^{FLAG}uS19 через s⁴U-содержащий триплет в A-участке рибосомы.

119



Рисунок 36. LOGO аминокислотных последовательностей, кодируемых нуклеотидными последовательностями, представленными на Рисунке 34. Нумерация аминокислотных остатков приведена согласно [308], где позиция аминокислотного остатка, соответствующего кодону в P-участке рибосомы обозначена как 0, а в A-участке как +1. (A) и (Б) – то же, что на Рисунке 34.

Для того чтобы понять, могла ли высокая частота встречаемости Glu- и Lys/Argкодирующих триплетов в мРНК обеспечивать её сшивку с ^{FLAG}uS19 в рибосомах, арестованных циклогексимидом, была оценена встречаемость мРНК, сшивающихся с FLAGuS19 по ланным PAR-CLIP, среди мРНК, кодирующих нерегулярные повторы Glu/Lys (E/K). Для этого с использованием последовательности мотива (E/K)₁₂ в качестве референсной из базы данных Ensembl извлечены все аминокислотные последовательности белков человека, в которых встречается этот мотив. В анализе допускали, что в данной последовательности может быть до 4 замен, чтобы внутри неё могли встретиться аминокислотные остатки, кодируемые триплетами, содержащими остатки U. Полученный набор генов, кодирующих вышеобозначенные белки, сокращен фильтрацией по уровню их экспрессии в клетках НЕК293 согласно данным рибосомного профайлинга [309] до топ-1000 генов. Среди них обнаружены 118 генов, кодирующих мотив (Е/К)₁₂, и 51 из них оказался среди тех, чьи мРНК сшивались с FLAGuS19 по данным PAR-CLIP (Supplementary, Table S4, Babaylova, Gopanenko et al., Nucleic Acids Res. 2020; 10.1093/nar/gkz1145). Таким образом, практически половина мРНК, кодирующих нерегулярные повторы Glu/Lys, присутствует в наборе мРНК, сшивающихся с FLAG uS19. Более того, визуальная проверка с помощью геномного браузера IGV оставшихся 67 генов, показала, что многие из них также содержат кластеры ридов с Т/С-транзициями. Однако эти кластеры не удовлетворяли вышеупомянутым критериям отбора кластеров ридов в качестве

специфических участков генома, соответствующих регионам мРНК, сшивающимся с FLAG uS19 (либо из-за низкого покрытия ридами, либо из-за отсутствия T/C-транзиций или остатков T в ридах), и поэтому они не были использованы в анализе. Очевидно, что неполное совпадение вышеуказанных наборов генов связано, во-первых, с жёсткими критериями отбора кластеров с T/C-транзициями, а, во-вторых, с достаточно упрощенной моделью оценки встречаемости Glu/Lys-повторов в аминокислотных последовательностях белков человека. Тем не менее, можно заключить, что способность FLAG uS19 сшиваться с s⁴U-содержащими триплетами в регионах мРНК, кодирующих Glu/Lys(Arg)-богатые последовательности белков, не зависит от последовательности самой мРНК, а связана с природой аминокислотных остатков, кодируемых соответствующими регионами мРНК.

Таким образом, можно заключить, 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.

3.1.3 Влияние снижения уровня рибосомного белка eL29 в клетках HEK293 на профиль их транскриптома

Белок eL29 является компонентом 60S субчастицы рибосомы. Он известен также как гепарин/гепаран-сульфат связывающий белок [21-25], который впервые обнаружен на поверхности эндотелиальных клеток мочевого пузыря [21], а позже и ряда других [310]. Будучи ассоциированным с гепарин/гепаран-сульфатом, этот белок может участвовать в ряде клеточных процессов, таких как межклеточная коммуникация, адгезия, дифференциация, пролиферация и др [11-17]. Интересно отметить, что в эндотелиальных клетках, дефицитных по $\alpha\nu\beta$ интегрину, при снижении уровня eL29 происходит ингибирование васкуляризации [311]. С использованием животных моделей показано, что дефицит eL29 приводит к развитию фенотипа с рядом аномалий. В частности, мыши, нокаутированные по гену *RPL29*, хотя и оставались жизнеспособными, имели меньшие размеры тела, пропорционально уменьшенные размеры органов, а также повышенную хрупкость костей и зубов по сравнению с мышами того же возраста с нормальным содержанием eL29 [23, 33, 312]. Авторы данных работ полагают, что наблюдаемые аномалии у мышей обусловлены дефицитом рибосом вследствие отсутствия eL29. С другой стороны, появление вышеуказанного фенотипа могло быть связано с

120

изменениями в экспрессии генов, вызванными отсутствием eL29, который является не только компонентом трансляционной машины, но и может выполнять определенные внерибосомные функции. Подходящим методом для оценки изменений в экспрессии генов на полногеномном уровне, как уже упоминалось, является метод PHK-сек [313-315].

3.1.3.1 Нокдаун eL29 в клетках HEK293

Для снижения клеточного уровня eL29 использован метод PHК-интерференции. Для этого клетки НЕК293, выращенные до 60% конфлюентности, трансфицировали малыми интерферирующими РНК (далее siPHK), направленными против мРНК eL29, с использованием в контрольном эксперименте неспецифичной siPHK. Через один и два дня после трансфекции уровень снижения eL29 в клетках оценивали с помощью вестерн-блот анализа с использованием антител, специфичных к eL29, а жизнеспособность клеток – с помощью МТТ теста. Как видно из данных на Рисунке 37 А, в клетках, трансфицированных с помощью siPHK против мРНК eL29, уровень eL29 снижался соответственно примерно в 1.5 и 2.5 раза по сравнению с его уровнем в клетках, обработанных контрольной siPHK, тогда как уровень uS2 (оцененный в качестве контроля с использованием соответствующих поликлональных антител) практически не изменялся. Тест МТТ показал, что трансфекция клеток данными siPHK не влияла заметно на их жизнеспособность (Рисунок 37 Б). Кроме того, сравнение результатов электрофоретического анализа образцов тотальной РНК из клеток, обработанных siPHK против мРНК eL29 и контрольной siPHK, не выявило существенных различий в паттерне pPHK между этими образцами (Рисунок 37 В). 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 (Рисунок 37 Г). Это означает, что рибосомы, лишенные eL29, которые присутствовали наряду с нормальными рибосомами в клетках с пониженным уровнем этого белка, активны в трансляции.

Все вышеизложенное позволяет рассматривать клетки НЕК293, трансфицированные специфическими siPHK против мPHK eL29, адекватной моделью для изучения изменений в транскриптоме, вызванных дефицитом данного белка.



Рисунок 37. Характеризация клеток НЕК293 с нокдауном по рибосомному белку eL29. (А) Вестернблот анализ уровней белков eL29 и uS2 (в качестве контроля) в клетках НЕК293 через один и два дня после трансфекции с использованием специфических siPHK против мPHK eL29 и контрольной siPHK. Диаграммы показывают данные вестерн-блоттинга в трех повторах в виде среднего значения произвольных единиц (a.u.) ± SEM (** p <0,01, рассчитано с использованием t-критерия Стьюдента). (Б). Данные МТТ-теста для трансфицированных клеток. (В) Электрофоретический анализ препаратов тотальной PHK, выделенных из трансфицированных клеток. Окраска бромистым этидием. (Г) Полисомные профили клеток, трансфицированных с помощью siPHK против мPHK eL29 (пунктирная линия) и контрольной siPHK (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 мPHK), «лёгкие» полисомы (<5 рибосом на мPHK) и 80S рибосомы (с небольшой долей 60S субчастиц).

3.1.3.2 Анализ данных РНК-сек для клеток НЕК293 с пониженным уровнем eL29

Чтобы выяснить влияние дефицита eL29 на профиль транскриптома, из клеток HEK293 через 2 дня после их трансфекции специфическими siPHK против мPHK eL29 и контрольной неспецифической siPHK выделены препараты тотальной клеточной PHK, из которых получены соответствующие ДНК-библиотеки с их последующим высокопроизводительным секвенированием на платформе Illumina HiSeq 2500 (Приложение 2, Таблица П1). Эксперимент выполнен в трех биологических повторах.

Предварительная оценка данных РНК-сек с помощью метода главных компонент и анализа матрицы расстояний показала высокое качество кластеризации между биологическими повторами (Рисунок 38 А,Б). Это означало, что данные РНК-сек пригодны для использования в анализе дифференциальной экспрессии генов, который выполнен на наборе более чем 12000 генов с использованием пакета DESeq2 (Supplementary, Table S4, Copanenko et al., Cells 2020; 10.3390/cells9051228). Изменения экспрессии генов В клетках, трансфицированных специфическими siPHK, по сравнению с их экспрессией в клетках, трансфицированных контрольной siPHK, считали значимыми, если согласно результатам DESeq2-анализа параметр их |LFC| > 0.322, что соответствовало изменениям уровней экспрессии генов более чем на 25%, а параметр их p.adj < 0.01. Таким критериям удовлетворяли 1308 генов (названных DEGs, см. раздел 2.2.4.3) (Supplementary, Table S5, Copanenko et al., Cells 2020; 10.3390/cells9051228). График, иллюстрирующий результаты анализа дифференциальной экспрессии генов, представлен на Рисунке 38 В. Доли генов, чьи уровни экспрессии повышались или понижались (ап-регулируемых и даун-регулируемых DEGs соответственно) при снижении содержания eL29 в клетках НЕК293, показаны на Рисунке 38 Г в зависимости от значения LFC генов в наборе, взятом в анализ дифференциальной экспрессии. Данные, отображающие изменения в экспрессии генов, кодирующих рибосомные белки eL29 и uS2 (см. Рисунок 37 A), приведены на Рисунке 38 Д. Эти данные вместе с теми, что представлены на Рисунке 37 А, указывают на то, что в клетках HEK293 с нокдауном eL29 уровень мРНК eL29 снижен значительно сильнее, чем уровень самого eL29. Расхождение между уровнями eL29 и его мРНК, наблюдаемое через два дня после трансфекции клеток, указывает, вероятно, на то, что скорость синтеза eL29 превышает скорость его деградации. Для нескольких DEGs, в частности даун-регулируемых CHCHD3, CLIC4, G3BP1, TFAM и ап-регулируемого RAD23, проведена валидация данных PHКсек с помощью ПЦР в реальном времени (Приложение 1, Рисунок П5). Сравнение данных по изменению уровней экспрессии (значений LFC), полученных при анализе РНК-сек и ПЦР в реальном времени для этого набора генов, показало высокую степень корреляции (r =0.913, p = 0.004) между этими данными.



Рисунок 38. Обобщённые результаты анализа данных РНК-сек клеток НЕК293, дефицитных по рибосомному белку eL29. (А) Результаты анализа методом главных компонент образцов РНК-сек, соответствующих трём биологическим повторам клеток НЕК293, трансфицированных специфическими siPHK против мPHK eL29 (красные точки), и клеток HEK293, трансфицированных контрольной siPHK (синие точки). (Б) Тепловая карта эвклидовых расстояний между выше описанными образцами РНК-сек с иерархической кластеризацией. В правом верхнем углу – гистограмма распределения количества образцов как функция от эвклидового расстояния (показано цветом). (В) График рассеивания значений LFC (log2fold change) (ось Y) в зависимости от усредненных нормализованных значений количества

1000

L29_{HOKAAYH}I

HOPMA

1000

L29 khokqayh

HOPMA

ридов, соответствующих каждому гену (ось X), построенный на основе результатов анализа дифференциальной экспрессии генов с использованием вышеуказанных образцов РНК-сек. По оси абсцисс приведено значение средних нормализованных значений количества ридов, картирующихся на соответствующие гены, по оси ординат – рассчитанное значение их LFC. Синими пунктирными линиями отмечены значения LFC, равные –1, –0.585, –0.322, 0.322, 0.585 и 1, которые соответствуют изменениям в экспрессии генов на 25%, 50% и 100%. DEGs обозначены красными точками. Топ-10 генов, отнесенных к ап-регулируемым или даун-регулируемым DEGs в соответствии со значениями их LFC, показаны синими точками с подписями. (Г) Обобщенное представление результатов анализа дифференциальной экспрессии генов с помощью пакета DESeq2. На диаграммах показана доля апрегулируемых (обозначены зеленым цветом) и даун-регулируемых (обозначены красным цветом) DEGs вместе с их количеством, указанным в скобках. (Д) Бокс-плот графики, демонстрирующие сравнение изменений экспрессии генов *RPL29* и *RPSA* (кодирующих рибосомные белки eL29 и uS2 соответственно) на основании анализа данных PHK-сек. Красными точками показаны нормализованные с помощью DESeq2 значения количеств сиквенсных ридов, соответствующих этим генам, для каждого образца.

Следует отметить, что в наборе DEGs, помимо гена *RPL29*, обнаружены гены ещё нескольких рибосомных белков (Рисунок 39, Приложение 2, Таблица П2).



Рисунок 39. Экспрессия генов рибосомных белков в eL29-дефицитных клетках по сравнению с их экспрессией в клетках, обработанных контрольной siPHK. (А) Гистограммы значений RPKM для

каждого гена рибосомного белка малой 40S субчастицы (сверху) и большой 60S субчастицы (снизу) в нормальных клетках (белые столбики) и eL29-дефицитных клетках (серые столбики) для трёх биологических повторов. Ошибка – одно стандартное отклонение. (Б) Вестерн-блот анализ содержания рибосомных белков eL29 и uL5, а также uS15, eS10 и белка GAPDH (взятых в качестве контролей) в клетках НЕК293, трансфицированных специфическими siPHK против eL29 или контрольной siPHK. Диаграмма показывает результаты денситометрии uL5-специфичных сигналов на вестерн-блоте, полученном в трёх биологических повторах (**p < 0.01, тест Стьюдента).

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 (Рисунок 39 A). Для одного из этих белков, а именно uL5, с помощью вестерн-блот анализа с использованием специфических антител против uL5 показано, что его уровень в клетке снижается в ответ на снижение уровня eL29 (Рисунок 39 Б).

3.1.3.3 Клеточные процессы, ассоциированные с генами, экспрессия которых изменяется при снижении уровня eL29

Для набора DEGs проведен анализ обогащения по функциональной принадлежности с использованием метода категоризации GeneOntology (далее GO). Кроме того, сходный анализ выполнен с помощью пакета ReactomePA, что позволило выявить биологические процессы и пути, в которые могут быть вовлечены DEGs. С использованием ReactomePA-анализа обнаружено, что ап-регулируемые DEGs ассоциированы с широким спектром клеточных путей, в том числе связанных с внутриклеточной передачей сигнала, апоптозом, сплайсингом, формированием коллагена и некоторыми другими (Рисунок 40). GO-анализ вышеуказанного набора DEGs показал, что они имеют отношение к таким процессам, как контроль качества неправильно свернутых или не полностью синтезированных белков (*UFD1*, *RNF5*, *HDAC6* и др.), ответ на стресс эндоплазматического ретикулюма (*CUL7*, *NFE2L1*, *SRPRA* и др.), организация митохондрий (COX17, LETM1, UQCC3 и др.), регуляция активностей ГТФаз (*AKT2*, *GPSM1*, *GDI1* и др.) и регуляция активности митотического цикла (*CDK10*, *INCENP*, *DCTN1* и др.) (Таблица 4).



Рисунок 40. Точечный график, отражающий клеточные пути, ассоциированные с ап-регулируемыми DEGs. Показаны топ-20 по количеству вовлеченных генов клеточных путей из найденных 38 с параметром p.adj < 0.1 (Приложение 2, Таблица ПЗА). Цвет и размер точек на графике отражают уровень параметра p.adj и количество генов, вовлеченных в данный клеточный путь, соответственно.

GO даун-регулируемых DEGs выявил большее число процессов, анализ ассоциированных с этими генами, по сравнению с тем, что найдено для ап-регулируемых DEGs. Оказалось, что даун-регулируемые DEGs причастны к процессам, связанным с процессингом РНК (в частности рРНК), биогенезом рибонуклеопротеиновых комплексов (в частности, рибосом) (WDR12, DDX21, NPM1 и др.) и функционированием белок-синтезирующего аппарата, а именно: инициацией трансляции и регуляцией трансляции (EIF4EBP1, PTBP3, EIF2AK2 и др.) (Таблица 4). Кроме того, даун-регулируемые DEGs имеют отношение к процессам, ассоциированным с метаболизмом малых молекул, содержащих нуклеиновое основание (PPAT, NADK2NAMPT и др.), и с актиновыми филаментами (PDLIM5, SHROOM3, MYO1D, и др), а также к ядерному транспорту (NUP37, NUP58, XPOT и др.) и биосинтезу органофосфатов и фосфолипидов (OCRL, PLS1, PIGX и др.) (Таблица 4). Наконец, даунрегулируемые DEGs связаны также с такими процессами, как позитивная регуляция организации клеточных образований (MNS1, WASL, OCLN и др.), локализация белков на клеточной мембране (LIN7C, VAMP7, CD24 и др.), регуляция клеточного катаболизма (NAMPT, *PGAM1, MET* и др.), регуляция клеточного ответа на стресс (*CD44, HIF1A, UBE2N* и др.), и процессами, ассоциированными с вирусной инфекцией (MICB, AP1S2, CR2 и др.) (Таблица 4). Анализ с помощью пакета ReactomePA выявил причастность даун-регулируемых DEGs к ряду сигнальных путей, включая путь, ассоциированный с клеточным ответом на инфекцию, Ca²⁺-

опосредованный сигнальный путь, внеядерный эстроген-ассоциированный сигнальный каскад и другие, а также к некоторым из процессов, перечисленных выше (Рисунок 41).

Таблица 4. Результаты анализа обогащения по функциональной принадлежности DEGs, полученные с помощью Gene Ontology¹.

GO термин	Определение	Fold enrichment
	Ап-регулированные гены	
GO:0006515	Контроль качества неправильно сформированных или неполностью синтезированных белков	6.54
GO:0034976	Ответ на стресс эндоплазматического ретикулюма	2.76
GO:0007005	Организация митохондрий	2.39
GO:0043087	Регуляция активности ГТФаз	2.09
GO:0007346	Регуляция митотического клеточного цикла	2.09
	Даун-регулированные гены	
GO:0006413	Инициация трансляции	3.37
GO:0022613	Биогенез рибонуклеопротеиновых комплексов	2.87
GO:0008654	Процесс биосинтеза фосфолипидов	2.70
GO:0051169	Ядерный транспорт	2.61
GO:0090407	Процесс биосинтеза органофосфатов	2.52
GO:0006417	Регуляция трансляции	2.48
GO:0031346	Позитивная регуляция формирования клеточных образований	2.35
GO:0072657	Локализация белков на мембране	2.17
GO:0016032	Процессы, ассоциированные с вирусной инфекцией	2.11
GO:0006396	Процессинг РНК	2.08
GO:0055086	Метаболические процессы, связанные с малыми молекулами, содержащими азотистые основания	2.08
GO:0031329	Регуляция клеточного катаболизма	2.07
GO:0007015	Процессы, ассоциированные с актиновыми филаментами	2.03
GO:0080135	Регуляция клеточного ответа на стресс	2.01

¹Представлены только GO-термины с параметром FoldEnrichment > 2, которые являются вершинами древа иерархической кластеризации.

Все эти данные говорят о том, что дефицит рибосомного белка eL29 в клетке приводит к реорганизации экспрессии генов, что, по-видимому, является следствием того, что клеточная регуляторная машина пытается преодолеть негативные последствия, вызванные дисбалансом данного белка. Так, например, при понижении уровня eL29 снижается активность генов, ответственных за синтез рибосом и факторов трансляции, что может приводить к снижению скорости биосинтеза белка, и соответственно к снижению скорости клеточного роста. С другой стороны, активация генов, связанных с клеточным сигналингом, работой шаперонов, организацией митохондрий и формированием коллагена, происходящая при снижении уровня

eL29, означает, что клетка пытается скорректировать нарушения, связанные с организацией мембран и цитоскелета.



Рисунок 41. Точечный график, отражающий клеточные пути, ассоциированные с даун-регулируемыми DEGs. Показаны все обнаруженные 19 клеточных путей с параметром p.adj < 0.1 (Приложение 2, Таблица ПЗБ). Цвет и размер точек на графике отражают уровень параметра p.adj и количество генов, вовлеченных в данный клеточный путь, соответственно.

3.1.3.4 Гены-мишени р53 и с-Мус, экспрессия которых изменяется при снижении уровня eL29

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 [80, 128, 130]. 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 мPHK не изменился. В то же время в этом наборе оказались гены, которые рассматриваются как гены-мишени белка p53 [262]. Среди них 23 ап-регулируемых генов (*BAX, CES2, XPC* и др.) и 6 даун-регулируемых генов (*NLRP1, GNA11, CCNG1* и др.) (Приложение 2, Таблица П4). Можно предположить, что дефицит eL29 в клетках вызвал нарушения работы системы p53-MDM2, вследствие чего были запущены клеточные каскады, приводящие к изменениям в активности генов, регулируемых p53.

Ещё одним сигнальным каскадом, на функционирование которого влияют нарушения в биогенезе рибосом, является каскад, регулируемый протоонкогенным белком с-Мус [9, 103-106, 109]. Как и в случае с геном p53, экспрессия гена *МYC* 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 с-Мус [263]. Среди них оказалось 57 ап-регулируемых и 55 даун-регулируемых генов (Приложение 2, Таблица П5). Реорганизация экспрессии этих генов в eL29-дефицитных клетках может быть обусловлена нарушением взаимодействия с-Мус с его клеточными партнерами. В целом, факт того, что среди DEGs в условиях дефицита рибосомного белка eL29 в клетке может являться триггером, запускающим процессы, ассоциированные с онкогенезом. Данное предположение находится в едином ключе с современной концепцией относительно существования связи между нарушениями в биогенезе рибосом и трансляции и процессами, ассоциированными со злокачественной трансформацией клеток [12, 13, 316].

Таким образом, определение изменений в профиле транскриптома клеток млекопитающих, обусловленных дефицитом рибосомного белка eL29, позволило установить взаимосвязь между балансом eL29 и активностью определенных генов, и, кроме того, выявить процессы, в которые вовлечены белки, кодируемые eL29-зависимыми генами.

3.2 Обсуждение результатов

В настоящей работе впервые исследованы функциональные свойства рибосомных белков eS1, uS19 и eL29 в клетках млекопитающих. С использованием метода PAR-CLIP установлено, что клеточными партнерами белка eS1, помимо pPHK, являются PHK, кодируемые генами *RNU11* и *RNU5A-1*, которые взаимодействуют с eS1 преимущественно через U-богатые участки, соответствующие регионам так называемого Sm-сайта в U11 мяPHK и апикальной части петли I в U5 мяPHK. Оказалось, что eS1 ассоциирован с U11 пре-мяPHK как в ядре, так и в цитоплазме, а с U11/U12 мяPHП в ядре. Установлено, что понижение содержания eS1 в клетках приводит к повышению уровня U11 пре-мяPHK и снижению эффективности сплайсинга пре-мPHK, содержащих минорные интроны. Показано, что связывание eS1 с транскриптом U11 мяPHK *in vitro* сопровождается значительными структурными перестройками сахарофосфатного остова в регионе Sm-сайта, за узнавание которого ответственен N-концевой лизин-богатый участок eS1.

С использованием модифицированного метода PAR-CLIP, включающего элементы протокола рибосомного профайлинга, выявлены на уровне транслятома взаимодействия клеточных мРНК с белком uS19, чей неструктурированный эукариот/архей-специфичный С-хвост является ключевым компонентом декодирующего центра 80S рибосом. Установлено, что в клетках с остановленной трансляцией uS19 контактирует с кодонами мРНК в рибосомном Аучастке, расположенными в G/A-богатых регионах, кодирующих преимущественно чередующиеся остатки лизина/глутамина и реже аргинина.

С использованием метода РНК-сек показано, что снижение уровня рибосомного белка eL29 в клетках приводит к изменению экспрессии более чем тысячи генов на уровне представленности их мРНК, не влияя при этом существенно на жизнеспособность клеток, уровень рРНК и глобальную трансляцию. Установлены клеточные процессы и пути, ассоциированные с генами, чья экспрессия изменилась в ответ на дефицит eL29. Среди этих генов оказались также мишени транскрипционных факторов p53 и с-Мус, что указывает на возможную связь дисбаланса eL29 со злокачественной трансформацией клеток. В целом, эти данные говорят о существенной реорганизации клеточного транскриптома при дефиците eL29.

3.2.1 Роль рибосомного белка eS1 в процессинге U11 пре-мяРНК и функционировании минорной сплайсосомы

U11 мяРНК является U12-зависимым компонентом минорной сплайсосомы. осуществляющим сплайсинг пре-мРНК с редкими интронами [295]. Известно, что сложный мультикомпонентный белковый комплекс (SMN) отвечает за процессинг и созревание премяРНК в цитоплазме, в состав которого входят белок SMN (от англ. survival of motor neurons), гемины 2-8 и другие белки [293, 294]. SMN-комплекс обеспечивает формирование Sm-кора, состоящего из Sm-белков, вокруг Sm-сайтов пре-мяРНК. Данные, что eS1 является ассоциированным с U11 пре-мяРНК как в ядре, так и в цитоплазме и остается также связанным со зрелой U11 мяРНК, позволили заключить, что eS1 экспортируется из ядра в цитоплазму в комплексе с U11 пре-мяРНК и после процессинга последней импортируется обратно в ядро в составе U11/U12 мяРНП. Структурные изменения U11 мяРНК-транскрипта в районе Sm-сайта, выявленные при его комплексообразовании с ^{His6-FLAG}eS1, вероятнее всего, отражают перестройки в соответствующем регионе U11 пре-мяРНК, индуцируемые ее связыванием с eS1 в ядре, в которое вовлекается лизин-богатый неструктурированный N-концевой участок eS1. По-видимому, конформационные изменения в регионе Sm-сайта U11 пре-мяРНК необходимы для её корректного взаимодействия с SMN-комплексом в цитоплазме, приводящего к формированию кора Sm-белков. Очевидно, что к моменту образования этого кора Sm-сайт должен быть свободен от вышеупомянутого N-концевого участка eS1, непосредственно взаимодействующего с Sm-сайтом. Однако, поскольку eS1 остается ассоциированным с U11 пре-мяРНК в цитоплазме, разумно предположить, что после образования Sm-кора в связывание с eS1 становится вовлеченным другой её участок. Как показал анализ с использованием структуры U1 мяРНК, гомолога U11 мяРНК, таким участком мог бы быть тот, что находится в углублении между SL I и SL III и по своей структуре напоминает участок 18S pPHK, с которым взаимодействует eS1 в 40S субчастице. Наличие такого участка для eS1 подтверждено экспериментами *in vitro* по связыванию U11 мяРНК-транскрипта с ^{His6-FLAG}eS1 и химическому пробингу его структуры в комплексе с этим белком. Таким образом, можно заключить, что в результате связывания Sm-белков с Sm-сайтом U11 пре-мяРНК неструктурированный Nконцевой участок eS1 высвобождается, и eS1 остается связанным с PHK в основном за счет участка, который взаимодействует с 18S рРНК в 40S субчастице. Хотя точный механизм процессинга 3'-концевого участка U11 пре-мяРНК не известен, данные о том, что при понижении уровня eS1 в клетках увеличивается количество U11 пре-мяРНК и нарушается сплайсинг пре-мРНК, содержащих минорные интроны, говорят о том, что eS1 принимает участие в биогенезе U11 мяРНК.

Несмотря на то, что в экспериментах in vitro не удалось обнаружить связывания eS1 с U5 мяРНК/U5 пре-мяРНК, данные о том, что ^{FLAG}eS1 образует соответствующие сшивки в клетках, позволяют сделать предположение, что eS1 может взаимодействовать с U5 мяРНК в процессе сплайсинга, будучи при этом связанным с U11 мяРНК. Принято считать, что на начальных стадиях сплайсинга пре-мРНК с минорными интронами, U11 мяРНК узнаёт участок интрона, относящийсяся к 5'-сайту сплайсинга, и вместе с U12 мяРНК формирует так называемый пресплайсосомный комплекс (комплекс А) [289, 295]. На следующем этапе U5 мяРНП соединяется с комплексом А в виде тройного комплекса, состоящего также из U4atac и U6atac мяРНП, приводя к формированию минорной пре-каталитической сплайсосомы (комплекс Б). В ходе ряда структурных превращений комплекс Б переходит в каталитически активную конформацию (комплекс Б*), схожую с таковой в мажорной сплайсосоме [289, 295]. Хотя точный состав комплекса Б для минорной сплайсосомы пока не установлен, U1 мяРНК (гомолог U11 мяРНК) и U5 мяРНК обнаружены среди компонентов аналогичного комплекса мажорной сплайсосомы [288, 317]. Поэтому можно было предположить, что U5 и U11 мяРНК входят в состав комплекса Б минорной сплайсосомы. Этот комплекс к тому же является единственным её состоянием, в котором U5 и U11 мяРНК могут оказаться сближенными, поскольку в комплексе A еще нет U5 мяРНК, а в комплексе Б* уже отсутствует U11 мяРНК. В комплексе Б минорной сплайсосомы U5 мяРНК может взаимодействовать посредством петли I с частью экзона, находящейся рядом с 5'-сайтом сплайсинга минорного интрона, тогда как U11 мяРНК может связываться с частью

интрона. сближенной с 5'-сайтом сплайсинга, посредством 5'-концевого участка. расположенного рядом со спиралью Н [318, 319]. Следовательно, белок eS1, связанный с U11 мяРНК, может контактировать с U5 мяРНК через высвободившийся лизин-богатый неструктурированный N-концевой участок (см. выше). Такой сценарий вполне реалистичен, поскольку данный участок eS1 не может взаимодействовать с U-богатым регионом Sm-сайта U11 мяРНК, когда последний занят комплексом Sm-белков. Следовательно, N-концевой участок eS1 в зрелом U11 мяРНП должен быть более подвижен, чем в комплексе eS1 с U11-премяРНК. Соответственно, в комплексе Б этот участок eS1 мог бы взаимодействовать с петлёй I U5 мяРНК, а также с петлями Іb и Іс (см. Рисунок 20 Б, стр. 93). На основании полученных данных предложен возможный путь вовлечения белка eS1 в биогенез U11 мяРНК и работу минорной сплайсосомы, схематически представленный на Рисунке 42.



Рисунок 42. Схематическое представление возможного пути участия рибосомного белка eS1 в клеточных процессах, связанных с процессингом U11 пре-мяРНК и работой минорной сплайсосомы. Малые ядерные РНК изображены как остовы их вторичных структур синим цветом. Справа жёлтым цветом обозначен мультикомпонентный белковый комплекс (называемый Integrator [320]), ответственный, в том числе, за процессинг 3'-конца малых ядерных РНК.

Согласно данной схеме eS1 связывается с U11 пре-мяРНК в ядре в основном за счёт взаимодействий со шпильками SLI и SLIII и петлей Н. 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-мяРНК, 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-мяРНК и высвобождением N-концевого участка eS1. После процессинга eS1 в комплексе с U11 мяРНП импортируется обратно в ядро, где он может вовлекаться в сборку минорной сплайсосомы и взаимодействовать N-концевым участком с U5 мяРНК в районе 5'-сайта сплайсинга пре-мРНК в пре-каталитическом комплексе минорной сплайсосомы.

3.2.2 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, выявленное с помощью PAR-CLIP, свидетельствует о том, что в момент обработки клеток данным антибиотиком в них уже присутствовали рибосомные комплексы, в которых s⁴Uсодержащий 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 большое количество таких остатков, при прохождении через рибосомный туннель, начинающийся в пептидил-трансферазном центре [308, 321]. Одной из функций этого туннеля является обеспечение беспрепятственного выхода растущей цепи из рибосомы. Данные, полученные с использованием бактериальных рибосом, свидетельствуют о том, что стенки этого туннеля, сформированные в основном нуклеотидными остатками рРНК большой субчастицы [322, 323], способны контролировать продвижение аминокислотной последовательности проходящего через туннель пептида [324]. Кроме того показано, что продвигающийся пептид может взаимодействовать со стенками туннеля, приводя к задержке рибосом на соответствующих участках мРНК в процессе элонгации трансляции [325, 326]. Помимо этого, с использованием бесклеточной белок-синтезирующей системы на основе ретикулоцитного лизата кролика установлено, что положительно заряженные остатки Lys и Arg, находясь в рибосомном туннеле, могут модулировать скорость элонгации трансляции, приводя к временному аресту рибосом [327]. Однако для полипептидных цепей, состоящих из отрицательно заряженных остатков Glu, такого эффекта не замечено. В связи с этим, можно

предположить, что паузы рибосом на G/A-богатых регионах мРНК, выявленные с помощью PAR-CLIP, являются следствием снижения скорости элонгации трансляции, вызванного чередованием отрицательно заряженных остатков Glu и положительно заряженных остатков в растущем полипептиде. При транслокации пептидил-тРНК Lys/Arg чередование вышеописанных аминокислотных остатков может значительно осложнять прохождение пептидильной части из А-участка в Р-участок в 60S субчастице. Соответственно, состояние пептидил-тРНК в паузированных рибосомах может быть охарактеризовано как гибридное состояние Р/А. С другой стороны, пептидил-тРНК может находиться в Р/Р-состоянии, но структурные перестройки в пептидил-трансферазном центре, вызванные взаимодействием растущего пептида со стенками туннеля, не позволяют аминоацил-тРНК попасть в А-участок, и как следствие, кодон в А-участке остается свободным и способен взаимодействовать с uS19. Возможность таких структурных перестроек продемонстрирована в исследованиях по структуры паузированных бактериальных 70S рибосом. изучению полученных с использованием мРНК, кодирующих специфические пептиды, вызывающие арест трансляции, с применением крио-электронной микроскопии [328, 329]. Отсутствие сшивок ^{FLAG}uS19 в регионах мРНК, отличных от описанных выше, вероятно, связано с защитным эффектом находиться в А/Р-состоянии пептидил-тРНК, которая может [330] В оставшихся циклогексимид-арестованных рибосомах, подобным эффекту, наблюдаемому in vitro в комплексах 80S рибосом с аналогами мРНК II и III.

Таким образом, основываясь на полученных данных, можно заключить, что при попадании кодона мРНК в А-участок рибосомы его нуклеотидные основания контактируют с С-концевым хвостом uS19, который становится недоступным для этих контактов, когда Аучасток занимает аминоацил- или пептидил-тРНК. Однако данные по аффинной модификации 80S рибосом вышеуказанными аналогами мРНК показали, что молекула тРНК в А-участке лишь частично экранирует uS19 от сшивки с s⁴U-содержащим кодоном в этом участке. Различие в эффектах экранирования тРНК в А-участке, наблюдаемых в системах in vivo и in vitro, по всей видимости, обусловлены разными путями связывания молекул тРНК в А-участке. В последнем случае тРНК, соответствующая триплету в А-участке (используемая в концентрации существенно превышающей концентрацию рибосом для достижения наибольшего уровня связывания), попадает в него напрямую без стадий узнавания и аккомодации, которые имеют место в реальной белоксинтезирующей системе, где аминоацилтРНК доставляется к рибосоме в виде тройного комплекса с eEF-1 и GTP. Следовательно, в системе in vitro тРНК, связанная в А-участке, должна быть в равновесии со свободной несвязанной тРНК. Таким образом, при облучении такой системы uS19 может сшиваться с s⁴Uсодержащим триплетом только в тот момент, когда тРНК уже диссоциировала из А-участка, а

следующая тРНК ещё не связалась в А-участке. В системе транляции *in vivo* молекула тРНК, связанная в А-участке, не может покинуть его до стадии транспептидации и последующей транслокации образующейся пептидил тРНК из А-участка в Р-участок, что приводит к полному экранированию uS19 от сшивания с s⁴U-содержащим кодоном в А-участке.

Зачем рибосомный белок uS19 взаимодействует с мРНК в декодирующем центре в ходе элонгации трансляции? Принимая во внимание тот факт, что C-хвост uS19 контактирует со стоп-кодоном в претерминационном комплексе [4, 68, 331-333], можно предположить, что функциональное предназначение присутствия С-концевого фрагмента данного хвоста в декодирующем центре рибосомы состоит в обеспечении правильного положения кодона в Аучастке, когда происходит его узнавание соответствующей аминоацил-тРНК или eRF1. Однако это предположение не согласуется с недавно представленными данными о том, что делеция 15 С-концевых аминокислотных остатков в uS19, делающая 80S рибосомы полностью некомпетентными в трансляции, не влияет на способность 80S инициаторного комплекса связывать аминоацил-тРНК в А-участке, из чего следовало, что связавшаяся аминоацил-тРНК не активна в транспептидации. Все это послужило основанием для вывода о критической роли С-хвоста uS19 в аккомодации аминоацил тРНК в А-участке, одной из лимитирующих стадий, определяющих скорость трансляции, И предшествующей транспептидации [273]. Соответственно, функциональная роль взаимодействия С-хвоста uS19 с кодоном мРНК в свободном А-участке, очевидно, связана с поддержанием правильной конформации этого кодона, которая обеспечивает аккомодацию распознавшей его аминоацил-тРНК в А-участке, делая её способной к акцептированию пептидильного остатка от пептидил-тРНК в Р-участке (Рисунок 43 А).

Неструктурированный консервативный у эукариот и архей С-концевой хвост uS19 впервые полностью разрешён в недавно представленных трёхмерных моделях рибосом человека, соответствующих различным стадиям элонгации трансляции [334]. Показано, что этот хвост подвергается динамичным перестройкам в ходе элонгации трансляции, взаимодействуя при этом как с молекулами тРНК в А- и Р-участках, так и с кодоном мРНК в Аучастке. Это означает, что защитный эффект молекулы тРНК в А-участке по отношению к uS19, наблюдаемый в настоящей работе, связан с переключением взаимодействия uS19 в Аучастке от кодона мРНК к тРНК при переходе рибосом из состояния с вакантным А-участком в состояние, соответствующее претранслокационному комплексу, как предполагалось ранее [1].

В ряде исследований, где анализировали паттерны герминальных и соматических мутаций, характерных для хронической лимфоцитарной лейкемии (CLL), обнаружено, что наличие мутаций в C-хвосте uS19 ассоциировано с более тяжёлым течением и рефрактерностью CLL к проводимой химиотерапии [335, 336]. В дополнение к этому показано, что мутации

аминокислотных остатков C-хвоста uS19 приводят к снижению точности трансляции [337], что может служить объяснением более агрессивного течения CLL у пациентов, имеющих такие мутации. Кроме того, у пациентов с болезнью Паркинсона отмечали повышенный уровень фосфорилирования C-хвоста uS19 [338], что также может влиять на точность трансляции. Все это свидетельствует о том, что C-хвост белка uS19 является критически важным для точности трансляции, нарушение которой может приводить к тяжелым последствиям. При этом для многих мутаций связь с нарушением точности трансляции еще предстоит выявить.



Рисунок 43. Роль С-концевого неструктурированного хвоста рибосомного белка uS19 в процессе элонгации трансляции. (А) Расположение uS19, мРНК и молекул тРНК в А-, Р- и Е-участках на 40S

рибосомной субчастице согласно субатомной модели рибосомных комплексов [8] (PDB ID: 5LZS), в которой С-концевой неструктурированный участок uS19 разрешён лучше, чем в других доступных моделях рибосом млекопитающих. Репрезентация рисунка из [273]. Сверху слева – общий вид 40S субчастицы, сверху справа – увеличенный вид фрагмента 40S субчастицы, содержащий фрагмент Схвоста uS19, кодонов мРНК в А- и Р- участках, а также антикодоновых шпилек тРНК, находящихся в этих участках. uS19 показан розовым цветом, его С-концевой участок (131-140), разрешённый на модели, показан в виде сфер. С-концевые аминокислотные остатки в позициях 141-145 не разрешены; молекула мРНК показана в виде желтых сфер, молекулы тРНК в А-, Р- и Е-участках показаны темносиним, красным и зеленым цветом соответственно. Снизу – та же модель, что и сверху справа, только с делетированным С-концевым участком (130-145) рибосомного белка uS19. (Б) 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 красным и зелёным цветом соответственно. Кодон-антикодоновые взаимодействия между кодоном мРНК и антикодоном тРНК в Ручастке 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

Стоит также отметить, что N-концевая часть рибосомного белка eS30, по всей видимости, способствует C-концевому хвосту uS19 в поддержании правильной конформации кодона в A-участке, необходимой для аккомодации распознавшей его тPHK. Данное предположение основано на том, что eS30 также расположен в рибосомном декодирующем центре и его взаимодействие с кодоном в A-участке полностью блокируется лигандом, связывающимся в этом участке [67, 68].

В целом, полученные результаты свидетельствуют о том, что С-концевой хвост белка uS19 напрямую взаимодействует с клеточными мPHK в А-участке (Рисунок 43 Б). Поскольку эти взаимодействия возможны только тогда, когда кодон в А-участке не участвует в формировании дуплекса мPHK-тPHK, последовательности в мPHK, с которыми взаимодействует uS19, – это те регионы, на которых рибосомы делают паузы в ходе элонгации трансляции. Эти регионы мPHK кодируют Lys/Glu- и Arg-богатые полипептидные последовательности, которые могут замедлять продвижение растущей полипептидной цепи через рибосомный туннель. Таким образом, полученные данные проливают свет на неизвестные ранее особенности элонгации трансляции в клетках млекопитающих, позволяя поновому взглянуть на этот процесс.

3.2.3 Рибосомный белок eL29 как возможный регулятор экспрессии генов

Анализ данных РНК-сек, полученных для клеток НЕК293, дефицитных по эукариотспецифичному 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 НЕК293, 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.

Примечательно, что 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. Возможно, гены этих пяти белков контролируются специфическими механизмами, отличными от тех, которые регулируют клеточный баланс оставшихся рибосомных белков, и понижение уровня eL29 каким-то образом отразилось на этих механизмах. Например, uL11, который, как и eL29, является «несущественным рибосомным белком» [339], способен контролировать собственный синтез посредством ингибирования сплайсинга своей пре-мРНК [340], тогда как баланс большинства рибосомных белков обеспечивается MDM2-опосредованной деградацией [81, 130]. Кроме того, белки uL5 и uL18 включаются в состав 60S рибосомной субчастицы в виде комплекса с 5S рРНК, которая в свою очередь синтезируется РНК полимеразой III, тогда как другие рРНК синтезируются РНК полимеразой I [341]. Это означает, что синтез данных белков и 5S рРНК может регулироваться координированно и отдельно от других рибосомных белков. С другой стороны, повышение уровней мРНК рибосомных белков uL23, uS7 and eS21 в ответ на дефицит eL29 могло быть связано с их возможным участием в регуляции процессов, которые активирует клетка, пытаясь исправить нарушения, вызванные дисбалансом eL29.

Примечательно, что дефицит eL29 привел к изменениям экспрессии генов, которые являются генами-мишенями транскрипционных факторов p53 и с-Мус, не затрагивая при этом экспрессию самих генов *TP53* и *MYC*, по крайней мере, на уровне баланса их мPHK. Среди этих генов присутствует ген *BAX*, кодирующий BCL2-ассоциированный белок X, являющийся

регулятором апоптоза, ген *MKNK2*, кодирующий MAPK-ассоциированную серин/треонин киназу 2, которая играет важную роль в злокачественной трансформации клеток и процессе малигнизации, а также ген *PIDD1*, кодирующий р53-индуцируемый белок 1, содержащий домен смерти, который является эффектором р53-зависимого запуска апоптоза. Все эти данные свидетельствуют о том, что дисбаланс eL29 может быть ассоциирован с процессом онкогенеза и злокачественной трансформации клеток.

Данные о жизнеспособности eL29-дефицитных клеток HEK293 согласуются с наблюдением, что мыши с гомозиготной нулевой мутацией eL29 способны выживать, несмотря на различные нарушения роста [23, 33, 312]. Хотя трудно судить о причинах этих специфических нарушений, появление фенотипа с уменьшенным размером скелета и ломкостью костей у таких мышей может быть связано со значительной дисрегуляцией гена COL24A1 (LFC = 1,00), кодирующего фибриллярный коллаген, который экспрессируется в костях и регулирует фибриллогенез коллагена типа I, из-за отсутствия у них eL29.

Кроме того, данные, полученные в настоящей работе, позволяют объяснить факт пропорционального уменьшения размеров тела и органов у мышей, дефицитных по eL29, причиной которого, как считают авторы, была недостаточность рибосом, вызванная отсутствием eL29 [23, 33, 312]. Наши данные показали, что, хотя рибосомы в отсутствие eL29 могут участвовать в трансляции, уменьшение уровня этого белка в клетках приводит к снижению активности генов, связанных с процессами, которые обеспечивают биогенез рибосом и контролируют их функционирование во время трансляции. Следовательно, уменьшение размеров тела и органов у мышей, скорее всего, обусловлено дефицитом продуктов генов, ассоциированных с вышеуказанными процессами, в результате снижения уровней их экспрессии из-за отсутствия eL29, что приводило к недостаточности рибосом и нарушению регуляции трансляции. Такими генами, согласно полученным данным, являются гены, кодирующие геликазы DExD-бокс 21 и 52, участвующие в реорганизации вторичной структуры РНК; WD повтор-содержащие белки 12, 36 и 43, участвующие в процессинге и созревании молекул пре-рРНК и RIO киназа 3, участвующая в процессинге пре-40S субчастиц. Кроме того, к ним относятся гены, кодирующие UTP3-компонент малой субъединицы процессомы, участвующий в созревании пре-рРНК малой субчастицы; TSR1-белок, участвующий в процессинге пре-рРНК, а также EIF2AK2 и EIF4G2, фосфорилирующие альфа субъединицу eIF2 и гамма субъединицу eIF4 соответственно, и другие.

С другой стороны, недостаток рибосом вместе с нарушением трансляционного контроля может привести к дефициту специфических белков, и, таким образом, инициировать запуск компенсаторных механизмов, активирующих транскрипцию генов, кодирующих эти белки. Логично предположить, что по этой причине были активированы гены, чья экспрессия

повысилась при снижении уровня eL29. Среди них оказались гены, кодирующие фактор 2 сборки стресс-гранул (G3BP2), митохондриальную PHK-полимеразу (MtRPOL), DExH-боксгеликазу 34 (DHX34), ядрышковый фосфопротеин 1 (NOLC1), участвующий в регуляции работы PHK-полимеразы I и активатор белка теплового шока 90 кДа. В этот набор входят также гены, кодирующие ATPазный гомолог 1 (AHA1), являющийся ко-активатором молекулярного шаперона HSP90AA1 посредством модуляции ATPазной активности; митохондриальную протеин-аденилаттрансферазу SelO (SelO), катализирующую перенос AMP на остатки серина, треонина и тирозина; тирозин-специфичную протеинкиназу CSK (CSK) и многие другие.

И, наконец, поскольку известно, что eL29 является гепарин/гепаран сульфатсвязывающим белком, который вовлечен в межклеточные контакты и коммуникацию [28], неудивительно, что его дефицит приводит к активизации работы генов, ассоциированных с образованием коллагена и функционированием аппарата Гольджи. Ими оказались гены, кодирующие некоторые типы коллагена (альфа-цепи 1, 2 и 6 коллагена типа IV, а также альфацепь 1 коллагена типов VI, XII и XXIV); рецептор к инсулиноподобному фактору роста 2, участвующий во внутриклеточном транспорте лизосомальных ферментов; субъединицу 1 динактина, участвующую в транспорте везикул и органелл вдоль микротрубочек, и другие.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что дефицит рибосомного белка eL29 приводит к значительной реорганизации транскриптома клеток, не влияя при этом существенно на их выживаемость. На основании этих результатов предложена гипотетическая схема, демонстрирующая влияние дефицита eL29 в клетках на экспрессию генов (Рисунок 44).

В соответствии с этой схемой недостаток данного белка приводит к дисбалансу некоторых рибосомных белков и дисрегуляции систем p53 и с-Мус, что может сказываться на биогенезе рибосом и регуляции трансляции. Кроме того, для рибосом, дефицитных по eL29, может быть характерен отличный от нормальных рибосом паттерн трансляции, что может привести к дисбалансу продуктов множества генов. Вместе с этим могут быть нарушены клеточные процессы, в которых участвует eL29, выполняя свои внерибосомные функции. Череда вышеописанных событий могла способствовать реорганизации транскриптома клеток HEK293 при дефиците рибосомного белка eL29.



Рисунок 44. Схематическое представление результатов анализа данных РНК-сек, полученных для eL29дефицитных клеток HEK293. Красным и зелёным шрифтом обозначены клеточные процессы, ассоциированные с генами, чьи уровни экспрессии снизились или повысились в ответ на понижение уровня eL29 соответственно. Красные и зёленые стрелки показывают даун-регулируемые и апрегулируемые гены соответственно. ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа представляет собой первое исследование *in vivo* структурнофункциональных 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 премяРНК и сплайсинге пре-мРНК в составе минорной сплайсосомы, где он взаимодействует со зрелыми U11 и U5 мяРНК. 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 циклогексимидом. 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.

Совокупность полученных результатов даёт новое представление о роли рибосомных белков млекопитающих в функционировании клеточных структур и о важности их баланса для нормальной экспрессии генов, что имеет фундаментальное значение для понимания механизмов, посредством которых рибосомные белки вовлекаются в разнообразные клеточные процессы. Последнее особенно важно в свете всё возрастающего количества данных о причастности рибосомных белков, в том числе eS1, uS19 и eL29, к развитию ряда наследственных заболеваний и злокачественной трансформации клеток. Информация, полученная в настоящей работе, несомненно, будет способствовать распутыванию сложнейшей сети внутриклеточных связей, вовлекающих рибосомные белки, и может стать основой для разработки подходов, направленных на борьбу с заболеваниями, связанными с дефектами экспрессии генов рибосомных белков, сборки рибосомных субчастиц и трансляции.
выводы

• Созданы стабильные линии клеток на основе HEK293, 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 PHK с помощью метода PAR-CLIP.

• Партнёрами рибосомного белка eS1 в клетках являются PHK, кодируемые генами *RNU11* и *RNU5A-1*, которые связываются с eS1 через U-богатые последовательности, соответствующие району Sm-сайта в U11 мяPHK и апикальной петле I в U5 мяPHK, что указывает на участие eS1 вне рибосомы в процессах, имеющих отношение к сплайсингу пре-мPHK.

• В клетках белок eS1 ассоциирован с U11 пре-мяРНК в ядре и цитоплазме и со зрелой U11 мяРНК в составе U11/U12 мяРНП в ядре, что указывает на причастность eS1 к функционированию минорной сплайсосомы. 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, свидетельствуя о роли eS1 в биогенезе U11 пре-мяРНК.

• Связывание белка eS1 c T7 транскриптом U11 мяРНК 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-мяРНК, 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-тРНК. 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 с-Мус, что указывает на возможную связь между дисбалансом eL29 и онкогенезом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Graifer D., Karpova G. Interaction of mRNA with ribosomes in the course of translation in higher eukaryotes // In: mRNA: Molecular Biology, Processing and Function. (eds Fernandez I. and Jackson L.) pp 1-42. Nova Science Publishers Inc. 2018, New York. ISBN: 978-1-53613-169-7 (eBook), ISBN: 978-1-53613-168-0 (hardcover).

2. Graifer D., Karpova G. Photoactivatable RNA derivatives as tools for studying the structural and functional organization of complex cellular ribonucleoprotein machineries // RSC Adv. -2013. -V. 3. -P. 2858-2872.

3. Graifer D., Karpova G. Roles of ribosomal proteins in the functioning of translational machinery of eukaryotes // Biochimie. – 2015. – V. 109. – P. 1-17.

4. Chavatte L., Frolova L., Kisselev L., Favre A. The polypeptide chain release factor eRF1 specifically contacts the s(4)UGA stop codon located in the A site of eukaryotic ribosomes // Eur. J. Biochem. -2001. - V. 268, No 10. - P. 2896-904.

5. Graifer D., Molotkov M., Styazhkina V., Demeshkina N., Bulygin K., Eremina A., Ivanov A., Laletina E., Ven'yaminova A., Karpova G. Variable and conserved elements of human ribosomes surrounding the mRNA at the decoding and upstream sites // Nucleic Acids Res. – 2004. – V. 32, No 11. – P. 3282-93.

6. Pisarev A. V., Kolupaeva V. G., Yusupov M. M., Hellen C. U., Pestova T. V. Ribosomal position and contacts of mRNA in eukaryotic translation initiation complexes // EMBO J. – 2008. – V. 27, No 11. – P. 1609-21.

7. Khairulina J., Graifer D., Bulygin K., Ven'yaminova A., Frolova L., Karpova G. Eukaryote-specific motif of ribosomal protein S15 neighbors A site codon during elongation and termination of translation // Biochimie. -2010. - V. 92, No 7. - P. 820-5.

8. Shao S., Murray J., Brown A., Taunton J., Ramakrishnan V., Hegde R. S. Decoding Mammalian Ribosome-mRNA States by Translational GTPase Complexes // Cell. – 2016. – V. 167, № 5. – P. 1229-1240 e15.

9. Dai M. S., Lu H. Crosstalk between c-Myc and ribosome in ribosomal biogenesis and cancer // J. Cell Biochem. – 2008. – V. 105, № 3. – P. 670-7.

10. Sulima S. O., Hofman I. J. F., De Keersmaecker K., Dinman J. D. How Ribosomes Translate Cancer // Cancer Discov. – 2017. – V. 7, № 10. – P. 1069-1087.

11. Dolezal J. M., Dash A. P., Prochownik E. V. Diagnostic and prognostic implications of ribosomal protein transcript expression patterns in human cancers // BMC Cancer. – 2018. – V. 18, № 1. – P. 275.

12. Catez F., Dalla Venezia N., Marcel V., Zorbas C., Lafontaine D. L. J., Diaz J.-J. Ribosome biogenesis: An emerging druggable pathway for cancer therapeutics // Biochemical Pharmacology. – 2019. – V. 159. – P. 74-81.

13. Penzo M., Montanaro L., Treré D., Derenzini M. The Ribosome Biogenesis-Cancer Connection // Cells. – 2019. – V. 8, № 1. – P. 55.

14. Ivanov A. V., Malygin A. A., Karpova G. G. Eukaryotic ribosomal proteins: Interactions with their own pre-mRNAs and their involvement in splicing regulation // Molecular Biology. -2006. - V. 40, $N_{\rm P} 4. - P. 570-578$.

15. Laletina E., Graifer D., Malygin A., Ivanov A., Shatsky I., Karpova G. Proteins surrounding hairpin IIIe of the hepatitis C virus internal ribosome entry site on the human 40S ribosomal subunit // Nucleic Acids Res. -2006. - V. 34, No 7. - P. 2027-36.

16. Babaylova E., Graifer D., Malygin A., Stahl J., Shatsky I., Karpova G. Positioning of subdomain IIId and apical loop of domain II of the hepatitis C IRES on the human 40S ribosome // Nucleic Acids Res. -2009. - V. 37, No 4. - P. 1141-51.

17. Muhs M., Yamamoto H., Ismer J., Takaku H., Nashimoto M., Uchiumi T., Nakashima N., Mielke T., Hildebrand P. W., Nierhaus K. H., Spahn C. M. Structural basis for the binding of IRES RNAs to the head of the ribosomal 40S subunit // Nucleic Acids Res. -2011. - V. 39, No 12. - P. 5264-75.

18. des Georges A., Dhote V., Kuhn L., Hellen C. U., Pestova T. V., Frank J., Hashem Y. Structure of mammalian eIF3 in the context of the 43S preinitiation complex // Nature. – 2015. – V. 525, № 7570. – P. 491-5.

19. Song D., Sakamoto S., Taniguchi T. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase activity by Bcl-2 in association with the ribosomal protein S3a // Biochemistry. -2002. -V. 41, No 3. -P. 929-34.

20. Cui K., Coutts M., Stahl J., Sytkowski A. J. Novel interaction between the transcription factor CHOP (GADD153) and the ribosomal protein FTE/S3a modulates erythropoiesis // J. Biol. Chem. – 2000. – V. 275, № 11. – P. 7591-6.

21. Raboudi N., Julian J., Rohde L. H., Carson D. D. Identification of cell-surface heparin/heparan sulfate-binding proteins of a human uterine epithelial cell line (RL95) // J. Biol. Chem. – 1992. – V. 267, N 17. – P. 11930-9.

22. Liu S., Smith S. E., Julian J., Rohde L. H., Karin N. J., Carson D. D. cDNA cloning and expression of HIP, a novel cell surface heparan sulfate/heparin-binding protein of human uterine epithelial cells and cell lines // J. Biol. Chem. – 1996. – V. 271, № 20. – P. 11817-23.

23. Kirn-Safran C. B., Oristian D. S., Focht R. J., Parker S. G., Vivian J. L., Carson D. D. Global growth deficiencies in mice lacking the ribosomal protein HIP/RPL29 // Dev. Dyn. – 2007. – V. 236, N 2. – P. 447-60.

24. Kirn-Safran C. B., D'Souza S. S., Carson D. D. Heparan sulfate proteoglycans and their binding proteins in embryo implantation and placentation // Semin Cell Dev. Biol. – 2008. – V. 19, № 2. – P. 187-93.

25. Hoke D. E., LaBrenz S. R., Hook M., Carson D. D. Multiple domains contribute to heparin/heparan sulfate binding by human HIP/L29 // Biochemistry. – 2000. – V. 39, № 51. – P. 15686-94.

26. Liu S., Julian J., Carson D. D. A peptide sequence of heparin/heparan sulfate (HP/HS)-interacting protein supports selective, high affinity binding of HP/HS and cell attachment // J. Biol. Chem. – 1998. – V. 273, N_{2} 16. – P. 9718-26.

27. Jacobs A. L., Julian J., Sahin A. A., Carson D. D. Heparin/heparan sulfate interacting protein expression and functions in human breast cancer cells and normal breast epithelia // Cancer Res. – 1997. – V. 57, № 22. – P. 5148-54.

28. Liu S., Hoke D., Julian J., Carson D. D. Heparin/heparan sulfate (HP/HS) interacting protein (HIP) supports cell attachment and selective, high affinity binding of HP/HS // J. Biol. Chem. – 1997. – V. 272, N 41. – P. 25856-62.

29. Liu S., Zhou F., Hook M., Carson D. D. A heparin-binding synthetic peptide of heparin/heparan sulfate-interacting protein modulates blood coagulation activities // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1997. – V. 94, N_{0} 5. – P. 1739-44.

30. Ta T. V., Baraniak D., Julian J., Korostoff J., Carson D. D., Farach-Carson M. C. Heparan sulfate interacting protein (HIP/L29) negatively regulates growth responses to basic fibroblast growth factor in gingival fibroblasts // J. Dent. Res. -2002. - V. 81, No 4. - P. 247-52.

31. Liu J. J., Zhang J., Ramanan S., Julian J., Carson D. D., Hooi S. C. Heparin/heparan sulfate interacting protein plays a role in apoptosis induced by anticancer drugs // Carcinogenesis. -2004. - V. 25, No 6. - P. 873-9.

32. Liu J. J., Huang B. H., Zhang J., Carson D. D., Hooi S. C. Repression of HIP/RPL29 expression induces differentiation in colon cancer cells // J. Cell. Physiol. – 2006. – V. 207, № 2. – P. 287-92.

33. Sloofman L. G., Verdelis K., Spevak L., Zayzafoon M., Yamauchi M., Opdenaker L. M., Farach-Carson M. C., Boskey A. L., Kirn-Safran C. B. Effect of HIP/ribosomal protein L29 deficiency on mineral properties of murine bones and teeth // Bone. – 2010. – V. 47, № 1. – P. 93-101.

34. Licatalosi D. D., Mele A., Fak J. J., Ule J., Kayikci M., Chi S. W., Clark T. A., Schweitzer A. C., Blume J. E., Wang X., Darnell J. C., Darnell R. B. HITS-CLIP yields genome-wide insights into brain alternative RNA processing // Nature. – 2008. – V. 456, № 7221. – P. 464-9.

35. Konig J., Zarnack K., Rot G., Curk T., Kayikci M., Zupan B., Turner D. J., Luscombe N. M., Ule J. iCLIP reveals the function of hnRNP particles in splicing at individual nucleotide resolution // Nat. Struct. Mol. Biol. -2010. - V. 17, No 7. - P. 909-15.

36. Hafner M., Landthaler M., Burger L., Khorshid M., Hausser J., Berninger P., Rothballer A., Ascano M., Jr., Jungkamp A. C., Munschauer M., Ulrich A., Wardle G. S., Dewell S., Zavolan M., Tuschl T. Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP // Cell. – 2010. – V. 141, $N_{\rm D}$ 1. – P. 129-41.

37. Wang Z., Gerstein M., Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics // Nat. Rev. Genet. -2009. - V. 10, No 1. - P. 57-63.

38. Ingolia N. T., Ghaemmaghami S., Newman J. R., Weissman J. S. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling // Science. – 2009. – V. 324, № 5924. – P. 218-23.

39. Khatter H., Myasnikov A. G., Natchiar S. K., Klaholz B. P. Structure of the human 80S ribosome // Nature. – 2015. – V. 520, № 7549. – P. 640-5.

40. Anger A. M., Armache J. P., Berninghausen O., Habeck M., Subklewe M., Wilson D. N., Beckmann R. Structures of the human and Drosophila 80S ribosome // Nature. – 2013. – V. 497, № 7447. – P. 80-5.

41. Kenmochi N., Kawaguchi T., Rozen S., Davis E., Goodman N., Hudson T. J., Tanaka T., Page D. C. A map of 75 human ribosomal protein genes // Genome Res. – 1998. – V. 8, № 5. – P. 509-23.

42. Yoshihama M., Uechi T., Asakawa S., Kawasaki K., Kato S., Higa S., Maeda N., Minoshima S., Tanaka T., Shimizu N., Kenmochi N. The Human Ribosomal Protein Genes: Sequencing and Comparative Analysis of 73 Genes // Genome Res. – 2002. – V. 12, № 3. – P. 379-90.

43. Ishii K., Washio T., Uechi T., Yoshihama M., Kenmochi N., Tomita M. Characteristics and clustering of human ribosomal protein genes // BMC Genomics. – 2006. – V. 7. – P. 37.

44. Warner J. R. The economics of ribosome biosynthesis in yeast // Trends Biochem. Sci. – 1999. – V. 24, № 11. – P. 437-40.

45. Bortoluzzi S., d'Alessi F., Romualdi C., Danieli G. A. Differential expression of genes coding for ribosomal proteins in different human tissues // Bioinformatics. – 2001. – V. 17, № 12. – P. 1152-7.

46. Wilson D. N., Nierhaus K. H. Ribosomal proteins in the spotlight // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. – 2005. – V. 40, № 5. – P. 243-67.

47. Markus M. A., Hinck A. P., Huang S., Draper D. E., Torchia D. A. High resolution solution structure of ribosomal protein L11-C76, a helical protein with a flexible loop that becomes structured upon binding to RNA // Nature Structural Biology. -1997. - V. 4. - P. 70.

48. Draper D. E., Reynaldo L. P. RNA binding strategies of ribosomal proteins // Nucleic Acids Research. – 1999. – V. 27, № 2. – P. 381-388.

49. Graifer D., Malygin A., Zharkov D. O., Karpova G. Eukaryotic ribosomal protein S3: A constituent of translational machinery and an extraribosomal player in various cellular processes // Biochimie. – 2014. – V. 99. – P. 8-18.

50. Li T., Stark M. R., Johnson A. D., Wolberger C. Crystal structure of the MATa1/MAT alpha 2 homeodomain heterodimer bound to DNA // Science. – 1995. – V. 270, № 5234. – P. 262-9.

51. Hirsch J. A., Aggarwal A. K. Structure of the even-skipped homeodomain complexed to AT-rich DNA: new perspectives on homeodomain specificity // EMBO J. – 1995. – V. 14, № 24. – P. 6280-91.

52. Draper D. E., Pratt C. W., von Hippel P. H. Escherichia coli ribosomal protein S1 has two polynucleotide binding sites // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1977. – V. 74, $N_{\rm P}$ 11. – P. 4786.

53. Schnier J., Kimura M., Foulaki K., Subramanian A. R., Isono K., Wittmann-Liebold B. Primary structure of Escherichia coli ribosomal protein S1 and of its gene rpsA // Proceedings of the National Academy of Sciences. -1982. - V. 79, N 4. - P. 1008.

54. Murzin A. G. OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences // EMBO J. – 1993. – V. 12, № 3. – P. 861-7.

55. Golden B. L., Hoffman D. W., Ramakrishnan V., White S. W. Ribosomal protein S17: characterization of the three-dimensional structure by 1H and 15N NMR // Biochemistry. -1993. - V. 32, Nº 47. - P. 12812-20.

56. Lecompte O., Ripp R., Thierry J. C., Moras D., Poch O. Comparative analysis of ribosomal proteins in complete genomes: an example of reductive evolution at the domain scale // Nucleic Acids Res. -2002. - V. 30, No 24. -P. 5382-90.

57. Ban N., Beckmann R., Cate J. H., Dinman J. D., Dragon F., Ellis S. R., Lafontaine D. L., Lindahl L., Liljas A., Lipton J. M., McAlear M. A., Moore P. B., Noller H. F., Ortega J., Panse V. G., Ramakrishnan V., Spahn C. M., Steitz T. A., Tchorzewski M., Tollervey D., Warren A. J., Williamson J. R., Wilson D., Yonath A., Yusupov M. A new system for naming ribosomal proteins // Curr. Opin. Struct. Biol. – 2014. – V. 24. – P. 165-9.

58. Gerbasi V. R., Weaver C. M., Hill S., Friedman D. B., Link A. J. Yeast Asc1p and mammalian RACK1 are functionally orthologous core 40S ribosomal proteins that repress gene expression // Mol. Cell. Biol. -2004. - V. 24, No 18. - P. 8276-87.

59. Link A. J., Eng J., Schieltz D. M., Carmack E., Mize G. J., Morris D. R., Garvik B. M., Yates J. R., 3rd. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry // Nat. Biotechnol. – 1999. – V. 17, № 7. – P. 676-82.

60. Kruger K., Grabowski P. J., Zaug A. J., Sands J., Gottschling D. E., Cech T. R. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena // Cell. – 1982. – V. 31, N_{0} 1. – P. 147-57.

61. Shine J., Dalgarno L. Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes // Nature. – 1975. – V. 254, № 5495. – P. 34-8.

62. 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, No 7. – P. 3056-65.

63. Budkevich T. V., Giesebrecht J., Behrmann E., Loerke J., Ramrath D. J., Mielke T., Ismer J., Hildebrand P. W., Tung C. S., Nierhaus K. H., Sanbonmatsu K. Y., Spahn C. M. Regulation of the mammalian elongation cycle by subunit rolling: a eukaryotic-specific ribosome rearrangement // Cell. -2014. - V. 158, No 1. -P. 121-31.

64. Bulygin K. N., Graifer D. M., Hountondji C., Frolova L. Y., Karpova G. G. Exploring contacts of eRF1 with the 3'-terminus of the P site tRNA and mRNA stop signal in the human ribosome at various translation termination steps // Biochim. Biophys. Act (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms. – 2017. – V. 1860, No 7. – P. 782-793.

65. Svidritskiy E., Brilot A. F., Koh C. S., Grigorieff N., Korostelev A. A. Structures of yeast 80S ribosome-tRNA complexes in the rotated and nonrotated conformations // Structure. – 2014. – V. 22, $N_{\rm P}$ 8. – P. 1210-1218.

66. Spahn C. M., Beckmann R., Eswar N., Penczek P. A., Sali A., Blobel G., Frank J. Structure of the 80S ribosome from Saccharomyces cerevisiae--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions // Cell. -2001. - V. 107, No 3. - P. 373-86.

67. Molotkov M. V., Graifer D. M., Popugaeva E. A., Bulygin K. N., Meschaninova M. I., Ven'yaminova A. G., Karpova G. G. mRNA 3' of the A site bound codon is located close to protein S3 on the human 80S ribosome // RNA Biol. – 2006. – V. 3, N_{2} 3. – P. 122-9.

68. Bulygin K., Chavatte L., Frolova L., Karpova G., Favre A. The first position of a codon placed in the A site of the human 80S ribosome contacts nucleotide C1696 of the 18S rRNA as well as proteins S2, S3, S3a, S30, and S15 // Biochemistry. -2005. - V. 44, No 6. -P. 2153-62.

69. Pisarev A. V., Kolupaeva V. G., Pisareva V. P., Merrick W. C., Hellen C. U. T., Pestova T. V. Specific functional interactions of nucleotides at key -3 and +4 positions flanking the initiation codon with components of the mammalian 48S translation initiation complex // Genes & Development. – 2006. – V. 20, N_{0} 5. – P. 624-636.

70. Sharifulin D. E., Grosheva A. S., Bartuli Y. S., Malygin A. A., Meschaninova M. I., Ven'yaminova A. G., Stahl J., Graifer D. M., Karpova G. G. Molecular contacts of ribose-phosphate backbone of mRNA with human ribosome // Biochim. Biophys. Acta. – 2015. – V. 1849, № 8. – P. 930-9.

71. Sharifulin D., Babaylova E., Kossinova O., Bartuli Y., Graifer D., Karpova G. Ribosomal protein S5e is implicated in translation initiation through its interaction with the N-terminal domain of initiation factor eIF2 α // Chembiochem. – 2013. – V. 14, No 16. – P. 2136-43.

72. Hountondji C., Créchet J. B., Tanaka M., Suzuki M., Nakayama J. I., Aguida B., Bulygin K., Cognet J., Karpova G., Baouz S. Ribosomal protein eL42 contributes to the catalytic activity of the yeast ribosome at the elongation step of translation // Biochimie. – 2019. – V. 158. – P. 20-33.

73. Blumenthal T., Carmichael G. G. RNA replication: function and structure of Qbeta-replicase // Annu. Rev. Biochem. – 1979. – V. 48. – P. 525-48.

74. Aseev L. V., Boni I. V. Extraribosomal functions of bacterial ribosomal proteins // Molecular Biology. – 2011. – V. 45, № 5. – P. 739-750.

75. Lindstrom M. S. Emerging functions of ribosomal proteins in gene-specific transcription and translation // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2009. – V. 379, № 2. – P. 167-70.

76. Lu H., Zhu Y. F., Xiong J., Wang R., Jia Z. Potential extra-ribosomal functions of ribosomal proteins in Saccharomyces cerevisiae // Microbiol. Res. – 2015. – V. 177. – P. 28-33.

77. Warner J. R., McIntosh K. B. How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? // Mol. Cell. – 2009. – V. 34, № 1. – P. 3-11.

78. Wool I. G. Extraribosomal functions of ribosomal proteins // Trends Biochem. Sci. – 1996. – V. 21, № 5. – P. 164-5.

79. Xue S., Barna M. Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2012. – V. 13, N_{0} 6. – P. 355-69.

80. Deisenroth C., Zhang Y. Ribosome biogenesis surveillance: probing the ribosomal protein-Mdm2p53 pathway // Oncogene. – 2010. – V. 29, № 30. – P. 4253-60.

81. Zhou X., Liao W. J., Liao J. M., Liao P., Lu H. Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome // J. Mol. Cell. Biol. – 2015. – V. 7, № 2. – P. 92-104.

82. Patil A. V., Hsieh T. S. Ribosomal Protein S3 Negatively Regulates Unwinding Activity of RecQlike Helicase 4 through Their Physical Interaction // J. Biol. Chem. – 2017. – V. 292, № 10. – P. 4313-4325.

83. Jang C. Y., Kim H. D., Zhang X., Chang J. S., Kim J. Ribosomal protein S3 localizes on the mitotic spindle and functions as a microtubule associated protein in mitosis // Biochem. Biophys. Res. Commun. -2012. - V.429, No 1-2. - P.57-62.

84. Le S., Sternglanz R., Greider C. W. Identification of Two RNA-binding Proteins Associated with Human Telomerase RNA // Mol. Biol. Cell. – 2000. – V. 11, № 3. – P. 999-1010.

85. Nakayama J., Saito M., Nakamura H., Matsuura A., Ishikawa F. TLP1: a gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family // Cell. – 1997. – V. 88, N_{2} 6. – P. 875-84.

86. Schnapp G., Rodi H. P., Rettig W. J., Schnapp A., Damm K. One-step affinity purification protocol for human telomerase // Nucleic Acids Research. – 1998. – V. 26, № 13. – P. 3311-3313.

87. Kim J., Chubatsu L. S., Admon A., Stahl J., Fellous R., Linn S. Implication of mammalian ribosomal protein S3 in the processing of DNA damage // J. Biol. Chem. – 1995. – V. 270, № 23. – P. 13620-9.

88. Hegde V., Kelley M. R., Xu Y., Mian I. S., Deutsch W. A. Conversion of the bifunctional 8oxoguanine/beta-delta apurinic/apyrimidinic DNA repair activities of Drosophila ribosomal protein S3 into the human S3 monofunctional beta-elimination catalyst through a single amino acid change // J. Biol. Chem. – 2001. – V. 276, No 29. – P. 27591-6.

89. Kim S. H., Lee J. Y., Kim J. Characterization of a wide range base-damage-endonuclease activity of mammalian rpS3 // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2005. – V. 328, № 4. – P. 962-7.

90. Hegde V., Wang M., Deutsch W. A. Human ribosomal protein S3 interacts with DNA base excision repair proteins hAPE/Ref-1 and hOGG1 // Biochemistry. – 2004. – V. 43, № 44. – P. 14211-7.

91. Hegde V., Wang M., Mian I. S., Spyres L., Deutsch W. A. The high binding affinity of human ribosomal protein S3 to 7,8-dihydro-8-oxoguanine is abrogated by a single amino acid change // DNA Repair (Amst). -2006. - V. 5, $N_{2} 7. - P. 810-5$.

92. Ko S. I., Park J. H., Park M. J., Kim J., Kang L. W., Han Y. S. Human ribosomal protein S3 (hRpS3) interacts with uracil-DNA glycosylase (hUNG) and stimulates its glycosylase activity // Mutat. Res. -2008. - V.648, No 1-2. - P.54-64.

93. Hegde V., Yadavilli S., Deutsch W. A. Knockdown of ribosomal protein S3 protects human cells from genotoxic stress // DNA Repair (Amst). – 2007. – V. 6, № 1. – P. 94-9.

94. Hegde V., Yadavilli S., McLaughlin L. D., Deutsch W. A. DNA repair efficiency in transgenic mice over expressing ribosomal protein S3 // Mutat. Res. – 2009. – V. 666, № 1-2. – P. 16-22.

95. Choi S. H., Kim S. Y., An J. J., Lee S. H., Kim D. W., Ryu H. J., Lee N. I., Yeo S. I., Jang S. H., Won M. H., Kang T. C., Kwon H. J., Cho S. W., Kim J., Lee K. S., Park J., Eum W. S., Choi S. Y. Human PEP-1-ribosomal protein S3 protects against UV-induced skin cell death // FEBS Lett. – 2006. – V. 580, № 30. – P. 6755-62.

96. Ahn E. H., Kim D. W., Kang H. W., Shin M. J., Won M. H., Kim J., Kim D. J., Kwon O. S., Kang T. C., Han K. H., Park J., Eum W. S., Choi S. Y. Transduced PEP-1-ribosomal protein S3 (rpS3) ameliorates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice // Toxicology. – 2010. – V. 276, № 3. – P. 192-7.

97. Grosheva A. S., Zharkov D. O., Stahl J., Gopanenko A. V., Tupikin A. E., Kabilov M. R., Graifer D. M., Karpova G. G. Recognition but no repair of abasic site in single-stranded DNA by human ribosomal uS3 protein residing within intact 40S subunit // Nucleic Acids Res. – 2017. – V. 45, N_{2} 7. – P. 3833-3843.

98. Balyeva K. E., Malygin A. A., Karpova G. G., Nevinskii G. A., Zharkov D. O. [Interactions of human ribosomal protein S3 with undamaged and damaged DNA] // Mol. Biol. (Mosk). -2008. - V. 42, No 2. - P. 314-22.

99. Ochkasova A. S., Meschaninova M. I., Venyaminova A. G., Ivanov A. V., Graifer D. M., Karpova G. G. The human ribosome can interact with the abasic site in mRNA via a specific peptide of the uS3 protein located near the mRNA entry channel // Biochimie. -2019. - V. 158. - P. 117-125.

100. Kim Y., Kim H. D., Kim J. Cytoplasmic ribosomal protein S3 (rpS3) plays a pivotal role in mitochondrial DNA damage surveillance // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. – 2013. – V. 1833, № 12. – P. 2943-2952.

101. Yang C., Zang W., Ji Y., Li T., Yang Y., Zheng X. Ribosomal protein L6 (RPL6) is recruited to DNA damage sites in a poly(ADP-ribose) polymerase-dependent manner and regulates the DNA damage response // J Biol Chem. – 2019. – V. 294, № 8. – P. 2827-2838.

102. Bhavsar R. B., Makley L. N., Tsonis P. A. The other lives of ribosomal proteins // Human Genomics. -2010. - V. 4, No 5. - P. 327.

103. Conacci-Sorrell M., McFerrin L., Eisenman R. N. An overview of MYC and its interactome // Cold Spring Harb. Perspect. Med. – 2014. – V. 4, № 1. – P. a014357.

104. van Riggelen J., Yetil A., Felsher D. W. MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis // Nat. Rev. Cancer. – 2010. – V. 10, № 4. – P. 301-9.

105. Dai M.-S., Sun X.-X., Lu H. Ribosomal Protein L11 Associates with c-Myc at 5 S rRNA and tRNA Genes and Regulates Their Expression // The Journal of Biological Chemistry. -2010. - V. 285, No 17. -P. 12587-12594.

106. Dai M.-S., Arnold H., Sun X.-X., Sears R., Lu H. Inhibition of c-Myc activity by ribosomal protein L11 // The EMBO Journal. – 2007. – V. 26, № 14. – P. 3332-3345.

107. Challagundla K. B., Sun X. X., Zhang X., DeVine T., Zhang Q., Sears R. C., Dai M. S. Ribosomal protein L11 recruits miR-24/miRISC to repress c-Myc expression in response to ribosomal stress // Mol. Cell. Biol. -2011. - V. 31, No 19. -P. 4007-21.

108. Li Y., Challagundla K. B., Sun X. X., Zhang Q., Dai M. S. MicroRNA-130a associates with ribosomal protein L11 to suppress c-Myc expression in response to UV irradiation // Oncotarget. – 2015. - V. 6, No 2. – P. 1101-14.

109. Liao J. M., Zhou X., Gatignol A., Lu H. Ribosomal proteins L5 and L11 co-operatively inactivate c-Myc via RNA-induced silencing complex // Oncogene. – 2014. – V. 33, № 41. – P. 4916-23.

110. Zhou X., Hao Q., Liao J. M., Liao P., Lu H. Ribosomal protein S14 negatively regulates c-Myc activity // J. Biol. Chem. – 2013. – V. 288, № 30. – P. 21793-801.

111. Wanzel M., Russ A. C., Kleine-Kohlbrecher D., Colombo E., Pelicci P. G., Eilers M. A ribosomal protein L23-nucleophosmin circuit coordinates Mizl function with cell growth // Nat. Cell. Biol. – 2008. - V. 10, No 9. - P. 1051-61.

112. Qi Y., Li X., Chang C., Xu F., He Q., Zhao Y., Wu L. Ribosomal protein L23 negatively regulates cellular apoptosis via the RPL23/Miz-1/c-Myc circuit in higher-risk myelodysplastic syndrome // Sci. Rep. -2017. - V. 7, No 1. - P. 2323.

113. Wu L., Li X., Xu F., Chang C., He Q., Zhang Z., Zhang Y. Over-expression of RPL23 in myelodysplastic syndromes is associated with apoptosis resistance of CD34+ cells and predicts poor prognosis and distinct response to CHG chemotherapy or decitabine // Ann. Hematol. – 2012. – V. 91, N 10. – P. 1547-54.

114. Qi Y., Li X., Chang C., Xu F., He Q., Zhao Y., Wu L. Ribosomal protein L23 negatively regulates cellular apoptosis via the RPL23/Miz-1/c-Myc circuit in higher-risk myelodysplastic syndrome // Scientific Reports. – 2017. – V. 7. – P. 2323.

115. Wan F., Lenardo M. J. The nuclear signaling of NF-kappaB: current knowledge, new insights, and future perspectives // Cell Res. – 2010. – V. 20, № 1. – P. 24-33.

116. Zhang Q., Lenardo M. J., Baltimore D. 30 Years of NF-kappaB: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology // Cell. – 2017. – V. 168, № 1-2. – P. 37-57.

117. Wan F., Anderson D. E., Barnitz R. A., Snow A., Bidere N., Zheng L., Hegde V., Lam L. T., Staudt L. M., Levens D., Deutsch W. A., Lenardo M. J. Ribosomal protein S3: a KH domain subunit in NF-kappaB complexes that mediates selective gene regulation // Cell. – 2007. – V. 131, No 5. – P. 927-39.

118. Gao X., Wan F., Mateo K., Callegari E., Wang D., Deng W., Puente J., Li F., Chaussee M. S., Finlay B. B., Lenardo M. J., Hardwidge P. R. Bacterial effector binding to ribosomal protein s3 subverts NF-kappaB function // PLoS Pathog. – 2009. – V. 5, № 12. – P. e1000708.

119. Wan F., Weaver A., Gao X., Bern M., Hardwidge P. R., Lenardo M. J. IKKbeta phosphorylation regulates RPS3 nuclear translocation and NF-kappaB function during infection with Escherichia coli strain O157:H7 // Nat. Immunol. – 2011. – V. 12, N_{2} 4. – P. 335-43.

120. Wier E. M., Neighoff J., Sun X., Fu K., Wan F. Identification of an N-terminal truncation of the NF-kappaB p65 subunit that specifically modulates ribosomal protein S3-dependent NF-kappaB gene expression // J. Biol. Chem. -2012. - V. 287, $N_{0} 51. - P. 43019-29$.

121. Leeman J. R., Gilmore T. D. Alternative splicing in the NF-kappaB signaling pathway // Gene. – 2008. – V. 423, № 2. – P. 97-107.

122. Baruch K., Gur-Arie L., Nadler C., Koby S., Yerushalmi G., Ben-Neriah Y., Yogev O., Shaulian E., Guttman C., Zarivach R., Rosenshine I. Metalloprotease type III effectors that specifically cleave JNK and NF-kappaB // EMBO J. -2011. - V. 30, $N_{0} 1. - P. 221-31$.

123. Collins P. E., Mitxitorena I., Carmody R. J. The Ubiquitination of NF-κB Subunits in the Control of Transcription // Cells. – 2016. – V. 5, № 2.

124. Stanborough T., Niederhauser J., Koch B., Bergler H., Pertschy B. Ribosomal protein S3 interacts with the NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha // FEBS Lett. – 2014. – V. 588, № 5. – P. 659-64.

125. Lim K. H., Kim K. H., Choi S. I., Park E. S., Park S. H., Ryu K., Park Y. K., Kwon S. Y., Yang S. I., Lee H. C., Sung I. K., Seong B. L. RPS3a over-expressed in HBV-associated hepatocellular carcinoma enhances the HBx-induced NF-kappaB signaling via its novel chaperoning function // PLoS One. -2011. - V. 6, No 8. - P. e22258.

126. Yang Z. Y., Qu Y., Zhang Q., Wei M., Liu C. X., Chen X. H., Yan M., Zhu Z. G., Liu B. Y., Chen G. Q., Wu Y. L., Gu Q. L. Knockdown of metallopanstimulin-1 inhibits NF-kappaB signaling at different levels: the role of apoptosis induction of gastric cancer cells // Int. J. Cancer. – 2012. – V. 130, N 12. – P. 2761-70.

127. Zhang Y., Lu H. Signaling to p53: ribosomal proteins find their way // Cancer Cell. – 2009. – V. 16, № 5. – P. 369-77.

128. Deisenroth C., Zhang Y. The Ribosomal Protein-Mdm2-p53 Pathway and Energy Metabolism: Bridging the Gap between Feast and Famine // Genes Cancer. – 2011. – V. 2, № 4. – P. 392-403.

129. Nicolas E., Parisot P., Pinto-Monteiro C., de Walque R., De Vleeschouwer C., Lafontaine D. L. Involvement of human ribosomal proteins in nucleolar structure and p53-dependent nucleolar stress // Nat. Commun. – 2016. – V. 7. – P. 11390.

130. Deisenroth C., Franklin D. A., Zhang Y. The Evolution of the Ribosomal Protein-MDM2-p53 Pathway // Cold Spring Harb. Perspect. Med. – 2016. – V. 6, № 12.

131. Xu X., Xiong X., Sun Y. The role of ribosomal proteins in the regulation of cell proliferation, tumorigenesis, and genomic integrity // Sci. China Life Sci. – 2016. – V. 59, № 7. – P. 656-72.

132. Russo A., Russo G. Ribosomal Proteins Control or Bypass p53 during Nucleolar Stress // Int. J. Mol. Sci. – 2017. – V. 18, № 1.

133. Perri F., Pisconti S., Della Vittoria Scarpati G. P53 mutations and cancer: a tight linkage // Ann. Transl. Med. – 2016. – V. 4, № 24. – P. 522.

134. Toledo F., Wahl G. M. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas // Nat. Rev. Cancer. -2006. - V. 6, No 12. - P. 909-23.

135. Haupt Y., Maya R., Kazaz A., Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53 // Nature. – 1997. – V. 387, № 6630. – P. 296-9.

136. Dubs-Poterszman M. C., Tocque B., Wasylyk B. MDM2 transformation in the absence of p53 and abrogation of the p107 G1 cell-cycle arrest // Oncogene. – 1995. – V. 11, № 11. – P. 2445-9.

137. Eischen C. M., Lozano G. The Mdm network and its regulation of p53 activities: a rheostat of cancer risk // Hum. Mutat. – 2014. – V. 35, N_{2} 6. – P. 728-37.

138. Wu X., Bayle J. H., Olson D., Levine A. J. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop // Genes Dev. – 1993. – V. 7, № 7A. – P. 1126-32.

139. Kruse J. P., Gu W. Modes of p53 regulation // Cell. – 2009. – V. 137, № 4. – P. 609-22.

140. Yadavilli S., Mayo L. D., Higgins M., Lain S., Hegde V., Deutsch W. A. Ribosomal protein S3: A multi-functional protein that interacts with both p53 and MDM2 through its KH domain // DNA Repair (Amst). -2009. - V. 8, $N_{\rm D} 10. - P. 1215-24$.

141. Zhu Y., Poyurovsky M. V., Li Y., Biderman L., Stahl J., Jacq X., Prives C. Ribosomal protein S7 is both a regulator and a substrate of MDM2 // Mol. Cell. – 2009. – V. 35, № 3. – P. 316-26.

142. Zhou X., Hao Q., Liao J., Zhang Q., Lu H. Ribosomal protein S14 unties the MDM2-p53 loop upon ribosomal stress // Oncogene. – 2013. – V. 32, № 3. – P. 388-96.

143. Daftuar L., Zhu Y., Jacq X., Prives C. Ribosomal proteins RPL37, RPS15 and RPS20 regulate the Mdm2-p53-MdmX network // PLoS One. – 2013. – V. 8, № 7. – P. e68667.

144. Zhang X., Wang W., Wang H., Wang M. H., Xu W., Zhang R. Identification of ribosomal protein S25 (RPS25)-MDM2-p53 regulatory feedback loop // Oncogene. – 2013. – V. 32, № 22. – P. 2782-91. 145. Cui D., Li L., Lou H., Sun H., Ngai S. M., Shao G., Tang J. The ribosomal protein S26 regulates

p53 activity in response to DNA damage // Oncogene. – 2014. – V. 33, \mathbb{N} 17. – P. 2225-35.

146. Sun X. X., DeVine T., Challagundla K. B., Dai M. S. Interplay between ribosomal protein S27a and MDM2 protein in p53 activation in response to ribosomal stress // J. Biol. Chem. – 2011. – V. 286, No 26. – P. 22730-41.

147. Xiong X., Zhao Y., He H., Sun Y. Ribosomal protein S27-like and S27 interplay with p53-MDM2 axis as a target, a substrate and a regulator // Oncogene. – 2011. – V. 30, № 15. – P. 1798-811.

148. Xiong X., Zhao Y., Tang F., Wei D., Thomas D., Wang X., Liu Y., Zheng P., Sun Y. Ribosomal protein S27-like is a physiological regulator of p53 that suppresses genomic instability and tumorigenesis // Elife. -2014. -V. 3. -P. e02236.

149. He X., Li Y., Dai M. S., Sun X. X. Ribosomal protein L4 is a novel regulator of the MDM2-p53 loop // Oncotarget. -2016. - V. 7, N 13. - P. 16217-26.

150. Dai M. S., Lu H. Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5 // J. Biol. Chem. – 2004. – V. 279, № 43. – P. 44475-82.

151. Fregoso O. I., Das S., Akerman M., Krainer A. R. Splicing-factor oncoprotein SRSF1 stabilizes p53 via RPL5 and induces cellular senescence // Mol. Cell. – 2013. – V. 50, № 1. – P. 56-66.

152. Zhou X., Hao Q., Zhang Q., Liao J. M., Ke J. W., Liao P., Cao B., Lu H. Ribosomal proteins L11 and L5 activate TAp73 by overcoming MDM2 inhibition // Cell Death Differ. – 2015. – V. 22, № 5. – P. 755-66.

153. Bai D., Zhang J., Xiao W., Zheng X. Regulation of the HDM2-p53 pathway by ribosomal protein L6 in response to ribosomal stress // Nucleic Acids Res. – 2014. – V. 42, № 3. – P. 1799-811.

154. Zhang Y., Wolf G. W., Bhat K., Jin A., Allio T., Burkhart W. A., Xiong Y. Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway // Mol. Cell. Biol. – 2003. – V. 23, № 23. – P. 8902-12.

155. Lohrum M. A., Ludwig R. L., Kubbutat M. H., Hanlon M., Vousden K. H. Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11 // Cancer Cell. – 2003. – V. 3, № 6. – P. 577-87.

156. Bhat K. P., Itahana K., Jin A., Zhang Y. Essential role of ribosomal protein L11 in mediating growth inhibition-induced p53 activation // EMBO J. – 2004. – V. 23, № 12. – P. 2402-12.

157. Jin A., Itahana K., O'Keefe K., Zhang Y. Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23 // Mol. Cell. Biol. – 2004. – V. 24, № 17. – P. 7669-80.

158. Dai M. S., Zeng S. X., Jin Y., Sun X. X., David L., Lu H. Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting MDM2 function in response to ribosomal perturbation but not to translation inhibition // Mol. Cell. Biol. -2004. - V. 24, No 17. - P. 7654-68.

159. Zhang Y., Wang J., Yuan Y., Zhang W., Guan W., Wu Z., Jin C., Chen H., Zhang L., Yang X., He F. Negative regulation of HDM2 to attenuate p53 degradation by ribosomal protein L26 // Nucleic Acids Res. -2010. - V. 38, N_{2} 19. - P. 6544-54.

160. Takagi M., Absalon M. J., McLure K. G., Kastan M. B. Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin // Cell. -2005. - V. 123, No 1. - P. 49-63.

161. Fumagalli S., Ivanenkov V. V., Teng T., Thomas G. Suprainduction of p53 by disruption of 40S and 60S ribosome biogenesis leads to the activation of a novel G2/M checkpoint // Genes Dev. – 2012. – V. 26, N 10. – P. 1028-40.

162. Sloan K. E., Bohnsack M. T., Watkins N. J. The 5S RNP couples p53 homeostasis to ribosome biogenesis and nucleolar stress // Cell Rep. – 2013. – V. 5, № 1. – P. 237-47.

163. Nishimura K., Kumazawa T., Kuroda T., Katagiri N., Tsuchiya M., Goto N., Furumai R., Murayama A., Yanagisawa J., Kimura K. Perturbation of ribosome biogenesis drives cells into senescence through 5S RNP-mediated p53 activation // Cell Rep. -2015. - V. 10, No 8. - P. 1310-23.

164. Sasaki M., Kawahara K., Nishio M., Mimori K., Kogo R., Hamada K., Itoh B., Wang J., Komatsu Y., Yang Y. R., Hikasa H., Horie Y., Yamashita T., Kamijo T., Zhang Y., Zhu Y., Prives C., Nakano T., Mak T. W., Sasaki T., Maehama T., Mori M., Suzuki A. Regulation of the MDM2-P53 pathway and tumor growth by PICT1 via nucleolar RPL11 // Nat. Med. – 2011. – V. 17, № 8. – P. 944-51.

165. Gray J. P., Davis J. W., 2nd, Gopinathan L., Leas T. L., Nugent C. A., Vanden Heuvel J. P. The ribosomal protein rpL11 associates with and inhibits the transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha // Toxicol. Sci. – 2006. – V. 89, № 2. – P. 535-46.

166. Chen J., Crutchley J., Zhang D., Owzar K., Kastan M. B. Identification of a DNA Damage-Induced Alternative Splicing Pathway That Regulates p53 and Cellular Senescence Markers // Cancer Discov. -2017. - V. 7, No 7. - P. 766-781.

167. Zhang Y., O'Leary M. N., Peri S., Wang M., Zha J., Melov S., Kappes D. J., Feng Q., Rhodes J., Amieux P. S., Morris D. R., Kennedy B. K., Wiest D. L. Ribosomal Proteins Rpl22 and Rpl2211 Control Morphogenesis by Regulating Pre-mRNA Splicing // Cell Rep. – 2017. – V. 18, № 2. – P. 545-556.

168. Ivanov A. V., Malygin A. A., Karpova G. G. [Ribosomal protein binding with the first intron of the human ribosomal protein S26 pre-mRNA stimulates its interaction with proteins extracted from Hela cells] // Mol. Biol. (Mosk). -2002. - V. 36, No 3. - P. 503-10.

169. Ivanov A. V., Malygin A. A., Karpova G. G. [Interaction of human S26 ribosomal protein with fragments of mRNA and pre-mRNA for this protein in Hela nuclear cell extracts] // Mol. Biol. (Mosk). -2003. - V. 37, No 5. - P. 900-5.

170. Ivanov A. V., Malygin A. A., Karpova G. G. [Human ribosomal protein S26 inhibits splicing of its own pre-mRNA] // Mol. Biol. (Mosk). – 2004. – V. 38, № 4. – P. 676-83.

171. Ivanov A. V., Malygin A. A., Karpova G. G. Human ribosomal protein S26 suppresses the splicing of its pre-mRNA // Biochim. Biophys. Acta. – 2005. – V. 1727, № 2. – P. 134-40.

172. Ivanov A. V., Gopanenko A. V., Malygin A. A., Karpova G. G. The eS26 protein is involved in the formation of a nucleophosmin binding site on the human 40S ribosomal subunit // Biochim Biophys Acta Proteins Proteom. $-2018. - V. 1866, N_{\odot} 5-6. - P. 642-650.$

173. Neumann F., Hemmerich P., von Mikecz A., Peter H. H., Krawinkel U. Human ribosomal protein L7 inhibits cell-free translation in reticulocyte lysates and affects the expression of nuclear proteins upon stable transfection into Jurkat T-lymphoma cells // Nucleic Acids Res. – 1995. – V. 23, № 2. – P. 195-202.

174. Kim H. D., Kim T. S., Joo Y. J., Shin H. S., Kim S. H., Jang C. Y., Lee C. E., Kim J. RpS3 translation is repressed by interaction with its own mRNA // J. Cell. Biochem. – 2010. – V. 110, No 2. – P. 294-303.

175. Ivanov A. V., Parakhnevich N. M., Malygin A. A., Karpova G. G. [Human ribosomal protein S16 inhibites excision of the first intron from its own] // Mol. Biol. (Mosk). -2010. - V. 44, $N_{2} 1. - P. 90-7$.

176. Malygin A. A., Parakhnevitch N. M., Ivanov A. V., Eperon I. C., Karpova G. G. Human ribosomal protein S13 regulates expression of its own gene at the splicing step by a feedback mechanism // Nucleic Acids Res. -2007. - V. 35, No 19. - P. 6414-23.

177. Parakhnevich N. M., Ivanov A. V., Malygin A. A., Karpova G. G. [Human ribosomal protein S13 inhibits splicing of the own pre-mRNA] // Mol. Biol. (Mosk). – 2007. – V. 41, № 1. – P. 51-8.

178. Lindahl L., Zengel J. M. Operon-specific regulation of ribosomal protein synthesis in Escherichia coli // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1979. – V. 76, № 12. – P. 6542-6546.

179. Klinge S., Woolford J. L., Jr. Ribosome assembly coming into focus // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2019. – V. 20, N_{2} 2. – P. 116-131.

180. Henras A. K., Plisson-Chastang C., O'Donohue M. F., Chakraborty A., Gleizes P. E. An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes // Wiley Interdiscip. Rev. RNA. – 2015. – V. 6, № 2. – P. 225-42.

181. Kos M., Tollervey D. Yeast pre-rRNA processing and modification occur cotranscriptionally // Mol. Cell. – 2010. – V. 37, N_{2} 6. – P. 809-20.

182. Kressler D., Bange G., Ogawa Y., Stjepanovic G., Bradatsch B., Pratte D., Amlacher S., Strauss D., Yoneda Y., Katahira J., Sinning I., Hurt E. Synchronizing nuclear import of ribosomal proteins with ribosome assembly // Science. -2012. - V.338, No 6107. - P.666-71.

183. Iouk T. L., Aitchison J. D., Maguire S., Wozniak R. W. Rrb1p, a yeast nuclear WD-repeat protein involved in the regulation of ribosome biosynthesis // Mol. Cell. Biol. -2001. - V. 21, No 4. - P. 1260-71.

184. Koch B., Mitterer V., Niederhauser J., Stanborough T., Murat G., Rechberger G., Bergler H., Kressler D., Pertschy B. Yar1 protects the ribosomal protein Rps3 from aggregation // J. Biol. Chem. -2012. - V. 287, No 26. - P. 21806-15.

185. Perreault A., Bellemer C., Bachand F. Nuclear export competence of pre-40S subunits in fission yeast requires the ribosomal protein Rps2 // Nucleic Acids Res. – 2008. – V. 36, № 19. – P. 6132-42.

186. Rouquette J., Choesmel V., Gleizes P. E. Nuclear export and cytoplasmic processing of precursors to the 40S ribosomal subunits in mammalian cells // EMBO J. -2005. - V. 24, No 16. - P. 2862-72.

187. Mauro V. P., Edelman G. M. The ribosome filter hypothesis // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2002. – V. 99, No 19. – P. 12031-6.

188. Dalla Venezia N., Vincent A., Marcel V., Catez F., Diaz J. J. Emerging Role of Eukaryote Ribosomes in Translational Control // Int. J. Mol. Sci. – 2019. – V. 20, № 5.

189. Narla A., Ebert B. L. Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction // Blood. – 2010. – V. 115, № 16. – P. 3196-205.

190. Nakhoul H., Ke J., Zhou X., Liao W., Zeng S. X., Lu H. Ribosomopathies: mechanisms of disease // Clin. Med. Insights Blood Disord. – 2014. – V. 7. – P. 7-16.

191. Kondrashov N., Pusic A., Stumpf C. R., Shimizu K., Hsieh A. C., Xue S., Ishijima J., Shiroishi T., Barna M. Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning // Cell. – 2011. – V. 145, No 3. – P. 383-97.

192. Mallo M., Alonso C. R. The regulation of Hox gene expression during animal development // Development. – 2013. – V. 140, № 19. – P. 3951-63.

193. Mallo M., Wellik D. M., Deschamps J. Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan // Dev. Biol. – 2010. – V. 344, № 1. – P. 7-15.

194. Xue S., Tian S., Fujii K., Kladwang W., Das R., Barna M. RNA regulons in Hox 5' UTRs confer ribosome specificity to gene regulation // Nature. – 2015. – V. 517, № 7532. – P. 33-8.

195. Horos R., Ijspeert H., Pospisilova D., Sendtner R., Andrieu-Soler C., Taskesen E., Nieradka A., Cmejla R., Sendtner M., Touw I. P., von Lindern M. Ribosomal deficiencies in Diamond-Blackfan anemia impair translation of transcripts essential for differentiation of murine and human erythroblasts // Blood. – 2012. – V. 119, No 1. – P. 262-72.

196. Lee A. S., Burdeinick-Kerr R., Whelan S. P. A ribosome-specialized translation initiation pathway is required for cap-dependent translation of vesicular stomatitis virus mRNAs // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. -2013. -V. 110, N 1. -P. 324-9.

197. Ceci M., Gaviraghi C., Gorrini C., Sala L. A., Offenhauser N., Marchisio P. C., Biffo S. Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly // Nature. – 2003. – V. 426, № 6966. – P. 579-84.

198. Gallo S., Ricciardi S., Manfrini N., Pesce E., Oliveto S., Calamita P., Mancino M., Maffioli E., Moro M., Crosti M., Berno V., Bombaci M., Tedeschi G., Biffo S. RACK1 Specifically Regulates Translation through Its Binding to Ribosomes // Molecular and Cellular Biology. – 2018. – V. 38, № 23. – P. e00230-18.

199. Nilsson J., Sengupta J., Frank J., Nissen P. Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome // EMBO Rep. -2004. - V. 5, No 12. - P. 1137-41.

200. Karamyshev A. L., Karamysheva Z. N. Lost in Translation: Ribosome-Associated mRNA and Protein Quality Controls // Frontiers in Genetics. – 2018. – V. 9, № 431.

201. Ikeuchi K., Izawa T., Inada T. Recent Progress on the Molecular Mechanism of Quality Controls Induced by Ribosome Stalling // Front. Genet. – 2018. – V. 9. – P. 743.

202. Sundaramoorthy E., Leonard M., Mak R., Liao J., Fulzele A., Bennett E. J. ZNF598 and RACK1 Regulate Mammalian Ribosome-Associated Quality Control Function by Mediating Regulatory 40S Ribosomal Ubiquitylation // Mol. Cell. – 2017. – V. 65, № 4. – P. 751-760 e4.

203. Sugiyama T., Li S., Kato M., Ikeuchi K., Ichimura A., Matsuo Y., Inada T. Sequential Ubiquitination of Ribosomal Protein uS3 Triggers the Degradation of Non-functional 18S rRNA // Cell Rep. -2019. - V. 26, No 12. - P. 3400-3415 e7.

204. Guimaraes J. C., Zavolan M. Patterns of ribosomal protein expression specify normal and malignant human cells // Genome biology. -2016. - V. 17, $N_{2} 1. - P. 236-236$.

205. Arthurs C., Murtaza B. N., Thomson C., Dickens K., Henrique R., Patel H. R. H., Beltran M., Millar M., Thrasivoulou C., Ahmed A. Expression of ribosomal proteins in normal and cancerous human prostate tissue // PLoS One. – 2017. – V. 12, № 10. – P. e0186047.

206. Slavov N., Semrau S., Airoldi E., Budnik B., van Oudenaarden A. Differential Stoichiometry among Core Ribosomal Proteins // Cell Rep. – 2015. – V. 13, № 5. – P. 865-73.

207. Shi Z., Fujii K., Kovary K. M., Genuth N. R., Rost H. L., Teruel M. N., Barna M. Heterogeneous Ribosomes Preferentially Translate Distinct Subpools of mRNAs Genome-wide // Mol. Cell. – 2017. – V. 67, N_{2} 1. – P. 71-83 e7.

208. Simsek D., Barna M. An emerging role for the ribosome as a nexus for post-translational modifications // Curr. Opin. Cell. Biol. – 2017. – V. 45. – P. 92-101.

209. Sloan K. E., Warda A. S., Sharma S., Entian K. D., Lafontaine D. L. J., Bohnsack M. T. Tuning the ribosome: The influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function // RNA Biol. -2017. - V. 14, No 9. - P. 1138-1152.

210. Odintsova T. I., Muller E. C., Ivanov A. V., Egorov T. A., Bienert R., Vladimirov S. N., Kostka S., Otto A., Wittmann-Liebold B., Karpova G. G. Characterization and analysis of posttranslational modifications of the human large cytoplasmic ribosomal subunit proteins by mass spectrometry and Edman sequencing // J. Protein. Chem. – 2003. – V. 22, N_{0} 3. – P. 249-58.

211. Yu Y., Ji H., Doudna J. A., Leary J. A. Mass spectrometric analysis of the human 40S ribosomal subunit: native and HCV IRES-bound complexes // Protein Sci. – 2005. – V. 14, № 6. – P. 1438-46.

212. Emmott E., Jovanovic M., Slavov N. Ribosome Stoichiometry: From Form to Function // Trends Biochem. Sci. – 2019. – V. 44, № 2. – P. 95-109.

213. Meyuhas O. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level // Eur. J. Biochem. -2000. - V. 267, No 21. - P. 6321-30.

214. Sharma S., Lafontaine D. L. J. 'View From A Bridge': A New Perspective on Eukaryotic rRNA Base Modification // Trends Biochem. Sci. – 2015. – V. 40, № 10. – P. 560-575.

215. Monaco P. L., Marcel V., Diaz J. J., Catez F. 2'-O-Methylation of Ribosomal RNA: Towards an Epitranscriptomic Control of Translation? // Biomolecules. – 2018. – V. 8, № 4.

216. Penzo M., Montanaro L. Turning Uridines around: Role of rRNA Pseudouridylation in Ribosome Biogenesis and Ribosomal Function // Biomolecules. – 2018. – V. 8, № 2.

217. Chen J., Kastan M. B. 5'-3'-UTR interactions regulate p53 mRNA translation and provide a target for modulating p53 induction after DNA damage // Genes Dev. – 2010. – V. 24, № 19. – P. 2146-56.

218. Haronikova L., Olivares-Illana V., Wang L., Karakostis K., Chen S., Fåhraeus R. The p53 mRNA: an integral part of the cellular stress response // Nucleic Acids Research. – 2019. – V. 47, № 7. – P. 3257-3271.

219. Chen J., Guo K., Kastan M. B. Interactions of nucleolin and ribosomal protein L26 (RPL26) in translational control of human p53 mRNA // J. Biol. Chem. – 2012. – V. 287, № 20. – P. 16467-76.

220. Towers C. G., Guarnieri A. L., Micalizzi D. S., Harrell J. C., Gillen A. E., Kim J., Wang C. A., Oliphant M. U., Drasin D. J., Guney M. A., Kabos P., Sartorius C. A., Tan A. C., Perou C. M., Espinosa J. M., Ford H. L. The Six1 oncoprotein downregulates p53 via concomitant regulation of RPL26 and microRNA-27a-3p // Nat. Commun. – 2015. – V. 6. – P. 10077.

221. Zhang M., Zhang J., Yan W., Chen X. p73 expression is regulated by ribosomal protein RPL26 through mRNA translation and protein stability // Oncotarget. – 2016. – V. 7, N_{0} 48. – P. 78255-78268. 222. Sun X. X., Dai M. S. p73 to the rescue: Role of RPL26 // Oncotarget. – 2017. – V. 8, N_{0} 4. – P. 5641-5642.

223. Mukhopadhyay R., Jia J., Arif A., Ray P. S., Fox P. L. The GAIT system: a gatekeeper of inflammatory gene expression // Trends Biochem. Sci. – 2009. – V. 34, № 7. – P. 324-31.

224. Mazumder B., Fox P. L. Delayed translational silencing of ceruloplasmin transcript in gamma interferon-activated U937 monocytic cells: role of the 3' untranslated region // Mol. Cell. Biol. – 1999. – V. 19, N_{2} 10. – P. 6898-905.

225. Sampath P., Mazumder B., Seshadri V., Fox P. L. Transcript-Selective Translational Silencing by Gamma Interferon Is Directed by a Novel Structural Element in the Ceruloplasmin mRNA 3' Untranslated Region // Molecular and Cellular Biology. – 2003. – V. 23, № 5. – P. 1509-1519.

226. Mazumder B., Sampath P., Seshadri V., Maitra R. K., DiCorleto P. E., Fox P. L. Regulated release of L13a from the 60S ribosomal subunit as a mechanism of transcript-specific translational control // Cell. -2003. - V. 115, No 2. - P. 187-98.

227. Sampath P., Mazumder B., Seshadri V., Gerber C. A., Chavatte L., Kinter M., Ting S. M., Dignam J. D., Kim S., Driscoll D. M., Fox P. L. Noncanonical function of glutamyl-prolyl-tRNA synthetase: gene-specific silencing of translation // Cell. – 2004. – V. 119, № 2. – P. 195-208.

228. Arif A., Chatterjee P., Moodt R. A., Fox P. L. Heterotrimeric GAIT complex drives transcriptselective translation inhibition in murine macrophages // Mol. Cell. Biol. – 2012. – V. 32, № 24. – P. 5046-55.

229. Arif A., Jia J., Moodt R. A., DiCorleto P. E., Fox P. L. Phosphorylation of glutamyl-prolyl tRNA synthetase by cyclin-dependent kinase 5 dictates transcript-selective translational control // Proc Natl Acad Sci U S A. -2011. - V. 108, No 4. - P. 1415-20.

230. Arif A., Jia J., Mukhopadhyay R., Willard B., Kinter M., Fox P. L. Two-site phosphorylation of EPRS coordinates multimodal regulation of noncanonical translational control activity // Mol. Cell. – 2009. – V. 35, No 2. – P. 164-80.

231. Kapasi P., Chaudhuri S., Vyas K., Baus D., Komar A. A., Fox P. L., Merrick W. C., Mazumder B. L13a blocks 48S assembly: role of a general initiation factor in mRNA-specific translational control // Mol. Cell. – 2007. – V. 25, № 1. – P. 113-26.

232. Vyas K., Chaudhuri S., Leaman D. W., Komar A. A., Musiyenko A., Barik S., Mazumder B. Genome-wide polysome profiling reveals an inflammation-responsive posttranscriptional operon in gamma interferon-activated monocytes // Mol. Cell. Biol. – 2009. – V. 29, No 2. – P. 458-70.

233. Poddar D., Basu A., Baldwin W. M., 3rd, Kondratov R. V., Barik S., Mazumder B. An extraribosomal function of ribosomal protein L13a in macrophages resolves inflammation // J. Immunol. -2013. - V. 190, No 7. - P. 3600-12.

234. Stanfield B. A., Luftig M. A. Recent advances in understanding Epstein-Barr virus // F1000Res. – 2017. – V. 6. – P. 386.

235. Young L. S., Yap L. F., Murray P. G. Epstein-Barr virus: more than 50 years old and still providing surprises // Nat. Rev. Cancer. – 2016. – V. 16, № 12. – P. 789-802.

236. Moss W. N., Lee N., Pimienta G., Steitz J. A. RNA families in Epstein-Barr virus // RNA Biol. – 2014. – V. 11, No 1. – P. 10-7.

237. Herbert K. M., Pimienta G. Consideration of Epstein-Barr Virus-Encoded Noncoding RNAs EBER1 and EBER2 as a Functional Backup of Viral Oncoprotein Latent Membrane Protein 1 // MBio. -2016. - V. 7, No 1. - P. e01926-15.

238. Swaminathan S., Tomkinson B., Kieff E. Recombinant Epstein-Barr virus with small RNA (EBER) genes deleted transforms lymphocytes and replicates in vitro // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1991. – V. 88, N 4. – P. 1546-50.

239. Gregorovic G., Bosshard R., Karstegl C. E., White R. E., Pattle S., Chiang A. K., Dittrich-Breiholz O., Kracht M., Russ R., Farrell P. J. Cellular gene expression that correlates with EBER expression in Epstein-Barr Virus-infected lymphoblastoid cell lines // J. Virol. – 2011. – V. 85, N_{0} 7. – P. 3535-45.

240. Yajima M., Kanda T., Takada K. Critical role of Epstein-Barr Virus (EBV)-encoded RNA in efficient EBV-induced B-lymphocyte growth transformation // J. Virol. – 2005. – V. 79, № 7. – P. 4298-307.

241. Yamamoto N., Takizawa T., Iwanaga Y., Shimizu N., Yamamoto N. Malignant transformation of B lymphoma cell line BJAB by Epstein-Barr virus-encoded small RNAs // FEBS Lett. – 2000. – V. 484, № 2. – P. 153-8.

242. Houmani J. L., Davis C. I., Ruf I. K. Growth-promoting properties of Epstein-Barr virus EBER-1 RNA correlate with ribosomal protein L22 binding // J. Virol. – 2009. – V. 83, № 19. – P. 9844-53.

243. Toczyski D. P., Steitz J. A. EAP, a highly conserved cellular protein associated with Epstein-Barr virus small RNAs (EBERs) // EMBO J. – 1991. – V. 10, № 2. – P. 459-66.

244. Toczyski D. P., Matera A. G., Ward D. C., Steitz J. A. The Epstein-Barr virus (EBV) small RNA EBER1 binds and relocalizes ribosomal protein L22 in EBV-infected human B lymphocytes // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1994. – V. 91, Notember 8. – P. 3463-3467.

245. Fok V., Mitton-Fry R. M., Grech A., Steitz J. A. Multiple domains of EBER 1, an Epstein-Barr virus noncoding RNA, recruit human ribosomal protein L22 // RNA. – 2006. – V. 12, № 5. – P. 872-82.

246. Elia A., Vyas J., Laing K. G., Clemens M. J. Ribosomal protein L22 inhibits regulation of cellular activities by the Epstein-Barr virus small RNA EBER-1 // Eur. J. Biochem. – 2004. – V. 271, № 10. – P. 1895-905.

247. Kashuba E., Yurchenko M., Szirak K., Stahl J., Klein G., Szekely L. Epstein-Barr virus-encoded EBNA-5 binds to Epstein-Barr virus-induced Fte1/S3a protein // Exp. Cell. Res. – 2005. – V. 303, № 1. – P. 47-55.

248. Shen C.-L., Liu C.-D., You R.-I., Ching Y.-H., Liang J., Ke L., Chen Y.-L., Chen H.-C., Hsu H.-J., Liou J.-W., Kieff E., Peng C.-W. Ribosome Protein L4 is essential for Epstein–Barr Virus Nuclear Antigen 1 function // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2016. – V. 113, № 8. – P. 2229.

249. Cervantes-Salazar M., Angel-Ambrocio A. H., Soto-Acosta R., Bautista-Carbajal P., Hurtado-Monzon A. M., Alcaraz-Estrada S. L., Ludert J. E., Del Angel R. M. Dengue virus NS1 protein interacts with the ribosomal protein RPL18: this interaction is required for viral translation and replication in Huh-7 cells // Virology. -2015. -V. 484. -P. 113-26.

250. Li C., Ge M., Yin Y., Luo M., Chen D. Silencing expression of ribosomal protein L26 and L29 by RNA interfering inhibits proliferation of human pancreatic cancer PANC-1 cells // Molecular and cellular biochemistry. – 2012. – V. 370, № 1-2. – P. 127-139.

251. Yoon J. H., De S., Srikantan S., Abdelmohsen K., Grammatikakis I., Kim J., Kim K. M., Noh J. H., White E. J., Martindale J. L., Yang X., Kang M. J., Wood W. H., 3rd, Noren Hooten N., Evans M. K., Becker K. G., Tripathi V., Prasanth K. V., Wilson G. M., Tuschl T., Ingolia N. T., Hafner M., Gorospe M. PAR-CLIP analysis uncovers AUF1 impact on target RNA fate and genome integrity // Nat. Commun. – 2014. – V. 5. – P. 5248.

252. Brummelkamp T. R., Bernards R., Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells // Science. – 2002. – V. 296, № 5567. – P. 550-3.

253. Babaylova E., Malygin A., Gopanenko A., Graifer D., Karpova G. Tetrapeptide 60-63 of human ribosomal protein uS3 is crucial for translation initiation // Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech. – 2019. – V. 1862, № 9. – P. 194411.

254. Das P., Basu A., Biswas A., Poddar D., Andrews J., Barik S., Komar A. A., Mazumder B. Insights into the mechanism of ribosomal incorporation of mammalian L13a protein during ribosome biogenesis // Mol. Cell. Biol. – 2013. – V. 33, № 15. – P. 2829-42.

255. Kargapolova Y., Levin M., Lackner K., Danckwardt S. sCLIP-an integrated platform to study RNA-protein interactomes in biomedical research: identification of CSTF2tau in alternative processing of small nuclear RNAs // Nucleic Acids Res. – 2017. – V. 45, № 10. – P. 6074-6086.

256. Ingolia N. T., Lareau L. F., Weissman J. S. Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes // Cell. -2011. -V. 147, No 4. -P. 789-802.

257. Alioto T. S. U12DB: a database of orthologous U12-type spliceosomal introns // Nucleic Acids Res. – 2007. – V. 35, № Database issue. – P. D110-5.

258. Hashimshony T., Senderovich N., Avital G., Klochendler A., de Leeuw Y., Anavy L., Gennert D., Li S., Livak K. J., Rozenblatt-Rosen O., Dor Y., Regev A., Yanai I. CEL-Seq2: sensitive highly-multiplexed single-cell RNA-Seq // Genome Biology. – 2016. – V. 17, № 1. – P. 77.

259. Smith T., Heger A., Sudbery I. UMI-tools: modeling sequencing errors in Unique Molecular Identifiers to improve quantification accuracy // Genome Res. – 2017. – V. 27, № 3. – P. 491-499.

260. Leek J. T., Scharpf R. B., Bravo H. C., Simcha D., Langmead B., Johnson W. E., Geman D., Baggerly K., Irizarry R. A. Tackling the widespread and critical impact of batch effects in high-throughput data // Nat. Rev. Genet. -2010. - V. 11, No 10. - P. 733-9.

261. Mi H., Muruganujan A., Ebert D., Huang X., Thomas P. D. PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools // Nucleic Acids Res. -2019 - V.47, No D1. -P. D419-D426.

262. Fischer M. Census and evaluation of p53 target genes // Oncogene. – 2017. – V. 36, No 28. – P. 3943-3956.

263. Kim J., Lee J. H., Iyer V. R. Global identification of Myc target genes reveals its direct role in mitochondrial biogenesis and its E-box usage in vivo // PLoS One. – 2008. – V. 3, № 3. – P. e1798.

264. Huang C., Yu Y. T. Synthesis and labeling of RNA in vitro // Curr. Protoc. Mol. Biol. – 2013. – Chapter 4. – Unit4. 15.

265. Yanshina D. D., Bulygin K. N., Malygin A. A., Karpova G. G. Hydroxylated histidine of human ribosomal protein uL2 is involved in maintaining the local structure of 28S rRNA in the ribosomal peptidyl transferase center // FEBS J. – 2015. – V. 282, № 8. – P. 1554-66.

266. Malygin A. A., Kossinova O. A., Shatsky I. N., Karpova G. G. HCV IRES interacts with the 18S rRNA to activate the 40S ribosome for subsequent steps of translation initiation // Nucleic Acids Res. -2013. - V. 41, No 18. - P. 8706-14.

267. Matasova N. B., Myltseva S. V., Zenkova M. A., Graifer D. M., Vladimirov S. N., Karpova G. G. Isolation of ribosomal subunits containing intact rRNA from human placenta: estimation of functional activity of 80S ribosomes // Anal Biochem. – 1991. – V. 198, № 2. – P. 219-23.

268. Bulygin K. N., Bartuli Y. S., Malygin A. A., Graifer D. M., Frolova L. Y., Karpova G. G. Chemical footprinting reveals conformational changes of 18S and 28S rRNAs at different steps of translation termination on the human ribosome // RNA. -2016. - V. 22, No 2. - P. 278-89.

269. Molotkov M., Graifer D., Demeshkna N., Repkova M., Ven'yaminova A., Karpova G. Arrangement of mRNA 3' of the A site codon on the human 80S ribosome // RNA Biol. – 2005. – V. 2, N_{2} 2. – P. 63-9.

270. Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C., Ferrin T. E. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis // J. Comput. Chem. -2004. - V. 25, No 13. - P. 1605-12.

271. Wang L., Huang C., Yang M. Q., Yang J. Y. BindN+ for accurate prediction of DNA and RNAbinding residues from protein sequence features // BMC Syst. Biol. – 2010. – V. 4 Suppl 1. – P. S3.

272. De Graeve S., Marinelli S., Stolz F., Hendrix J., Vandamme J., Engelborghs Y., Van Dijck P., Thevelein J. M. Mammalian ribosomal and chaperone protein RPS3A counteracts alpha-synuclein aggregation and toxicity in a yeast model system // Biochem. J. – 2013. – V. 455, № 3. – P. 295-306.

273. Bulygin K., Malygin A., Gopanenko A., Graifer D., Karpova G. The functional role of the C-terminal tail of the human ribosomal protein uS19 // Biochim. Biophys. Acta. Gene Regul. Mech. – $2020. - V. 1863, N \ge 3. - P. 194490.$

274. Ascano M., Hafner M., Cekan P., Gerstberger S., Tuschl T. Identification of RNA-protein interaction networks using PAR-CLIP // Wiley Interdiscip. Rev. RNA. – 2012. – V. 3, № 2. – P. 159-77.

275. Yamamoto H., Collier M., Loerke J., Ismer J., Schmidt A., Hilal T., Sprink T., Yamamoto K., Mielke T., Burger J., Shaikh T. R., Dabrowski M., Hildebrand P. W., Scheerer P., Spahn C. M. Molecular architecture of the ribosome-bound Hepatitis C Virus internal ribosomal entry site RNA // EMBO J. – 2015. – V. 34, No 24. – P. 3042-58.

276. Lecomte F., Szpirer J., Szpirer C. The S3a ribosomal protein gene is identical to the Fte-1 (v-fos transformation effector) gene and the TNF-alpha-induced TU-11 gene, and its transcript level is altered in transformed and tumor cells // Gene. – 1997. – V. 186, No 2. – P. 271-7.

277. Kho C. J., Zarbl H. Fte-1, a v-fos transformation effector gene, encodes the mammalian homologue of a yeast gene involved in protein import into mitochondria // Proceedings of the National Academy of Sciences. -1992. - V. 89, N = 6. - P. 2200.

278. Kho C. J., Wang Y., Zarbl H. Effect of decreased fte-1 gene expression on protein synthesis, cell growth, and transformation // Cell Growth Differ. – 1996. – V. 7, № 9. – P. 1157-66.

279. Naora H., Takai I., Adachi M., Naora H. Altered Cellular Responses by Varying Expression of a Ribosomal Protein Gene: Sequential Coordination of Enhancement and Suppression of Ribosomal Protein S3a Gene Expression Induces Apoptosis // J. Cell. Biol. – 1998. – V. 141, № 3. – P. 741-53.

280. Hu Z. B., Minden M. D., McCulloch E. A., Stahl J. Regulation of drug sensitivity by ribosomal protein S3a // Blood. – 2000. – V. 95, № 3. – P. 1047-55.

281. Hamaguchi N., Ohdaira T., Shinohara A., Iwamatsu A., Ihara S., Fukui Y. Identification of ribosomal protein S3a as a candidate for a novel PI 3-kinase target in the nucleus // Cytotechnology. -2002. - V. 40, No 1-3. - P. 85-92.

282. Spillantini M. G., Schmidt M. L., Lee V. M. Y., Trojanowski J. Q., Jakes R., Goedert M. α -Synuclein in Lewy bodies // Nature. – 1997. – V. 388, No 6645. – P. 839-840.

283. Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases // Nature Reviews Neuroscience. – 2001. – V. 2, № 7. – P. 492-501.

284. Reynaud E., Bolshakov V. N., Barajas V., Kafatos F. C., Zurita M. Antisense suppression of the putative ribosomal protein S3A gene disrupts ovarian development in Drosophila melanogaster // Mol. Gen. Genet. – 1997. – V. 256, No 4. – P. 462-7.

285. Kim M., Sim C., Denlinger D. L. RNA interference directed against ribosomal protein S3a suggests a link between this gene and arrested ovarian development during adult diapause in Culex pipiens // Insect. Mol. Biol. – 2010. - V. 19, No 1. - P. 27-33.

286. Behrmann E., Loerke J., Budkevich T. V., Yamamoto K., Schmidt A., Penczek P. A., Vos M. R., Burger J., Mielke T., Scheerer P., Spahn C. M. Structural snapshots of actively translating human ribosomes // Cell. – 2015. – V. 161, № 4. – P. 845-57.

287. Krol A., Gallinaro H., Lazar E., Jacob M., Branlant C. The nuclear 5S RNAs from chicken, rat and man. U5 RNAs are encoded by multiple genes // Nucleic Acids Res. – 1981. – V. 9, No 4. – P. 769-87.

288. Will C. L., Lührmann R. Spliceosome structure and function // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2011. – V. 3, № 7.

289. Turunen J. J., Niemela E. H., Verma B., Frilander M. J. The significant other: splicing by the minor spliceosome // Wiley Interdiscip. Rev. RNA. -2013. - V. 4, $N_{2} 1. - P. 61-76$.

290. Montzka K. A., Steitz J. A. Additional low-abundance human small nuclear ribonucleoproteins: U11, U12, etc // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1988. – V. 85, № 23. – P. 8885-9.

291. Steitz J. A., Dreyfuss G., Krainer A. R., Lamond A. I., Matera A. G., Padgett R. A. Where in the cell is the minor spliceosome? // Proceedings of the National Academy of Sciences. -2008. - V. 105, No 25. -P. 8485.

292. Will C. L., Luhrmann R. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function // Curr. Opin. Cell. Biol. – 2001. – V. 13, № 3. – P. 290-301.

293. Patel S. B., Bellini M. The assembly of a spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particle // Nucleic Acids Res. – 2008. – V. 36, № 20. – P. 6482-93.

294. Yong J., Kasim M., Bachorik J. L., Wan L., Dreyfuss G. Gemin5 delivers snRNA precursors to the SMN complex for snRNP biogenesis // Mol. Cell. – 2010. – V. 38, № 4. – P. 551-62.

295. Patel A. A., Steitz J. A. Splicing double: insights from the second spliceosome // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. -2003. - V. 4, No 12. - P. 960-70.

296. Will C. L., Schneider C., Hossbach M., Urlaub H., Rauhut R., Elbashir S., Tuschl T., Luhrmann R. The human 18S U11/U12 snRNP contains a set of novel proteins not found in the U2-dependent spliceosome // RNA. -2004. - V. 10, Nº 6. - P. 929-41.

297. Wahl M. C., Will C. L., Luhrmann R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine // Cell. -2009. - V. 136, No 4. - P. 701-18.

298. Gopanenko A. V., Malygin A. A., Karpova G. G. Exploring human 40S ribosomal proteins binding to the 18S rRNA fragment containing major 3'-terminal domain // Biochim. Biophys. Acta. – 2015. - V. 1854, No 2. - P. 101-9.

299. Jakel S., Mingot J. M., Schwarzmaier P., Hartmann E., Gorlich D. Importins fulfil a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains // EMBO J. - 2002. - V. 21, No 3. - P. 377-86.

300. Moazed D., Stern S., Noller H. F. Rapid chemical probing of conformation in 16 S ribosomal RNA and 30 S ribosomal subunits using primer extension // J. Mol. Biol. – 1986. – V. 187, No 3. – P. 399-416.

301. Latham J. A., Cech T. R. Defining the inside and outside of a catalytic RNA molecule // Science. -1989. - V. 245, No 4915. - P. 276-82.

302. Mortimer S. A., Weeks K. M. A fast-acting reagent for accurate analysis of RNA secondary and tertiary structure by SHAPE chemistry // J. Am. Chem. Soc. – 2007. – V. 129, № 14. – P. 4144-5.

303. Pomeranz Krummel D. A., Oubridge C., Leung A. K., Li J., Nagai K. Crystal structure of human spliceosomal U1 snRNP at 5.5 A resolution // Nature. – 2009. – V. 458, № 7237. – P. 475-80.

304. Malygin A. A., Shaulo D. D., Karpova G. G. Proteins S7, S10, S16 and S19 of the human 40S ribosomal subunit are most resistant to dissociation by salt // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression. -2000. - V. 1494, No 3. - P. 213-216.

305. Garreau de Loubresse N., Prokhorova I., Holtkamp W., Rodnina M. V., Yusupova G., Yusupov M. Structural basis for the inhibition of the eukaryotic ribosome // Nature. – 2014. – V. 513, № 7519. – P. 517-22.

306. Schneider-Poetsch T., Ju J., Eyler D. E., Dang Y., Bhat S., Merrick W. C., Green R., Shen B., Liu J. O. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin // Nat. Chem. Biol. – 2010. – V. 6, N 3. – P. 209-217.

307. Myasnikov A. G., Kundhavai Natchiar S., Nebout M., Hazemann I., Imbert V., Khatter H., Peyron J. F., Klaholz B. P. Structure-function insights reveal the human ribosome as a cancer target for antibiotics // Nat. Commun. -2016. - V. 7. - P. 12856.

308. Mankin A. S. Nascent peptide in the 'birth canal' of the ribosome // Trends in Biochemical Sciences. -2006. - V.31, No 1. - P.11-13.

309. Li X., Xiong X., Zhang M., Wang K., Chen Y., Zhou J., Mao Y., Lv J., Yi D., Chen X. W., Wang C., Qian S. B., Yi C. Base-Resolution Mapping Reveals Distinct m(1)A Methylome in Nuclear- and Mitochondrial-Encoded Transcripts // Mol. Cell. – 2017. – V. 68, № 5. – P. 993-1005 e9.

310. Hoke D. E., Regisford E. G., Julian J., Amin A., Begue-Kirn C., Carson D. D. Murine HIP/L29 is a heparin-binding protein with a restricted pattern of expression in adult tissues // J. Biol. Chem. – 1998. – V. 273, № 39. – P. 25148-57.

311. Jones D. T., Lechertier T., Reynolds L. E., Mitter R., Robinson S. D., Kirn-Safran C. B., Hodivala-Dilke K. M. Endogenous ribosomal protein L29 (RPL29): a newly identified regulator of angiogenesis in mice // Dis. Model. Mech. – 2013. – V. 6, N_{P} 1. – P. 115-24.

312. Oristian D. S., Sloofman L. G., Zhou X., Wang L., Farach-Carson M. C., Kirn-Safran C. B. Ribosomal protein L29/HIP deficiency delays osteogenesis and increases fragility of adult bone in mice // J. Orthop. Res. -2009. - V. 27, No 1. - P. 28-35.

313. McGettigan P. A. Transcriptomics in the RNA-seq era // Curr. Opin. Chem. Biol. – 2013. – V. 17, No 1. - P. 4-11.

314. Hrdlickova R., Toloue M., Tian B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis // Wiley Interdiscip. Rev. RNA. -2017. - V. 8, No 1.

315. Cai R., Tang G., Zhang Q., Yong W., Zhang W., Xiao J., Wei C., He C., Yang G., Pang W. A Novel lnc-RNA, Named lnc-ORA, Is Identified by RNA-Seq Analysis, and Its Knockdown Inhibits Adipogenesis by Regulating the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway // Cells. – 2019. – V. 8, № 5.

316. Sulima S. O., Kampen K. R., De Keersmaecker K. Cancer Biogenesis in Ribosomopathies // Cells. – 2019. – V. 8, N_{2} 3.

317. Matera A. G., Wang Z. A day in the life of the spliceosome // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. – 2014. – V. 15, N_{2} 2. – P. 108-21.

318. Kolossova I., Padgett R. A. U11 snRNA interacts in vivo with the 5' splice site of U12-dependent (AU-AC) pre-mRNA introns // RNA. -1997. - V. 3, No 3. - P. 227-33.

319. Yu Y. T., Steitz J. A. Site-specific crosslinking of mammalian U11 and u6atac to the 5' splice site of an AT-AC intron // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1997. – V. 94, № 12. – P. 6030-5.

320. Baillat D., Hakimi M. A., Näär A. M., Shilatifard A., Cooch N., Shiekhattar R. Integrator, a multiprotein mediator of small nuclear RNA processing, associates with the C-terminal repeat of RNA polymerase II // Cell. -2005. - V. 123, $N_{2} 2. - P. 265-76$.

321. Kosolapov A., Deutsch C. Tertiary interactions within the ribosomal exit tunnel // Nature Structural & Molecular Biology. -2009. - V. 16, No 4. - P. 405-411.

322. Ban N., Nissen P., Hansen J., Moore P. B., Steitz T. A. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 A resolution // Science. – 2000. – V. 289, № 5481. – P. 905-20.

323. Harms J., Schluenzen F., Zarivach R., Bashan A., Gat S., Agmon I., Bartels H., Franceschi F., Yonath A. High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium // Cell. -2001. - V. 107, No 5. - P. 679-88.

324. Martinez A. K., Shirole N. H., Murakami S., Benedik M. J., Sachs M. S., Cruz-Vera L. R. Crucial elements that maintain the interactions between the regulatory TnaC peptide and the ribosome exit tunnel responsible for Trp inhibition of ribosome function // Nucleic Acids Res. – 2012. – V. 40, No 5. – P. 2247-57.

325. Ito K., Chiba S. Arrest peptides: cis-acting modulators of translation // Annu. Rev. Biochem. – 2013. – V. 82. – P. 171-202.

326. Wilson D. N., Arenz S., Beckmann R. Translation regulation via nascent polypeptide-mediated ribosome stalling // Curr. Opin. Struct. Biol. – 2016. – V. 37. – P. 123-33.

327. Lu J., Deutsch C. Electrostatics in the ribosomal tunnel modulate chain elongation rates // J. Mol. Biol. -2008. - V.384, No 1. - P.73-86.

328. Sohmen D., Chiba S., Shimokawa-Chiba N., Innis C. A., Berninghausen O., Beckmann R., Ito K., Wilson D. N. Structure of the Bacillus subtilis 70S ribosome reveals the basis for species-specific stalling // Nat. Commun. -2015. - V. 6. - P. 6941.

329. Zhang J., Pan X., Yan K., Sun S., Gao N., Sui S. F. Mechanisms of ribosome stalling by SecM at multiple elongation steps // Elife. – 2015. – V. 4.

330. Julián P., Konevega A. L., Scheres S. H. W., Lázaro M., Gil D., Wintermeyer W., Rodnina M. V., Valle M. Structure of ratcheted ribosomes with tRNAs in hybrid states // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – V. 105, № 44. – P. 16924.

331. Chavatte L., Seit-Nebi A., Dubovaya V., Favre A. The invariant uridine of stop codons contacts the conserved NIKSR loop of human eRF1 in the ribosome // The EMBO Journal. – 2002. – V. 21, № 19. – P. 5302-5311.

332. Chavatte L., Frolova L., Laugaa P., Kisselev L., Favre A. Stop codons and UGG promote efficient binding of the polypeptide release factor eRF1 to the ribosomal A site // J. Mol. Biol. – 2003. – V. 331, No 4. – P. 745-58.

333. Bulygin K. N., Khairulina Y. S., Kolosov P. M., Ven'yaminova A. G., Graifer D. M., Vorobjev Y. N., Frolova L. Y., Karpova G. G. Adenine and guanine recognition of stop codon is mediated by different N domain conformations of translation termination factor eRF1 // Nucleic Acids Res. – 2011. – V. 39, № 16. – P. 7134-46.

334. Bhaskar V., Graff-Meyer A., Schenk A. D., Cavadini S., von Loeffelholz O., Natchiar S. K., Artus-Revel C. G., Hotz H. R., Bretones G., Klaholz B. P., Chao J. A. Dynamics of uS19 C-Terminal Tail during the Translation Elongation Cycle in Human Ribosomes // Cell Rep. – 2020. – V. 31, № 1. – P. 107473.

335. Landau D. A., Tausch E., Taylor-Weiner A. N., Stewart C., Reiter J. G., Bahlo J., Kluth S., Bozic I., Lawrence M., Böttcher S., Carter S. L., Cibulskis K., Mertens D., Sougnez C. L., Rosenberg M., Hess J. M., Edelmann J., Kless S., Kneba M., Ritgen M., Fink A., Fischer K., Gabriel S., Lander E. S., Nowak M. A., Döhner H., Hallek M., Neuberg D., Getz G., Stilgenbauer S., Wu C. J. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse // Nature. – 2015. – V. 526, № 7574. – P. 525-30.

336. Ljungström V., Cortese D., Young E., Pandzic T., Mansouri L., Plevova K., Ntoufa S., Baliakas P., Clifford R., Sutton L. A., Blakemore S. J., Stavroyianni N., Agathangelidis A., Rossi D., Höglund M., Kotaskova J., Juliusson G., Belessi C., Chiorazzi N., Panagiotidis P., Langerak A. W., Smedby K. E., Oscier D., Gaidano G., Schuh A., Davi F., Pott C., Strefford J. C., Trentin L., Pospisilova S., Ghia P., Stamatopoulos K., Sjöblom T., Rosenquist R. Whole-exome sequencing in relapsing chronic lymphocytic leukemia: clinical impact of recurrent RPS15 mutations // Blood. – 2016. – V. 127, № 8. – P. 1007-16.

337. Bretones G., Álvarez M. G., Arango J. R., Rodríguez D., Nadeu F., Prado M. A., Valdés-Mas R., Puente D. A., Paulo J. A., Delgado J., Villamor N., López-Guillermo A., Finley D. J., Gygi S. P., Campo E., Quesada V., López-Otín C. Altered patterns of global protein synthesis and translational fidelity in RPS15-mutated chronic lymphocytic leukemia // Blood. – 2018. – V. 132, № 22. – P. 2375-2388.

338. Martin I., Kim J. W., Lee B. D., Kang H. C., Xu J. C., Jia H., Stankowski J., Kim M. S., Zhong J., Kumar M., Andrabi S. A., Xiong Y., Dickson D. W., Wszolek Z. K., Pandey A., Dawson T. M., Dawson V. L. Ribosomal protein s15 phosphorylation mediates LRRK2 neurodegeneration in Parkinson's disease // Cell. – 2014. – V. 157, № 2. – P. 472-485.

339. Briones E., Briones C., Remacha M., Ballesta J. P. The GTPase center protein L12 is required for correct ribosomal stalk assembly but not for Saccharomyces cerevisiae viability // J. Biol. Chem. – 1998. – V. 273, N 48. – P. 31956-61.

340. Mitrovich Q. M., Anderson P. Unproductively spliced ribosomal protein mRNAs are natural targets of mRNA surveillance in C. elegans // Genes. Dev. – 2000. – V. 14, № 17. – P. 2173-84.

341. Donati G., Peddigari S., Mercer C. A., Thomas G. 5S ribosomal RNA is an essential component of a nascent ribosomal precursor complex that regulates the Hdm2-p53 checkpoint // Cell Rep. -2013. -V. 4, No 1. -P. 87-98.



Рисунок П1. Установление эффектов влияния на транслятом клеток НЕК293 продукции экзогенного рибосомного белка ^{FLAG}uS19 или добавления s⁴U в культуральную среду с использованием метода рибосомного профайлинга, примененного к клеткам НЕК293, продуцирующим ^{FLAG}uS19, или клеткам

НЕК293, выращенным в культуральной среде, содержащей s⁴U. (А) Корреляция между данными высокопроизводительного секвенирования фрагментов мРНК, защищаемых FLAGuS19-содержащими рибосомами, иммунопреципитированными за FLAGuS19 (Рибо-сек + FLAGuS19), и фрагментов мРНК, защищаемых рибосомами из фракции, оставшейся после иммунопреципитации и содержащих эндогенный uS19 (Рибо-сек + WT-uS19), полученных в ходе экспериментов Рибо-сек, с использованием клеток HEK293, продуцирующих ^{FLAG}uS19. График рассеивания значений log10 TPM (от англ. transcripts per million), расчитанных для каждого гена на основании трёх повторов эксперимента. R, корреляция Пирсона. (Б) Корреляция между данными высокопроизводительного секвенирования фрагментов мРНК, защищаемых рибосомами, полученными в ходе экспериментов Рибо-сек, с использованием нормальных клеток НЕК293 (Рибо-сек без s⁴U) и клеток НЕК293, выращенных в присутствии 4-тиоуридина (Рибосек + s⁴U). График рассеивания аналогичен таковому на панели (А). (В) Зеркальная диаграмма, отражающая нормализованную плотность распределения ридов, картирующихся на кодирующие последовательности (КДС) транскриптов (синие диаграммы), построенная на основании данных высокопроизводительного секвенирования ДНК-библиотек, полученных в рамках экспериментов Рибосек, описанных в легенде к панели А. Верхняя панель – при построении учитывались все гены со значением RPKM > 5; ниже приведены аналогичные графики для трех отдельных генов (HNRNPA2B1, *RPS15*, *YWHAE*). Серые диаграммы отражают нормализованную плотность распределения ридов, расчитанную на основании данных высокопроизводительного секвенирования ДНК-библиотек, полученных в рамках экспериментов PAR-CLIP с FLAGuS19. R, корреляция Пирсона. (Г) Зеркальная диаграмма, отражающая нормализованную плотность распределения ридов, картирующихся на кодирующие последовательности (КДС) транскриптов (синие диаграммы), построенная на основании высокопроизводительного секвенирования ДНК-библиотек, данных полученных рамках в экспериментов Рибо-сек, описанных в легенде к панели А. Верхняя панель – при построении учитывались все гены со значением RPKM > 5; ниже приведены аналогичные графики для трех отдельных генов (*РТМА*, *RPL27a*, *RPS14*). Описание аналогично панели В.



Рисунок П2. Распределение длин кластеров ридов, содержащих Т/С-транзиции.



Рисунок ПЗ. Распределение относительных положений Т/С-транзиций внутри координат кластеров ридов.



Рисунок П4. Распределение частоты встречаемости Т/С-транзиций относительно положения нуклеотида внутри триплета мРНК, находящего в А-сайте рибосомы.



Рисунок П5. Анализ экспрессии генов в eL29-дефицитных клетках HEK293 с помощью ПЦР в реальном времени. Относительное содержание мРНК нескольких генов (подписаны сверху) в клетках, трансфицированных контрольной siPHK (чёрные столбики) или специфичными к мРНК eL29 siPHK (серые столбики). Показано стандартное отклонение (S.D.) рассчитанное на основании трех повторов эксперимента; *P < 0.05, **P < 0.01, согласно тесту Манна-Уитни.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Название образца и код	Описание	Платформа	Глубина покрытия библиотеки	Тип ридов	Количество ридов, картирующихся на геном человека (%)
Rep1, batch 1, 5- T07	контроль	HiSeq 2500	2x10110203	2x100 bp	19442986 (96.2)
Rep1, batch 1, 5- T08	eL29-нокдаун	HiSeq 2500	2x12050076	2x100 bp	23232708 (96.4)
Rep2, batch 2, 8- T01	контроль	HiSeq 2500	2x12446417	2x100 bp	23834427 (95.7)
Rep2, batch 2, 8- T02	контроль	HiSeq 2500	2x12731297	2x100 bp	24350779 (95.6)
Rep3, batch 2, 8- T03	eL29- нокдаун	HiSeq 2500	2x12818849	2x100 bp	24610696 (96.0)
Rep3, batch 2, 8- T04	eL29- нокдаун	HiSeq 2500	2x13436686	2x100 bp	25794050 (96.0)

Таблица П1. Основные характеристики данных высокопроизводительного секвенирования ДНКбиблиотек, полученных в рамках РНК-сек анализа клеток НЕК293, дефицитных по eL29.

Таблица П2. Список генов, кодирующих рибосомные белки, чья экспрессия изменилась в ответ на дефицит рибосомного белка eL29.

Название гена	Ensembl gene ID	LFC	p.adj
RPL29	ENSG00000162244	-2,22	1,79E-49
RPL34	ENSG00000109475	-0,78	3,21E-08
RPL5	ENSG00000122406	-0,55	0,000104
RPL11	ENSG00000142676	-0,53	0,000104
RPL12	ENSG00000197958	-0,451	0,004021
RPL22	ENSG00000116251	-0,44	0,002895
RPL23A	ENSG00000198242	0,40	0,008581
RPS21	ENSG00000171858	0,43	0,009224
RPS5	ENSG0000083845	0,52	0,002346

Таблица ПЗА. Список клеточных процессов, ассоциированных с ап-регулируемыми в условиях дефицита рибосомного белка eL29 генами согласно анализу, выполненному с помощью ReactomePA.

				Количество
ID	Описание	p.adj	Список генов	генов
			MYL6/CALM3/DVL2/SRGAP2/TUBA1C/ZWINT/SRF/O	
			BSCN/ARHGAP21/PDPK1/KLC1/ARHGEF1/SPC24/AR	
			AP1/CYBA/MYO9B/BRK1/H2AJ/INCENP/CENPT/PIN1	
	Signaling		/KLC2/ARHGDIA/MYH14/MAD1L1/GDI1/KLC4/CTTN/	
R-HSA-	by Rho	0,066	MYH9/RHOT2/CENPM/BAIAP2/ARHGAP33/PREX1/F	
194315	GTPases		MNL1	35
	Intracellular		PSMD2/PSMD8/PIP4K2B/PSMD7/CALM3/PSMB5/AK	
R-HSA-	signaling by	0,077	T2/CHD3/FOXO4/PDPK1/PSMB6/MAF1/PSMC3/RIN	
9006925	second		G1/ADCY3/TSC2/GRK2/AKT1S1/LAMTOR4/PIP5K1C/	25

	messengers		MTA1/HDAC1/FGFR3/ADCY9/WWP2	
			MYL6/CALM3/DVL2/SRGAP2/TUBA1C/ZWINT/SRF/P	
	RHO		DPK1/KLC1/SPC24/CYBA/BRK1/H2AJ/INCENP/CENP	
R-HSA-	GTPase	0,094	T/PIN1/KLC2/MYH14/MAD1L1/KLC4/CTTN/MYH9/CE	
195258	Effectors		NPM/BAIAP2/FMNL1	25
			BECN1/PSMD2/PSMD8/INO80E/PSMD7/PSMB5/FOX	
			<i>O4/HCFC1/UFD1/PSMB6/NEDD8/PSMC3/HGS/TRAF</i>	
R-HSA-	Deubiquitin	0,082	3/H2AW/FKBP8/AXIN1/RNF123/TRAF2/ADRM1/KAT2	
5688426	ation	, i	A/MBD6/JOSD2/RAD23A	24
	Processing			
	of Capped			
	Intron-		RBM5/SRRT/SYMPK/SF3B5/U2AF1/DDX23/DDX39A/S	
R-HSA-	Containing	0.095	F3B2/LSM7/GLE1/SNRNP70/CPSF1/PRPF31/DHX38/	
72203	Pre-mRNA	- ,	XAB2/SF3A2/POLR2L/SUGP1/WBP4/SART1	20
			ACIN1/PSMD2/PSMD8/PSMD7/NMT1/PSMB5/DBNL/	
R-HSA-		0.066	AKT2/PSMB6/PSMC3/LMNA/E2F1/TRAF2/MAPT/DAP	
109581	Apoptosis	0,000	K3/PLEC/CASP7/BAX	18
107001	Programme		ACIN1/PSMD2/PSMD8/PSMD7/NMT1/PSMB5/DBNI/	
R-HSA-	d Cell	0.066	AKT2/PSMB6/PSMC3/LMNA/E2F1/TRAF2/MAPT/DAP	
5357801	Death	0,000	K3/PLEC/CASP7/BAX	18
5557001	mRNA			10
	Splicing -		RBM5/SPRT/SYMPK/SE3R5/1/24E1/DDY23/SE3R2/IS	
р нел	Major	0.069	$\frac{1}{2} \frac{1}{2} \frac{1}$	
K-115A- 72162	Dethyvov	0,008	$\frac{1}{1} \frac{1}{1} \frac{1}$	10
72103	Fallway		$\frac{OLK2L}{SOOT} \frac{1}{WD1} \frac{4}{SAK11}$	10
	mDNA	0.077	$\frac{1}{1} \frac{1}{1} \frac{1}$	
К-ПЗА- 72172	Splicing	0,077		10
12112	Splicing		ULK2L/SUGF I/ WDF 4/ SAKT I	10
DIICA	Clathrin-	0.077	DVI 2/A D2C1/ICC2D/CAV/NEDD9/A DECAD1/ILCC/DN	
R-HSA-	mediated	0,077	DVL2/AP2SI/IGF2R/GAK/NEDD8/ARFGAP1/HGS/DN	17
8856828	endocytosis		MI/GRK2/PIPSKIC/CIIN/EPNI/AP2AI/LDLR/CLIB	15
DUGA	DTEN	0.000	PSMD2/PSMD8/PSMD//PSMB5/AK12/CHD3/PSMB6/	
R-HSA-	PIEN	0,090	MAF1/PSMC3/RING1/LAM1OR4/M1A1/HDAC1/WWP	14
6807070	Regulation			14
R-HSA-	DNA	0,094	MCM3/PSMD2/PSMD8/PSMD//PSMB5/POLE/PSMB6/	10
69306	Replication		PSMC3/CDT1/E2F1/POLD1/LIG1/ANAPC11	13
	Unfolded			
	Protein			
R-HSA-	Response	0,066	DCTN1/SRPRA/ARFGAP1/EXTL3/KLHDC3/LMNA/CU	
381119	(UPR)		L7/MYDGF/CREB3/ZBTB17/ACADVL/SYVN1	12
R-HSA-	UCH	0,077	PSMD2/PSMD8/INO80E/PSMD7/PSMB5/HCFC1/PSM	
5689603	proteinases		B6/NEDD8/PSMC3/H2AW/ADRM1/MBD6	12
	XBP1(S)			
	activates			
R-HSA-	chaperone	0,004	DCTN1/SRPRA/ARFGAP1/EXTL3/KLHDC3/LMNA/CU	
381038	genes		L7/MYDGF/ZBTB17/ACADVL/SYVN1	11
	IRE1alpha			
R-HSA-	activates	0,004	DCTN1/SRPRA/ARFGAP1/EXTL3/KLHDC3/LMNA/CU	
381070	chaperones		L7/MYDGF/ZBTB17/ACADVL/SYVN1	11
R-HSA-	Collagen	0,080	COL4A2/COL4A6/COLGALT1/COL4A1/PLOD1/BMP1/	
1474290	formation		P4HB/COL6A1/PLEC/COL13A1/COL24A1	11
R-HSA-	PCP/CE	0,082	PSMD2/PSMD8/PSMD7/DVL2/PSMB5/AP2S1/PSMB6/	
4086400	pathway		PSMC3/AP2A1/SCRIB/CLTB	11
	Collagen			
	biosynthesis			
R-HSA-	and	0,066	COL4A2/COL4A6/COLGALT1/COL4A1/PLOD1/BMP1/	
1650814	modifying		P4HB/COL6A1/COL13A1/COL24A1	10

	enzymes			
	Plasma			
	lipoprotein			
	assembly,			
	remodeling,			
R-HSA-	and	0.066	AP2S1/CES3/BMP1/NR1H3/P4HB/AP2A1/LDLR/LMF2	
174824	clearance	- ,	/LCAT/NR1H2	10
	Degradation			
	of beta-			
	catenin by			
	the			
R-HSA-	destruction	0.090	PSMD2/PSMD8/PSMD7/PSMB5/FRAT2/PSMB6/PSMC	
195253	complex	0,070	3/AXIN1/HDAC1/TLE5	10
	DNA			
	Replication			
R-HSA-	Pre-	0 094	MCM3/PSMD2/PSMD8/PSMD7/PSMR5/POLF/PSMR6/	
69002	Initiation	0,074	PSMC3/CDT1/E2F1	10
07002	Hedgehog			10
R-HSA-	ligand	0.082	OS9/PSMD2/PSMD8/PSMD7/PSMR5/PSMR6/PSMC3/	
5358346	hiogenesis	0,082	PAHR/SYVN1	9
3330340	Assembly			/
	of the pre-			
D HSV	replicative	0.000		
K-115A- 68867	complex	0,090	1/////////////////////////////////////	0
08807	Uh mutanta		J/CD11/E2F1)
	that don't			
	undergo			
	autocataryti			
	c processing			
	dogradad by	0.000	050/D5MD3/D5MD9/D5MD7/D5MD5/D5MD6/D5MC2/5	
К-ПЗА- 5262769	EDAD	0,090	US9/FSIMD2/FSIMD0/FSIMD7/FSIMB3/FSIMB0/FSIMC5/S	Q
3302708	EKAD			0
	INON-			
	integrin			
	memorane-	0.004		
K-H5A-	ECM	0,094	COL4A2/COL4A0/LAMA4/COL4A1/DAG1/IKAPPC4/A	0
3000171	Interactions		GRIV/INTIN4	8
	Hn mutants			
	abrogate	0.004	050/D5MD3/D5MD9/D5MD7/D5MD5/D5MD6/D5MC2/5	
K-HSA-	ngand	0,094	US9/PSMD2/PSMD8/PSMD//PSMB5/PSMB0/PSMC5/S	0
3387390	Begulation			0
	regulation			
	OI IP55			
	Activity	0.000		
К-ПЗА- 6904759	unrougn	0,066	DID AV D / INC 5 / A VT C (C UD 2 / DIN 1 / DDDE 1 / UD A C 1)	7
6804758	Acetylation		PIP4K2B/ING5/AK12/CHD5/PIN1/BKPF1/HDAC1	1
	in-giycan			
	the ED is 1			
	the EK and			
	Calnexin/Ca	0.077		
к-нбА-	ireticulin	0,066		-
532668	cycle		US9/KNF5/MUG5/PKKC5H/GANAB/ENGASE/SYVN1	1
DIIGA	Plasma	0.000		
K-HSA-	iipoprotein	0,090		-
8964043	clearance		AP251/CE55/NK1H5/AP2A1/LDLR/NR1H2	6

	RHO			
	GTPases			
R-HSA-	activate	0,094		
5627123	PAKs		MYL6/CALM3/MYH14/CTTN/MYH9	5
R-HSA-	Cholesterol	0,095		
191273	biosynthesis		FDPS/DHCR24/LSS/MVK/MVD	5
	Constitutive			
	Signaling			
	by AKT1			
R-HSA-	E17K in	0,095		
5674400	Cancer		AKT2/FOXO4/PDPK1/TSC2/AKT1S1	5
	Caspase-			
	mediated			
	cleavage of			
R-HSA-	cytoskeletal	0,077		
264870	proteins		DBNL/MAPT/PLEC/CASP7	4
	VLDLR			
	internalisati			
R-HSA-	on and	0,077		
8866427	degradation		AP2S1/NR1H3/AP2A1/NR1H2	4
	Cytosolic			
	iron-sulfur			
R-HSA-	cluster	0,082		
2564830	assembly		NDOR1/POLD1/CIAO3/NUBP2	4
	Anchoring			
R-HSA-	fibril	0,094		
2214320	formation		COL4A2/COL4A6/COL4A1/BMP1	4
	WNT5A-			
	dependent			
R-HSA-	internalizati	0,094		
5099900	on of FZD4		DVL2/AP2S1/AP2A1/CLTB	4

Таблица ПЗБ. Список клеточных процессов, ассоциированных с даун-регулируемыми в условиях дефицита рибосомного белка eL29 генами согласно анализу, выполненному с помощью ReactomePA.

				Количество
ID	Описание	p.adj	Список генов	генов
			RPL29/SYT1/MAP2K4/NUP37/POLR2K/TAF9B/BTR	
			C/RPL34/PSMC1/GTF2A1/CD9/AP1S2/GTF2F2/NUP	
			58/CBLL1/KPNA3/NPM1/RPL5/MET/RPL11/CTNNB	
R-HSA-	Infectious	0,008	1/PSIP1/RPL12/RPL22/EIF2AK2/GRSF1/KPNA2/IPO	
5663205	disease		5/KPNB1	29
	rRNA			
	processing			
	in the		RPL29/ERI1/RIOK3/RPL34/NIP7/PNO1/UTP3/WDR3	
R-HSA-	nucleus and	0,014	6/GAR1/RPL5/RPL11/DDX52/DDX21/RPL12/RPL22/	
8868773	cytosol	-	WDR12/WDR43/TSR1	18
			RPL29/ERI1/RIOK3/RPL34/NIP7/PNO1/UTP3/WDR3	
R-HSA-	rRNA	0,015	6/GAR1/RPL5/RPL11/DDX52/DDX21/RPL12/RPL22/	
72312	processing	-	WDR12/WDR43/TSR1	18
	Major			
	pathway of		RPL29/ERI1/RIOK3/RPL34/NIP7/PNO1/UTP3/WDR3	
R-HSA-	rRNA	0,015	6/RPL5/RPL11/DDX52/DDX21/RPL12/RPL22/WDR1	
6791226	processing	,	2/WDR43/TSR1	17

	in the			
	nucleolus			
	and cytosol			
			RPL29/NUP37/POLR2K/RPL34/GTF2F2/NUP58/KP	
R-HSA-	Influenza	0,012	NA3/RPL5/RPL11/RPL12/RPL22/EIF2AK2/GRSF1/K	
168254	Infection		PNA2/IPO5/KPNB1	16
R-HSA-	Influenza	0,054	RPL29/NUP37/POLR2K/RPL34/GTF2F2/NUP58/RPL	
168255	Life Cycle		5/RPL11/RPL12/RPL22/GRSF1/IPO5/KPNB1	13
	Influenza			
	Viral RNA			
	Transcriptio			
R-HSA-	n and	0,072	RPL29/NUP37/POLR2K/RPL34/GTF2F2/NUP58/RPL	
168273	Replication		5/RPL11/RPL12/RPL22/GRSF1/IPO5	12
	ISG15			
R-HSA-	antiviral	0.015	NUP37/EIF4G2/NUP58/UBE2N/TRIM25/KPNA3/UB	
1169408	mechanism	0,010	E2E1/EIF2AK2/KPNA2/KPNB1	10
	Antiviral			
	mechanism			
	by IFN-			
R-HSA-	stimulated	0.022	NUP37/EIF4G2/NUP58/UBE2N/TRIM25/KPNA3/UB	
1169410	genes	0,022	$F^{2}F^{1}/F^{1}F^{2}AK^{2}/KPNA^{2}/KPNB^{1}$	10
	C_{2}^{\perp}	0.018	GNR4/GNG12/GNG4/F7D3/KR4S/M4P3K7/TNRC6C	10
1086308	Ca2+	0,018	CTNNR1/ACO2	0
4080398	Extro		/C11NNB1/AGO2	7
	EXIIa-			
DIIGA	nuclear	0.054	CND4/EQVQ2/LILLMV1/DIV2C4/CCND1/CNC12/CN	
К-П5А-	estrogen	0,054	GIND4/FUXU3/UTIMIXI/FIK5CA/CCINDI/GING12/GIN	0
9009391	signaling		G4/GNAII/KKAS	9
R-HSA-		0,079	INFAIP8LI/ARF3/PIK3CA/INFAIP8/MIMR9/PIP4K	0
1483255	Metabolism		ZA/PIPN13/OCRL/MIMR1	9
DIIGA	Apoptotic			
K-HSA-	execution	0,022	DSG2/UCLN/IJP1/CINNB1/SIK20/DSP/KPNB1/HM	0
/5153	phase		GBI	8
	Cooperation			
	OF PDCL			
	(PhLP1) and			
D HGA	TRIC/CCT			
R-HSA-	in G-protein	0,030		-
6814122	beta folding		GNB4/GNG12/GNG4/GNA11/RGS9/PDCL/CC12	1
	Apoptotic			
	cleavage of			
R-HSA-	cellular	0,072		
111465	proteins		DSG2/OCLN/IJP1/CINNB1/SIK26/DSP	6
	NS1			
	Mediated			
	Effects on			
R-HSA-	Host	0,083		
168276	Pathways		NUP37/NUP58/KPNA3/EIF2AK2/KPNA2/KPNB1	6
	Apoptotic			
	cleavage of			
	cell			
R-HSA-	adhesion	0,008		
351906	proteins		DSG2/OCLN/TJP1/CTNNB1/DSP	5
	Purine			
	ribonucleosi			
R-HSA-	de	0,035		
73817	monophosp		PPAT/PAICS/ADSS2/GMPS	4

	hate			
	biosynthesis			
R-HSA-	Nucleobase	0,071		
8956320	biosynthesis		PPAT/PAICS/ADSS2/GMPS	4

Таблица П4. Список дифференциально экспрессируемых генов в условиях дефицита рибосомного белка eL29, пересекающихся с набором из 343 генов-мишеней p53, описанных в Fischer M. Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene* 2017, 36, 3943-3956.

Название			
гена	Описание	LFC	p.adj
	cation channel sperm associated auxiliary subunit gamma	0,973	- •
CATSPERG	[Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:25243]		0,00057
	solute carrier family 12 member 4 [Source:HGNC	0,936	
SLC12A4	Symbol;Acc:HGNC:10913]		7,92E-08
	TNF receptor superfamily member 10d [Source:HGNC	0,923	
TNFRSF10D	Symbol;Acc:HGNC:11907]		2,31E-08
	phosphohistidine phosphatase 1 [Source:HGNC	0,915	
PHPT1	Symbol;Acc:HGNC:30033]		1,82E-05
	scribble planar cell polarity protein [Source:HGNC	0,899	
SCRIB	Symbol;Acc:HGNC:30377]		2,58E-08
	carbohydrate sulfotransferase 14 [Source:HGNC	0,871	
CHST14	Symbol;Acc:HGNC:24464]		0,00443
	BCL2 associated X, apoptosis regulator [Source:HGNC	0,845	
BAX	Symbol;Acc:HGNC:959]		5,73E-07
	p53-induced death domain protein 1 [Source:HGNC	0,806	
PIDD1	Symbol;Acc:HGNC:16491]		0,000195
	pleckstrin homology like domain family A member 3	0,772	
PHLDA3	[Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:8934]		0,000696
	transmembrane protein 8B [Source:HGNC	0,685	
TMEM8B	Symbol;Acc:HGNC:21427]		0,006174
		0,645	
FDXR	ferredoxin reductase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3642]		0,000291
TTD ID (thyroid hormone receptor interactor 6 [Source:HGNC	0,615	
TRIP6	Symbol;Acc:HGNC:12311]	0.110	0,000523
DIVNDO		0,610	1.045.05
PLXNB2	plexin B2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9104]	0.507	1,24E-05
	LDL receptor related protein associated protein I [Source:HGNC	0,605	0.000000
LKPAPI	Symbol;Acc:HGNC:6/01]	0.602	0,000292
EAMORC	family with sequence similarity 98 member C [Source:HGNC	0,603	0.004997
FAM96C	Symbol, Acc. HONC: 27119]	0.591	0,004887
IMNA	lamin A/C [Source:HGNC Symbol: Acc:HGNC:6636]	0,381	0 000283
	MAPK interacting sering/thraoning kingse 2 [Source:HGNC	0.571	0,000283
MKNK2	Symbol: A cc:HGNC:71111	0,371	0.000371
	inositol-3-phosphate synthese 1 [Source:HGNC	0.557	0,000371
ISYNA1	Symbol: Acc: HGNC: 298211	0,337	0 004995
1011011	XPC complex subunit DNA damage recognition and repair factor	0.553	0,004775
XPC	[Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC 12816]	0,333	0 000656
		0 493	0,000000
CES2	carboxylesterase 2 [Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:1864]	5,775	0.004366
		0.493	.,
NADSYN1	NAD synthetase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:29832]	.,	0,004907

NADH:ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 8	0,436	
[Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:33551]		0,00642
	0,416	
angiomotin like 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17811]		0,009893
zinc finger matrin-type 3 [Source:HGNC	-0,512	
Symbol;Acc:HGNC:29983]		0,009031
heat shock protein family A (Hsp70) member 4 like [Source:HGNC	-0,518	
Symbol;Acc:HGNC:17041]		0,006956
	-0,676	
cyclin G1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1592]		1,62E-06
TNF alpha induced protein 8 [Source:HGNC	-0,712	
Symbol;Acc:HGNC:17260]		0,00165
G protein subunit alpha i1 [Source:HGNC	-0,724	
Symbol;Acc:HGNC:4384]		0,000208
NLR family pyrin domain containing 1 [Source:HGNC	-1,041	
Symbol;Acc:HGNC:14374]		0,00225
	NADH:ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 8[Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:33551]angiomotin like 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17811]zinc finger matrin-type 3 [Source:HGNCSymbol;Acc:HGNC:29983]heat shock protein family A (Hsp70) member 4 like [Source:HGNCSymbol;Acc:HGNC:17041]cyclin G1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1592]TNF alpha induced protein 8 [Source:HGNCSymbol;Acc:HGNC:17260]G protein subunit alpha i1 [Source:HGNCSymbol;Acc:HGNC:4384]NLR family pyrin domain containing 1 [Source:HGNCSymbol;Acc:HGNC:14374]	NADH:ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:33551]0,436angiomotin like 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17811]0,416zinc finger matrin-type 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:29983]-0,512heat shock protein family A (Hsp70) member 4 like [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17041]-0,518cyclin G1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1592]-0,676TNF alpha induced protein 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17260]-0,712G protein subunit alpha i1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4384]-0,724NLR family pyrin domain containing 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:14374]-1,041

Таблица П5. Список дифференциально экспрессируемых генов в условиях дефицита рибосомного белка eL29, пересекающихся с набором из 1469 генов-мишеней с-Мус, описанных в Kim J., Lee JH., Iyer VR. Global identification of Myc target genes reveals its direct role in mitochondrial biogenesis and its E-box usage in vivo. *PloS One* 2008, 3, e1798.

Название			
гена	Описание	LFC	p.adj
	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1 [Source:HGNC	1,001	
NOLC1	Symbol;Acc:HGNC:15608]		1,15E-16
		0,940	
ACO2	aconitase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:118]		3,78E-10
	ADAM metallopeptidase domain 15 [Source:HGNC	0,821	
ADAM15	Symbol;Acc:HGNC:193]		3,83E-08
	ilvB acetolactate synthase like [Source:HGNC	0,772	
ILVBL	Symbol;Acc:HGNC:6041]		3,32E-06
	acyl-CoA dehydrogenase very long chain [Source:HGNC	0,765	
ACADVL	Symbol;Acc:HGNC:92]		1,57E-08
		0,711	
ENSA	endosulfine alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3360]		1,68E-07
		0,710	
MYH9	myosin heavy chain 9 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7579]		1,53E-06
		0,709	
MVK	mevalonate kinase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7530]		0,00163
	tubulin gamma complex associated protein 6 [Source:HGNC	0,690	
TUBGCP6	Symbol;Acc:HGNC:18127]		1,66E-05
	peroxisomal biogenesis factor 6 [Source:HGNC	0,681	
PEX6	Symbol;Acc:HGNC:8859]		0,000407
	cAMP responsive element binding protein 3 [Source:HGNC	0,678	
CREB3	Symbol;Acc:HGNC:2347]		0,006123
	WW domain binding protein 4 [Source:HGNC	0,674	
WBP4	Symbol;Acc:HGNC:12739]		0,004097
	activator of basal transcription 1 [Source:HGNC	0,665	
ABT1	Symbol;Acc:HGNC:17369]		0,001584
		0,660	
PDCL3	phosducin like 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:28860]	-	0,001479
	Rho GDP dissociation inhibitor alpha [Source:HGNC	0,652	
ARHGDIA	Symbol;Acc:HGNC:678]	-	0,000567

CCM2	CCM2 scaffold protein [Source:HGNC Symbol: Acc:HGNC:21708]	0,628	0 000402
CCM2	DNA polymerase dalta 1. cotalytic subunit [Source:HGNC	0.622	0,000402
	Sumbol: A control of 1751	0,623	0.000642
POLDI	Symbol;Acc:HGNC:9175]		0,000643
	trafficking protein particle complex 4 [Source:HGNC	0,616	
TRAPPC4	Symbol;Acc:HGNC:19943]		0,002794
		0,611	
CUL7	cullin 7 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:21024]		0,001735
		0,610	
COQ4	coenzyme Q4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19693]		0,000409
		0,609	
DHX38	DEAH-box helicase 38 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17211]		9,56E-05
	activator of HSP90 ATPase activity 1 [Source:HGNC	0.607	
AHSA1	Symbol:Acc:HGNC:1189]	-,	1.23E-05
	NES1 cysteine desulfurase [Source:HGNC	0.500	1,202 00
NES1	Symbol: A co: HCNC: 150101	0,377	0 000803
11151	Drol host shock metric family (Han 40) member D12	0.505	0,009893
DNA ID 12	Dhaj heat shock protein family (Hsp40) member B12	0,596	0.000561
DNAJB12	[Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:14891]		0,002561
		0,594	
HOXD9	homeobox D9 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5140]		0,001051
	adaptor related protein complex 4 subunit beta 1 [Source:HGNC	0,593	
AP4B1	Symbol;Acc:HGNC:572]		0,006716
	glutathione S-transferase zeta 1 [Source:HGNC	0,587	
GSTZ1	Symbol:Acc:HGNC:4643]		0,00642
	RNA binding motif protein 10 [Source:HGNC	0 586	, ,
RRM10	Symbol: Acc: HGNC: 9896]	0,500	0.000176
REMITO	ATPase H transporting V1 subunit E [Source:HGNC	0.5%6	0,000170
ATD6V1E	Symbol: A co:HCNC:16922]	0,380	0.000803
AIFOVIT		0.505	0,009893
440.04	aldolase, fructose-bisphosphate A [Source:HGNC	0,585	0.000000
ALDOA	Symbol;Acc:HGNC:414]		0,000388
		0,581	
LMNA	Iamin A/C [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6636]		0,000283
		0,563	
DAGI	dystroglycan 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2666]		0,000767
	ADP ribosylation factor related protein 1 [Source:HGNC	0,561	
ARFRP1	Symbol;Acc:HGNC:662]		0,006174
	acylaminoacyl-peptide hydrolase [Source:HGNC	0,558	
APEH	Symbol:Acc:HGNC:586]		0,006312
		0.552	
COASY	Coenzyme A synthase [Source: HGNC Symbol: Acc: HGNC: 29932]	0,001	0.000148
001101	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog B	0.541	0,000110
TIMM8R	[Source:HCNC Symbol: Acc:HCNC:11818]	0,541	0.002608
TIMIMOD	[Source.HOINC Symbol, Acc.HOINC.11818]	0.520	0,002098
MTOA	matallathianain 24 [Coursed UCNC Samplel: A soullCNC:7406]	0,539	0.004946
MIZA	metallothionein 2A [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7406]	0.520	0,004846
WD D 12		0,530	0.000404
WDR13	WD repeat domain 13 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:14352]		0,008404
	cell division cycle associated 3 [Source:HGNC	0,528	
CDCA3	Symbol;Acc:HGNC:14624]		0,003121
		0,522	
RPS5	ribosomal protein S5 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10426]		0,002346
	NEDD8 ubiquitin like modifier [Source:HGNC	0.518	
NEDD8	Symbol;Acc:HGNC:77321	, -	0,001181
	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A3 [Source HGNC	0 496	,
NDUFA 3	Symbol: Acc: HGNC:7686]	0,770	0.008109
1,201110	BCS1 homolog ubiquinol-outochrome c reductase complex	0.490	0,000107
PCS11	chaparana [Source: HCNC Symbol: A ce: HCNC: 1020]	0,489	0.001204
DUSIL	enaperone [source.more symbol, Acc. more. 1020]		0,004200

	protein phosphatase 1 regulatory subunit 10 [Source:HGNC	0,488	
PPP1R10	Symbol;Acc:HGNC:9284]	0.477	0,003458
DDX23	DEAD-box helicase 23 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17347]	0,475	0,00083
	24-dehydrocholesterol reductase [Source:HGNC Symbol: Acc:HGNC:2859]	0,473	0 000392
DIICK24	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1 [Source:HGNC	0.472	0,000392
U2AF1	Symbol;Acc:HGNC:12453]	0,472	0,000396
RNF5	ring finger protein 5 [Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:10068]	0,469	0.009893
	splicing factor 3b subunit 5 [Source:HGNC	0,469	- ,
SF3B5	Symbol;Acc:HGNC:21083]	,	0,003864
RPLP1	ribosomal protein lateral stalk subunit P1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10372]	0,468	0,000281
DOLG	DNA polymerase gamma, catalytic subunit [Source:HGNC	0,464	0.000.77
POLG	Symbol;Acc:HGNC:9179]	0.452	0,000877
ATP6AP1	Symbol;Acc:HGNC:868]	0,453	0,007468
	proteasome 26S subunit, non-ATPase 7 [Source:HGNC	0,436	
PSMD7	Symbol;Acc:HGNC:9565]	0.400	0,003121
RPS21	ribosomal protein \$21 [Source:HGNC Symbol: Acc:HGNC:10409]	0,432	0 009224
10 521	proteasome 26S subunit, non-ATPase 8 [Source:HGNC	0 426	0,007224
PSMD8	Symbol;Acc:HGNC:9566]	0,120	0,001438
		0,417	·
UBL5	ubiquitin like 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:13736]		0,006872
МСМ3	minichromosome maintenance complex component 3 [Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:6945]	0,394	0.001681
	karyopherin subunit beta 1 [Source:HGNC	-0,363	.,
KPNB1	Symbol;Acc:HGNC:6400]		0,005132
RAR11A	RAB11A, member RAS oncogene family [Source:HGNC Symbol: Acc:HGNC:0760]	-0,397	0 008504
KADITA	Symbol, Acc. Holice. 9700]	-0.405	0,008394
PLP2	proteolipid protein 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9087]	0,105	0,008594
	alastic 2 [Compared HCNC Compared Association (COCO)]	-0,409	0.007904
PLS3	plastin 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9091]	0.410	0,007804
SLC38A1	Symbol;Acc:HGNC:13447]	-0,410	0,009456
	eukaryotic translation initiation factor 5 [Source:HGNC	-0,426	·
EIF5	Symbol;Acc:HGNC:3299]		0,003629
OPA1	OPA1 mitochondrial dynamin like GTPase [Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:8140]	-0,431	0.008265
	BCL2 associated transcription factor 1 [Source:HGNC	-0.431	0,000200
BCLAF1	Symbol;Acc:HGNC:16863]	- 7 -	0,004465
CCD	glutathione-disulfide reductase [Source:HGNC	-0,432	0.000020
GSK	Symbol;Acc:HGNC:4025]	0.427	0,009939
GMPS	Symbol;Acc:HGNC:4378]	-0,437	0,006982
		-0,438	
DDX1	DEAD-box helicase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2734]	0.442	0,001803
WDR12	WD repeat domain 12 [Source:HGNC Symbol: Acc:HGNC:14008]	-0,443	0 006276
	where the repeat domain 12 [Source.HOIVE Symbol, Acc.HOIVE.14098]	-0.452	0,000270
RPL12	ribosomal protein L12 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10302]	0,102	0,004021
CLVI	CDC like himses 1 [Source: UCNC Source at A control (0.2009]	-0,460	0.000552
ULAI	UDU like kinase 1 [Source: HGNU Symbol; ACC: HGNU: 2068]		0,008553

SKP2 Symbol;Acc:HGNC:10901]	0,007748
-0,4/5	0.000641
DDA21 DEXD-box hencase 21 [Source:HGNC	0,000041
ACAA2 Symbol: Acc: HGNC:83]	0 00407
-0.508	0,00407
<i>FBXO5</i> F-box protein 5 [Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:13584]	0,004459
VPS35 retromer complex component [Source:HGNC -0.508	,
VPS35 Symbol;Acc:HGNC:13487]	0,002895
thioredoxin interacting protein [Source:HGNC -0,518	
TXNIP Symbol;Acc:HGNC:16952]	0,007219
heat shock protein family A (Hsp70) member 4 like [Source:HGNC -0,518	
HSPA4L Symbol;Acc:HGNC:17041]	0,006956
-0,521	
ME2 malic enzyme 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6984]	0,000326
-0,533	0.000205
EXO1 exonuclease 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3511]	0,000395
-0,540	0.003273
	0,003273
RPL5 ribosomal protein L5 [Source: HGNC Symbol: Acc: HGNC: 10360]	0.000104
Cbl proto-oncogene like 1 [Source:HGNC -0 578	0,000101
CBLL1 Symbol:Acc:HGNC:21225]	0.008122
-0.588	.,
<i>TMPO</i> thymopoietin [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11875]	0,000388
syndecan binding protein [Source:HGNC -0,600	
SDCBP Symbol;Acc:HGNC:10662]	0,000642
-0,606	
GPHN gephyrin [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:15465]	0,006567
phosphoribosylaminoimidazole carboxylase and	
phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide synthase -0,607	
PAICS [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:8587]	1,16E-05
leucyl and cystinyl aminopeptidase [Source:HGNC -0,612	0.000077
LNPEP Symbol;Acc:HGNC:0050]	0,009967
WASP like actin nucleation promoting factor [Source:HGNC -0,615]	0.005172
WASE Symbol, Acc. HOINC.12735] 0.632	0,003172
PLAGL2 PLAG1 like zinc finger 2 [Source: HGNC Symbol: Acc: HGNC: 9047]	0.002129
-0.637	0,002129
	0,006877
BAG4 BAG cochaperone 4 Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:940	/
BAG4 BAG cochaperone 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:940] -0,660	
BAG4 BAG cochaperone 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:940] -0,660 SMAP1 small ArfGAP 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19651] -0,660	0,000313
BAG4 BAG cochaperone 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:940] -0,660 SMAP1 small ArfGAP 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19651] -0,678	0,000313
BAG4 BAG cochaperone 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:940] SMAP1 small ArfGAP 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19651] CFL2 cofilin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1875]	0,000313 0,000737
BAG4 BAG cochaperone 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:940] -0,660 SMAP1 small ArfGAP 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19651] -0,660 CFL2 cofilin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1875] -0,678 interferon alpha and beta receptor subunit 1 [Source:HGNC -0,694	0,000313 0,000737
BAG4 BAG cochaperone 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:940] SMAP1 small ArfGAP 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19651] CFL2 cofilin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1875] interferon alpha and beta receptor subunit 1 [Source:HGNC -0,694 IFNAR1 Symbol;Acc:HGNC:5432]	0,000313 0,000737 0,000126
BAG4 BAG cochaperone 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:940] -0,660 SMAP1 small ArfGAP 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19651] -0,660 CFL2 cofilin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19651] -0,678 interferon alpha and beta receptor subunit 1 [Source:HGNC -0,694 IFNAR1 Symbol;Acc:HGNC:5432] -0,6710	0,000313 0,000737 0,000126
BAG4 BAG cochaperone 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:940] -0,660 SMAP1 small ArfGAP 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19651] -0,678 CFL2 cofilin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1875] -0,678 interferon alpha and beta receptor subunit 1 [Source:HGNC -0,694 IFNAR1 Symbol;Acc:HGNC:5432] -0,710 pPP2CA Symbol;Acc:HGNC:9299] -0,710	0,000313 0,000737 0,000126 2,46E-07
BAG4 BAG cochaperone 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:940] -0,660 SMAP1 small ArfGAP 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19651] -0,660 CFL2 cofilin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19651] -0,678 CFL2 cofilin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1875] -0,678 Interferon alpha and beta receptor subunit 1 [Source:HGNC -0,694 IFNAR1 Symbol;Acc:HGNC:5432] -0,6710 protein phosphatase 2 catalytic subunit alpha [Source:HGNC -0,710 PPP2CA Symbol;Acc:HGNC:9299] -0,733 LWZC LGNC for the LAC HGNC 127001 -0,733	0,000313 0,000737 0,000126 2,46E-07
BAG4 BAG cochaperone 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:940] -0,660 SMAP1 small ArfGAP 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19651] -0,660 CFL2 cofilin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19651] -0,678 interferon alpha and beta receptor subunit 1 [Source:HGNC -0,694 IFNAR1 Symbol;Acc:HGNC:5432] -0,6710 protein phosphatase 2 catalytic subunit alpha [Source:HGNC -0,710 PPP2CA Symbol;Acc:HGNC:9299] -0,733 LIN7C [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17789] -0,734	0,000313 0,000737 0,000126 2,46E-07 0,000548
BAG4 BAG cochaperone 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:940] -0,660 SMAP1 small ArfGAP 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19651] -0,660 CFL2 cofilin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19651] -0,678 CFL2 cofilin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1875] -0,694 IFNAR1 Symbol;Acc:HGNC:5432] -0,694 protein phosphatase 2 catalytic subunit alpha [Source:HGNC -0,710 PPP2CA Symbol;Acc:HGNC:9299] -0,733 LIN7C [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17789] -0,734	0,000313 0,000737 0,000126 2,46E-07 0,000548
BAG4 BAG cochaperone 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:940] -0,660 SMAP1 small ArfGAP 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19651] -0,660 CFL2 cofilin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19651] -0,678 interferon alpha and beta receptor subunit 1 [Source:HGNC -0,694 IFNAR1 Symbol;Acc:HGNC:5432] -0,710 protein phosphatase 2 catalytic subunit alpha [Source:HGNC -0,710 PPP2CA Symbol;Acc:HGNC:9299] -0,733 LIN7C [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17789] -0,734 TOP1 DNA topoisomerase I [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11986] -0,735	0,000313 0,000737 0,000126 2,46E-07 0,000548 4,35E-07
BAG4 BAG cochaperone 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:940] -0,660 SMAP1 small ArfGAP 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19651] -0,660 CFL2 cofilin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19651] -0,678 interferon alpha and beta receptor subunit 1 [Source:HGNC -0,694 IFNAR1 Symbol;Acc:HGNC:5432] -0,694 protein phosphatase 2 catalytic subunit alpha [Source:HGNC -0,710 PPP2CA Symbol;Acc:HGNC:9299] -0,733 LIN7C [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17789] -0,734 TOP1 DNA topoisomerase I [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11986] -0,756 LAPTM4B Symbol;Acc:HGNC:13646] -0,756	0,000313 0,000737 0,000126 2,46E-07 0,000548 4,35E-07 2,46E-07
BAG4 BAG cochaperone 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:940] -0,660 SMAP1 small ArfGAP 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19651] -0,678 CFL2 cofilin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1875] -0,678 interferon alpha and beta receptor subunit 1 [Source:HGNC -0,694 IFNAR1 Symbol;Acc:HGNC:5432] -0,710 pPP2CA Symbol;Acc:HGNC:9299] -0,733 LIN7C [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17789] -0,734 TOP1 DNA topoisomerase I [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11986] -0,756 LAPTM4B Symbol;Acc:HGNC:13646] -0,800	0,000313 0,000737 0,000126 2,46E-07 0,000548 4,35E-07 2,46E-07

	hate transducin repeat containing E2 which it protein light	0.014	
	beta-transducin repeat containing E5 ubiquitin protein figase	-0,814	
BTRC	[Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1144]		7,29E-06
		-0.824	
LDHA	lactate dehydrogenase A [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6535]	-,	8,26E-09
	SRY-box transcription factor 4 [Source:HGNC	-0,834	
SOX4	Symbol;Acc:HGNC:11200]		1,71E-07
		-0,837	
TNPO1	transportin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6401]	,	1,07E-08
	fatty acid binding protein 5 [Source:HGNC	-0,851	
FABP5	Symbol;Acc:HGNC:3560]		3,08E-09
		-0,871	
CALU	calumenin [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1458]		1,43E-10
	actin related protein 2/3 complex subunit 1B [Source:HGNC	-0,894	
ARPC1B	Symbol;Acc:HGNC:704]		0,003092
	S100 calcium binding protein A10 [Source:HGNC	-0,896	
S100A10	Symbol;Acc:HGNC:10487]		8,17E-08
	phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase [Source:HGNC	-0,899	
PPAT	Symbol;Acc:HGNC:9238]		4,22E-07
		-0,988	
CORO1C	coronin 1C [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2254]		9,77E-11
		-1,019	
ITGA2	integrin subunit alpha 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6137]		6,79E-06
		-1,020	
ARF3	ADP ribosylation factor 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:654]		2,53E-11
	glutaminyl-tRNA amidotransferase subunit QRSL1 [Source:HGNC	-1,059	
QRSL1	Symbol;Acc:HGNC:21020]		1,43E-07