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

На правах рукописи

Малыгин Алексей Аркадьевич

Структурно-функциональные особенности взаимодействий рибосомных белков человека с различными видами РНК

03.01.04 – биохимия

Диссертация на соискание учёной степени доктора химических наук

> Научный консультант: д.х.н., проф. Карпова Галина Георгиевна

Новосибирск 2018

Оглавление

	стр.
Список сокращений	7
Введение	9
Основная часть	17
Глава 1. Структурно-функциональные свойства рибосомных белков млекопитающих	
(Обзор литературы)	17
1.1 Физико-химические характеристики рибосомных белков	17
1.1.1 Классификация и номенклатура рибосомных белков млекопитающих	17
1.1.2 Особенности структурной организации рибосомных белков	22
1.2 Жизненный цикл рибосомных белков	26
1.2.1 Структура генов рибосомных белков	26
1.2.2 Экспрессия генов рибосомных белков	33
1.2.2.1 Транскрипция генов рибосомных белков	33
1.2.2.2 Сплайсинг пре-мРНК генов рибосомных белков	
1.2.2.3 Координированная трансляция генов мРНК рибосомных белков	38
1.2.3 Ядерный импорт рибосомных белков	43
1.2.4 Роль рибосомных белков в процессе сборки и созревания субчастиц	
рибосом млекопитающих	45
1.2.5 Поддержание клеточного баланса рибосомных белков	51
1.2.6 Участие рибосомных белков в регуляции экспрессии собственных генов	53
1.3 Рибосомные белки и контроль биогенеза рибосом	55
1.3.1 Вовлечение рибосомных белков в контроль биогенеза рибосом	56
1.3.2 Заболевания, вызванные дисфункцией рибосомных белков	61
1.4 Вовлечение рибосомных белков в процесс трансляции	65
1.4.1 Участие рибосомных белков в трансляции специализированных клеточных	
матриц и её регуляции	65
1.4.2 Пост-трансляционные модификации рибосомных белков, влияющие	
на эффективность трансляции	69
1.5 Участие рибосомных белков в биогенезе вирусов	72
1.5.1 Взаимодействие вирусных РНК с рибосомными белками в изолированном	
состоянии	72
1.5.2 Взаимодействие вирусных РНК с рибосомными белками в составе	
рибосомных субчастиц	74
1.6 Экстрарибосомные функци рибосомных белков	81

Глава 2. Материалы и методы исследований (Экспериментальная часть)	87
2.1. Материалы	.87
2.2 Методы	.89
2.2.1 Получение кДНК рибосомных белков человека и её клонирование	
в плазмидные векторы	.89
2.2.2 Получение, очистка и ренатурация рекомбинантных рибосомных белков	.97
2.2.3 Выделение 40S и 60S субчастиц рибосом из плаценты человека	.98
2.2.4 Выделение суммарного белка из 40S рибосомных субчастиц	.99
2.2.5 Разделение рибосомных белков одномерным гель-электрофорезом	
в различных условиях	.99
2.2.6 Анализ рибосомных белков двумерным гель-электрофорезом1	.00
2.2.7 Окрашивание белков в полиакриламидном геле после разделения	
электрофорезом1	01
2.2.8 Регистрация КД-спектров рибосомных белков1	01
2.2.9 Иммуноблотинг рибосомных белков1	01
2.2.10 Очистка антител против рибосомного белка uS15 человека из	
соответствующей антисыворотки1	.02
2.2.11 Получение ДНК-матриц для синтеза РНК-транскриптов с помощью	
Т7 РНК-полимеразы1	02
2.2.12 Получение РНК-транскриптов с помощью Т7 РНК-полимеразы1	04
2.2.13 Введение ³² Р-метки на 5'-конец олигодезоксирибонуклеотида10	06
2.2.14 Измерение параметров связывания рибосомных белков с РНК-	
транскриптами методом фильтрования на нитроцеллюлозных фильтрах	
и определение кажущихся констант ассоциации1	06
2.2.15 Связывание суммарного белка 40S субчастиц рибосом человека с	
РНК-трансриптом 18S3DM1	107
2.2.16 Связывание рибосомного белка uS15 с фрагментами пре-мРНК	
в составе ядерного экстракта клеток HeLa1	107
2.2.17 Ферментативный футпринтинг РНК в комплексе с рибосомными белками1	08
2.2.18 Химический футпринтинг РНК в комплексе с рибосомными белками1	08
2.2.19 Определение разрывов цепи и модифицированных нуклеотидных	
остатков в РНК с помощью обратной транскрипции1	109
2.2.20 Сплайсинг фрагментов пре-мРНК uS15 и uS9 in vitro и анализ продуктов	
сплайсинга1	.09
2.2.21 Трансфекция клеток НЕК293 плазмидными конструкциями и проведение	

ПЦР в реальном времени110
2.2.22 Компьютерный анализ структуры белков и РНК110
2.2.23 Диссоциация белков из 40S субчастицы рибосомы человека под действием
моновалентных катионов111
2.2.24 Расщепление 40S субчастицы рибосом человека на голову и тело111
2.2.25 Расщепление белков трипсином и приготовление образцов для MALDI-TOF
масс-спектрометрии112
2.2.26 Связывание рекомбинантного рибосомного белка uS2 человека и его и
мутантных форм с 40S субчастицами рибосом112
2.2.27 Анализ связывания IRES ВГС с 40S рибосомными субчастицами113
2.2.28 Флуоресцентное зондирование экспонированных остатков лизина
рибосомных белков в 40S субчастицах и их комплексах с IRES BГС113
2.2.29 Селективное введение фотоактивируемых групп в IRES ВГС и
характеризация полученных производных114
2.2.30 Аффинная модификация 40S субчастиц рибосом человека производными
IRES ВГС и идентификация сшитых белков115

Глав	за 3. Структурно-функциональные особенности взаимодействий рибосомных	
белк	ков человека с различными видами РНК (Результаты и обсуждение)	117
3.	1 Получение функционально активных рекомбинантных рибосомных белков	
Ч	еловека и изучение их вторичной структуры	117
	3.1.1 Создание генетических конструкций и получение рекомбинантных	
	рибосомных белков человека	118
	3.1.2 Подтверждение фолдинга рекомбинантных рибосомных белков	122
	3.1.3 Устойчивость структуры рибосомных белков к действию мочевины и	
	кислотно-щелочной денатурации	126
3.	2 Структурные основы взаимодействий рибосомных белков с 18S рРНК и её	
ф	рагментами	128
	3.2.1 Порядок диссоциации белков из 40S субчастицы рибосомы человека под	
	действием моновалентных катионов	129
	3.2.2 Отщепление головы 40S субчастицы от тела и картирование рибосомного	
	белка S28 на голове субчастицы	132
	3.2.3 Подходы, использованные в настоящей работе для изучения связывания	
	рибосомных белков человека с различными видами РНК	135
	3.2.4 Связывание рекомбинантного рибосомного белка uS2 человека с 40S	

субчастицами, дефицитными по белку uS2, и картирование участка	
связывания эукариот-специфичного С-концевого домена белка uS2 на 40S	
субчастице13	7
3.2.5 Взаимодействие рибосомных белков uS7, uS15, uS9 и uS13 человека с	
фрагментами 18S рРНК, содержащими участки их связывания14	5
3.2.5.1 Связывание рибосомного белка uS7 с фрагментом 1203-1236/1521-1698	
18S рРНК14	5
3.2.5.2 Связывание рибосомного белка uS9 с фрагментом 1203-1236/1521-1698	
18S рРНК150	0
3.2.5.3 Кооперативное связывание рибосомных белков uS7 и uS9 с фрагментом	
1203-1236/1521-1698 18S pPHK150	5
3.2.5.4 Рибосомный белок uS13 как молекулярная "скрепка" центральной части	
большого 3'-концевого домена 18S рРНК16	1
3.2.5.5 Связывание рибосомного белка uS15 человека с центральным доменом	
18S рРНК16	5
3.2.5.6 Роль ионов Mg ²⁺ и белка uS15 в формировании структуры центрального	
домена 18S рРНК17	2
3.2.6 Роль гидроксилирования рибосомного белка uL2 в поддержании	
функционально активной структуры 60S субчастицы рибосомы человека17	7
3.2.7 Схожие структурные мотивы в эубактериальных рибосомных белках bS20, bS18	
и bS16 и в эукариотических рибосомных белках eS25, eS26 и eS31 соответственно18	35
3.2.8 Связывание суммарного белка 40S субчастицы рибосомы человека	
с большим З'-концевым доменом 18S рРНК18	38
3.3 Роль рибосомных белков 40S субчастицы в инициации трансляции	
геномной РНК ВГС19	17
3.3.1 Роль рибосомного белка uS2 в связывании IRES ВГС с 40S рибосомными	
субчастицами19	7
3.3.2 Рибосомные белки 40S субчастицы, участвующие в связывании IRES ВГС	
через экспонированные остатки лизина19	9
3.3.3 Структурная организация участка связывания IRES ВГС на 40S	
субчастице20	4
3.3.4 Молекулярный механизм IRES-зависимой инициации трансляции ВГС	
и ВГС-подобных вирусов20	15
3.3.5 Расположение нуклеотидов, фланкирующих стартовый кодон ORF IRES BГС,	
в бинарном комплексе IRES BГС с 40S субчастицами рибосом	5

3.4 Роль рибосомных белков человека в регуляции собственного биосинтеза на уровне	
сплайсинга кодирующих их пре-мРНК	223
3.4.1 Способность рибосомных белков uS15 и uS9 связываться с их кодирующими	
пре-мРНК и ингибировать их сплайсинг	225
3.4.2 Определение участков связывания рибосомных белков uS15, uS9 и eS26 на	
фрагментах соответствующих им пре-мРНК, и механизм контроля экспрессии	
генов этих белков на уровне сплайсинга	235
Заключение	245
Выводы	251
Список литературы	253
Благодарности	283

Список сокращений

- Бис-Трис 2-[бис(2-гидроксиэтил)амино]-2-(гидроксиметил)пропан-1,3-диол
- БСА бычий сывороточный альбумин

ВГС – вирус гепатита С

- ВЭЖХ высокоэффективная жидкостная хроматография
- ДМСО диметилсульфоксид
- кДНК комплементарная ДНК
- ИПТГ изопропил-β-D-тиогалактопиранозид

КД – круговой дихроизма

Крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия

НТО – нетранслируемая область

ПААГ – полиакриламидный гель

ПТЦ – пептидилтрансферазный центр

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ТМАО – триметиламиноксид

ТР40 - суммарный белок 40S рибосомных субчастиц

Трис – 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол

гРНК – геномная РНК

мРНК – матричная РНК

- мякРНК малая ядрышковая РНК
- мяРНП малый ядерный рибонуклеопротеид

рРНК – рибосомная РНК

тРНК – транспортная РНК

РСА – рентгеноструктурный анализ

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат, 2-[2-[бис(карбоксиметил)амино]этил-(карбоксиметил)амино]уксусная кислота

5'-ETS – внешний транскрибируемый спейсер (от англ. external transcribing spacer)

BzCN - бензоилцианид

BVDV – вирус бычьей диареи

- ChIP метод иммунопреципитации хроматина (от англ. chromatin immunoprecipitation)
- СМСТ 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)-карбодиимид мето-р-толуолсульфонат
- CrPV вирус паралича сверчка
- CSFV вирус классической чумы свиней

- СТD С-концевой домен
- DBA анемия Даймонда-Блэкфена (Diamond-Blackfan anemia)
- DMS диметилсульфат
- DTT дитиотреитол
- EBV вирус Эпштейна-Барр
- EBER1 PHK 1, кодируемая EBV (от англ. EBV encoded RNA 1)
- ENU этилнитрозомочевина
- НЕРЕЅ 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
- НОАс уксусная кислота
- IRES внутренний участок входа рибосомы (от англ. Internal Ribosome Entry Site)
- ITS1 внутренний транскрибируемый спейсер (от англ. internal transcribing spacer)
- MES 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота
- NHS N-гидроксисукцинимидный эфир
- NLS последовательность ядерной локализации (от англ. nuclear localization sequence)
- NoLS последовательность ядрышковой локализации (от англ. nucleolar localization sequence)
- 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
- PMSF фенилметилсульфонилфторид
- PTV вирус энзоотического энцефаломиелита свиней
- SDS додецилсульфат нария

Введение

Актуальность проблемы и степень её разработанности

Синтез белков на рибосомах является заключительной стадией реализации генетической информации, заложенной в белок-кодирующих генах всех живых организмов. В ходе этого процесса, трансляции, осуществляется точное декодирование последовательности нуклеотидов мРНК и катализ образования пептидных связей в синтезируемом полипептиде в точном соответствии с генетическим кодом. Центральный участник трансляции – рибосома – представляет собой динамичный мультикомпонентный РНК-белковый комплекс, состоящий из специфичных рибосомных РНК (рРНК) и рибосомных белков, которые вместе формируют две рибосомные субчастицы – большую и малую. От согласованной работы этого комплекса и других участников процесса трансляции зависит в конечном итоге жизнспособность клетки в целом.

Поскольку рибосомы присущи всем клеточным организмам, и основной их функцией является синтез белков, то у всех рибосом имеются одинаковые (консервативные) черты в их строении. Однако чем в более дальнем эволюционном родстве находятся эти организмы, тем больше отличий в строении их рибосом. В настоящее время принято классифицировать рибосомы по трём типам согласно трём доменам жизни: рибосомы эубактерий и архей (прокариотические рибосомы) и рибосомы эукариот. Рибосомы разных типов сильно отличаются друг от друга, причём рибосомы эукариот устроены наиболее сложным образом. Субчастицы эукариотических рибосом в дополнение к белкам, имеющим эубактериальные гомологи, содержат большой набор эукариот/архей-специфичных белков, а в белках, гомологичных эубактериальным рибосомным белкам, часто встречаются протяжённые районы, специфичные для архей и эукариот. Кроме того, эукариотические рРНК имеют большую длину, чем прокариотические рРНК, и включают участки, не имеющие гомологии в рРНК прокариот (т.н. сегменты экспансии). Всё это делает субчастицы эукариотических рибосом более крупными по сравнению с субчастицами рибосом прокариот, что отражается на коэффициентах их седиментации: 60S и 40S для соответственно большой и малой субчастиц 80S рибосомы эукариот (50S и 30S у большой и малой субчастиц 70S рибосомы прокариот).

Процесс сборки рибосомных субчастиц имеет огромное значение для клетки, поскольку от безошибочности этого процесса зависит эффективность и точность трансляции. В клетках прокариот этот процесс контролируют несколько десятков различных белков, а у эукариот за сборку рибосомных субчастиц отвечает свыше двух сотен участников. Тем не менее, ещё в 60-ых годах прошлого века в группе Номуры было показано, что 30S субчастицы рибосом *Escherichia coli* могут быть собраны *in vitro* из отдельных рибосомных белков и 16S рРНК без

участия дополнительных факторов [1]. Позднее, подобным образом удалось осуществить сборку активных субчастиц рибосом других представителей эубактерий и архей (напр., [2-4]). Эти работы существенно расширили методологический арсенал исследователей, что сыграло впоследствии неоценимую роль в изучении структурно-функциональной топографии субчастиц рибосом прокариот и в расшифровке их структуры на атомарном уровне. Однако, несмотря на усилия многих лабораторий, попытки собрать *in vitro* активные субчастицы эукариотических рибосом не увенчались успехом, что, вероятно, обусловлено сложностью самого процесса сборки, требующего участия большого числа вспомогательных факторов. В связи с этим представляло интерес определить рибосомные белки, образующие кор (от англ. соге – ядро, сердцевина) 40S субчастицы, и изучить особенности РНК-белковых взаимодействий, происходящих при сборке отдельных её морфологических районов и формировании структуры 60S субчастицы вблизи каталитического центра, используя индивидуальные рибосомные белки и фрагменты pPHK, содержащие участки связывания этих белков.

Функциональная роль рибосомных белков не ограничивается их участием в трансляции в качестве конститутивных компонентов рибосом. Известно множество примеров вовлечения рибосомных белков в клеточные процессы, не сопряжённые с трансляцией мРНК на рибосомах. В этом плане прокариотические рибосомные белки также изучены лучше: например, хорошо известна их способность контролировать свой биосинтез через регуляцию уровня трансляции соответствующих оперонов, осуществляемую по принципу обратной связи. У эукариот процесс экспрессии генов более сложен, чем у прокариот, и включает стадию сплайсинга первичного транскрипта, на которой происходит вырезание незначащих последовательностей (интронов) и лигирование последовательностей, составляющих зрелую мРНК (экзонов). Учитывая высокое сродство рибосомных белков к разным видам РНК, а также тот факт, что данные белки присутствуют в клеточном ядре, где происходит сплайсинг и созревание мРНК, можно полагать, что отдельные рибосомные белки вовлекаются в процесс регуляции экспрессии генов на этой стадии. О существовании таких регуляторных функций у рибосомных белков высших эукариот можно судить из того, что уровень экспресии генов отдельных рибосомных белков в клетках при канцерогенезе или развитии аутоиммунных заболеваний существенно отличается от такового в норме. Очевидно, что нарушение уровня экспресии генов рибосомных белков должно катастрофическим образом сказываться также на процессе сборки рибосомных субчастиц в клетке и, как следствие, на её общей трансляционной активности. На момент начала настоящей работы возможность регуляции биосинтеза рибосомных белков эукариот на стадии сплайсинга их пре-мРНК была показана для дрожжей, но оставалось неизвестным, существует ли подобный тип регуляции экспрессии генов рибосомных белков у высших эукариот, чей процесс сплайсинга более сложен, чем у низших эукариот.

Известно, что геномные РНК (гРНК) многих вирусов могут инициировать свою трансляцию по механизму, принципиально отличающемуся от механизма инициации трансляции кэпированных клеточных мРНК, благодяря наличию в 5'-нетранслируемых областях этих гРНК особых структурных элементов, так называемых IRES (от англ. Internal Ribosome Entry Site – внутренний участок входа рибосомы). Так, IRES-элемент гРНК одного из опаснейших патогенов человека – вируса гепатита С (ВГС) способен прочно связываться с 40S субчастицей рибосомы в отсутствие факторов инициации трансляции. В результате этого связывания стартовый AUG-кодон гРНК ВГС оказывается помещённым вблизи района 40S субчастицы, соответствующего участку, где происходит взаимодействие этого кодона с инициаторной тРНК. На основании данных по сшивкам IRES ВГС с 40S субчастицами рибосом [5-7] сложилось мнение, что в связывание с IRES при инициации трансляции гРНК ВГС на 40S субчастицах вовлекаются исключительно рибосомные белки. Однако структурные основы молекулярного механизма IRES-зависимой инициации трансляции, обеспечивающего синтез вирусного полипротеина в обход регуляторных механизмов клетки, оставались неизвестными. Кроме того, отсутствовала информация об устройстве на 40S субчастице фрагмента кодирующей части гРНК ВГС, входящего в состав IRES, хотя и существовала точка зрения, что в бинарном комплексе IRES BГС с 40S субчастицей этот фрагмент фиксируется стабильно в мРНК-связывающем канале [7].

Таким образом, представлялось актуальным изучение особенностей взаимодействия рибосомных белков человека с разными видами РНК и их роли в регуляции экспрессии собственных генов и инициации трансляции гРНК ВГС.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы являлось изучение структурных особенностей взаимодействий рибосомных белков человека с разными видами РНК, лежащих в основе различных клеточных процессов, не связанных непосредственно с трансляцией клеточных мРНК.

Для достижения поставленной цели предполагалось решить следующие задачи.

1. Разработать платформу для получения функционально активных рекомбинантных рибосомных белков человека и на её основе получить репрезентативный набор таких белков для изучения их взаимодействий с различными видами РНК.

2. Определить устойчивость 40S субчастиц рибосом человека к действию высоких концентраций моновалентных катионов, и установить порядок диссоциации рибосомных белков из 40S субчастиц.

3. Изучить взаимодействие рибосомных белков человека с 18S pPHK с использованием рекомбинантных рибосомных белков и фрагментов 18S pPHK, содержащих участки связывания этих белков, и выявить характерные особенности таких взаимодействий.

4. Установить роль посттрансляционной модификации – гидроксилирования рибосомного белка uL2 в структуре 60S субчастицы рибосомы человека.

5. Реконструировать на основе РНК-транскрипта, соответствующего большому З'концевому домену 18S рРНК, и суммарного белка 40S субчастицы большую морфологическую часть 40S субчастицы рибосомы человека – голову.

6. Определить структурные элементы 40S субчастицы рибосомы человека, взаимодействующие с IRES BГС в составе соответствующего бинарного комплекса, и предложить молекулярный механизм, обеспечивающий узнавание инициаторного кодона AUG IRES BГС в этом комплексе Met-tRNA_i^{Met} без участия факторов инициации.

7. Изучить взаимодействие рибосомных белков человека с кодирующими их пре-мРНК, и выяснить, способны ли эти белки регулировать экспрессию собственных генов на стадии сплайсинга их пре-мРНК.

Научная новизна

Настоящая работа представляет собой первое комплексное исследование структурнофункциональных свойств рибосомных белков человека, проявляемых ими в различных клеточных процессах, помимо непосредственно трансляции клеточных мРНК. В ходе выполнения исследования была разработана платформа для получения очищенных рекомбинантных рибосомных белков человека, предложены методы их ренатурации и получен представительный набор таких белков. С помощью полученных рекомбинантных белков и РНК-транскриптов, соответствующих различным районам 18S и 28S рРНК, установлен ряд характерных особенностей связывания рибосомных белков человека с этими рРНК и выявлена роль гидроксилирования белка uL2 в формировании рибосомного каталитического центра. Впервые выполнена сборка большой морфологической части 40S субчастицы, головы, из суммарного белка субчастицы и РНК-транскрипта, соответствующего большому З'-концевому домену 18S рРНК. Установлен ряд белков 40S субчастицы рибосомы человека, вовлеченных в её связывание с IRES ВГС, а также впервые получены структурные данные, позволившие предложить молекулярный механизм IRES-зависимой инициации трансляции гРНК ВГС. Использование рекомбинантных белков и РНК-транскриптов, соответствующих фрагментам их пре-мРНК, позволило открыть новый способ регуляции экспресси генов рибосомных белков человека на уровне сплайсинга, в основе которого лежит принцип обратной связи. Таким образом, в настоящей работе впервые установлены структурные особенности взаимодействий

рибосомных белков человека с разными видами РНК при функционировании в процессах, связанных со сборкой 40S и 60S субчастиц рибосом, инициацией трансляции гРНК ВГС и регуляцией экспрессии их генов, и показана роль конкретных рибосомных белков в этих процессах.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты настоящего исследования существенно расширили представление о функциональных свойствах рибосомных белков высших эукариот и внесли весомый вклад в понимание их роли в биогенезе рибосом. Универсальность разработанной платформы для получения рекомбинантных рибосомных белков млекопитающих сделала возможным использование этих белков в различных направлениях исследований. Полученные данные об особенностях РНК-белковых взаимодействий рибосомных белков с фрагментами 18S рРНК выявили существенные отличия в характере связывания рибосомных белков млекопитающих (и, скорее всего, рибосомных белков эукариот в целом) с рРНК от аналогичного процесса у эубактерий. Эти данные позволили показать, что, несмотря на значительные видимые сходства в связывании гомологичных рибосомных белков эубактерий и человека с соответствующими участками рРНК, эукариот-специфичные фрагменты рибосомных белков вносят значительные коррективы в это связывание. Выявленные особенности взаимодействия рибосомных белков с рРНК, включая роль гидроксилирования белка uL2 в формировании рибосомного каталитического центра, и продемонстрированная на примере головы 40S субчастицы принципиальная возможность сборки из отдельных компонентов рибонуклеопротеида, соответствующего её отдельному морфологическому району, могут иметь значение при определении ключевых аспектов клеточных механизмов, обеспечивающих сборку 40S субчастиц. Открытие нового способа авторегуляции экспрессии генов рибосомных белков человека на уровне сплайсинга их пре-мРНК расширило список известных функций этих белков, проявляемых ими вне рибосомных субчастиц, что, несомненно, может оказаться полезным для понимания молекулярных механизмов патологий, связанных с дисфункцией рибосомных белков.

Результаты работы, касающиеся выявления белков 40S субчастицы рибосомы человека, участвующих в связывании с IRES BГС, существенно дополнили данные по сайтнаправленному сшиванию IRES BГС с 40S субчастицей [8, 9] и структурные данные низкого разрешения для рибосомных комплексов IRES [10, 11]. Всё это позволило точно локализовать сайт связывания IRES на 40S субчастице и определить участки IRES, контактирующие с конкретными рибосомными белками. Показано, что один из этих белков, рибосомный белок uS2, вносит существенный вклад в связывание IRES BГС с 40S субчастицей. Впервые продемонстрированы прямые контакты IRES с 18S рРНК, способствующие позиционированию домена II IRES вблизи рибосомного белка uS7, и выявлен конформационный переход 18S рРНК в районе G1639, ответственном за селекцию Met-тРНК_i^{Met}. Полученные данные проливают свет IRES-зависимой инициации трансляции молекулярный механизм гРНК ΒΓC. на обеспечивающий селекцию Met-тРНК^{Met} 40S субчастицами, связанными с IRES, без участия факторов инициации, ответственных за узнавание старт-кодона. С помощью сайтнаправленного сшивания IRES ВГС с 40S субчастицами установлено, что триплет IRES с 3'стороны от старт-кодона AUG взаимодействует с рибосомным белком uS19, специфическим компонентом декодирущего центра [12, 13], только в незначительной доле бинарных комплексов. Эти данные показывают, что в большей части таких комплексов кодирующая часть IRES не фиксируется в мРНК-связывающем канале так, как канонические мРНК в комплексах с кодон-антикодоновым взаимодействием в Р-сайте. Все данные, полученные с IRES ВГС, могут быть распространёны на гРНК других вирусов, чьи IRES-элементы имеют вторичную структуру, аналогичную структуре IRES ВГС. Знание молекулярного механизма IRESзависимой инициации трансляции гРНК ВГС открывает новые возможности в разработке инновационных подходов к созданию противовирусных препаратов, направленных на борьбу с ВГС и подобными ему вирусами.

Таким образом, полученные в ходе исследования знания могут иметь принципиальное значение для понимания структурных аспектов фундаментальных процессов, протекающих в клетках с участием рибосомных белков, включая процесс трансляции гРНК ВГС белоксинтезирующей системой человека.

Методология и методы исследования

В работе был использован широкий набор современных подходов к изучению белков и РНК-белковых комплексов, включающих молекулярно-биологические, химические И физические методы исследований. Рекомбинантные рибосомные белки человека и их мутантные формы были получены в системе клеток E. coli, а фолдинг белков был определён с помощью спектроскопии кругового дихроизма. Фрагменты рРНК получали путём Т7транскрипции ДНК-матриц, сконструированных с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР). Структура РНК в составе рибонуклеопротеидных комплексов была исследована с помощью зондирования с использованием набора химических и ферментативных зондов различной специфичности. Белки 40S субчастицы рибосомы человека, участвующие в связывании с IRES ВГС, были выявлены с применением подхода, основанного на Nфлуоресцентном экспонированных белках мечении остатков лизина в гидроксисукцинимидным производным красителя Су3. Белки 40S субчастицы, соседствующие

с нуклеотидными остатками домена IV IRES ВГС, были установлены с использованием производных IRES ВГС, несущих фотоактивируемую группу в заданном положении, которые были получены с помощью метода, основанного на комплементарно-адресованном алкилировании РНК. Кроме того, в работе были использованы методы биоинформатики для анализа структур РНК и белков.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Платформа, разработанная для получения рекомбинантных рибосомных белков человека в клетках *E. coli*, позволяет нарабатывать белки, пригодные для структурно-функциональных исследований.

2. Малая субчастица рибосомы млекопитающих более чувствительна к концентрации моновалентных катионов, чем соответствующая субчастица рибосомы эубактерий и отличается от неё порядком диссоциации белков.

3. Рибосомные белки человека, взаимодействуя с рРНК, стабилизируют её структуру в участках связывания, действуя подобно ионам Mg²⁺ или как "молекулярная скрепка"; участки универсальных рибосомных белков на рРНК, связывания в нелом. эволюнионно эукариот/архей-специфичные фрагменты белков либо образуют консервативны, а дополнительные контакты с рРНК, либо остаются свободными.

4. Гидроксильная группа на остатке His216 рибосомного белка uL2 человека играет роль в формировании структуры каталитического центра рибосомы, способствуя конформационным перестройкам соответствующего региона 28S pPHK при его связывании с гидроксилированным белком, которые делают структуру этого региона такой, как в зрелых 60S субчастицах.

5. Отщепление морфологической части 40S субчастицы рибосомы – головы от остальной её части и возможность реконструкции соответствующего рибонуклеопротеида, удовлетворительно коррелирующего с головой по белковому составу и экспонированности РНК, являются свидетельствами независимого характера сборки этой части 40S субчастицы при её биосинтезе.

6. В связывание IRES ВГС 40S субчастицами рибосомы вовлекаются белки eS1, uS2, eS10, uS11, eS26 и eS27, а также апикальная часть шпильки h26 18S pPHK, взаимодействие которой с субдоменом IIId IRES способствует uS7-опосредованным структурным перестройкам 18S pPHK в районе, ответственном за связывание инициаторной тPHK в P-сайте. Эти перестройки лежат в основе механизма, обеспечивающего узнавание старт-кодона IRES инициаторной тPHK в отсутствие факторов инициации трансляции.

7. Рибосомные белки человека способны связываться с различными консенсусными участками сплайсинга в первом интроне кодирующих их пре-мРНК, и тем самым ингибировать

вырезание этого интрона. Эта способность даёт возможность рибосомным белкам обеспечивать авторегуляцию экспрессии собственных генов на стадии сплайсинга. Узнавание рибосомными белками участков связывания на разных видах РНК происходит по принципу структурной мимикрии.

Степень достоверности и аппробация результатов

Результаты работы в виде устных и стендовых докладов были представлены автором лично на 16 российских и международных конференциях и конгрессах. По результатам работы опубликовано 26 статей в ведущих рецензируемых российских и зарубежных изданиях. Публикации автора активно цитируются научным сообществом.

Личный вклад автора

Результаты исследований были получены лично автором, либо сотрудниками под его непосредственным руководством преимущественно в рамках выполнения проектов Российского фонда фундаментальных исследований, в которых автор являлся руководителем. В совместных работах ему принадлежит ключевая роль в постановке задач, выборе методов исследования, разработке методик и гипотез, анализе литературных источников и интепретации полученных результатов. Он принимал непосредственное участие в планировании и организации проведения экспериментов, систематизации и обобщении экспериментальных данных, подготовке публикаций, а также представлял результаты исследований на научных конференциях.

Основная часть

Глава 1

Структурно-функциональные свойства рибосомных белков млекопитающих (Обзор литературы)

Рибосомные белки составляют большую группу белков, выделенную в отдельный класс согласно их основной функции – участию в формировании и поддержании структуры рибосомы, обеспечивающей её активность в процессе трансляции. Поскольку рибосомы как основные компоненты белоксинтезирующей системы клетки присущи всем живым системам, то и рибосомные белки являются необходимыми белками для клеток организмов всех доменов жизни. Естественно, что в ходе эволюции жизни рибосомные белки претерпевали различные изменения в структуре, приобретая новые функциональные свойства или, наоборот, утрачивая некоторые из свойств; в составе рибосом при этом появлялись новые рибосомные белки, а какие-то белки, наоборот, исчезали. В настоящей главе рассмотрены основные структурно-функциональные свойства рибосомных белков наиболее сложно организованных живых систем – млекопитающих.

Обзор литературы охватывает работы по изучению структурной организации рибосомных белков млекопитающих и их функциональной активности, опубликованные, преимущественно, за последние два десятилетия. В нём подробно изложены современные взгляды и концепции, касающиеся биогенеза рибосомных белков и его регуляции. Основное внимание уделено структурным свойствам рибосомных белков, экспрессии их генов, участию рибосомных белков в сборке рибосомных субчастиц и вовлечению в биологическую активность некоторых вирусов. Отдельно рассмотрены вопросы, связанные с поддержанием клеточного баланса рибосомных белков и последствиями его нарушения, а также вопросы, касающиеся заболеваний и генетические расстройств, вызванных дисфункцией генов рибосомных белков.

1.1 Физико-химические характеристики рибосомных белков

1.1.1 Классификация и номенклатура рибосомных белков млекопитающих

К классу рибосомных белков относят клеточные белки, являющиеся конструктивными компонентами рибосом, т. е. присутствующими в их составе постоянно, в отличие от различных белковых лигандов рибосом, например трансляционных факторов, связывающихся с ними только на определённых этапах процесса биосинтеза белка. В основу номенклатуры рибосомных белков положены их принадлежность к большой (large, L) или малой (small, S) субчастице и порядковый номер белкового пятна на электрофореграмме после разделения суммарного белка субчастиц с помощью двумерного электрофореза в полиакриламидном геле (считая от точки старта в направлении миграции). В соответствии с этой номенклатурой рибосомные белки обозначаются как, например: S3, S15, L16, L30 и т.д. Таким образом, как правило, молекулярная масса рибосомного белка уменьшается с увеличением его порядкового номера, поскольку увеличивается его электрофоретическая подвижность. Если белок был отнесён к рибосомным белкам позднее классификации основной группы белков и для его обозначения не оставалось подходящего порядкового номера, то в названии такого белка использовали дополнительные символы (например: S15A, P0, SA и др.) или сохраняли наименование, данное прежде (например RACK1).

Количество белков в субчастицах рибосом организмов, относящихся к различным доменам живых существ (эубактериям, археям и эукариотам), различно; более того, даже внутри одного домена могут встречаться вариации числа рибосомных белков. Поэтому очевидно, что описанный выше способ классификации, отражающий общее число белков в рибосомной субчастице, никак не учитывает эволюционное родство между рибосомными белками из организмов, относящихся к различным доменам, что создаёт определённую путаницу при сравнительном описании рибосомных белков. В связи с этим, до недавнего времени при описании рибосомных белков использовали либо принятую для белков данного организма классификацию, либо, когда требовалось сравнивать имеющие одинаковое обозначение различные белки, дополнительные символы. Например, в обозначение белков вставляли дополнительные буквы "р", "а" или "е", указывающие на принадлежность белков к прокариотам (имея в виду при этом только эубактерии), археям или эукариотам соответственно, например: S7p, S5e, L30p, L30e, LXa и т.п. Однако несоответствия в цифровой номенклатуре рибосомных белков продолжали сохраняться даже внутри одного и того же домена жизни. В частности, такое несответствие осталось между рибосомными белками дрожжей и млекопитающих, у которых соответственно гомологами являются, например: белки S31 и S27A, L2 и L8 или L42 и L36A. Благодаря расшифровке структур субчастиц рибосом эукариотических организмов [14-17] и их сравнению со структурами субчастиц рибосом эубактерий и архей, полученными ранее [18-21], стало очевидно не только генетическое, но и структурное родство между соответствующими рибосомными белками (напр., [22]). Попытка унифицировать номенклатуру рибосомных белков была предпринята в работе [15], в которой была предложена система единой номенклатуры белков на основе наименований их семейств. Недавно эта система была взята за основу универсальной номенклатуры рибосомных белков (Таблица 1.1), принятой большой группой исследователей в области структуры и функции рибосом [23].

Согласно этой системе, белку присваивается его обозначение, принятое для эубактериального белка, при этом, если гомологичные белки встречаются во всех доменах жизни, то впереди ставится префикс «u» (от англ. universal), а если белок специфичен только для эубактерий, то – «b» (от англ. bacterial). Для эукариот-специфичных белков и их архейных гомологов сохраняется их обозначение, принятое для белков дрожжей и добавляется префикс «e» (от англ. eukaryotic). За белками RACK1, P1 и P2 сохранились их прежние имена. Поскольку новая номенклатура рибосомных белков предложена относительно недавно, то далее в тексте рибосомные белки млекопитающих приведены с теми же наименованиями, что в соответствующих обсуждаемых работах, а их универсальные обозначения даны в скобках при первом упоминании белка.

Таблица 1.1.

Единая номенклатура рибосомных белков эукариот, адаптированная согласно классификации, предложенной в работе [23]

N⁰	Универсаль-	ниверсаль- Наимено-		Обозначение	Обозначение	Обозначение у	
п/п	ное обозна-	вание	мическая	у эубактерий	у дрож-	млекопитаю-	
	чение (с	семейства	принад-		жей**	щих	
	2014 г.)		лежность*				
Мал	ая субчастица р	рибосомы	1			1	
1	eS1	S1e	AE	-	S1	S3a	
2	uS2	S2	BAE	S2	SO	SA	
3	uS3	S 3	BAE	S3	S 3	S3	
4	uS4	S4	BAE	S4	S9	S9	
5	eS4	S4e	AE	-	S4	S4 [#]	
6	uS5	S5	BAE	S5	S2	S2	
7	eS6	S6e	AE	-	S6	S6	
8	uS7	S7	BAE	S7	S5	S5	
9	eS7	S7e	Е	-	S7	S7	
10	uS8	S8	BAE	S8	S22	S15A	
11	eS8	S8e	AE	-	S8	S8	
12	uS9	S9	BAE	S9	S16	S16	
13	uS10	S10	BAE	S10	S20	S20	
14	eS10	S10e	Е	-	S10	S10	
15	uS11	S11	BAE	S11	S14	S14	

16	uS12	S12	BAE	S12	S23	S23
17	7 eS12 S12e		Е	-	S12	S12
18	8 uS13 S13		BAE	S13	S18	S18
19	19 uS14 S14		BAE	S14	S14 S29	
20	uS15	S15	BAE	S15	S13	S13
21	uS17	S17	BAE	S17	S11	S11
22	eS17	S17e	AE	-	S17	S17
23	uS19	S19	BAE	S19	S15	S15
24	eS19	S19e	AE	-	S19	S19
25	eS21	S21e	Е	-	S21	S21
26	eS24	S24e	AE	-	S24	S24
27	eS25	S25e	AE	-	S25	S25
28	eS26	S26e	Е	-	S26	S26
29	eS27	S27e	AE	-	S27	S27
30	eS28	S28e	AE	-	S28	S28
31	eS30	S30e	AE	-	S30	S30
32	eS31	S31e	AE	-	S31	S27A
33	RACK1	RACK1	Е	-	Asc1	RACK1
33 Болг	RACK1 ьшая субчастиц	RACK1 а рибосомы	Е	-	Asc1	RACK1
33 Болг 1	RACK1 ьшая субчастин uL1	RACK1 ца рибосомы L1	E B A E	- L1	Asc1	RACK1 L10A
33 Болі 1 2	RACK1 ьшая субчастин uL1 uL2	RACK1 ца рибосомы L1 L2	E BAE BAE	- L1 L2	Asc1 L1 L2	RACK1 L10A L8
33 Болл 1 2 3	RACK1 ышая субчастин uL1 uL2 uL3	RACK1 ца рибосомы L1 L2 L3	E BAE BAE BAE	- L1 L2 L3	Asc1 L1 L2 L3	RACK1 L10A L8 L3
33 Болл 1 2 3 4	RACK1 ышая субчастин uL1 uL2 uL3 uL4	RACK1 ца рибосомы L1 L2 L3 L4	E BAE BAE BAE BAE	- L1 L2 L3 L4	Asc1 L1 L2 L3 L4	RACK1 L10A L8 L3 L4
33 Болл 1 2 3 4 5	RACK1 ышая субчастин uL1 uL2 uL3 uL4 uL5	RACK1 ца рибосомы L1 L2 L3 L4 L5	E BAE BAE BAE BAE BAE	- L1 L2 L3 L4 L5	Asc1 L1 L2 L3 L4 L11	RACK1 L10A L8 L3 L4 L11
33 Болл 1 2 3 4 5 6	RACK1 ышая субчастин uL1 uL2 uL3 uL4 uL5 uL6	RACK1 ца рибосомы L1 L2 L3 L4 L5 L6	E BAE BAE BAE BAE BAE BAE BAE	- L1 L2 L3 L4 L5 L6	Asc1 L1 L2 L3 L4 L11 L9	RACK1 L10A L8 L3 L4 L11 L9
33 Болл 1 2 3 4 5 6 7	RACK1 ышая субчастин uL1 uL2 uL3 uL4 uL5 uL6 eL6	RACK1 да рибосомы L1 L2 L3 L4 L5 L6 L6e	E BAE BAE BAE BAE BAE BAE E	- L1 L2 L3 L4 L5 L6 -	Asc1 L1 L2 L3 L4 L11 L9 L6	RACK1 L10A L8 L3 L4 L11 L9 L6
33 Болл 1 2 3 4 5 6 7 8	RACK1 ышая субчастин uL1 uL2 uL3 uL4 uL5 uL6 eL6 eL8	RACK1 ца рибосомы L1 L2 L3 L4 L5 L6 L8e	E BAE BAE BAE BAE BAE E AE	- L1 L2 L3 L4 L5 L6 - -	Asc1 L1 L2 L3 L4 L11 L9 L6 L8	RACK1 L10A L8 L3 L4 L11 L9 L6 L7A
33 Болл 1 2 3 4 5 6 7 8 9	RACK1 ышая субчастин uL1 uL2 uL3 uL4 uL5 uL6 eL6 eL8 uL11	RACK1 ца рибосомы L1 L2 L3 L4 L5 L6 L8e L11	E B A E B A E B A E B A E B A E B A E E A E B A E	- L1 L2 L3 L4 L5 L6 - - L11	Asc1 L1 L2 L3 L4 L11 L9 L6 L8 L12	RACK1 L10A L8 L3 L4 L11 L9 L6 L7A L12
33 Болл 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	RACK1 ышая субчастин uL1 uL2 uL3 uL4 uL5 uL6 eL6 eL8 uL11 uL13	RACK1 ца рибосомы L1 L2 L3 L4 L5 L6 L8e L11 L12	E B A E B A E B A E B A E B A E B A E E A E B A E B A E B A E	- L1 L2 L3 L4 L5 L6 - L11 L13	Asc1 L1 L2 L3 L4 L11 L9 L6 L8 L12 L16	RACK1 L10A L8 L3 L4 L11 L9 L6 L7A L12 L13A
33 Болл 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11	RACK1 ышая субчастин uL1 uL2 uL3 uL4 uL5 uL6 eL6 eL8 uL11 uL13 eL13	RACK1 ца рибосомы L1 L2 L3 L4 L5 L6 L8e L11 L13 L13 L13 L13	E B A E B A E B A E B A E B A E B A E E A E B A E B A E B A E A E	- L1 L2 L3 L4 L5 L6 - L11 L13 -	Asc1 L1 L2 L3 L4 L11 L9 L6 L8 L12 L16 L13	RACK1 L10A L8 L3 L4 L11 L9 L6 L7A L12 L13A L13
33 Болл 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12	RACK1 ышая субчастин uL1 uL2 uL3 uL4 uL5 uL6 eL6 eL8 uL11 uL13 eL13 uL14	RACK1 ца рибосомы L1 L2 L3 L4 L5 L6 L8e L11 L13 L14 L3 L4 L5 L6 L3e L11 L13 L13 L13e L14	E B A E B A E B A E B A E B A E B A E E A E B A E B A E B A E B A E B A E	- L1 L2 L3 L4 L5 L6 - - L11 L13 - L14	Asc1 L1 L2 L3 L4 L11 L9 L6 L8 L12 L16 L13 L23	RACK1 L10A L8 L3 L4 L11 L9 L6 L7A L12 L13A L13 L23
33 Болл 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13	RACK1 ыпая субчастин uL1 uL2 uL3 uL4 uL5 uL6 eL6 eL8 uL11 uL13 eL13 uL14 eL14	RACK1 ца рибосомы L1 L2 L3 L4 L5 L6 L8e L11 L13 L14 L5 L6 L38e L11 L13 L14 L13 L14 L14	E B A E B A E B A E B A E B A E B A E E A E B A E B A E A ‡ E B A E A ‡ E	- L1 L2 L3 L4 L5 L6 - - L11 L13 - L14 - L14 -	Asc1 L1 L2 L3 L4 L11 L9 L6 L8 L12 L16 L13 L23 L14	RACK1 L10A L8 L3 L4 L11 L9 L6 L7A L12 L13A L13 L23 L14

15	eL15	L15e	AE	-	L15	L15
16	uL16	L16	BAE	L16	L10	L10
17	uL18	L18	BAE	L18	L5	L5
18	eL18	L18e	AE	-	L18	L18
19	eL19	L19e	AE	-	L19	L19
20	eL20	L20e	Е	-	L20	L18A
21	eL21	L21e	AE	-	L21	L21
22	uL22	L22	BAE	L22	L17	L17
23	eL22	L22e	Е	-	L22	L22
24	uL23	L23	BAE	L23	L25	L23A
25	uL24	L24	BAE	L24	L26	L26
26	eL24	L24e	AE	-	L24	L24
27	eL27	L27e	Е	-	L27	L27
28	eL28	L28e	Е	-	-	L28
29	uL29	L29	BAE	L29	L35	L35
30	eL29	L29e	Е	-	L29	L29
31	uL30	L30	BAE	L30	L7	L7
32	eL30	L30e	A‡ E	-	L30	L30
33	eL31	L31e	AE	-	L31	L31
34	eL32	L32e	AE	-	L32	L32
35	eL33	L33e	A‡ E	-	L33	L35A
36	eL34	L34e	A‡ E	-	L34	L34
37	eL36	L36e	Е	-	L36	L36
38	eL37	L37e	AE	-	L37	L37
39	eL38	L38e	A‡ E	-	L38	L38
40	eL38	L39e	AE	-	L39	L39
41	eL40	L40e	A‡ E	-	L40	L40
42	eL41	L41e	A‡ E	-	L41	L41
43	eL43	L43e	AE	-	L43	L37A
44	eL44	L44e	AE	-	L42	L36A
45	P1	P1 ##	BAE	L12	P1	LP1
46	P2	P2 ##	BAE	L12	P2	LP2
47	uL10	P0	BAE	L10	PO	LPO

* В – эубактерии, А – археи, Е – эукариоты

** У дрожжей (*Sacharomyces cerevisiae*) гены большинства рибосомных белков дуплицированы, поэтому при обозначении белков используют дополнительно индексы А и В в соответствии с геном, продуктом которого является данный белок.

‡ Белки, отсутствующие в рибосомах *Haloarcula marismortui*, но присутствующие у некоторых других архей.

Рибосомный белок S4 человека имеет 2 изоформы, которые незначительно отличаются друг от друга по первичной структуре, являясь продуктами генов *RPS4X* и *RPS4Y*, расположенных на половых хромосомах.

Рибосомные белки P1 и P2 эукариот являются структурными гомологами белка L12 эубактерий.

Таким образом, по имеющимся на сегодняшний день данным, к рибосомным белкам млекопитающих относится 80 различных белков: 33 белка малой субчастицы рибосомы и 47 – большой субчастицы. Следует отметить, что некоторые исследователи иногда исключают из классификации белок RACK1 (напр., [24-26]), поскольку его структурно-функциональные свойства значительно отличаются от таковых для большинства рибосомных белков (напр., [27]); поэтому в некоторых источниках можно встретить другое число рибосомных белков млекопитающих – 79. Тем не менее, на сегодняшний день, по-видимому, установлены уже все рибосомные белки. Последнее сообщение об открытии "нового" рибосомного белка млекопитающих, сделанное в [28], было вскоре опровергнуто, потому что им оказался локализованный в ядрышке белок, чья функция, по-видимому, связана со сборкой большой субчастицы рибосомы [29].

1.1.2 Особенности структурной организации рибосомных белков

Рибосомные белки млекопитающих, подобно рибосомным белкам других организмов, не имеют каких-либо характерных структурных элементов, которые являлись бы общими и могли бы подчёркивать их принадлежность исключительно к классу рибосомных белков. Кроме того, они отличаются сравнительно небольшой для белков молекулярной массой. Масса самого большого рибосомного белка человека, uL4 (база данных UniProtKB [30], индекс P36578), составляет 47697 Да, а самого маленького, eL41 (база данных UniProtKB, индекс P36578), – 3456 Да; в целом же, величины белковых масс лежат, в основном, в пределах 8–35 кДа. Большинство рибосомных белков имеют схожие физико-химические характеристики. Как правило, они содержат большое число остатков лизина и аргинина, что придаёт им высокий положительный заряд (для большинства белков изоэлектрическая точка (pI) лежит в интервале от 8 до 13). Вместе с тем, среди рибосомных белков есть также белки с более низким значением pI – это так называемые кислые рибосомные белки. Например, у белка P1 (база данных

UniProtKB, индекс P05386) расчётная величина pI составляет 4.21, что соответствует самому низкому значению pI, встречающемуся у рибосомных белков. Многие рибосомные белки подвергаются посттрансляционному процессингу. Наиболее распространённая модификация – это N-концевое деметионилирование с последующим N-концевым ацетилированием. Кроме того, отдельные рибосомные белки могут подвергаться фосфорилированию, ацетилированию, гидроксилированию и нести другие модификации (роль некоторых модификаций в функциональной активности рибосомных белков рассмотрена в соответствующих разделах обзора). Следует отметить, что некоторые рибосомные белки содержат структурные мотивы, характерные для клеточных белков других семейств. Так, например, мотив типа цинковый палец, часто встречающийся в структурах факторов транскрипции, был предсказан для структур белков S26 (eS26), S27 (eS27), S27A (eS31) и S29 (uS14) млекопитающих [31] и впоследствии обнаружен у гомологичных рибосомных белков инфузории Tetrahymena thermophila [17]. Домен WD40, найденный у нескольких белковых семейств, к которым принадлежат некоторые G-белки, факторы транскрипции, и протеинкиназы, присутствует в структуре белка RACK1 (база данных UniProtKB, индекс P63244). Наконец, КН-мотив, характерный для белков класса hnRNP, найден в белке S3 (uS3) (база данных UniProtKB, индекс Р23396). Таким образом, можно видеть, что рибосомные белки млекопитающих отличаются структурным разнообразием.

На момент получения моделей атомарных структур субчастиц рибосом низших эукариот с помощью рентгеноструктурного анализа (РСА) [15-17] пространственная структура большинства рибосомных белков млекопитающих была неизвестна. Лишь в отдельных случаях удавалось получать кристаллы индивидуальных рибосомных белков, пригодные для РСА, что, по-видимому, было обусловлено причинами, связанными с особой молекулярной организацией рибосомных белков, которая препятствует формированию их кристаллов. В частности, с помощью РСА были разрешены структуры белков L10 (uL16) [32] и L30 (eL30) [33], а также глобулярного домена белка SA (uS2) [34]. Кроме того, с применением ЯМР-спектроскопии удалось определить структуру комплекса белков LP1/LP2 (P1/P2) [35]. О пространственных структурах рибосомных белков млекопитающих, у которых есть эубактериальные гомологи, можно было судить, исходя из структур их гомологов в составе кристаллических структур рибосомных субчастиц эубактерий [19, 21, 36, 37], типичным представителем которых является наиболее хорошо изученная бактерия *E. coli*. Однако структура эукариот-специфичных участков этих белков оставалась неизвестной.

При исследовании рибосом человека с помощью метода крио-электронной микроскопии (крио-ЭМ) удалось получить структуры среднего разрешения (4-6 Å), что с использованием известных данных по структуре гомологичных участков субчастиц рибосом низших эукариот и

эубактерий, полученных с помощью РСА, позволило построить атомарные модели субчастиц рибосом человека [14]. На основании этих моделей можно составить представление о расположении и структуре каждого рибосомного белка в составе рибосомных субчастиц и получить информацию о контактах рибосомных белков с рРНК и соседними рибосомными белками (Рисунок 1). Тем не менее, следует отметить, что расположение протяжённых неупорядоченных концевых участков (которые, как правило, являются эукариотспецифичными) для многих рибосомных белков осталось Наиболее невыясненным. значительные участки с отсутствующей структурной информацией приходятся на белки SA (uS2), S2 (uS5), S25 (eS25), L4 (uL4), L17 (uL22), L23A (uL15) и некоторые другие.

С расшифровкой пространственных структур эукариотических рибосом и, в частности, рибосомы человека была выяснена интересная особенность эукариотических рибосомных белков, с которой, по-видимому, и связана их плохая способность к образованию кристаллов. Оказалось, что почти все эукариотические рибосомные белки содержат участки, у которых практически отсутствует внутренняя структурная организация, то есть, будучи связанными с рРНК, эти участки приобретают упорядоченную структуру, тогда как в свободном состоянии они не способны формировать глобулярную структуру являются И полностью дезорганизованными [38]. Авторы этого исследования использовали структурные данные, полученные для рибосом дрожжей, однако их выводы в полной мере справедливы и для рибосомных белков млекопитающих. Было установлено, что, за исключением белков RACK1 и L11 (uL5), все рибосомные белки в той или иной степени обладают внутренней разупорядоченностью, причём некоторые из них практически полностью лишены собственной пространственной структуры. Белки с подобными свойствами ранее часто обнаруживали среди РНК- и ДНК-связывающих белков, и они получили название белков с внутренней разупорядоченностью (от англ. intrinsically disordered proteins) (напр., [39]). Разупорядоченный участок в рибосомном белке находится, как правило, в одном из его концевых районов, тогда как центральная часть белка имеет глобулярную структуру, что в целом придаёт белку форму, упрощённо напоминающую головастика. Как оказалось, разупорядоченные участки белков аминокислотами и обогащены обеднены объёмными гидрофобными положительно заряженными остатками аргинина и лизина, на долю которых приходится в среднем 29% от общего числа аминокислот, тогда как в глобулярной части белка доля этих остатков существенно ниже (около 19%) [38]. Такая особенность аминокислотного состава этих участков белков должна отрицательно сказываться на их способности к автономному фолдингу, в то же время повышенное содержание в этих участках остатков аргинина и лизина должно способствовать их связыванию с отрицательно заряженной рРНК.



Рисунок 1. Пространственная структура субчастиц рибосомы человека по данным [14]. На панелях "а" и "b" приведены виды малой (слева) и большой (справа) рибосомных субчастиц со стороны межсубъединичной поверхности, и поверхности, обращённой в раствор, соотвественно. Рибосомная РНК изображена в сером цвете, рибосомные белки даны в виде ленточных структур и окрашены в разные цвета. Нумерация белков соответствует наименованию их семейств (см. Таблицу 1). Обозначения морфологических частей субчастиц: Н – голова, Bd – тело, Pt – платформа, Be – клюв, Rf – правая нога, Lf – левая нога, CP – центральный протуберанец, L1 stalk и P stalk – стебли L1 и P соответственно.

Авторы работы [38] предположили, что именно структурно разупорядоченные участки рибосомных белков играют определяющую роль в связывании этих белков с рРНК при формировании структур рибосомных субчастиц и при взаимодействии отдельных рибосомных белков с нерибосомными РНК.

Суммируя вышесказанное, можно заключить, что рибосомным белкам млекопитающих, несмотря на схожесть их физико-химических характеристик, свойственны структурное разнообразие и разупорядочность их N- или C-концевых фрагментов, что обеспечивает формирование уникальной структуры рибосомы.

1.2 Жизненный цикл рибосомных белков

На синтез рибосомных белков активно растущая клетка расходует значительную часть своих ресурсов. Подсчитано, например, что в клетках дрожжей в период быстрого роста до 50% активности РНК-полимеразы II приходится на транскрипцию генов рибосомных белков [40]. Организмы млекопитающих и, в частности, человека составляют множества клеток различного типа, которые организованы значительно сложнее, чем дрожжевые клетки, поэтому можно ожидать, что доля биосинтеза рибосомных белков в общем клеточном синтезе белков у млекопитающих будет ниже, чем у дрожжей. Данные глубокого секвенирования общей РНК клеток различных тканей человека показывают, что количество мРНК, кодирующих рибосомные белки, составляет около 5% от общего количества мРНК в этих клетках [41]. Данная величина может оказаться более значительной, если учесть, что большинство клеток в тканях не находятся в состоянии активного роста и не синтезируют рибосомы в большом количестве. В настоящем разделе рассмотрены основные аспекты, касающиеся экспрессии генов рибосомных белков и жизненного цикла этих белков.

1.2.1 Структура генов рибосомных белков

Среди генов рибосомных белков млекопитающих наиболее изучены гены рибосомных белков человека. Поэтому в настоящем разделе рассмотрено устройство генов именно рибосомных белков человека и приведены их сравнительные характеристики относительно соответствующих генов других представителей млекопитающих.

На сегодняшний день принято считать, что каждый рибосомный белок человека кодируется, как правило, одним функциональным геном [26]. Исключение составляет рибосомный белок S4 (uS4), для которого обнаружены два различных гена на X- и Y-

хромосомах (номера в базе данных GeneBank – AF041427 и AF041428 соответственно). Строго говоря, продукты этих генов, рибосомные белки S4X и S4Y, отличаются по первичной структуре незначительно (идентичность их последовательностей составляет 93%) и являются функционально эквивалентными, и поэтому они обычно рассматриваются как один белок. Гены рибосомных белков распределены в геноме и находятся почти на всех хромосомах, кроме 7-ой и 21-ой [25, 42], причём больше всего генов (13) расположено на 19-ой хромосоме (Рисунок 2). В структурной организации генов рибосомных белков человека существуют определённые закономерности. В работе [26] путем анализа структур 73-х генов рибосомных белков установлено, что сами гены являются небольшими, их средняя длина составляет 4.4 kb и в среднем они включают в себя по 5-6 экзонов (Рисунок 3). Область промотора у них является GC-богатой и часто содержит ТАТА-бокс или аналогичный ему элемент. Транскрипция этих С, который генов начинается с остатка находится В области характерного олигопиримидинового тракта, а район инициаторного ATG-кодона лежит в первом или во втором экзоне, причём примерно в половине случаев он расположен в пределах ±5 п.н. от границ первого интрона. Средняя длина участков 5'- и 3'-нетранслируемых областей (HTO) у генов рибосомных белков значительно меньше (42 и 56 п.н. соответственно), чем у других белок-кодирующих генов; при этом участок, соответствующий 5'-НТО, расположен практически исключительно в первом экзоне. К особенностям генов рибосомных белков человека отнесено также разделение интроном участков гена, которые отвечают за регуляцию его экспрессии на уровнях транскрипции (область промотора) и трансляции (5'-НТО), от участков, кодирующих аминокислотную последовательность белка [43]. Помимо этого, в [43] отмечают присутствие в архитектуре промоторов у большинства этих генов ряда функционально важных структурных мотивов. Это – (1) олигопиримидиновый тракт в районе точки старта транскрипции, имеющий консенсусную последовательность $(Y)_2 C^{+1} TY(T)_2 (Y)_3$, (2) консервативные ТАТА-бокс или А/Т-богатый участок, которые могли бы связывать фактор транскрипции ТВР, и (3) консервативные участки связывания транскрипционных факторов GABP, Sp1 и YY1. В этой же работе высказано предположение, что вышеперечисленные структурные особенности в промоторах генов рибосомных белков человека могут способствовать согласованному регулированию транскрипционной активности некоторых подмножеств этих генов, и, кроме того, отмечено, что промоторные участки генов рибосомных белков мыши (здесь и далее вид *Mus musculus*) имеют, в целом, такую же архитектуру. Позднее, роль расположенной в районе точки старта транскрипции консенсусной последовательности в инициации транскрипции генов рибосомных белков была подробно изучена и эта последовательность была названа ТСТ-мотивом [44].



Рисунок 2. Цитогенетическая карта генов человека, кодирующих рибосомные белки [25]. Номера хромосом отмечены арабскими цифрами. Участки расположения генов рибосомных белков отмечены справа от хромосом серыми полосами и подписаны принятыми названиями этих генов, где "*RP*" означает "рибосомный белок" (от англ. ribosomal protein).

Следует упомянуть, что гены рибосомных белков S27A, L40 (eL40) и S30 (eS30) кодируют гибридные полипептиды, в состав которых, помимо собственно рибосомных белков, входит также сцепленный с их N-концами убиквитин (в случае S27A и L40) или убиквитинподобный белок (в случае S30) [43]. Как происходит процессинг этих полипептидов, и каким образом при этом формируются зрелые рибосомные белки, остаётся пока неизвестным.

Особенностью генов рибосомных белков человека является то, что у всех из них есть соответствующие им процессированные (образованные в результате ретротранспозиции) псевдогены, чье число по данным работы [45] варьирует в широких пределах: от 3-х у RPL14 до 145-ти у RPL21. В среднем на один функциональный ген приходится 26 псевдогенов. Следует отметить, что по уточнённым данным [41] для гена RPL14 обнаружено 9 псевдогенов, а минимальное число псевдогенов (3) найдено для генов, кодирующих белки RACK1 и S30 (Таблица 1.2). Процессированные псевдогены лишены интронов и, как правило, неактивны. Кроме того, для ряда генов рибосомных белков найдены непроцессированные (содержащие интроны) псевдогены, образовавшиеся в результате дупликации функциональных генов и обладающие экзонной структурой, идентичной той, которая присутствует в структуре соответствующих им функциональных генов [45]. Непроцессированные псевдогены имеются у генов RPS3A, RPS4Y, RPS9, RPS15A, RPS17, RPS27, RPL3, RPL7A, RPL8 (два псевдогена), RPL13A, RPL17, RPL26, RPL36 и RPLP0 (два псевдогена). Из этих перечисленных псевдогенов только *RPL13A* не может в принципе стать соответствующим функциональным геном вследствие сдвига рамки считывания, возникшей в результате мутации в его кодирующей последовательности, а для двух из остальных псевдогенов функциональная активность была доказана, что позволяет рассматривать их как паралоги этих генов. В частности, псевдоген, соответствующий гену *RPS4Y*, способен транскрибироваться в клетках семенников и простаты, что, по мнению авторов, должно иметь значение для сперматогенеза [46]. Интересно, что по оценкам, сделанным в работе [47], дупликация гена *RPS4Y* произошла около 35 млн. лет назад. Псевдоген RPS27L, в отличие от соответствующего ему гена RPL27, как оказалось, трансактивируется фактором р53, участок связывания которого расположен в этом псевдогене в начале первого интрона [48]. Интересно, что у генов рибосомных белков, сцепленных с Ххромосомой (таких как RPL10, RPL36A и RPL39), обнаружены процессированные псевдогены в аутосомах [49]. Эти псевдогены получили названия RPL10L, RPL36AL и RPL39L (где последняя буква L означает like – "подобный"), и их экспрессия была доказана на уровне мРНК, чьи нуклеотидные последовательности были на 89-95% идентичны последовательностям мРНК соответствующих функциональных генов.





Рисунок 3. Схематическое представление структурной организации генов рибосомных белков [26]. Чёрными прямоугольниками показаны экзоны. Синими стрелками отмечены положения инициаторного и терминаторного кодонов. Красные овалы показывают положение генов мякРНК. Масштабная линейка в тыс. п.о. (kb) представлена сверху.

Показано, что экспрессия псевдогенов RPL10L и RPL39L тканеспецифична, и происходит только в семенниках, тогда как экспрессию псевдогена *RPL36AL* наблюдали во всех 16-ти исследованных типах ткани. Кроме того, псевдоген RPL39AL экспрессировался также в некоторых опухолевых клеточных линиях. Тканеспецифичность экспрессии псевдогенов *RPL10L* и *RPL39L* авторы связали с возможной компенсацией инактивации функциональных генов рибосомных белков, сцепленных с Х-хромосомой, при сперматогенезе. Аналогичная ситуация имеет место и у мышей, чьи аутосомные псевдогены, соответствующие генам RPL10L, RPL36AL И RPL39L, находящимся Х-хромосоме, В также проявляли тканеспецифичную активность [49].

Таблица 1.2.

Белки 40S субчастицы					Белки 60S субчастицы				
белок	число	число	ткане-	альтер-	белок	число	число	ткане-	альтер-
	актив-	певдо-	специ-	натив-		актив-	певдо-	специ-	натив-
	ных	генов	фичная	ный		ных	генов	фичная	ный
	генов		экспрес-	сплай-		генов		экспрес-	сплай-
			сия	синг				сия	синг
				>1%					>1%
RACK1	1	3	_	_	L3	2	14	да	_
SA	1	75	-	_	L4	1	9	-	_
S2	1	63	-	_	L5	1	40	-	да
S 3	1	7	_	_	L6	1	32	-	_
S3A	1	60	-	_	L7	1	64	-	_
S4	3	24	-	-	L7A	1	77	-	-
S5	1	8	_	да	L8	1	6	—	_
S6	1	24	-	-	L9	1	36	-	-
S7	1	18	_	_	L10	2	33	да	да
S8	1	10	—	_	L10A	1	14	—	—
S9	1	4	_	_	L11	1	5	—	_
S10	1	33	—	_	L12	1	49	—	да
S11	1	8	_	_	L13	1	14	—	_
S12	1	34	-	да	L13A	1	29	-	да
S13	1	11	-	_	L14	1	9	-	_
S14	1	10	-	_	L15	1	23	-	-

Гены и псевдогены рибосомных белков человека (согласно [41])

S15	1	13	-	_	L17	1	55	_	_
S15A	1	40	_	-	L18	1	14	_	_
S16	1	11	_	—	L18A	1	19	_	_
S17	2	18	_	_	L19	1	22	_	_
S18	1	14	_	_	L21	1	145	_	_
S19	1	7	_	—	L22	2	25	_	_
S20	1	35	_	—	L23	1	14	_	_
S21	1	9	_	—	L23A	1	82	_	_
S23	1	9	_	_	L24	1	10	_	да
S24	1	30	-	да	L26	2	40	_	_
S25	1	10	_	—	L27	1	15	_	да
S26	1	61	_	—	L27A	1	8	_	_
S27	2	30	да	—	L28	1	6	_	_
S27A	1	22	_	—	L29	1	38	—	_
S28	1	11	_	—	L30	1	19	_	_
S29	1	32	_	—	L31	1	66	—	_
S30	1	3	_	—	L32	1	39	_	_
					L34	1	40	_	_
					L35	1	9	—	—
					L35A	1	37	_	_
					L36	1	24	_	_
					L36A	2	55	—	—
					L37	1	25	_	—
					L37A	1	9	_	_
					L38	1	6	_	_
					L39	2	47	да	_
					L40	1	11	_	_
					L41	1	22	_	—
					P0	1	11	_	да
					P1	1	15	_	да
					P2	1	5	_	да

Ещё одной важной особенностью генов рибосомных белков является наличие в их интронах генов мякРНК (малых ядрышковых РНК) (Рисунок 3). Эти РНК, которых в клетках

человека присутствует свыше 100 видов, принимают участие в процессинге pPHK, обеспечивая, в основном, определение уникальных сайтов в pPHK для их модификации – 2'-Ометилирования (C/D-семейство мякPHK) или псевдоуридилирования (H/ACA-семейство мякPHK) [50]. Расположение генов мякPHK в интронах генов рибосомных белков, позволяет клеткам осуществлять биосинтез мякPHK параллельно с экспрессией генов рибосомных белов, что, по-видимому, обусловлено синхронизацией процессов созревания пре-pPHK и сборки рибосомных субчастиц. Имеются данные, что молекулярный механизм процессинга отдельных мякPHK сопряжён с лигированием экзонов при сплайсинге пре-мPHK гена-хозяина [51], однако этот механизм всё ещё далёк от полного понимания.

Таким образом, суммируя сказанное выше, можно заключить, что гены рибосомных белков, несмотря на сложную структурную организацию, имеют много общих черт, которые, по-видимому, обусловлены общей судьбой кодируемых ими продуктов – участием в биогенезе рибосомных субчастиц, что, естественно, подразумевает и общий способ активации этих генов.

1.2.2 Экспрессия генов рибосомных белков

1.2.2.1 Транскрипция генов рибосомных белков

Координированный и синхронизированный синтез рибосомных белков в течение клеточного цикла должен иметь критическое значение для биогенеза рибосом. Начальный этап экспрессии генов рибосомных белков включает процессы активации промоторов этих генов, инициации их транскрипции и синтеза первичного транскрипта (пре-мРНК), осуществляемого РНК-полимеразой II. Несмотря на всю важность этих процессов для жизнедеятельности клетки, информации на эту тему накоплено немного.

Как уже было отмечено ранее, промоторы большинства генов рибосомных белков имеют схожие черты (см. раздел 1.2.1), поэтому активация промоторов этих генов должна проходить по схожему механизму. В работе [52] изучали регуляцию активации экспрессии генов рибосомных белков S27A, S24 (eS24), S6 (eS6), L9 (uL6) и L4, используя синхронизированную культуру клеток человека. Уровень мРНК этих генов многократно возрастал в средней и заключительной частях фазы G1 клеточного цикла, что свидетельствовало об активации генов рибосомных белков на этой стадии роста клеток; при этом увеличение уровня биосинтеза рРНК происходило только в самом начале фазы G1. Для промотора гена *S27A* удалось установить, что в его активации основное участие принимают факторы трансрипции Sp1 (specificity protein 1) и CREB (сАМР response-element binding protein). Так, повышение содержания факторов Sp1 и CREB в клетках приводило к многократному увеличению уровня экспрессии репортерной

ДНК-конструкции, содержащей промотор гена белка S27A, включающий участки связывания данных факторов. При снижении уровня факторов Sp1 и CREB наблюдали подавление экспрессии этой конструкции. Более того, оказалось, что факторы Sp1 и CREB действуют кооперативно при связывании с промотором гена белка S27A и его последующей активацией. Ещё один фактор транскрипции E2F1 (E2F transcription factor 1), чьи участки связывания также расположены в области промотора гена белка S27A, наоборот, подавлял активность этого промотора, т. е. действовал как репрессор. Взаимодействие E2F1 с данным промотором приводило к уменьшению уровня связывания с ним факторов Sp1 и CREB, при этом уровень связывания самого E2F1 с промотором не возрастал, зато увеличивался уровень связывания корепрессоров Rb (retinoblastoma) и HDAC1 (histone deacetylase 1). Поскольку ацетилирование гистонов сопряжено с активацией транскрипции, авторы [52] попытались определить уровень гистоновых ацетилтрансфераз, связанных в районе промотора гена белка S27A, с помощью метода иммунопреципитации хроматина (ChIP, от англ. Chromatin immunoprecipitation). Оказалось, что при активации промотора происходит увеличение уровня ацетилтрансфераз РЗОО и CRB (CREB-binding protein), при этом наиболее сильно (в 5 раз) возрастает уровень ацетилтрансферазы PCAF (P300/CRB associated protein). На основании полученных данных в работе [52] предложена модель регуляции экспрессии генов рибосомных белков в зависимости от фазы клеточного цикла (Рисунок 4), которая на сегодняшний день наиболее полно описывает механизм активации генов рибосомных белков. Следует отметить, что предложенный в этой работе способ активации экспрессии генов рибосомных белков, по-видимому, не является универсальным, или, возможно, в нём опущены многие участники этого процесса. Так, промоторы генов некоторых рибосомных белков (в частности белков S6 и L4, упомянутых в [52]) не содержат участков связывания факторов транскрипции Sp1, CREB и E2F1, хотя активация этих генов также должна происходить синхронно с активацией генов других рибосомных белков, чтобы обеспечивать координированный биогенез рибосомных субчастиц. Следовательно, должны существовать иные пути активации генов рибосомных белков, сопряжённые с тем способом, который описан выше.

Участок, в котором расположена точка старта транскрипции белок-кодирующих генов, располагается в регионе, называемом центральным промотором (от англ. – core promoter) PHK-полимеразы II и занимающем обычно область ДНК от –40 до +40 нуклеотида (относительно нуклеотида +1, с которого начинается транскрипция). Центральный промотор содержит ряд специфических мотивов, которые могут вносить различный вклад в его активность (см., напр., [53, 54]), – ТАТА-бокс, элементы Inr (от англ. – initiator), DPE (от англ. – downstream core promoter element), МТЕ (от англ. – motif ten element), два элемента узнавания фактора



Рисунок 4. Модель регуляции экспрессии генов рибосомных белков в течение клеточного цикла, согласно [52]. (А) В средней и заключительной частях фазы G1 клеточного цикла гены рибосомных белков активируются сбалансированным связыванием с их промоторами специфических факторов транскрипции Sp1, CREB и E2F1, что облегчает рекрутирование гистоновых ацетилтрансфераз P300, CBP и PCAF и их нацеливание на ацетилирование гистонов. Это приводит к раскрытию нуклеосомальной ДНК в соответствующих районах и активации генов рибосомных белков. (В) По достижении высокого уровня рибосомных белков по окончании фазы G1 включается механизм обратной связи, который активирует фактор E2F1, облегчающий рекрутирование корепрессоров HDAC1 и Rb и их связывание с промотором. Это вызывает диссоциацию ацетилтрансфераз из хроматина и удаление эпигенетических маркеров, приводя к ингибированию экспрессии генов рибосомных белков.

транскрипции TFIIB – BREu и BREd (от англ. – TFIIB recognition elements), а также мотив TCT (от англ. – polypyrimidine initiator).

Универсального мотива, характерного для центрального промотора, не существует. Ключевая роль ТСТ-мотива (см. раздел 1.2.1.) в инициации транскрипции показана в работе [44] на примере генов рибосомных белков дрозофилы (здесь и далее *Drosophila malanogaster*), имеющих фактически такой же ТСТ-мотив, как и тот, который присутствует в генах рибосомных белков человека. Замена консенсусной последовательности указанного мотива в положениях -1-+2 (включая точку старта транскрипции $-C^{+1}$) или +3+5 на триплет GGG в промоторах генов рибосомных белков LP1 (P1) и L15 (eL15) практически лишала их транскрипционной активности [44]. Кроме того, оказалось, что ТСТ-мотив не способен взаимодействовать с мультисубъединичным ключевым фактором транскрипции TFIID, который обычно связывается с промоторами, содержащими элемент Ihr, однако единственная замена тимидина в положении +2 на аденозин делала последовательность ТСТ-мотива похожей на элемент Ihr и придавала ей функциональные свойства этого элемента. Таким образом, установлено, что система транскрипции генов, основанная на узнавании ТСТ-мотива, не связана с системой, в основе которой лежит узнавание элемента Ihr, и является отдельной системой транскрипции.

Поскольку фактор TFIID, так же как и его ключевой элемент TBP (TATA box-binding protein), не способен узнавать ТСТ-мотив, возникает вопрос: какой транскрипционный фактор обеспечивает узнавание этого мотива? Ответ на этот вопрос был получен лишь недавно в работе [55], где было показано, что уровень ТСТ-зависимой транскрипции увеличивается или уменьшается в соответствии с повышением или понижением уровня транскрипционного фактора TRF2 (TBP related factor 2). Более того, путем анализа ДНК-белковых взаимодействий с помощью метода ChIP в сочетании с высокопроизводительным секвенированием (ChIP-seq, от англ. ChIP followed by high-throughput DNA sequencing) было установлено, что фактор TRF2 локализуется преимущественно на ТСТ-зависимых, а не ТАТА-зависимых промоторах. Оказалось, что сам фактор TRF2, хотя и похож на TBP, не связывается с последовательностью ТАТА; более того, пока не удалось найти последовательности в ДНК, к которой он имел бы сродство. Всё это наводит на мысль, что данный фактор, возможно, связывается с ДНК опосредованно или только при определённых условиях, которые пока неизвестны. Следует отметить, что ТСТ-мотив также характерен для промоторов генов, кодирующих некоторые трансляционные факторы, аминоацил-тРНК-синтетазы и РНК-связывающие белки, что позволяет предполагать единый механизм регуляции транскрипции генов, содержащих ТСТзависимые промоторы, чьи продукты имеют отношение к процессу трансляции.
1.2.2.2 Сплайсинг пре-мРНК генов рибосомных белков

Все гены рибосомных белков человека имеют экзон-интронную структуру (см. Рисунок 3), и, следовательно, соответствующие им первичные транскрипты должны подвергаться сплайсингу, при котором последовательности интронов удаляются, и осуществляется лигирование концов соседних экзонов. Этот процесс происходит в клеточном ядре, и его центральным участником является сплайсосома – сложная динамическая клеточная машина, распознающая в пре-мРНК сигнальные последовательности сплайсинга (прежде всего 5'- и 3'участки сплайсинга и точку ветвления) и осуществляющая каталитическую функцию. Когда узнавание тех или иных сигнальных последовательностей в силу каких-либо причин продуктов нарушается, происходит образование альтернативных сплайсинга, характеризующихся удлинённой или укороченной формами экзона, либо его пропуском, либо сохранением интрона. Принято считать, что альтернативный сплайсинг увеличивает разнообразие транскриптома и в конечном итоге – протеома клетки. Доля генов, чьи пре-мРНК способны к альтернативному сплайсингу, превышает по разным оценкам 95% [56, 57].

Важно отметить, что первичные транскрипты генов рибосомных белков человека практически не подвергаются альтернативному сплайсингу. В работе [41] было обнаружено, что из 376 интронов пре-мРНК генов рибосомных белков только 14 интронов, относящихся к 12 белкам, проявляют способность к альтернативному сплайсингу с долей соответствующего продукта выше 1% (см. Таблицу 2). Большая часть событий альтернативного сплайсинга (восемь), найденных для пре-мРНК рибосомных белков, относится к различным вариантам пропуска экзонов; мРНК, которая образуется в результате альтернативного сплайсинга, в ряде случаев кодирует более длинную форму белка. Например, такие мРНК были найдены для рибосомных белков L10, L12 (uL11), L13A (uL13), P0 (uL10), P1 и S12 (eS12) [41].

Интересно, что распределение альтернативно сплайсируемых транскриптов гена рибосомного белка S24 (eS24) является тканеспецифичным. Существование альтернативных форм мРНК у этого белка в клетках млекопитающих впервые было отмечено в работах [58, 59]. Действительно, первичный транскрипт гена рибосомного белка S24 человека может подвергаться альтернативному сплайсингу со встраиванием одного или двух микроэкзонов длиной 19 и 22 нуклеотида перед последним экзоном пре-мРНК. Последовательности белков в соответствии с образующимися в результате альтернативного сплайсинга мРНК должны отличаться С-концевыми участками. Так, при каноническом сплайсинге, когда встраивания микроэкзонов не происходит, образующаяся мРНК кодирует наиболее длинную форму белка с последовательностью AGKKPKE на C-конце (форма C). В случае встраивания одновременно двух микроэкзонов при альтернативном сплайсинге, зрелая мРНК кодирует белок с

укороченной С-концевой последовательностью ...АGKKK (форма A) из-за появления альтернативного стоп-кодона. При встраивании только одного (второго) из микроэкзонов, зрелая мРНК кодирует самую короткую форму белка с С-концевой последовательностью ...АGKK (форма B). Было обнаружено, что для клеток тканей мышц и сердца характерна мРНК формы A, тогда как в клетках печени, почек, мозга и семенников присутствуют, в основном, мРНК форм B и C (с преобладанием формы B) [41]. Примечательно, что такое распределение образующихся альтернативных форм мРНК рибосомного белка S24 сохраняется, в основном, также для клеток соответствующих тканей мыши [41, 60]. Какова функциональная роль изоформ мРНК, которые образуются в результате альтернативного сплайсинга пре-мРНК рибосомного белка S24, остается пока неизвестным. Тем не менее, тот факт, что распределение этих изоформ является тканеспецифичным с преобладающим содержанием в клетках разных тканей одной из изоформ, кодирующих формы A и B рибосомного белка S24, даёт основание полагать, что соответствующие формы белка присутствуют в этих клетках и, скорее всего, входят в состав функционирующих в них рибосом.

Однако, в общем, вопрос о том, существуют ли реально в клетке белковые продукты, синтезированные на основе мРНК, образовавшихся в результате альтернативного сплайсинга пре-РНК рибосомных белков, остаётся открытым. В частности, авторам работы [41] не удалось найти соответствующих белковых продуктов в базах данных клеточных протеомов; возможно, такие полипептиды не являются функциональными и подвергаются быстрой деградации.

1.2.2.3 Координированная трансляция генов мРНК рибосомных белков

В ранних работах по определению нуклеотидных последовательностей мРНК рибосомных белков была замечена одна уникальная особенность, присущая их 5'-НТО, – последовательность, состоящая из 4-14 пиримидиновых остатков и расположенная сразу после остатка С, являющегося первым нуклеотидом, следующим за кэп-структурой (напр., [61]). Эта последовательность, получившая название 5'-TOP (от англ. – 5'-terminal oligopyrimidine), оказалась характерна для большинства мРНК, кодирующих белки позвоночных, которые принимают участие в трансляции или событиях, связанных с биогенезом рибосомных субчастиц (напр., [62]). Наличие общего элемента в 5'-НТО различных мРНК, естественно, не могло не наводить на мысль о существовании единого механизма регуляции их трансляции. Действительно, в некоторых ранних работах (напр., [63]) было показано, что 5'-TOP-мотив в мРНК рибосомных белков млекопитающих необходим для контроля их трансляции, т. е. его можно рассматривать как некий цис-регуляторный элемент, позволяющий осуществлять синхронную экспрессию генов белков, необходимых для активного клеточного роста. Во

многих последующих работах прямая связь между клеточным ростом и уровнем трансляции мРНК, несущих 5'-TOP-мотив, была продемонстрирована экспериментально (напр., [64-66]). Сравнительный анализ большого набора мРНК, содержащих 5'-TOP-элемент [62], позволил выявить его основные характеристики. Оказалось, что этот элемент всегда начинается с остатка С, находящегося сразу за кэп-струтурой (что довольно нехарактерно для транскриптов млекопитающих, начинающихся обычно с остатка А, тогда как только 17% транскриптов начинаются с С), и что пропорция между С и U в его составе, в целом, сохраняется, хотя сам состав может варьировать даже между мРНК одного организма. Кроме того, после последовательности 5'-TOP-мотива следует обычно GC-богатый участок, а длина 5'-HTO в 5'-TOP-содержащих мРНК может составлять от 21 до 505 нуклеотидов. Консенсусы последовательностей начальных участков 5'-TOP-содержащих мРНК у некоторых позвоночных согласно данным работы [67] представлены на рисунке 5.



Рисунок 5. Консенсусы последовательностей начальных участков 5'-TOP-содержащих мРНК лягушки (вверху), мыши (в середине) и человека (внизу) согласно [67]. Номера соответствуют порядковому номеру нуклеотида в мРНК, а высота букв отражает частоту их встречаемости в данном положении.

Открытие 5'-ТОР-мотива в качестве цис-регуляторного элемента в последовательностях отдельного класса мРНК позволило выдвинуть предположение, что этот мотив может распознаваться конкретными транс-действующими факторами, и что именно эти факторы способны регулировать инициацию трансляции мРНК, содержащих данный мотив. Попытки обнаружить такие факторы, предпринятые в опытах на клетках лягушки *Xenopus laevis*, позволили выявить белки La аутоантиген и CNBP (cellular nucleic acid binding protein), которые селективно связывались с 5'-ТОР-мотивом мРНК и последовательностью, располагающейся непосредственно вслед за этим мотивом, соответственно [68, 69]. Было показано, что увеличение уровня биосинтеза La аутоантигена в клетках *X. laevis* и человека сопровождается

повышением уровня трансляции репортерной мРНК, несущей 5'-ТОР-мотив [70]; кроме того, La aytoanturen был обнаружен во фракциях полисом, содержащих мРНК с таким мотивом [71]. Эти данные могли бы свидетельствовать в пользу того, что специфическое взаимодействие между La aytoanturenom и 5'-TOP-мотивом в мРНК рибосомных белков симулирует активацию трансляции таких мРНК, однако вскоре были получены данные, вступающие в противоречие с этим предположением. В частности, было продемонстрировано, что связывание La аутоантигена с 5'-TOP-мотив-несущей 5'-HTO мРНК фактора EF1A человека ингибировало, а не активировало (как можно было бы ожидать) её трансляцию *in vitro* [72]. В другой работе увеличение биосинтеза La аутоантигена в клетках человека приводило к увеличению уровня его связывания с мРНК рибосомного белка L37 (eL37), содержащей 5'-TOP-мотив, и тем самым препятствовало её включению в состав полисом [73]. Таким образом, вопрос о существовании факторов, связывающихся с 5'-TOP-мотивом в мРНК рибосомных белков и тем самым

Другая предложенная в ранних работах гипотеза регуляции активности трансляции клеточных мРНК, содержащих 5'-ТОР-элемент, была основана на давно замеченной корреляции между рекрутированием таких мРНК в полисомы и высоким уровнем фосфорилирования рибосомного белка S6 в этих полисомах [74]. На роль основных регуляторов активности 5'-ТОР-содержащих мРНК некоторыми авторами выдвигались киназы S6K1 (S6 kinase 1) и S6K2 (S6 kinase 2), принадлежащие семейству киназ S6К и способные специфично фосфорилировать рибосомный белок S6 по нескольким участкам [75]. Было замечено, что иммунодепрессант рапамицин, изначально полученный из почвенных эубактерий, обитающих на острове Пасхи, и широко использующийся в настоящее время в качестве лекарственного препарата, способен опосредованно блокировать активацию киназ S6K1 и S6K2 и селективно подавлять трансляцию 5'-ТОР-содержащих мРНК [75-78]. Мишенью действия рапамицина у млекопитающих оказалась киназа mTOR (mammalian target of rapamycine) – центральный компонент сигнальных комплексов mTORC1 и mTORC2, управляющих клеточным ответом на различные стимулы (факторы роста, питательные вещества и т.д.). Эта киназа обладает широкой направленностью, в том числе способностью активировать киназы S6K (см., напр., [79]). В оригинальной модели сигнальных путей, регулирующих уровень трансляции 5'-ТОР-содержащих мРНК, ключевая роль в активации трансляции таких мРНК рибосомами была отведена киназе S6K1, фосфорилирующей белок S6 [77]. Однако данная модель не давала ответа на вопрос, каким образом фосфорилирование белка S6 в рибосомах приводит к их селективной чувствительности к 5'-ТОР-содержащим мРНК. Более того, описанная выше гипотеза в дальнейшем была поставлена под сомнение, поскольку в клеточных линиях, где активность киназ S6K была подавлена [80], или линиях мышей с нокаутированными генами этих киназ [81] не наблюдали

блокирования трансляции 5'-TOP-содержащих мРНК. Сравнительно недавнее сообщение об обнаружении у рибосомного белка S6 способности связываться с 5'-TOP-содержащими мРНК в клетках неходжкинской лимфомы [82] также не внесло прогресса в понимание механизма избирательной регуляции трансляции таких мРНК.

Прорыв в понимании обсуждаемого механизма был совершен в работе [83], где в опытах на фибробластах мыши с помощью метода рибосомного профайлинга исследовали зависимость уровней трансляции 5'-ТОР-содержащих мРНК от обработки клеток соединением хинолиновой природы, Торином 1, который является более сильным ингибитором комплекса mTORC1, чем рапамицин. Оказалось, что ингибирование mTORC1 приводит к значительному изменению профиля мРНК, ассоциированных с полисомами, причём подмножество мРНК, трансляция которых селективно подавляется при ингибировании mTORC1, почти полностью состоит из транскриптов с 5'-ТОР-мотивом или мотивом похожим на него. Более того, состав этого подмножества мРНК никак не коррелировал ни с длиной содержащихся в них 5'-НТО, ни со сложностью их структуры. Авторы предположили, что среди множества известных субстратов комплекса mTORC1, вероятными кандидатами на роль белков, чьё ингибирование фосфорилирования могло бы отражаться на изменении профиля транслируемых мРНК, являются белки-репрессоры фактора инициации трансляции eIF4E, 4E-BP1 и 4E-BP2, которые в дефосфорилированной форме способны связываться с этим фактором. Действительно, было установлено, что в клетках, обработанных ингибитором Торином 1, фактор eIF4E связывается с белком 4E-BP1 и благодаря этому теряет способность взаимодействовать с фактором eIF4G1. Более того, продуцирование в клетках неспособной к фосфорилированию мутантной формы 4Е-BP1 или понижение уровня фактора eIF4E в конечном итоге также приводило к ингибированию трансляции 5'-ТОР-содержащих мРНК [83]. Эти результаты показали, что трансляция мРНК с 5'-ТОР-мотивами является крайне чувствительной к фосфорилированию белков группы 4Е-ВР и что это фосфорилирование лежит в основе процесса регуляции трансляции комплексом mTORC1.

Однако почему ингибирование mTORC1 селективно сказывается только на трансляции 5'-TOP-содержащих мPHK? Ответ на этот вопрос был получен в этой же работе [83] с помощью опытов с фибробластами мышей с пониженным уровнем фактора инициации трансляции eIF4G1 или его гомолога eIF4G2. Эти опыты показали, что деплеция eIF4G1 приводит к селективному подавлению трансляции 5'-TOP-содержащих мPHK, независимо от фосфорилирования белков группы 4E-BP, тогда как деплеция eIF4G2, хотя и проявлялась в снижении общего уровня трансляции, не имела селективного влияния на трансляцию этих мPHK. Роль третьего гомолога факторов иницияции трансляции группы G, фактора eIF4G3, не была подробно изучена, поскольку уровень этого фактора в фибробластах мышей крайне низок

по отношению к остальным его гомологам и его роль в трансляции 5'-ТОР-содержащих мРНК оказалась незначительной. Известно, что фактор eIF4G1 связывается с кэп-связывающим белком – фактором инициации eIF4E, и, таким образом, оба эти фактора оказываются вовлечёнными в инициацию трансляции в составе комплекса eIF4F (напр., [84]). В отличие от eIF4G1, фактор eIF4G2 не способен взаимодействовать с eIF4E [85], а его участие в инициации трансляциии может сказываться на увеличении трансляции мРНК группы белков клеточного цикла [86]. Таким образом, прослеживается прямая связь между инактивацией mTORC1 и подавлением трансляции 5'-TOP-содержащих мРНК. Инактивация mTORC1 вызывает снижение активности киназ, фосфорилирующих белок 4E-BP1, что способствует накоплению нефосфорилированного 4E-BP1 и его взаимодействию с фактором eIF4E. Связывание с 4E-BP1 препятствует ассоциации eIF4E с фактором eIF4G1, который в отсутствие eIF4E не способен к инициации трансляции 5'-ТОР-содержащих мРНК, что в конечном итоге приводит к подавлению их трансляции. Понятно, что этот процесс обратим, и активация комплекса mTORC1 вызывает усиление трансляции 5'-TOP-содержащих мРНК. На основании всех полученных данных в работе [83] сделано заключение, что фактор eIF4G1 строго необходим для закрепления фактора eIF4E на кэп-структуре при инициации трансляции 5'-TOPсодержащих мРНК и что взаимодействие между этими двумя факторами лежит в основе селективной регуляции инициации трансляции таких мРНК (рисунк 6).

Ещё одним важным результатом работы [83] явилось то, что авторам, на основании анализа последовательностей большого количества мРНК, чей уровень трансляции зависит от ингибирования сигнального пути mTORC1, удалось показать, что классическое определение 5'-TOP-элемента (см. выше) является слишком строгим. В более широком понимании критерию mTORC1-зависимых мРНК удовлетворяют те мРНК, которые имеют олигопиримидиновый участок, состоящий из 5 и более нуклеотидов и расположенный на расстоянии не далее чем в 4 нуклеотида от первого нуклеотида мРНК. Среди мРНК рибосомных белков было найдено 50 мРНК, для которых наблюдали значительное ингибирование трансляции при обработке клеток Торином 1 [83]. Возможно, что регуляция трансляции мРНК некоторых рибосомных белков не зависит от сигнального пути mTORC1 и происходит иным способом, хотя нельзя также исключить, что некоторые мРНК рибосомных белков в цитируемой работе не удалось идентифицировать при использовании метода массового параллельного секвенирования.

В заключение раздела, посвящённого рассмотрению возможных вариантов координированной регуляции экспрессии генов рибосомных белков на уровне трансляции, можно отметить, что вариант, основанный на передаче сигнала через фосфорилирование белков группы 4E-BP в сигнальном пути mTOR, выглядит на сегодня наиболее доказанным. Тем не менее, здесь всё ещё остаётся немало вопросов, в частности, непонятна конкретная роль



Рисунок 6. Схема регуляции трансляции мРНК, содержащих 5'-ТОР-мотивы, согласно [83].

5'-ТОР-мотива в селекции соответствующих мРНК в инициации трансляции, и, кроме того, неясно, для всех ли без исключения рибосомных белков, необходимых для биогенеза рибосом, характерен такой способ регуляции трансляции их мРНК. Важно отметить, что сигнальный путь mTOR регулирует множество клеточных процессов, с которыми он тесно интегрирован; взаимные связи его компонентов очень сложны (напр., [87]), поэтому нельзя утверждать, что принципы координированной регуляции трансляции мРНК рибосомных белков уже известны. Следовательно, дальнейшие исследования могли бы внести существенный вклад в понимание механизма этого процесса.

1.2.3 Ядерный импорт рибосомных белков

Процесс ядерного импорта белков является основополагающим клеточным процессом, необходимым для функционированой активности основной массы ядерных белков. Этот процесс достаточно подробно изучен для различных типов белков и описан во множестве обзоров (напр., [88, 89]). Поэтому в настоящей главе будут выделены только те его особенности, которые характерны для рибосомных белков.

Рибосомные белки синтезируются в цитоплазме на рибосомах и далее наряду со многими ядерными белками импортируются в клеточное ядро специальными транспортными белками рецепторами ядерного импорта, принадлежащими к семейству импортинов/кариоферинов βтипа (от англ. – importin/karyopherin β family) (напр., [90]). Эти рецепторы распознают различные виды сигнальных последовательностей ядерной локализации (от англ. – nuclear localization sequences, NLS) в рибосомных белках и осуществляют перенос рибосомных белков через ядерные поры в клеточное ядро. В ядре после связывания транспортного белка с белком Ran в комплексе с GTP (RanGTP) происходит высвобождение рибосомного белка, а комплекс транспортного белка с RanGTP переносится обратно в цитоплазму (напр., [91, 92]). Среди 19-ти известных к настоящему времени кариоферинов β-типа (Карβ) [90], только 6 (Карβ1, Карβ2, RanBP4, RanBP5, RanBP7 и RanBP9) обнаружены в качестве участников транспорта рибосомных белков ([91, 92]), причём сразу несколько различных кариоферинов могут быть специфичны к одному и тому же рибосомному белку. Так, установлено, что ядерный транспорт рибосомных белков S7 (eS7), L5 (uL18) и S23A (uL23) могут осуществлять кариоферины Карβ1, Карβ2, RanBP5 и RanBP7 [93]. Показано также, что кариоферин RanBP9 способен переносить белки S7 и L18A (eL20), белок S3A (eS1) переносится кариоферином RanBP4, а димер Карв1и RanBP7 специфичен к белкам L4 и L6 [94].

Сигнальные последовательности в белках не имеют чётко выраженного консенсуса и представляют собой участки с преобладанием положительно заряженных аминокислот, причём в рибосомных белках NLS-последовательности могут быть достаточно протяжёнными и расположенными в различных участках белка. Так, например, в белке L23A NLS-последовательность расположена в районе 52-74 [93], а в белке S25 – в участке 25-41 [95]. Некоторые рибосомные белки содержат две NLS-последовательности. Например, в белке L5 основная NLS находится в районе 21-37, а С-концевой район белка 255-297 содержит дополнительный NLS [96]; в белке S19 (eS19) NLS-последовательности расположены в районах 1-16 и 120-142, т. е. в N- и C-концевых фрагментах белка [97]. В белках L7A (eL8) и S6 обнаружены сразу три NLS-последовательности (в L7A – в участках 23-51, 52-100 и 100-220 [98], а в S6 – в районах 166-170, 188-191 и 230-233 [99]).

Кариоферины β-типа характеризуются высокой молекулярной массой (Mw = 90–150 кДа) и низкой величиной pI (4.0–5.0), что, очевидно, способствует их взаимодействию с положительно заряженными последовательностями рибосомных белков, несущими NLS. Важно отметить, что кариоферины β-типа выступают, по-видимому, также в роли цитоплазматических шаперонов, маскируя богатые лизинами и аргининами участки рибосомных белков и предотвращая агрегацию этих белков в присутствии нуклеиновых кислот как полианионов. Так,

показано, что добавление импортинов к очищенным рибосомным белкам S7 или L23A препятствует их агрегации в присутствии полианионов, а белки L4, L6 (eL6), L18A (eL20) и S3A (eS1) не подвергаются агрегации в цитоплазматическом экстракте клеток HeLa при добавлении соответствующего им кариоферина [94].

Следует подчеркнуть, что наряду с сигналом NLS, в рибосомных белках отмечают также наличие сигнальной последовательности ядрышковой локализации (от англ. – <u>n</u>ucle<u>o</u>lar localization <u>s</u>equence, NoLS), т. е. последовательности, которая позволяет белку переноситься в ядрышко. Иногда встречаются другие термины для такой последовательности, например сигнал ядрышкового нацеливания (от англ. – <u>n</u>ucle<u>o</u>lar targeting <u>s</u>ignal, NOS) или сигнал ядрышковой локализации (от англ. – <u>n</u>ucle<u>o</u>lar localization <u>s</u>ignal, NOS). По-видимому, в рибосомных белках сигнал NoLS сопряжён с сигналом NLS, являясь его частью. В пользу этого предположения свидетельствуют данные, полученные в опытах с мутантными белками. Так, оказалось, что отдельные мутации по аминокислотным остаткам в NLS (например, делеция трёх остатков Lys в положениях 31-33 белка S25 [95] или замены Val15Phe и Gly127Gln в белке S19 [97]) мешают переносу рибосомных белков в ядрышко, хотя и не препятствуют их ядерной локализации.

На сегодняшний день лишь для небольшой части рибосомных белков установлено расположение NLS-мотивов в их аминокислотных последовательностях и определена специфичность белков в отношении конкретных кариоферинов. Остаётся также невыясненной судьба рибосомных белков в клеточном ядре, после того как комплекс RanGTP, связываясь с кариоферинами, высвобождает рибосомные белки. Почему не происходит агрегация свободных рибосомных белков в ядре, и каким образом рибосомные белки доставляются к месту сборки рибосом – ответов на эти вопросы пока нет.

1.2.4 Роль рибосомных белков в процессе сборки и созревания субчастиц рибосом млекопитающих

Процесс сборки рибосомных субчатиц является одним из самых энергозатратных клеточных событий и прямо ассоциирован со скоростью роста клеток. В среднем, растущая клетка HeLa синтезирует в минуту около 7500 рибосомных субчастиц, используя при этом около 300000 рибосомных белков, что составляет почти 50% всех синтезируемых белков в растущей клетке [100]. В связи с этим можно утверждать, что биосинтез рибосомных субчастиц является одним из основных клеточных процессов.

Сборка субчастиц рибосом эукариот происходит в отдельном компартменте клеточного ядра – ядрышке. В области ядрышка локализованы расположенные тандемно гены рибосомных РНК и происходит их активная транскрипция, осуществляемая ДНК-полимеразой I.

Образующийся первичный транскрипт (47S пре-рРНК) подвергается процессингу, при котором происходит его последовательное расщепление по определённым местах, сопровождающееся удалением незначимых фрагментов (внешних и внутренних транскрибируемых спейсеров), посттранскрипционная модификация (преимущественно псевдоуридилирование и 2'О-метилирование) и формирование зрелых 18S, 5,8S и 28S рРНК (Рисунок 7).



Рисунок 7. Схема процессинга пре-рРНК в клетках человека [101]. В зависимости от очерёдности расщепления по 5'-ETS (от англ. external transcribing spacer – внешний транскрибируемый спейсер) (участки A0 и 1) и ITS1 (от англ. internal transcribing spacer – внутренний транскрибируемый спейсер) (участок 2) существуют 2 пути образования зрелых рРНК. В клетках HeLa основным является путь, представленный слева.

Процесс, в результате которого происходит созревание pPHK и сборка рибосомных субчастиц, чрезвычайно сложен, и его механизм пока ещё далёк от полного понимания. Тем не менее, на сегодняшний день для клеток человека установлено уже около 300 кофакторов (PHK и белков), принимающих участие в формировании рибосомных субчастиц [102]. Оказалось, что в процессинге 47S пре-мPHK в клетках человека принимают участие 74 белка, которые не

имеют гомологии с дрожжевыми белками, что является весомым свидетельством в пользу существенно большей сложности процесса сборки рибосом у млекопитающих, чем у низших эукариот. Следует также отметить, что многие из генов, кодирующих белки, идентифицированные в работе [102] в качестве кофакторов сборки рибосом, давно известны как биомаркеры различных заболеваний, особенно тех, которые сопряжены с развитием рака.

Связывание рибосомных белков с рРНК с последующим формированием пре-40S и пре-60S рибосомных субчастиц осуществляется одновременно с процессингом 47S пре-рРНК. В работе [103] на примере нескольких белков 40S и 60S субчастиц (S6, S7, S15 (uS19), S16 (uS9), S17 (eS17), S19, S24, S25, S28 (eS28), L5, L7 (uL30), L11, L14 (eL14), L26 (uL24) и L35A (eL33)) выявлено непосредственное влияние отдельных рибосомных белков на созревание рРНК. Чтобы снизить уровень биосинтеза любого из этих белков, понижали уровень его мРНК с помощью РНК-интерференции. Деплеция какого-либо из вышеперечисленных белков приводила, как правило (за исключением белков S15 и S25), к блокированию процессинга прерРНК на одной из его стадий и, что вполне закономерно, вызывала снижение уровня зрелых рибосомных субчастиц, соответствующих в большинстве случаев этому белку. Что касается обнаруженных исключений, то деплеция белка S15 не оказывала влияния на созревание 18S рРНК, хотя всё же и вызывала снижение общего уровня 40S субчастиц, указывая на вовлечение этого белка в созревание 40S субчастиц на поздних стадиях этого процесса. В то же время деплеция белка S25 никак не отражалась на уровне 40S субчастиц, свидетельствуя о малой значимости этого белка для созревания этих субчастиц. Важным наблюдением, сделанным в цитируемой работе, явилось то, что при деплеции любого из указанных белков (за исключением белка S25) происходило снижение клеточных уровней других рибосомных белков, соответствующих той рибосомной субчастице, к которой относился деплецированный белок. Эти данные свидетельствуют в пользу существования специального клеточного механизма (или механизмов), ответственного за поддержание баланса рибосомных белков в клетке. Авторы работы [103] предположили, что такой баланс мог бы осуществляться благодаря процессу, обеспечивающему быструю деградацию в клеточном ядре избыточных, т. е. не способных встраиваться в рибосомные субчастицы рибосомных белков, идея существования которого была высказана ранее в работе [104] (см. гл. 1.2.5). Вместе с тем, по-видимому, существуют и другие возможные пути поддержания баланса рибосомных белков, основанные на других клеточных молекулярных механизмах.

Наиболее полное исследование эффектов деплеции различных рибосомных белков 40S субчастицы, оказываемых на процесс созревания рибосомных субчастиц, проведено в работе [101]. Снижения клеточного уровня рибосомного белка в этой работе добивались также с помощью РНК-интерференции. Было установлено, что при снижении уровня практически

каждого из 32-х белков 40S субчастицы (белок RACK1 не изучали) происходили серьёзные нарушения в созревании 18S рРНК и формировании зрелых 40S субчастиц. Только в случае деплеции белка S27 или его паралога S27L уровень зрелых 40S субчатиц в клетках, как и уровень зрелой 18S рРНК, существенно не снижался. Однако совместная деплеция этих гомологичных белков приводила к падению уровней и 18S рРНК, и 40S рибосомных субчастиц, как и в случае с другими рибосомными белками. Эти данные указывают на то, что рибосомный белок S27 важен для сборки 40S субчастицы рибосомы, хотя и может быть заменён в этом процессе своим паралогом – белком S27L. Что касается рибосомного белка S25, несущественного для сборки 40S субчастицы по данным [103], авторы [101], напротив, показали, что деплеция этого белка, хотя и не отражается на созревании 18S рРНК, что находится в соответствии с [103], приводит к снижению уровня 40S субчастиц. Поэтому было высказано предположение, что рибосомный белок S25 имеет значение для эффективной сборки 40S субчастиц или их стабильности [101]. Другое разногласие между данными работ [101] и [103] можно заметить в отношении белка S15. Так, в работе [101] показано, что деплеция этого белка затрудняла созревание 18S рРНК, хотя и на поздней стадии этого процесса, тогда как в работе [103] такого эффекта обнаружено не было. Несмотря на то, что в работе [101] упомянутые противоречия никак не комментируются, можно предположить, что они связаны с различными критериями, используемыми при оценке наблюдаемых эффектов.

Чтобы систематизировать рибосомные белки 40S субчастицы согласно оказываемому ими влиянию на различные стадии созревания 47S пре-рРНК, авторы работы [101] разделили их на две условные группы. К первой группе, обозначенной как i-RPS (initiation-RPS), было отнесено 16 рибосомных белков (S3A, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S11, S13, S14, S16, S15a, S23, S24 и S28) (для соотнесения с современной номенклатурой рибосомных белков см. Таблицу 1). Эффект от деплеции этих белков проявлялся накоплением в клетках интермедиатов продуктов 45S и 30S, соответствующих ранним стадиям процессинга пре-рРНК (см. Рисунок 7), то есть в отсутствие этих белков не происходило расщепления первичного транскрипта прерРНК в участках транскрибируемых спейсеров 5'-ETS или ITS1. При деплеции белков второй группы (S19, S18, SA, S21, S2, S17, S27A, S29, S3, S20, S10, S26, S12, S25, S30 и S15), обозначенной как p-RPS (progression-RPS), наблюдали накопление интермедиатов – продуктов 26S, 21S и 18S-E, соответствующих поздним стадиям процессинга пре-рРНК. Таким образом, авторы работы [101] заключили, что отсутствие какого-либо белка из группы i-RPS полностью блокирует процессинг 47S рРНК, за исключением разрезания по сайту А0 на ранней стадии (Рисунок 7). Напротив, отсутствие белков из группы p-RPS, принимающих участие в созревании пре-рРНК на различных стадиях, полностью не ингибирует образования продукта 18S-Е на самой поздней стадии процессинга. Предложенная в [101] модель последовательности

событий, происходящих с участием вышеупомянутых групп белков в процессе созревания 40S рибосомных субчастиц, представлена на Рисунке 8.



Рисунок 8. Модель, отображающая последовательность событий, происходящих с участием рибосомных белков разных групп в созревании 40S субчастицы рибосомы согласно [101]. Вверху (инициация), рибосомные белки группы i-RPS связываются с синтезируемой пре-рРНК ко-транскрипционно одновременно с белковыми факторами сборки и мякРНК и участвуют в фолдинге доменов 18S рРНК, что позволяет осуществить правильную сборку аппарата процессинга пре-рибосомы. Внизу (развитие), белки группы р-RPS задействованы, главным образом, на последующих стадиях сборки, хотя они могут быть необходимы для координации расщепления пре-рРНК по сайтам A0 и 1. Пре-40S субчастицы, высвобождаемые из ядрышка, после расщепления по сайту Е экспортируются в цитоплазму, где происходит заключительный этап созревания субчастицы.

В этой же работе [101] удалось проследить, как недостаток рибосомных белков сказывается на транспорте незрелых 40S субчастиц. Оказалось, что при деплеции белков, относящихся к группе i-RPS, промежуточные продукты процессинга 47S пре-pPHK, 45S и 30S, остаются в ядрышке. При деплеции рибосомных белков S18, S19, SA и S21 из группы p-RPS, промежуточный продукт 21S также не покидал ядрышка или быстро деградировал в

нуклеоплазме. Деплеция белков S15 и S17 приводила к накоплению пре-40S субчастиц в нуклеоплазме, что указывало на возникающие дефекты ядерного экспорта таких субчастиц. Снижение клеточного уровня других белков, отнесённых к группе p-RPS, не приводило к нарушению цитоплазматического транспорта пре-40S рибосомных субчастиц, содержащих незрелую 18S pPHK в виде интермедиата 18S-E.

Сравнивая результаты своей работы с ранними данными об очерёдности встраивания рибосомных белков в пре-рибосомы [105], авторы [101] обнаружили, что в группы i-RPS и р-RPS входят, преимущественно, белки, которые встраиваются в пре-рибосомы на раннем и позднем этапах их созревания, соответственно. Кроме того, было обнаружено, что существует корреляция между очерёдностью связывания рибосомных белков с рРНК при созревании 40S субчастиц рибосом млекопитающих и сборке 30S субчастиц рибосом эубактерий. Так, для эубактериальных рибосомных белков, составляющих первую и частично вторую группы белков согласно очерёдности их связывания с 16S рРНК при сборке 30S субчастицы [106], были найдены гомологи среди белков группы i-RPS. Белки 30S субчастицы, составляющие остальную часть второй группы и третью группу, были гомологичны белкам группы p-RPS. На основании этого авторы [101] заключили, что в процессах сборки малых субчастиц рибосом эубактерий и млекопитающих существуют общие правила очерёдности связывания белков с рРНК.

Интересно отметить, что рибосомные белки группы p-RPS [101], согласно модели 40S субчастицы рибосомы человека [14], практически в полном составе расположены на голове субчастицы. Связано ли это как-то с более поздней очерёдностью транскрипции 3'-концевого домена 18S pPHK, формирующего основу головы 40S субчастицы, по сравнению с 5'-концевым и центральным доменами этой pPHK или с особыми термодинамическими параметрами формирования головы субчастицы, пока не понятно.

Рибосомный белок S25, как показано, слабо влияет на эффективность сборки 40S рибосомных субчастиц [101, 103], можно ожидать, что среди белков 60S субчастицы тоже есть такого рода белки. Так, например, у дрожжей, согласно исследованиям, выполненным в работе [107], при делеции 14-ти из 79-ти генов, кодирующих рибосомные белки (включая их паралоги), клетки сохраняли жизнеспособность, хотя в ряде случаев у них наблюдали серьёзные дефекты роста. Действительно, в недавнем исследовании [108] было установлено, что деплеция белка L40 в клетках HeLa, практически не оказывает влияния на уровень трансляции большинства клеточных мРНК. В другой работе [109] также было показано, что одновременное подавление в клетках 3Т9 (фибробласты мыши) биосинтеза рибосомного белка L22 (eL22) и его паралога L22L1, способного компенсировать недостаток белка L22 в рибосомах, хотя и вызывает существенное замедление клеточного роста, но не приводит к их

гибели. Эти данные могут свидетельствовать о том, что белки L22 и L40 не существенны для процессинга пре-рРНК и сборки 60S субчастиц.

Важно заметить, что данные рассмотренных выше работ [101, 103] по блокированию процессинга пре-рРНК в условиях недостатка определённого рибосомного белка, выполненные на клетках человека, в целом, хорошо соответствуют данным аналогичных исследований, проведённых на дрожжах [110], но есть и различия. Так, например, в клетках человека при недостатке белков S7 и S28 процессинг 47S пре-рРНК останавливается на стадии образования раннего промежуточного продукта – 30S пре-рРНК, тогда как недостаток гомологичных рибосомных белков у дрожжей оказывает влияние на поздние стадии созревания 40S субчастицы. Эти исключения лишний раз подчёркивают наличие существенных отличий в механизмах сборки рибосомных субчастиц у низших эукариот и млекопитающих.

Таким образом, на основании всей информации, приведённой в этом разделе, можно сделать заключение, что основную часть рибосомных белков справедливо рассматривать как полноправных участников процесса созревания рибосомных субчастиц, каждый из которых играет в этом процессе свою индивидуальную роль.

1.2.5 Поддержание клеточного баланса рибосомных белков

Строгое поддержание баланса компонентов для сборки рибосомных субчастиц в ядрышке должно определять успешность этого процесса. В ряде работ было отмечено, что нарушения в процессе сборки рибосомных субчастиц, вызванные различными причинами, приводят, как правило, к разрушению ядрышка и запуску механизма апоптоза (напр., [111]). Поэтому контроль баланса рибосомных белков является важной задачей растущей клетки. Очевидно, что механизмы координированной активации и транскрипции генов рибосомных белков, а также согласованной трансляции мРНК рибосомных белков способствуют продукции рибосомных белков в приблизительно эквимолярном количестве. В настоящем разделе будут рассмотрены вопросы, касающиеся дополнительных процессов, обеспечивающих координированное соблюдение клеточного баланса рибосомных белков.

Согласованная инициация трансляции мРНК рибосомных белков позволяет предположить, что для достижения одинакового уровня биосинтеза рибосомных белков уровень их мРНК тоже должен быть одинаков (если допустить, что скорость трансляции мРНК каждого рибосомного белка – величина приблизительно одинаковая, что, конечно же, не так). В работе [41] были проанализированы данные транскриптомного анализа нескольких клеточных линий и тканей человека, и проведена оценка относительного содержания в них мРНК рибосомных белков. Было обнаружено, что для 80-90% рибосомных белков уровень их мРНК в

клетках отличается между собой не более чем в три раза, соответствуя, таким образом, некоторому среднему уровню мРНК рибосомных белков. Однако были найдены и такие мРНК, чей уровень оказался существенно выше или ниже по сравнению со средним уровнем. В частности, уровень мРНК рибосомных белков L41 (eL41) и S27 был соответственно в 2 и 3 раза выше, а белков L36 (eL36), S26 (eS26), S5 (uS7) и S30 – более чем в два раза ниже среднего уровня мРНК рибосомных белков. Наблюдаемый высокий уровень мРНК, кодирующей белок L41, был объяснен её короткой рамкой считывания и аминокислотным составом синтезируемого белка. Дело в том, что из 25 аминокислотных остатков этого белка 17 составляют лизины и аргинины, что может затруднять прохождение растущим пептидом рибосомного "тоннеля" – полости в 60S субчастице, сквозь которую выходит наружу синтезируемый полипептид. Кроме того, авторы [41] учитывали, что при такой короткой рамке считывания эта мРНК может одномоментно транслироваться только одной рибосомой. Всё это должно сказываться на скорости трансляции мРНК рибосомного белка L41, делая её существенно ниже скорости трансляции мРНК других рибосомных белков, и поэтому для поддержания биосинтеза этого белка на необходимом уровне содержание его мРНК должно быть более высоким, чем у остальных рибосомных белков.

В этой же работе [41] был выполнен сравнительный анализ трансляционной активности мРНК рибосомных белков в клетках млекопитающих на основании данных, полученных с помощью метода рибосомного профайлинга в различных лабораториях. Было показано, что относительное количество транслируемых рибосомами мРНК рибосомных белков примерно соответствовало относительному количеству их мРНК, определённому в опытах по транскриптомному анализу. Эти результаты свидетельствуют о фактическом отсутствии пула трансляционно неактивных мРНК рибосомных белков в клетке. Однако данные работы [41] вовсе не означают, что уровни мРНК рибосомных белков в клетке не могут колебаться. Так, например, показано, что в некоторых тканях эмбриона мыши различия в уровнях мРНК у разных рибосомных белков могут достигать двух порядков [112]. Можно предположить, например, что фазы клеточного роста, суточный ритм, а также другие внешние и внутренние факторы могут оказывать существенное влияние на содержание мРНК различных рибосомных белков в клетке.

Значимые наблюдения, касающиеся скорости биосинтеза рибосомных белков, их транспорта в ядро и включения в состав рибосомных субчастиц, были сделаны в работе [104] на клетках HeLa с помощью мечения рибосомных белков изотопом ¹³С или флуоресцентными метками и последующего кинетического анализа содержания таких меток в клеточных компартментах. Оказалось, что вновь синтезируемые рибосомные белки довольно быстро переносятся из цитоплазмы в клеточное ядро: спустя лишь 2 ч от начала синтеза меченых

52

белков, их фракция уже составляет 50-80% от суммарного количества рибосомных белков в ядре. Было замечено, что скорость переноса белков малой субчастицы рибосомы несколько выше, чем белков большой субчастицы, а медленнее всего осуществляется перенос белка L5. При этом, скорость ядерного импорта рибосомных белков в несколько раз превышает скорость транспорта многих других ядерных белков, например, таких как фибрилларин, нуклеофозмин, фактор транскрипции UBF и некоторые другие. Интересно, что скорость ядерного экспорта рибосомных белков в составе пре-рибосомных субчастиц несопоставимо ниже скорости переноса рибосомных белков в ядро: так, только через 20 ч уровень вновь синтезированных рибосомных белков достигает примерно 40-60% от суммарного количества рибосомных белков в цитоплазме. Эти данные позволили предположить, что в клеточном ядре происходит деградация рибосомных белков, которая позволяет поддерживать их содержание на некотором требуемом для клетки уровне. Действительно, на примере белка L27 (eL27) было установлено, что при обработке клеток ингибиторами протеасом происходит накопление этого белка в ядре и ядрышке. Кроме того, было показано, что для свободных рибосомных белков характерен быстрый круговорот между нуклеоплазмой и ядрышком (около 80% белка L27, находившегося в ядрышке, оказывалось через 4 мин в нуклеоплазме).

Таким образом, данные работы [104] показали, что рибосомные белки, по-видимому, синтезируются клеткой в избыточном количестве, превышающем количество, требуемое для биосинтеза рибосомных субчастиц, а уровень белков, необходимый для эффективной сборки рибосомных субчастиц, обеспечивается постоянной деградацией избытка рибосомных белков протеасомами в нуклеоплазме. Между нуклеоплазмой и ядрышком осуществляется быстрый перенос рибосомных белков, и тем самым достигается примерный баланс уровней рибосомных белков протеасоманых белков, и тем самым достигается примерный баланс уровней рибосомных белков при сборке рибосомных субчастиц в ядрышке.

1.2.6 Участие рибосомных белков в регуляции экспрессии собственных генов

Одним из ярких проявлений разнообразия путей, регулирующих генную экспрессию, является процесс, при котором снижение уровня экспрессии определенного гена достигается посредством механизма, вовлекающего собственный продукт этого гена. Принцип такого механизма, получивший название "принцип обратной связи", характерен, например, для полицистронных генов рибосомных белков эубактерий (напр., [113]). Так, трансляцию мРНК оперона S10, кодирующего 11 рибосомных белков, регулирует рибосомный белок L4, который в отсутствие достаточного количества 23S рРНК, т. е. в условиях избытка белка, связывается с этой полицистронной мРНК в начальном её участке и выступает в качестве репрессора трансляции. Механизмы экспрессии генов эукариот, в целом, более сложны, чем таковые у

генов прокариот, в частности, они включают такие стадии как сплайсинг и транспорт процессированных мРНК в цитоплазму, поэтому из общих соображений вариантов авторегуляции экспрессии генов у эукариот должно быть больше, чем у прокариот. Ниже приведены известные на сегодняшний день данные, свидетельствующие об участии рибосомных белков млекопитающих в регуляции экспрессии собственных генов.

Информации об участии отдельных рибосомных белков млекопитающих в регуляции трансляции собственных мРНК накоплено немного. Так, в работе [114] было показано, что рибосомный белок S14 человека способен связываться со 114-звенным 5'-концевым участком кодирующей его мРНК in vitro, кроме того, этот же белок обладал высоким сродством к двум антисмысловым РНК, комплементарным двум перекрывающимся участкам в интроне 1 премРНК этого белка. Сверхэкспрессия этих антисмысловых РНК в клетках фибросаркомы человека (HT1080) стимулировала продукцию мРНК белка S14, а при трансфекции этих клеток ДНК-конструкцией, экспресирующей гомологичный рекомбинантный рибосомный белок S14A D. melanogaster, наблюдали ингибирование образования этой мРНК. Авторы предположили, что рибосомный белок S14 регулирует экспрессию собственного гена двумя путями: через связывание с антисмысловыми РНК, комплементарными участку интрона 1 его пре-мРНК, приводя к ингибированию образования зрелой мРНК, и посредством связывания с собственной мРНК, ингибируя её трансляцию. Хотя в указанном механизме оставалось много неясного, например, ингибирующий эффект белка S14 на трансляцию собственной мРНК так и не был продемонстрирован, дальнейшего развития данная работа не получила. В работе [115], выполненной на рибосомном белке L7 человека, прямо показано, что данный белок способен связываться с кодирующей его мРНК и селективно подавлять её трансляцию в бесклеточной белоксинтезирующей системе. Однако при этом было оговорено, что существуют и другие мРНК, к которым этот белок обладает сродством и трансляцию которых он может ингибировать. Позднее способность к взаимодействию со своей мРНК была обнаружена также у ещё одного рибосомного белка человека – белка S3 [116]. Авторы этой работы показали, что мРНК этого белка соосаждается вместе с Flag-меченым белком S3 из лизата клеток НЕК 293Т, экпрессирующих соответствующий эктопически ген, при иммунопреципитации с использованием антител против Flag-эпитопа. В опытах in vitro было установлено, что взаимодействие белка S3 с мРНК происходит вне рибосомы и что в это взаимодействие вовлекаются участок мРНК, кодирующий С-концевую часть белка, и области белка, включающие район его КН-домена и примыкающий к нему район С-концевого домена. Кроме того, было показано, что рекомбинантный рибосомный белок S3 подавляет эффективность трансляции in vitro мРНК-транскрипта, кодирующего данный белок. На основании полученных

данных авторы работы [116] предположили, что рибосомный белок S3 участвует в регуляции трансляции собственной мРНК по механизму, основанному на принципе обратной связи.

Существуют данные, указывающие на участие рибосомных белков млекопитающих в регуляции сплайсинга собственных пре-мРНК. Так, в работе [117] при повышении уровня рибосомного белка L3 (uL3) в клетках крысы линии PC12 путём их трансфекции соответствующей экзогенной конструкцией было обнаружено понижение уровня зрелой формы мРНК, кодирующей данный белок. Наряду с этим наблюдали увеличение уровня изоформы мРНК белка L3, где в результате альтернативного сплайсинга сохранялась часть третьего интрона. Эффект нарушения канонического сплайсинга пре-мРНК, кодирующей рибосомный белок L3, в ответ на увеличение его клеточной концентрации был специфичен для этого белка, и такого эффекта не наблюдали при увеличении концентрации "чужеродного" рибосомного белка L12 (uL11). Напротив, при трансфекции клеток ДНК-конструкцией, экспрессирующей белок L12, происходило нарушение сплайсинга пре-мРНК этого белка, что приводило к образованию изоформы мРНК, в которой сохранялась часть первого интрона. Изоформы мРНК обоих рибосомных белков не могли продуцировать полноразмерные белки, поскольку в результате альтернативного сплайсинга в них нарушалась рамка считывания, и, как было показано в [117], такие мРНК становились субстратами в клеточном пути нонсенсопосредованного распада мРНК (NMD, nonsense mediated decay). Таким образом, хотя в цитируемой работе не было показано непосредственное взаимодействие рибосомных белков млекопитающих с собственными пре-мРНК, тем не менее, авторы продемонстрировали, что между клеточным уровнем рибосомных белков и сплайсингом кодирующих их пре-мРНК существует отрицательная обратная связь.

1.3 Рибосомные белки и контроль биогенеза рибосом

Известно, что нарушение биосинтеза рибосом, независимо от причины, лежащей в его основе (ингибирование РНК-полимеразы I, нарушение процессинга пре-рРНК или неправильная сборка рибосомных субчастиц), вызывает ядрышковый стресс и запускает процесс разрушения ядрышка, приводящий к аресту клеточного цикла и далее к апоптозу (напр., [118]). Следовательно, можно предполагать, что существует особый клеточный механизм, обеспечивающий контроль процесса сборки рибосомных субчастиц. В ряде исследований продемонстрировано, что такой механизм тесно связан с универсальным сигнальным путём Mdm2-p53, в основе которого лежит взаимодействие основной E3-убиквитин-лигазы – белка Mdm2, продукта онкогена *MDM2* (другое его название – Hdm2), с белком p53 – онкосупрессом, функционирующим как транскрипционный фактор (напр., [119]).

В нормальных условиях клеточного роста белок Mdm2 поддерживает содержание белка p53 на низком уровне, делая это двумя способами: во-первых, он убиквитинилирует белок p53 по С-концу, обеспечивая, тем самым, его деградацию протеасомами, а, во-вторых, он ингибирует трансактивационную активность p53, препятствуя его взаимодействию с транскрипционным аппаратом клетки. В условиях стресса взаимодействие Mdm2 с p53 нарушается, что приводит к увеличению клеточного уровня белка p53 и запуску большого числа процессов, им контролируемых.

1.3.1 Вовлечение рибосомных белков в контроль биогенеза рибосом

Среди большого числа белковых факторов, способных модулировать активность Mdm2 и влиять на его связывание с р53, были обнаружены рибосомные белки. Впервые, способность Mdm2 к связыванию с рибосомными белками была показана в работе [120], где с помощью иммунопреципитации было установлено, что вместе с Mdm2, свободным или ассоциированным с белком p53, соосождается также рибосомный белок L5. Однако структурные и функциональные аспекты взаимодействия белка L5 с Mdm2 в упомянутой работе установлены не были. Позднее было показано, что за связывание белка L5 отвечает кислый домен Mdm2, расположенный в его центральной части [121]. Впоследствии было обнаружено несколько других рибосомных белков, способных связываться с Mdm2, а именно: L11 [122, 123], L23 [124, 125], S7 [126, 127], L26 [128] и S3 [129]. Было показано, что эти рибосомные белки препятствуют убиквитинилированию p53 белком Mdm2 и, соответственно, способствуют активации белка р53. К настоящему времени список рибосомных белков, вовлечённых в регуляцию сигнального пути Mdm2-p53 посредством взаимодействия с Mdm2, дополнен также белками S27, S27L [130], L37, S15, S20 [131], S25 [132], S14 [133], S26 [134] и L6 [135]. Учитывая такую слабую селективность Mdm2 по отношению к рибосомным белкам, можно полагать, что этот список в дальнейшем будет расширяться.

Как показывали исследования процитированных выше работ, способы участия перечисленных рибосомных белков в механизме сигнального пути Mdm2-p53 практически одинаковы, поэтому представляется возможным привести некоторые экспериментальные доказательства такого участия на примере только одного из белков. Так, в работе [132], чтобы установить взаимодействие между рибосомным белком S25 и Mdm2, использовали клетки млекопитающих, экспрессирующие рекомбинантные формы этих белков, несущие эпитопы, специфичные к различным стандартным антителам. С помощью иммунопреципитации с использованием соответствующих антител и последующего иммуноблотинга было установлено, что белок S25 взаимодействует непосредственно с Mdm2 и что в состав их комплекса входит также белок p53. В белке S25 во взаимодействие оказался вовлечён участок 42-93, а в Mdm2 – район 180-298, включающий кислый домен этого белка. При обработке клеток актиномицином D, ингибирующим ДНК-полимеразу I, т. е. в условиях ядрышкового стресса, связывание Mdm2 с S25 и p53 возрастало. Увеличение уровня синтеза рибосомного белка S25 в клетках, нокаутных по гену белка p53, не влияло на их пролиферацию, тогда как в клетках, несущих активный ген p53, повышение содержания белка S25 приводило к остановке клеточного цикла и апоптозу. Это ясно указывало на стабилизацию и активацию белка р53 при избыточном биосинтезе данного белка. Чтобы определить механизм, по которому рибосомный белок S25 стабилизирует белок p53, ДНК-конструкции, способные продуцировать Mdm2, p53, S25 и убиквитин, коэкспрессировали в клетках, нокаутных по гену белка p53, и наблюдали за убиквитинилированием белка р53. Как и ожидалось, в клетках, коэкспрессирующих убиквитин и p53, уровень убиквитинилирования p53 в присутствии Mdm2 был многократно выше, чем в отсутствие Mdm2, однако при избыточном биосинтезе рибосомного белка S25 уровень убиквитинилирования р53 значительно понижался. Напротив, в клетках, продуцирующих мутантную форму Mdm2, лишённую убиквитин-лигазной активности, при избыточном уровне рибосомного белка S25 не происходило ингибирования убиквитинилирования p53. Всё это подтверждало предположение о том, что связь между увеличением уровня рибосомного белка S25 и стабилизацией p53 в клетках осуществляется посредством взаимодействие белка S25 с Mdm2.

Обобщённая модель механизма контроля биогенеза рибосом, суммирующая данные по вовлечению рибосомных белков в сигнальный путь Mdm2-p53, к настоящему моменту выглядит следующим образом. В условиях, нарушающих правильную сборку рибосомных субчастиц, например при инактивации синтеза рРНК или при существенном дисбалансе рибосомных белков, в клеточном ядре образуется большой пул рибосомных белков, не вовлекаемых в сборку рибосомных субчастиц [136]. Рост уровня рибосомных белков приводит к возрастанию возможности взаимодействия отдельных рибосомных белков с убиквитинлигазой Mdm2. В рибосомных белках районы, участвующие во взаимодействии с Mdm2, расположены в разных частях белков [123, 130], но в Mdm2, область, с которой взаимодействуют рибосомные белки, как правило, перекрывается с его кислым доменом в центральной части белка [120, 122, 124, 127, 130] (Рисунок 9). Таким образом, можно полагать, что связывание рибосомных белков с Mdm2 происходит, в основном, за счёт электростатических взаимодействий между этими белками. Ассоциация с рибосомным белком не препятствует взаимодействию Mdm2 с белком p53, который контактирует с N-концевым доменом Mdm2, но снижает убиквитин-лигазную активность Mdm2 по отношению к p53 [122, 126, 127, 132], что, по-видимому, затрудняет диссоциацию белка p53 из комплекса с Mdm2.



Рисунок 9. Участки связывания рибосомных белков с убиквитин-лигазой Mdm2 [137]. Вверху схематически представлено расположение функциональных доменов белка Mdm2 на его первичной структуре. Кислый домен выделен жёлтым цветом. Фрагменты Mdm2, содержащие участки связывания указанных справа рибосомных белков, отмечены линиями с указанием номеров концевых аминокислотных остатков.

Вследствие этого, происходит снижение скорости убиквитинилирования белка р53, и, соответственно, скорости его деградации протеасомами, что приводит к общей стабилизации клеточного уровня, сопровождающегося p53 И повышению его усилением его трансактивационной активности. Связывание рибосомных белков с Mdm2, приводит к их убиквитинилированию самим Mdm2 [127, 128, 130], что, по-видимому, сопровождается далее диссоциацией убиквитинилированных белков из комплекса с Mdm2 и их деградацией. В результате клеточный уровень рибосомных белков снижается и основным субстратом Mdm2 вновь становится белок р53. Схематическое представление описанного процесса дано на Рисунке 10. Интересно отметить, что скорость деградации рибосомных белков, по-видимому, зависит от силы их сродства к Mdm2. Так, показано, что скорость Mdm2-зависимой деградации рибосомного белка S27 существенно ниже, чем соответствующая величина у его паралога, белка S27L, хотя оба белка отличаются только тремя аминокислотными остатками в их N-

концевых областях, участвующих во взаимодействии с Mdm2 [130]. По-видимому, эти остатки важны для связывания данных рибосомных белков с Mdm2.



Рисунок 10. Схематическое представление клеточного пути контроля сборки рибосомных субчастиц, вовлекающего сигнальный путь MDM2-p53. При ядрышковом стрессе, вызванном нарушением синтеза или процессинга пре-pPHK, либо сбоем в сборке или транспорте рибосомных субчастиц, в клеточном ядре происходит увеличение уровня рибосомных белков (гр), не вовлечённых в сборку рибосомных субчастиц. Избыточные рибосомные белки связываются с белком MDM2, вызывая диссоциацию белка p53 и прекращение его убиквитинилирования (Ub) белком MDM2. Это, в свою очередь, приводит к увеличению уровня белка p53 в клетке, что запускает механизмы ареста клеточного цикла и апоптоза. Связывание рибосомных белков с MDM2 сопровождается их убиквитинилированием и дальнейшей деградацией.

Пока точно не известно, сколько рибосомных белков способно взаимодействовать с Mdm2 и все ли рибосомные белки, связывающиеся с Mdm2, им убиквитинилируются. Вполне предсказуемо, что структурное разнообразие рибосомных белков должно находить своё отражение в способе их связывания с Mdm2, и, следовательно, в деталях механизма Mdm2опосредованной деградации рибосомных белков. Так, например, установлено, что хотя рибосомные белки L5 и L11 являются субстратами Mdm2 по отдельности, их совместное связывание с Mdm2 препятствует их деградации [138]. Кроме того, вполне вероятно, что многие рибосомные белки могут также являться субстратами других убиквитин-лигаз. Тем не менее, на основании имеющихся в настоящее время данных, можно утверждать, что, поскольку в поддержание баланса многих рибосомных белков вовлечен сигнальный путь Mdm2-p53, то повышение клеточного уровня даже одного из них способно повлиять на активность p53-зависимых генов и оказать существенное воздействие на клеточный рост.

Интересно отметить некоторые данные, касающиеся участия собственно белка р53 как транскрипционного фактора в регуляции экспрессии генов рибосомных белков. Оказывается, что р53, в зависимости от обстоятельств, может выступать и как трансактиватор, и как репрессор. Так, в работе [48] показано, что белок р53 способен активировать ген рибосомного белка S27L, являющийся непроцессированным псевдогеном родительского гена, кодирующего рибосомный белок \$27, по отношению к которому p53 выступает уже в качестве репрессора [130]. В другой работе было обнаружено, что активирование р53 при повышении уровня экзогенного рибосомного белка S25, приводит к подавлению транскрипции гена, кодирующего эндогенный белок S25 [132]. Авторам этой работы удалось даже предсказать in silico участок связывания фактора транскрипции p53 в промоторе гена белка S25 (нуклеотиды между положениями -893 и -861 от точки старта транскрипции +1). Экспрессия экзогенной ДНКконструкции, кодирующей p53 в клетках, нокаутных по генам белков p53 и Mdm2, снижала активность этого промотора [132]. К сожалению, в вышеупомянутых работах не было показано, распространяется ли ингибирующий эффект, оказываемый белком р53 на активность промоторов генов рибосомных белков S25 и S27, на промоторы генов каких-либо других рибосомных белков. Поэтому пока нет оснований судить о том, является ли обнаруженная связь между фактором p53 и промоторами генов рибосомных белков S25 и S27 уникальной или же фактор р53 может участвовать в глобальной регуляции экспрессии генов рибосомных белков. Кроме того, местоположение предсказанного участка связывания белка р53 в промоторе гена белка S25 (см. выше) настораживает, поскольку участки связывания других транскрипционных факторов расположены в промоторах генов рибосомных белков обычно на расстоянии не более чем 300 нуклеотидов от точки старта транскрипци (см. главу 1.2.1 и [43]).

Наконец, есть данные, указывающие на то, что в регуляции экспрессии гена белка p53 может участвовать рибосомный белок L26. Было показано, что этот белок может связываться с 5'-НТО мРНК, кодирующей p53, и тем самым способствовать эффективности её трансляции [128]. Исходя из этого, можно предположить, что повышение клеточного уровня рибосомного белка L23 обеспечивает активацию фактора p53 не только через взаимодействие этого белка с Mdm2 в клеточном ядре, но и путём усиления трансляции мРНК p53 в цитоплазме.

Таким образом, можно заключить, что биогенез рибосом является основополагающим клеточным процессом, который определяет жизнеспособность клетки и который строго контролируется механизмом, тесно связанным с центральным регулятором активности генов – белком р53. Следовательно, нарушения биогенеза рибосом должны находить своё отражение в развитии раковых заболеваний.

1.3.2 Заболевания, вызванные дисфункцией рибосомных белков

На сегодняшний день не известно заболеваний, которые были бы вызваны полным отсутствием в организме какого-либо из рибосомных белков из-за нарушений в его биосинтезе. Очевидно, такое событие настолько сильно сказывается на жизнеспособности клеток, что должно приводить к гибели организма в раннем эмбриогенезе. Тем не менее, у диплоидных организмов, которые имеют две копии генов рибосомных белков (см. раздел 1.2.1), при повреждении одной из копий может возникать гаплонедостаточнось, т. е. снижение функциональности продукта гена рибосомного белка, что может приводить к генетическим расстройствам.

Первое свидетельство того, что причина генетически наследуемого заболевания кроется в гене рибосомного белка, получено в 1999 году в работе [139], где был идентифицирован ген, ассоциированный с анемией Даймонда-Блэкфена (Diamond-Blackfan anemia) – заболеванием, характеризующимся нарушением функции клеток костного мозга. Генетические исследования пациентки, страдающей этим заболеванием, выявили реципрокную транслокацию, между хромосомами Х и 19, при этом точка транслокации в хромосоме 19 оказалась локализована в локусе 19q13 в гене рибосомного белка S19. Это позволило соотнести мутацию в гене RPS19 с возникновением анемии Даймонда-Блэкфена. Дальнейший поиск мутаций в этом гене у пациентов, страдающих этим заболеванием, выявил такие мутации, которые должны приводить к аминокислотным заменам в белке S19, сдвигам рамки считывания, преждевременной остановке трансляции мРНК или нарушениям сплайсинга пре-мРНК этого белка. В последующее десятилетие у больных анемией Даймонда-Блэкфена были выявлены мутации в генах других рибосомных белков, а именно: в генах белков S24 [140], L35a [141], S10 и S26 [142]. В настоящее время список генов рибосомных белков, мутации в которых ассоциированы или могут быть ассоциированы с этим заболеванием, пополняется всё новыми генами, которых насчитывается уже около полутора десятков. У более 50% пациентов, страдающих анемией Даймонда-Блэкфена, обнаружены дефекты в каком-либо из генов, имеющих отношение к этому заболеванию (напр., [111]).

Точный молекулярный механизм, приводящий к развитию анемии Даймонда-Блэкфэна, пока не установлен. С одной стороны, есть свидетельства того, что мутации в генах рибосомных белков S19 и S24 у пациентов с этим видом анемии вызывают нарушения в созревании 18S рРНК и биогенезе 40S рибосомных субчастиц [140, 143]. Более того, недавно было показано, что снижение уровня синтеза 18S pPHK происходит при деплеции белка S19 в клетке [144]. С другой стороны, непонятно, почему эти нарушения оказываются критичными именно в эритроидных клетках (предшественниках эритроцитов) костного мозга, дефект которых является отличительным признаком анемии Даймонда-Блэкфена. Можно было бы ожидать, что в клетках этого типа отсутствует или нарушен какой-либо из метаболических путей, позволяющих поддерживать баланс рибосомных белков, что в конечном итоге сказывается на развитии и дифференцировке этих клеток. Интенсивное изучение данного вопроса в последние годы (см. [145-147]) позволило сформулировать две гипотезы относительно молекулярных причин возникновения анемии Даймонда-Блэкфена [148]. Одна из гипотез заключается в том, что дисфункция или дефицит рибосом могут влиять на глобальный или мРНК-зависимый контроль трансляции, при этом некоторые специфические клетки или ткани могут быть более уязвимы к дисфункции/дефициту рибосом. Недавние исследования показали, что чувствительность некоторых тканей и клеток к дисфункции/дефициту рибосом включая ретикулоциты и тромбоциты, может быть связана с различиями в процессах трансляции в этих клетках, имеющими отношение к рециклингу рибосом. Другая гипотеза опирается на точку зрения о существовании "специализированных" рибосом и состоит в том, что рибосомы из разных тканей могут иметь разный состав белков и разный набор их посттрансляционных модификаций и что эта гетерогенность может иметь решающее значение для трансляции специфических мРНК. На сегодня пока нет данных, которые могли бы свидетельствовать в пользу какой-либо из этих гипотез.

Ещё одним заболеванием, связанным с нарушением экспрессии гена рибосомного белка, является так называемый синдром $5q^-$, который является независимым подтипом миелодиспластического синдрома, также характеризующегося нарушением дифференцировки эритроидных клеток. Установлено, что это заболевание возникает в результате спонтанной делеции участка в длинном плече хромосомы 5 ($5q^-$), содержащего 40 генов [149]. После такой делеции в геноме остаётся только одна аллель каждого из этих генов. Однако именно отсутствие одной копии гена рибосомного белка S14, входящего в число этих 40 делетированных генов, вызывает дефекты дифференциации эритроидных клеток [150]. Показано, что гаплонедостаточность гена рибосомного белка S14 в клетках TF-1 (линия клеток костного мозга человека) приводит к нарушениям в созревании 18S рРНК и в формировании 40S рибосомных субчастиц [150]. Таким образом, последствия нарушения экспрессии одного из

аллелей гена рибосомного белка делают симптомы синдрома 5q⁻ похожими на симптомы анемии Даймонда-Блэкфена. Другие проявления синдрома 5q⁻, такие как увеличение числа тромбоцитов и дефекты мегакариоцитов, связаны, по-видимому, с дефицитом микроРНК miR-145 и miR-146a, закодированных в районе гена, делетированном при этом заболевании [151].

В недавней работе [152] была выявлена связь между дисфункцией рибосомного белка L10, вызванной миссенс-мутацией в его гене и сопряжённым с X-хромосомой генетическим нарушением развития нервной системы, приводящим к микроцефалии. Обнаруженная мутация характеризуется замещением остатка лизина в положении 78 этого белка на остаток глутаминовой кислоты, что, вероятно, существенно влияет на его физико-химические свойства. Чтобы выяснить последствия дисфункции белка L10 на организм, авторы изучили эффекты подавления экспрессии его гена и возникновения мутаций в нём на рыбах Danio rerio. Было показано, что уменьшение уровня белка L10 сопровождается уменьшением размеров головы у эмбрионов и приводит к падению уровня трансляции в клетках головного мозга и их апоптозу, а одиночная мутация K78E в белке L10 приводит к таким же фенотипическим проявлениям, что и делеция гена этого белка. На основании того, что белок L10 находится в рибосоме вблизи пептидилтрансферазного центра, авторы предположили, что данная мутация приводит к нарушению каталитической функции рибосом [152]. Интересно, что ранее мутации в гене рибосомного белка L10 (L206M и H213Q) находили у некоторых больных аутизмом [153]. Хотя авторы этой работы прямо не связывали данные мутации с причиной болезни, в свете результатов более поздней работы [152] вполне ожидаемо, что дисфункция белка L10 может быть ассоциирована с нарушением развития нервной системы и с некоторыми случаями аутизма.

Следует упомянуть, что группа заболеваний, характеризующихся дефектами биосинтеза рибосомных субчастиц и нарушениями в работе рибосом, получила название рибосомопатий [154]. Однако к этой группе относятся не только те заболевания, которые связаны с гаплонедостаточностью рибосомных белков вследствие мутаций в их генах, но также расстройства, вызванные наследственной дисфункцией некоторых факторов, участвующих в сборке рибосомных субчастиц. Понятно, что в последнем случае симптоматика таких генетических расстройств напоминает симптоматику гаплонедостаточности рибосомных белков [154].

Наконец, недавно была установлена связь между дефектом гена рибосомного белка и одним из редких генетических заболеваний – врожденной аспленией, характеризующимся отсутствием селезенки при рождении без каких-либо других дефектов развития. У 18-ти из 33-х пациентов с врождённой аспленией в восьми семьях были обнаружены мутации в одной аллели гена рибосомного белка SA [155]. Одна из мутаций была нонсенс-мутацией, приводящей к

замене кодона глутамина на стоп-кодон (Q9X), ещё одна мутация являлась следствием дупликации 5-нуклеотидного звена, приводящей к сдвигу рамки считывания (P199SfsX25), в пяти случаях были обнаружены миссенс-мутации, приводящие к заменам аминокислотных остатков (T54N, L58F, R180W, R180G и R186C). Авторы работы [155] пришли к заключению, что причиной врождённой асплении является гаплонедостаточность рибосомного белка SA. Интересно, что в отличие от рассмотренных выше заболеваний, гаплонедостаточность белка SA не приводила к заметным дефектам в созревании 18S рРНК в клетках пациентов с гетерозиготными мутациями в гене этого белка [155], т. е. указанное заболевание не является рибосомопатией. Это наводит на мысль, что мутации в рибосомном белке SA, вызывающие нарушение развития селезёнки, могут отражаться на вовлечении этого белка во внерибосомные функции (см. раздел 1.6).

Интересно отметить, что кроме мутаций в генах рибосомных белков, приводяцих к тяжёлым генетическим расстройствам, найдена наследственная мутация, присутствующая в гене рибосомного белка, но не сказывающаяся катастрофическим образом на развитии и жизнеспособности организма. В работе [156] показано, что у пациентов с наследственным симплексным гипотрихозом, характеризующимся выпадением волос без характерных изменений волосяного стержня, присутствует мутация в гене рибосомного белка L21, вызывающая замену R32Q в продукте гена. По-видимому, эта мутация не изменяет существенным образом свойств белка, связанных с его участием в трансляции в качестве компонента рибосомы, а, возможно, затрагивает какую-то из его внерибосомных функций, неизвестную в настоящее время.

В завершении настоящего раздела особо следует отметить связь между мутациями в генах рибосомных белков и канцерогенезом. Понятно, что неконтролируемая пролиферация клеток, характеризующая канцерогенез, может иметь различные генетические причины. Однако тесная регуляторная связь рибосомных белков с онкогеном Mdm2 и белком p53 (см. раздел 1.3.1) позволяет ожидать, что в ряде случаев за развитие рака могут быть ответственны мутации в генах рибосомных белков (для подробного ознакомления с этой темой см. обзор [157]). Действительно, показано, что пациенты с рибосомопатиями, например, анемией Даймонда-Блэкфена (см. выше), предрасположены к лейкозу [154]. В числовом выражении доля мутаций, присутствующих в генах рибосомных белков у больных некоторыми видами рака, может оказываться значительной. Так, например, секвенирование экзомов у 67-ми больных острым лимфобластным лейкозом выявило мутации в гене белка L10 (в основном, мутацию R98S) в 8.2% случаев, причём преимущественно у детей [158]. Кроме того, были обнаружены разного сорта мутации в гене рибосомного белка L5 примерно в 2% случаев в равной степени у детей и взрослых. В настоящее время идёт интенсивный поиск возможных путей исправления

последствий DBA-связанных мутаций, и одним из вариантов является использование технологии сплайсосома-опосредованного транс-сплайсинга в редактировании РНК в гематопоэтических стволовых клетках (напр., [159]).

Таким образом, последствия изменений в генах рибосомных белков, как правило, приводят к очень тяжёлым заболеваниям, которые, по-видимому, являются следствием нарушения клеточных процессов биосинтеза рибосомных белков и сборки рибосомных субчастиц в клетках. Кроме того, нарушения в работе белоксинтезирующего аппарата клетки, вызванные изменениями в структуре рибосомных белков, также должны негативно сказываться на жизнедеятельности клетки и всего организма.

1.4 Вовлечение рибосомных белков в процесс трансляции

Будучи конструктивными компонентами рибосомы, рибосомные белки непосредственно вовлекаются в процесс трансляции, как формируя и поддерживая структуру рибосомы в целом, так и участвуя в организации функциональных центров рибосомы и её ассоциации с различными трансляционными факторами и лигандами. Механизм биосинтеза белка на рибосомах эукариот и, в частности, млекопитающих активно изучается в настоящее время, и современный взгляд на участие рибосомных белков в этом процессе подробно представлен в некоторых недавних обзорах (напр., [160]). В настоящей главе обзора литературы основное внимание уделено различным проявлениям участия рибосомных белков в трансляции специфических мРНК, в том числе геномных РНК некоторых вирусов, а также роли посттрансляционных модификаций рибосомных белков в трансляционной активности рибосом.

1.4.1 Участие рибосомных белков в трансляции специализированных клеточных матриц и её

регуляции

Один из ярких примеров участия рибосомных белков в регуляции трансляции специфичных мРНК был представлен в работах группы Пола Фокса [161, 162], где авторы описали механизм регуляции трансляции мРНК белка церулоплазмина. Этот белок обычно синтезируется и секретируется цитокин-стимулированными макрофагами в области воспаления. Было обнаружено, что в клетках линии U937 (лейкозных моноцитах) в ответ на активацию интерфероном гамма происходит индукция трансляции мРНК церулоплазмина, однако через 16 ч после такой индукции уровень трансляции этой мРНК падал вследствие блокирования (сайленсинга) её трансляции [161]. Показано, что блокирование трансляции мРНК церулоплазмина происходит только при наличии условий и белковых факторов,

обеспечивающих её циркуляризацию в полисомах (в частности, таких как фактор инициации трансляции eIF4G, 3'-концевая poly(A)-последовательность и белок PABP, связывающийся с этой последовательностью) [163]. Кроме того, регуляция этого процесса зависит от особого 29звенного элемента в её 3'-HTO, получившего название GAIT (от англ. INF-gamma activated inhibitor of translation – ингибитор трансляции, активируемый интерфероном гамма) [164]. Регулятором GAIT-элемента оказался рибосомный белок L13A, который, как установлено, способен связываться с этим элементом и подавлять трансляцию in vitro мРНК, содержащую такой элемент [162]. Примечательно, что указанные свойства были присущи белку L13a только после его фосфорилирования, которое наблюдали после 8-24 ч активации клеток интерфероном гамма, причём фосфорилированный L13A был обнаружен только в цитозольной фракции, тогда как уровень нефосфорилированного L13A непосредственно в рибосомах снижался [162]. На основании своих наблюдений авторы предположили, что фосфорилирование рибосомного белка L13A в рибосомах, которое происходит через 8-16 ч после индукции трансляции мРНК церулоплазмина, способствует его диссоциации из 60S рибосомных субчастиц и связыванию с GAIT-элементом мРНК, что приводит к блокированию её трансляции [162]. Впоследствии было обнаружено, что фосфорилирование белка L13A происходит по остатку Ser77 и такой белок связывается с GAIT-элементом мРНК в составе комплекса с тремя другими белками – GAPDH, NSAP1 и фосфорилированной формой глутамил-пролил-тРНК синтетазы (EPRS) [165]. Показано, что ингибирующий эффект белка L13A при связывании с GAIT-элементом мРНК церулоплазмина обеспечивается через его взаимодействие с фактором eIF4G, ассоциированным с 5'-НТО этой мРНК, препятствующее формированию 48S предынициаторного комплекса [166].

Спорным моментом в представленном выше механизме блокирования трансляции мРНК церулоплазмина является предположение, что источником фосфорилированного белка L13A являются зрелые 60S рибосомные субчастицы, а, например, не свободный белок L13A. В дополнение к данным работы [162] необходимы прямые доказательства диссоциации белка L13A из 60S рибосомных субчастиц вследствие его фосфорилирования, поскольку других примеров покидания рибосомными белками зрелых рибосомных субчастиц вследствие фосфорилирования этих белков, насколько нам известно, пока не описано. Сложно представить, что для блокирования трансляции мРНК, составляющей небольшую долю от суммарного количества клеточной мРНК, требуется фосфорилирование белка L13A в большей части 60S субчастиц. По-видимому, для того чтобы в какой-то мере снять это сомнение, в этой же группе была выполнена работа по изучению эффектов, возникающих при снижении уровня белка L13A в клетках с помощью трансдукции соответствующими лентивирусными векторами, экспрессирующими малые образующие шпильки РНК, направленные на подавление синтеза этого белка. Удивительно, снижение уровня белка L13A не оказало заметного влияния ни на общий уровень клеточного биосинтеза белка, ни на биогенез 60S рибосомных субчастиц, ни на сборку 80S рибосом или полисом, ни на точность трансляции [167]. С другой стороны, с помощью бицистронных конструкций было показано, что такие клетки обладают пониженной способностью транслировать мРНК белков p53, p27 и SNAT2, содержащие по некоторым данным [168-171] внутренний сайт посадки рибосомы (т.н. IRES-элемент, от англ. Internal Ribosome Entry Site). Следует отметить, что IRES-элементы, представляющие собой высокоструктурированные участки мРНК, позволяющие осуществлять их трансляцию по кэпнезависимому пути, изначально были открыты в составе 5'-НТО геномных РНК некоторых вирусов, а впоследствии подобные элементы стали обнаруживать также в мРНК различных клеточных белков (напр., [172]). Однако наличие IRES-элементов в клеточных мРНК в настоящее время является спорным вопросом, поскольку доказательство IRES-зависимого механизма трансляции требует чётких критериев, часто отсутствующих в работах по определению клеточных IRES-элементов, а кэп-независимая инициация трансляции отдельных мРНК не всегда означает, что она идёт по IRES-зависимому пути [173]. Поэтому к данным работы [167] о влиянии белка L13A на трансляцию мРНК белков p53, p27 и SNAT2, пердположительно содержащих IRES-элемент, следует относиться с осторожностью, тем более, что по данным этой же работы снижение уровня белка L13A не сказывалось на трансляции IRES-элементов, присутствующих в геномных РНК вируса гепатита С (ВГС) и вируса паралича сверчка (CrPV). Интересно, что в другой работе деплеция гомологов белка L13A в клетках дрожжей приводила к замедлению роста клеток и их гибели [174], что является ещё одним примером уже приводимых ранее различий в функциональной значимости между рибосомными белками млекопитающих и низших эукариот. Авторы работы [167] заключили, что, повидимому, в ходе эволюции рибосомный белок L13A утратил своё значение в качестве рибосомного белка и приобрёл функции, не связанные со сборкой 60S рибосомных субчастиц и участием в трансляционной активности рибосом, используя при этом 60S субчастицы в качестве депо.

Если регуляторная функция рибосомного белка L13A в трансляции специфической мPHK осуществляется через его предположительную диссоциацию из рибосомы и связывание с регуляторным элементом этой мPHK, то у других рибосомных белков аналогичные функции могут реализоваться иным путём. Так, для рибосом различных эукариотических организмов (например, для *S. cerevisiae, Dictiosltelium discoideum, Arabidopsis thaliana* и *D. melanogaster*) имеются данные о связи экспрессии некоторых генов с гетерогенностью белкового состава рибосом, что позволяет ожидать регуляторных функций для рибосомных белков, находящихся в составе рибосом (напр., [175]). Следует отметить, что гетерогенность белкового состава рибосом является составным элементом явления гетерогенности рибосом в целом, на котором

базируется гипотеза "рибосомного фильтра" [176]. Эта гипотеза предполагает, что регуляция экспрессии генов на уровне трансляции может осуществляться рибосомами в зависимости от их состава и модификации их компонентов. Такие рибосомы, имеющие уникальный состав или специфических мРНК, называть нацеленные на трансляцию предложено специализированными рибосомами" [175]. Однако примеров участия рибосомных белков в "специализации" рибосом млекопитающих пока накоплено мало. В качестве одного такого примера можно рассмотреть работу [112], где авторы задались целью выяснить генетическую причину расстройств в формировании скелета, наблюдающихся у линий мышей с доминантными мутациями Ts, Tss и Rbt. Оказалось, что у всех таких мышей присутствовали те или иные дефекты в гене рибосомного белка L38 (eL38), которые делали его нефункциональным и приводили в итоге к гаплонедостаточности этого белка. У трансгенных мышей этих линий с искусственно восстановленной работой указанного гена, расстройств в формировании скелета не наблюдали. Эти результаты выглядели необычными, поскольку известно, что у мышей ключевыми регуляторами формирования морфологии осевого скелета являются 39 гомеобоксных (Hox) генов [177]. В последующих опытах было выявлено, что дефекты в гене рибосомного белка L38, в целом, не влияют на общий уровень трансляции в клетках спинных сегментов и нейронной трубки мышиных эмбрионов с мутацией Ts, но приводят к существенному снижению уровня трансляции мРНК некоторых генов семейства *Hox.* Подобную картину наблюдали также в мезенхимальных стволовых клетках, нокаутных по гену рибосомного белка L38. В то же время, в клетках мышей с дефектами в генах некоторых других рибосомных белков уровень трансляции мРНК генов семейства Нох соответствовал общему уровню трансляции. Таким образом, было установлено, что рибосомный белок L38 вовлечён в тканеспецифичную регуляцию трансляции мРНК генов семейства Нох. Чтобы показать, что белок L38 проявляет эту функцию в составе рибосомы (а не при связывании в изолированном состоянии с 5'- или 3'-НТО специфичных мРНК), авторы с помощью иммуноблотинга продемонстрировали, что в клетках мышиных эмбрионов белок L38 присутствует в рибосомах и полисомах, но не в цитозоле. Однако последнее кажется маловероятным, поскольку рибосомные белки, как и все клеточные белки (за исключением митохондриальных белков), синтезируются в цитозоле и, следовательно, должны там присутствовать, а результаты иммуноблотинга, показавшие отсутствие белка L38 в цитозоле, могут быть объяснены недостаточной чувствительностью антител.

Полученные в работе [112] данные явились первым примером существования т.н. "специализированных рибосом", обнаруженных у млекопитающих. Более того, установив, что уровни экспрессии генов разных рибосомных белков в различных типах тканей эмбрионов мышей могут отличаться на порядок, авторы данной работы выдвинули смелую гипотезу об участии отдельных рибосомных белков в развитии различных органов в эмбриогенезе млекопитающих через регуляцию трансляции специфичных групп мРНК. Однако осталось не ясным, в каком состоянии, изолированном или в составе рибосомы, эти белки могли бы учавствовать в эмбриогенезе. Вывод об участии рибосомо-связанного белка L38 в регуляции трансляции мРНК гомеобоксных генов также выглядит не вполне доказанным, поскольку белок L38 мог вовлекаться в трансляцию мРНК генов семейства *Hox*, будучи в изолированнанном состоянии. В этом случае он мог бы выступать как транс-фактор, связываясь с цисрегуляторным элементом, присутствующим в этих мРНК. Поиск регуляторного элемента в 5'-НТО мРНК гомеобоксных генов, трансляция которых зависит от рибосомного белка L38, был предпринят в работе [178] с использованием бицистроных репортерных конструкций, содержащих между цистронами участки 5'-НТО мРНК гомеобоксных генов. Трансляция соответствующих репортерных мРНК в мезенхимальных стволовых клетках мыши выявила 2 последовательностей мРНК. инициацию типа в влияющих на ИХ трансляции. Последовательность первого типа находилась в 3'-концевом участке 5'-НТО мРНК гомеобоксных генов, она позволяла инициировать трансляцию репортерных мРНК независимо от 5'-кэпа, действуя как IRES-элемент. Последовательность второго типа, расположенная в 5'концевом участке 5'-НТО, действовала как ингибитор кэп-зависимой трансляции, ТІЕ-элемент (от англ. translation inhibitory element). Поскольку активность последовательности первого типа была снижена в клетках с гаплонедостаточностью рибосомного белка L38, в отличие от клеток с его нормальным уровнем, авторы работы [178] заключили, что именно этот участок мРНК отдельных гомеобоксных генов ответственен за их белок L38-зависимую трансляцию, осуществляемую в условиях, при которых ТІЕ-элемент также активен. Таким образом, по мнению авторов этой работы [178], полученные данные открывают новую систему взглядов на контроль регуляции экспрессии генов и развития организмов, опосредованный рибосомами. Между тем, следует отметить, что часть доказательств, приводимых в вышеупомянутой работе, не свободна от критики, представленной, например, в комментариях к этой работе на веб-сайте PubMed (см. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25409156/#comments). Основные замечания в этих комментариях связаны с отсутствием контролей, требуемых при работе с бицистронными конструкциями, что делает результаты некоторых экспериментов, выполненных в работе [178], недостоверными, а часть выводов ставит под сомнение.

1.4.2 Пост-трансляционные модификации рибосомных белков, влияющие на эффективность

трансляции

Протеомные исследования показывают, что рибосомные белки в составе рибосом несут довольно мало пост-трансляционных модификаций [179, 180], однако это не противоречит тому, что белки могут подвергаться модификации в составе рибосомы при регуляции трансляции. Одним из первых белков, чья модификация в составе рибосомы, как ожидалось, должна была иметь функциональное значение, являлся рибосомный белок S6. Было показано, что этот белок способен фосфорилироваться по остаткам серина в положениях 235, 236, 240, 244, и 247 и что за эти модификации отвечают киназы S6K1 и S6K2 (напр., [67]). Долгое время фосфорилированию белка S6 этими киназами приписывали регуляторную роль в трансляции 5'-ТОР-содержащих мРНК и в общей эффективности белкового синтеза. Однако опыты, поставленные на линиях мышей, нокаутных по генам указанных киназ и с мутированным геном белка S6, продуцирующего неспособный к фосфорилированию белок, опровергли эти суждения [67]. Впоследствии было показано, что помимо киназ S6K1 и S6K2, киназа DAPK (от англ. death-associated protein kinase – киназа, ассоциированная с апоптозом) также способна модифицировать белок S6 в составе 40S субчастицы по остатку S235 [181]. Было обнаружено, что киназа DAPK снижает эффективность трансляции в бесклеточной системе синтеза белка на основе лизата ретикулоцитов кролика. Однако уровень модифицированного белка S6 в этом лизате при этом возрастал, что, по мнению авторов [181], свидетельствует в пользу существования пути, обеспечивающего регуляцию трансляционной активности через фосфорилирование белка S6 киназой МАРК. Таким образом, играет ли фосфорилирование белка S6 роль в регуляции трансляции – пока не ясно.

Недавно было обнаружено, что рибосомные белки L8 (uL2), L27A (uL15) и S23 (uS12) в составе рибосом гидроксилированы [182, 183]. За гидроксилирование этих белков отвечают специфичные оксигеназы, а именно: оксигеназа NO66 гидроксилирует остаток His216 в белке L8, оксигеназа MINA53 – остаток His39 в белке L27A [182], а оксигеназа OGFOD1 – остаток Pro62 в белке S23 [183]. В цитируемых работах было отмечено, что аминокислотные остатки в белках, несущие эти модификации, расположены вблизи функциональных центров рибосомы, что давало повод ожидать функцинальной значимости таких модификаций. Однако функциональные исследования роли гидроксилирования рибосомных белков млекопитающих проведены пока только с белком S23 [183]. Интересно, что одновременно с открытием гидроксилирования рибосомного белка S23 человека гидроксилирование гомологичных белков обнаружено также у *D.melanogaster* [184] и дрожжей [185], что указывает на важность данной модификации для всех эукариот. Оказалось, что во всех указанных организмах за гидроксилирование соответствующих остатков пролина в рибосомных белках отвечают гомологичные гидроксилазы, однако в отличие от белков человека и дрозофилы, модифицированный пролин в белке S23 дрожжей несёт две гидроксильные группы. Поскольку

белок S23 (S12 у эубактерий) лежит в декодирующем центре рибосомы и, следовательно, участвует в поддержании точности трансляции [186, 187] и точном определении стоп-кодона, то авторы [183-185] предположили необходимость гидроксилирования белка S23 в поддержании точности терминации трансляции у эукариот. Используя атомарную структуру эубактериальной рибосомы в комплексе с мРНК и тремя тРНК, авторы [185] провели моделирование положения гидроксильной группы на аминокислотном остатке в белке S12, соответствующем модифицированному остатку Pro62 в белке S23. Таким образом, было установлено, что эта группа должна взаимодействовать с фосфатной группой мРНК, между последним нуклеотидом кодона в А-сайте рибосомы (положение +3) и нуклеотидом, следующим за ним (положение +4). Функциональные тесты, выполненные на рибосомном белке S23 дрожжей в этой же работе [185], выявили роль гидроксилирования S23 в терминации трансляции. Оказалось, что в клетках, где белок S23 не был гидроксилирован, точность узнавания стоп-кодонов либо уменьшалась, либо увеличивалась, в зависимости от нуклеотида, непосредствеено следующего за стоп-кодоном, А или С соответственно.

Что касается исследований функциональной значимости гидроксилирования белка \$23 млекопитающих, то такие опыты были выполнены в работе [183] на клетках эмбрионов мыши с использованием бицистронных конструкций с различными стоп-кодонами, помещёнными между цистронами. Было установлено, что в отсутствие гидроксилирования белка S23 эффективность терминации на всех стоп-кодонах оказывается в 3 раза выше, чем в опытах с гидроксилированным белком. Снижение уровня гидроксилирования белка S23 в клетках с пониженным содержанием соответствующей оксигеназы не сопровождалось преимущественным накоплением немодифицированного белка ни в 40S субчастицах, ни в 80S рибосомах, что свидетельствовало об отсутствии роли этой модификации в сборке малой субчастицы и инициации трансляции. На основании своих наблюдений авторы предположили, что гидроксилирование белка S23 оксигеназой OGFOD1 необходимо для модуляции эффективности трансляции.

Следует отметить, что отмеченное выше расположение гидроксильной группы на модифицированном остатке пролина белка S23 вблизи фосфатной группы между нуклеотидными остатками мРНК в положениях +3 и +4 подразумевает роль данной модификации не только в декодировании стоп-кодонов, но и в декодировании смысловых кодонов. Поэтому конкретную роль гидроксилированного остатка пролина рибосомного белка S23 в механизме трансляции, как и то, вовлечены ли в модуляцию трансляции гидроксильные остатки в белках L8 и L27A, ещё предстоит выяснить.

В заключение настоящего раздела следует упомянуть ещё одну недавнюю работу, касающуюся влияния фосфорилирования рибосомного белка S15 (uS19) на трансляцию [188].

71

Авторы этой работы исследовали субстраты киназы LRRK2, которая является мутированной у большого числа пациентов с болезнью Паркинсона. В частности, известно, что замена G2019S в этой киназе делает её гиперактивной, что вызывает нейродегенерацию культурированных нейронов. В цитируемой работе было установлено, что как минимум 16 белков 60S рибосомной субчастицы и 3 белка (S11, S15 и S27) 40S субчастицы являются субстратами киназы LRRK2. Замены остатков треонина, подвергающихся фосфорилированию в белках S11 (Т28А, Т46А, T54A) и S15 (T136A), показали, что только замена T136A в белке S15 препятствует нейродегенерации клеток с мутантной формой киназы LRRK2. Далее, изучая экспрессию в клетках бицистронных репортёрных конструкций, авторы [188] выяснили, что гиперфосфорилирование рибосомного белка S15 по остатку T136 мутантной формой киназы LRRK2 сопряжено с повышением общего уровня клеточной трансляции как по кэп-зависимому, так и по кэп-независимому (IRES-опосредованному) механизмам. Напротив, если клетки продуцировали мутантную форму белка S15(T139A), не способную к фосфорилированию, то в таких клетках наблюдали пониженную трансляционную активность. Известно, что С-концевой пептид белка S15 (включая остаток T136) расположен в мРНК-связывающем центре рибосомы вблизи кодона, связанного в А-сайте [13], поэтому нельзя исключить, что фосфорилирование белка S15 в составе рибосомы является частью клеточного механизма, регулирующего трансляцию. Однако способен ли белок S15 фосфорилироваться непосредственно в составе рибосомы, в работе [188] не показано, и поэтому механизм регуляции трансляции через фосфорилирование этого белка ещё предстоит установить.

1.5 Участие рибосомных белков в биогенезе вирусов

Имея высокий положительный заряд и, вследствие этого, обладая возможностью связываться с различными видами РНК, рибосомные белки способны взаимодействовать с РНК, чужеродными для клетки, например, с РНК вирусного происхождения. Многие вирусные РНК имеют характерные структурные элементы, критически необходимые для биогенеза соответствующих вирусов, для которых взаимодействие с рибосомными белками, изолированными или в составе рибосомных субчастиц, является важнейшим условием их жизненного цикла. В этом разделе рассмотрены наиболее показательные примеры таких взаимодействий.

1.5.1 Взаимодействие вирусных РНК с рибосомными белками в изолированном состоянии
Одним из наиболее изученных примеров взаимодействия свободного (изолированного) рибосомного белка с вирусной РНК является участие рибосомного белка L22 в связывании с одной из РНК, экспрессируемой вирусом Эпштейна-Барр (EBV). Этот вирус относится к ДНКсодержащим вирусам семейства Herpesviridae (герпесвирусы), и в настоящее время им инфицировано свыше 90% населения планеты [189]. Хотя в большинстве инфицированных клеток EBV находится в латентном состоянии, тем не менее, он является сильнодействующим митогенным и антиапоптическим агентом для В-лимфоцитов, который ассоциируют с возникновением нескольких различных типов опухолей человека [189]. Вирусный геном EBV кодирует шесть ядерных антигенов, три мембранных белка и две небольшие РНК [189], с одной из которых, как было найдено, в инфицированных клетках способен связываться рибосомный белок L22 [190, 191]. Эта РНК, названная EBER1 (от англ. EBV encoded RNA 1 - РНК 1, кодируемая EBV), синтезируется в клетке РНК-полимеразой III и представляет собой транскрипт длиной 167 н. с выраженной вторичной структурой, образующей несколько шпилечных доменов. Конкретная роль EBER1 в процессе патогенеза вируса пока не определена, хотя и показано, что уровень её экспрессии зависит от статуса жизненного цикла EBV [189].

В ранних работах было установлено, что в состав рибонуклеопротеида, образуемого EBER1 в клетках, инфицированных EBV, действительно входит рибосомный белок L22, причём в комплексе с этой РНК может находиться до половины от суммарного количества этого белка в клетке [190, 191]. Авторы [190] также отметили, что связывание белка L22 с EBER1 происходит в нуклеоплазме, где этот белок, как известно (см. выше), вовлекается также в сборку 60S рибосомных субчастиц, и, соответственно, его связывание с EBER1 не сопряжено с диссоциацией белка L22 из рибосом в цитоплазме. Интересно, что белок L22, как оказалось, может связываться независимо с тремя различными участками EBER1, расположенными в шпильках, формирующих домены I, III и IV этой РНК [192], причём ассоциация EBER1 с белком L22 может способствовать тонкой настройке её активности. Так, было установлено, что белок L22 конкурирует за один и тот же участок связывания в EBER1 (предположительно в домене IV) с проапоптотической протеинкиназой R (PKR) [193], которая, вследствие её активации связыванием с двуцепочечными РНК, способна фосфорилировать ряд субстратов и ингибировать клеточный рост. Таким образом, рибосомный белок L22, связываясь с EBER1, предотвращает ассоциацию киназы PKR с этой вирусной PHK и, как следствие, её ингибирование [193]. На основании этих наблюдений авторы указанной работы предположили, что ассоциация белка L22 с EBER-1 в EBV-инфицированных клетках может смягчать биологические эффекты этой вирусной РНК.

Кроме EBV, по-видимому, существуют другие вирусы, чьи РНК способны взаимодействовать с рибосомным белком L22. Так, в работе [194] для поиска белков, способных связываться с 3'-НТО гРНК ВГС было выполнено скринирование библиотек кДНК человека с использованием метода дрожжевой трёхгибридной системы. Полученные данные показали, что рибосомные белки L22, L3, S3, а также mL3 (митохондриальный гомолог белка L3) обладают сродством к 98-звенному 3'-концевому участку вирусной РНК (так называемый участок З'Х). Авторы указанной работы [194] предположили, что эти белки могут быть вовлечены в репликацию, трансляцию и/или упаковку геномной РНК ВГС. Действительно, опыты на клетках Huh7 (клетки гепатоцеллюлярной карциномы) по трансляции репортерных бицистронных конструкций, содержащих последовательности РНК ВГС, а именно 5'-НТО (включая IRES-элемент) и 3'-НТО (вместе с участком 3'Х), фланкирующие второй цистрон, показали, что в присутствии белка L22 трансляция второго цистрона усиливается. Более того, расчёт вторичной структуры участка З'Х РНК ВГС выявил его сходство со вторичной структурой фрагмента EBER1 EBV, включающего домены II, III и IV, указывая на то, что белок L22 обладает сродством к конкретному структурному элементу, присутствующему в обеих РНК. Авторы цитируемой работы не выяснили, каким образом белок L22 способен увеличивать уровень трансляции матриц, содержащих IRES и 3'Х элементы гРНК ВГС, но предположили, что одним из объяснений наблюдаемого эффекта могло бы быть участие белка L22 в стабилизации таких РНК.

Наконец, следует упомянуть также работу [195], где показано, что при инкубации IRES ВГС в цитоплазматическом экстракте клеток Huh7 с ним специфично связываются рибосомные белки SA, S3, S5, S7 и S18 (uS13). Эти данные позволили предположить, что IRES-элемент ВГС способен связываться с рибосомными белками и вне рибосомы. Однако клеточный экстракт, использованный в этой работе, не был очищен от рибосомных субчастиц, поэтому полученные результаты нельзя однозначно интерпретировать в пользу связывания IRES ВГС с индивидуальными рибосомными белками. По крайней мере, некоторые из них могли взаимодействовать с IRES ВГС, будучи в составе 40S субчастицы рибосомы.

1.5.2 Взаимодействие вирусных РНК с рибосомными белками в составе рибосомных субчастиц

Как следует из названия, IRES-элементы позволяют осуществлять инициацию трансляции некэпированных геномных РНК вирусов по специальному механизму, без участия ряда инициаторных факторов. Вирусные IRES-элементы, согласно их пространственной структуре и механизму действия, принято классифицировать на три группы: IRES-элементы семейств пикорнавирусов (*Picornaviridae*), флавивирусов (*Flaviviridae*) и дицистровирусов

(*Dicistriviridae*), причём IRES-элементы пикорнавирусов подразделяют ещё на 5 типов (классифицированные ранее типы I-IV [196] и недавно открытый тип V [197]), из которых тип IV похож на IRES-элемент флавивирусов. В этой части обзора основное внимание будет уделено взаимодействию с белками 40S субчастицы рибосомы IRES-элемента флавивирусов (на примере IRES BГС), использующего наименьший набор инициаторных факторов при инициации трансляции вирусной PHK по сравнению с IRES-элементами других опасных для млекопитающих вирусов [198, 199].

IRES-элемент геномной РНК ВГС, так же как и похожие на него IRES-элементы РНК вирусов BVDV (bovine viral diarrhea virus), CSFV (classical swine fever virus), PTV (porcine teschovirus) и некоторых других (подробнее о таких вирусах см. [198-201]), имеет сравнительно небольшую длину – около 330 н. Специфическая последовательность нуклеотидов придаёт этой цепи РНК жёсткую вторичную структуру, формирующую ряд двуспиральных участков, шпилек и псевдоузел. Структуру IRES ВГС подразделяют на три домена (домены II – IV), внутри которых выделяют отдельные субдомены (Рисунок 11), причём домен II обладает значительной конформационной подвижностью относительно остальной части структуры [202]. Такой IRESэлемент, связываясь с 40S субчастицей рибосомы, позиционирует старт-кодон AUG в районе, соответствующем Р-участку, что позволяет вирусу инициировать трансляцию его полицистронной РНК без сканирования нуклеотидной последовательности и сопряженного с ним гидролиза ATP с участием только факторов eIF2 и eIF3 [7, 203].

Работы по изучению взаимодействия IRES ВГС с белками в составе 40S субчастицы рибосомы удобнее рассматривать в исторической перспективе, так как такое изложение позволяет отразить многообразие экспериментальных подходов, использованных в данном направлении. История изучения механизма функциональной активности IRES ВГС насчитывает уже более 25 лет. Поскольку для образования бинарного комплекса с 40S субчастицей рибосомы IRES ВГС не требуются никакие вспомогательные факторы, легко было предположить, что правильное позиционирование этого IRES-элемента на субчастице обеспечивается взаимодействием его структурных доменов с определёнными рибосомными белками на поверхности субчастицы. В одной из ранних работ [207] с использованием различных мутантных форм IRES ВГС была изучена роль доменов и субдоменов IRES в связывании с 40S рибосомными субчастицами и фактором инициации трансляции eIF3. Эти исследования показали, что домен II практически не вносит вклада в сродство IRES ни с 40S субчастицами, ни с фактором (несмотря на то, что он нужен для функциональной активности IRES ВГС [205]), а субдомен IIIb необходим только для связывания IRES с фактором eIF3. Критически важной для связывания с 40S субчастицами оказалась структура основного стебля домена III вместе с субдоменами IIIa, IIIc, IIId и IIIe.



Рисунок 11. Вторичная структура IRES-элемента ВГС согласно [204-206]. Домены и субдомены обозначены римскими цифрами, старт-кодон подчёркнут.

Первые данные о контакте IRES BГС с конкретным рибосомным белком были получены в группе проф. И.Н. Шатского (МГУ). В частности, было показано, что при УФ-облучении бинарного комплекса 40S субчастиц рибосом с IRES BГС, он образует сшивку с рибосомным белком, который сначала был ошибочно идентифицирован как белок S9 [7], а впоследствии, по уточнённым данным, оказался белком S5 [5]. В работе [6] для идентификации рибосомных белков, контактирующих с IRES BГС, было использовано производное соответствующего PHKтранскрипта со статистически введенными остатками 4-тиоуридина, которые, как известно, способны образовывать сшивки практически нулевой длины с белками и PHK, индуцируемые длинноволновым ("мягким") УФ-светом [208-210]. Однако с тиоуридин-содержащим IRESэлементом сшивались только рибосомные белки, а именно S2, S3, S10, S15, S16/S18 и S27. При этом такой же набор сшитых белков был обнаружен и при использовании аналогичных производных мутантных форм IRES-элемента, в которых был делетирован домен II, либо субдомены IIIa, IIIb или IIIc [6]. На основании полученных данных был сделан вывод о ключевой роли рибосомных белков, а не 18S pPHK, в связывании IRES BГС с 40S субчастицей, что впоследствии оказалось не совсем так. Отсутствие в этом наборе рибосомного белка S5, контактирующего с IRES ВГС по данным [5], авторы [6] объясняли разными механизмами образования прямых и тиоуридин-зависимых РНК-белковых сшивок. Кроме того, следует заметить, что отсутствие сшивок не всегда означает отсутствие соответствующего РНК-белкового контакта и может быть связано с неблагоприятной конформацией сшивающих групп или отсутствием подходящей мишени в белке. Наглядным примером является рибосомный белок S25, который не был обнаружен среди белков, сшивающихся с IRES ВГС или его тиоуридин-содержащим производным в бинарном комплексе с 40S субчастицей рибосомы. Однако участие белка S25 в инициации трансляции на IRES ВГС было показано в работе [211], выполненной на клетках HeLa, истощенных по данному рибосомному белку. При трансляции в таких клетках репортерных бицистронных мРНК, содержащих IRES-элемент ВГС или CrPV, оказалось, что уровень IRES-зависимой трансляции в 2-4 раза ниже уровня кэп-зависимой трансляции, что указывало на прямое вовлечение белка S25 в инициацию трансляции на этих IRES-элементах.

В работах [8, 9] для идентификации компонентов 40S субчастицы рибосомы, соседствующих в бинарном комплексе с функционально важными субдоменами IIId и IIIe IRES ВГС, были использованы производные IRES, несущие фотоактивируемую группу в заданном положении. Эти производные были получены с помощью подхода, основанного на адресованном алкилировании РНК [4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензил]фосфамидным производным олигодезоксирибонуклеотида, комплементарного выбранному участку, с последующим гидролизом фосфамидной связи в ковалентном аддукте и введением арилазидогруппы по освободившейся в результате гидролиза алифатической аминогруппе сшитого с РНК остатка замещённого бензиламина. В оригинальной работе [212] такой подход был применен для введения фотоактивируемых групп в заданные положения тРНК. Позже было показано, что данный метод может быть распространён и на более длинные структурированные РНК, например, фрагмент мРНК треонил-тРНК-синтетазы E. coli длиной свыше 200 нуклеотидов [213]. Следует отметить, что природа фотоактивируемых сшивающих соединений, вводимых в РНК, может быть самой разной, при условии, что они легко реагируют с остатком алифатического амина, например 2,4-динитро-5-фторфенилазид [213] или Nгидроксисукцинымидные эфиры арилазидов [214]. Производные IRES ВГС, содержащие на нуклеотидах субдоменов IIId и IIIе фотоактивируемую 4-азидотетрафторбензойную группу, способную сшиваться как с белками, так и РНК, в бинарных комплексах с 40S субчастицами, аналогии с вышеупомянутыми 4-тиоуридин-содержащими производными IRES. по образовывали сшивки только с рибосомными белками. Данные, полученные с этими производными, показали, что субдомен Ше располагается на 40S субчастице в районе белков SA, S3a и S5 (uS2, eS1 и uS7), а субдомен IIId – в районе белков S3a, S14 и S16 (eS1, uS11 и uS9)

77

[8, 9]. При этом апикальная часть субдомена IIb в домене II, который не вносит существенного вклада в связывание IRES-элемента РНК ВГС с 40S субчастицами, оказывается в районе белков S14 и S16 (uS11 и uS9).

Развитие методов крио-ЭМ позволило существенно увеличить разрешение структур макромолекулярных объектов, исследуемых с помощью этого подхода, что дало возможность получить представление о контактах структурных элементов IRES BГC с компонентами рибосомы. Так, крио-ЭМ реконструкция комплекса 40S субчастиц рибосом кролика с хеликазой DHX29 и IRES-элементом вируса CSFV (подобным IRES-элементу BГC), лишённым домена II, с разрешением 8.5 Å позволила установить молекулярные контакты этого IRES-элемента с рибосомными белками на уровне нуклеотидов и аминокислот [215]. Было обнаружено, что петлевые области субдоменов IIIa IIIc и IIId IRES-элемента контактируют с белком S27, субдомены IIId и IIIe – с белком eS1 (S3a), а область псевдоузла – с белками S26 и S28 (Рисунок 12).



Рисунок 12. Диаграмма вторичной структуры IRES-элемента CSFV с отсутствующим доменом II, показывающая взаимодействие нуклеотидов IRES с белками 40S субчастицы рибосомы кролика [215]. Нуклеотиды гибких (флексибильных) участков IRES-элемента показаны полужирным шрифтом.

К аналогичным результатам пришли авторы другой работы [216], в которой с помощью докинга и компьютерного анализа атомарных моделей 40S рибосомных субчастиц с субнанометровым разрешением [14] и структуры связанного с 40S субчастицей IRES-элемента ВГС низкого разрешения [10, 11] были рассчитаны контакты этого IRES-элемента с рибосомными белками. По данным этой работы домен II IRES ВГС контактирует с белками S5 и S25, субдомен IIIabc – с белком S27, субдомен IIIe – с белком S3a, псевдоузел – с белком S26, а домен IV – с белками S5 и S28. Результаты приведённых выше исследований в целом были подтверждены крио-ЭМ структурой комплекса 80S рибосом кролика с полноразмерным IRES ВГС, инициаторной Met-tRNA^{Met}, фактором eIF5B и негидролизуемым аналогом GTP – GMPPNP с субнанометровым разрешением [217] (Рисунок 13). Таким образом, можно утверждать, что на сегодняшний день все белковые контакты IRES-элемента BГС в бинарном комплексе с 40S субчастицей рибосомы млекопитающих установлены.



Рисунок 13. Структура 40S субчастицы рибосомы кролика, связанной с IRES-элементом ВГС по данным [217]. Приведена часть структурной модели комплекса 80S•IRES ВГС•Met-tRNA_i^{Met} •eIF5B•GMPPNP, содержащая только 40S субчастицы, Met-tRNA_i^{Met} и IRES (PDB индексы 4UQ5 и 4UPY). Вид со стороны межсубъединичной поверхности. Рибосомные белки отмечены синим цветом; 18S рРНК показана синезелёным цветом, Met-tRNA_i^{Met} – зелёным; IRES ВГС выделен пурпурным цветом; белки, контактирующие с IRES-элементом по данным [215, 216], изображены разными цветами: S5 – жёлтым, S3A – оранжевым, S25 – серым, S27 – светло-зелёным и S28 – красным. Белок S26 в данном ракурсе структуры не виден. Тем не менее, разрешение (более 8 Å) современных моделей рибосомных комплексов, содержащих IRES-элемент, нельзя считать достаточным для уверенного определения межмолекулярных контактов на атомарном уровне. Видимо, поэтому эти модели содержат некоторые структурные ошибки (например, "зацеп" концевых петель шпильки h26 18S pPHK и субдомена IIId IRES BГС в работе [217]) и, кроме того, в них остаются неразрешёнными неструктурированные участки многих рибосомных белков. Следует также отметить, что в экспериментах по сшивкам с 40S субчастицами производных IRES BГС со статистически встроенными остатками 4-тиоуридина [6] были выявлены белки по большей части рибосомного мPHK-связывающего центра (S2, S3, S10 и S15) [12, 13, 208], с которыми мог контактировать начальный участок рамки считывания гPHK BГС.

К настоящему времени установлено, что одну из ключевых ролей в молекулярном механизме, используемом IRES ВГС и подобными ему IRES-элементами других вирусов для рекрутирования 40S субчастиц, играет рибосомный белок S5. В работе [218] авторы исследовали роль тринуклеотида 82-GCC-84 в апикальной части субдомена IIb IRES ВГС на фунциональную активность IRES-элемента и установили, что делеция этого участка, либо мутации в нём приводят к значительным искажениям пространственной структуры этого субдомена и существенно снижают эффективность IRES-зависимой трансляции. Авторы работы [218] предположили, что остаток С83 этого тринуклеотида контактирует с В-шпилькой рибосомного белка S5 в 40S субчастице, и что этот контакт критически важен для функциональной активности IRES ВГС. Эти результаты согласуются с данными другой работы [219], в которой показано, что нарушение пространственной структуры субдомена IIb, вызванное мутациями или делециями в его петлевых участках, приводит к нарушению его взаимодействия с рибосомным белком S5 и падению активности IRES-элемента. Таким образом, взаимодействие IRES ВГС с рибосомным белком S5 40S субчастицы оказывается принципиальным для инициации трансляции геномной РНК этого вируса, и, по-видимому, РНК других вирусов, обладающих IRES-элементами данного типа.

В заключение настоящего раздела обзора, следует заметить, что вовлечение рибосомных белков в процессы биогенеза вирусов не выглядит случайным. Во-первых, рибосомные белки присутствуют в клетке в большом количестве, и во-вторых, они обладают большим сродством к РНК, причём это сродство определяется не столько первичной структурой РНК, сколько её вторичной и третичной структурами. Следовательно, можно предположить, что вирусные РНК неизбежно должны взаимодействовать в клетке с рибосомными белками, и, в случае, если какое-либо из таких взаимодействий будет благотворно сказываться на биогенезе вирусов, их способность к высокой скорости изменчивости генома должна закреплять соответствующее эволюционное приобретение.

1.6 Экстрарибосомные функции рибосомных белков

Основной клеточной функцией рибосомных белков, как уже было отмечено ранее, является их участие в процессе трансляции в качестве структурных компонентов рибосомных субчастиц, а также в процессе сборки самих рибосомных субчастиц. Однако с расширением представлений о разнообразных процессах, протекающих в эукариотических клетках, стало понятно, что функциональная роль отдельных рибосомных белков не ограничивается исключительно этой функцией. Оказалось, что рибосомные белки могут быть вовлечены во многие клеточные процессы, не сопряжённые с трансляцией, где они выступают в изолированном виде, т. е. вне рибосомы, и такие "не основные" функции рибосомных белков получили название "экстрарибосомных" [220]. В последние годы была накоплена обширная информация об участии рибосомных белков млекопитающих в процессах, связанных с репарацией ДНК, экспрессией специфических генов, апоптозом, клеточным ответом на стресс и рядом других. Некоторые примеры такого участия, касающиеся биогенеза рибосомных белков и их вовлечения в трансляцию специфических мРНК, уже были рассмотрены в предыдущих главах этого обзора. В настоящей главе, чтобы продемонстрировать многофункциональность рибосомных белков, собраны некоторые из наиболее значимых примеров их экстрарибосомных функций.

Среди рибосомных белков следует выделить S3 как белок с наиболее широким репертуаром экстрарибосомных функций. Подробно эти функции приведены в обзоре, написанном с участием автора [221], а здесь они будут только кратко перечислены. Так, в ранних работах было обнаружено, что белок S3 человека способен катализировать βэлиминирование апурин-апиримидиновых сайтов (АР-сайтов) в двуцепочечной ДНК, но не обладает ДНК-гликозилазной активностью, присутствующей у его гомолога в D. melanogaster [222]. Кроме того, он может взаимодействовать с основными участниками процесса репарации ДНК – 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазой (OGG1) и апурин-апиримидин эндонуклеазой APEX1, конкурируя с ними за связывание с двуцепочечными ДНК-субстратами [223, 224]. Показано также, что белок S3 взаимодействует с урацил-ДНК-гликозилазой (UDG) и стимулирует её гликозилирующую активность [225]. Таким образом, рибосомный белок S3 вовлечён в работу клеточного механизма, обеспечивающего репарацию повреждённых оснований в ДНК. Недавно установлено, что белок S3 может проявлять АР-лиазную активность и по отношению к одноцепочечной ДНК, причём даже гораздо более высокую, чем по отношению к двуцепочечной, и что АР-лиазная активность характерна только для изолированного белка, но не для белка в составе 40S рибосомной субчастицы [226]. С помощью метода, основанного на иммунопреципитации хроматина и высокопроизводительном секвенировании ДНК (ChIP-seq),

было показано, что белок S3 связывается преимущественно с участками хроматина, ассоциированными с ядрышком [226]. Это позволило сделать предположение о вовлечении белка S3 в процессы, связанные с репарациией ДНК в ядрышке, где происходит транскрипция генов pPHK [226]. Интересно, что белок S3, являясь компонентом мPHK-связывающего канала, обладает способностью взаимодействовать с одноцепочечными PHK вне этого канала [227, 228]. За это взаимодействие отвечает фрагмент белка S3 (аминокислоты 56-64), экспонированный на поверхности 40S субчастицы недалеко от участка входа мPHK. На этом основании полагают, что взаимодействие белка S3 с одноцепочечными PHK может играть роль в регуляции трансляции [227, 228].

Кроме того, было отмечено участие белка S3 в процессах, связанных с индукцией апоптоза посредством его взаимодействия с белком TRADD (от англ. tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein – белок, взаимодействующий с доменом смерти первого рецептора фактора некроза опухоли) [229]. Показано, что в клетках, экспрессирующих белок S3, сцепленный с зеленым флуоресцирующим белком, происходит активация каскада каспазы-8/каспазы-3 и киназы JNK; такие клетки после УФ-облучения подвергаются апоптозу, причём белок TRADD присутствует в них в комплексе с белком S3 [229]. Авторы этой работы полагают, что белок S3 рекрутируется комплексом DISC (от англ. death-inducing signaling complex – сигнальный комплекс, индуцирующий смерть) при индукции клеточного апоптоза по каспаза-зависимому механизму в ответ на внешний стресс.

Следует также отметить, что белок S3 является субстратом многочисленных ферментов, способных вносить посттрансляционные модификации в его структуру, например, фосфорилирование, осуществляемое киназами Erk [230] и РКСб [231], и метилирование, выполняемое аргининметилтрансферазой PRMT1 [232]. Можно ожидать, что экстрарибосомные функции этого рибосомного белка тесно связаны с его посттрансляционными модификациями. Стоит также обратить внимание на то, что в составе 40S рибосомных субчастиц, выделенных из этот белок обнаружен как в фосфорилированной, так и в плаценты человека. нефосфорилированной формах [228], что может быть обусловлено возможным участием рибосомо-связанного белка S3 в регуляции трансляции (см. выше). В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что только нефосфорилированная форма этого белка в составе 40S субчастиц обладает сродством к АР-сайтам одноцепочечных ДНК [226], а, следовательно, посредством фосфорилирования может осуществляться регуляция и других функциональных свойств белка в составе 40S субчастиц.

Другим проявлением экстрарибосомных функций S3 является его участие в регуляции транскрипции генов, контролируемых белковым комплексом NF-кВ (ядерным фактором каппа В). Установлено, что белок S3 связывается с фактором NF-кВ в качестве его интегрального

компонента, многократно увеличивая сродство этого фактора к участкам кВ в ДНК, и, тем самым, способствуя активации экспрессии соответствующих генов, кодирующих, например, лёгкие к-цепи иммуноглобулинов и интерлейкины IL-2 и IL-8. Таким образом, белок S3 оказывается вовлечённым в регуляторный путь NF-кB, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа [233].

Рассмотренный ранее в настоящем разделе пример участия рибосомного белка S3 в регуляции транскрипции специфических генов не является исключительным событием для такого рода белков. Например, рибосомные белки S14 и L11 также могут вовлекаться в процессы, регулирующие транскрипционную активность отдельных групп генов. Так, в работе [234] при поиске молекулярных партнёров фактора транскрипции PPARa (от англ. peroxisome proliferator-activated receptor alpha – альфа-рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом) было обнаружено, что этот фактор ассоциирован с рибосомным белком L11. Интересно, что в отличие от PPARα, две его близкородственные изоформы PPARβ и PPARγ не были способны связываться с белком L11, что свидетельствует о высокой специфичности указанного взаимодействия. Оказалось также, что при связывании с фактором PPARa белок L11 уменьшает его сродство к специфичным участкам на ДНК, так называемым PPRE (от англ. PPAR-response elements – элементы, реагирующие на PPAR), и, тем самым, ингибирует транскрипционную активность PPARα в отношении генов, содержащих такие участки [234]. Учитывая, что к PPRE-зависимым генам относятся гены ацил-КоА оксидазы, ангиопоэтинподобного белка 4, цитохрома P450 4A1 и некоторые другие, можно полагать, что роль белка L11 в регуляции клеточного метаболизма довольно значительная. Регуляторная активность рибосомного белка S14 выявлена в работе [235]. Оказалось, что этот белок вовлекается в регуляцию активности онкопротеина с-Мус, являющегося также транскрипционным фактором. Авторы этой работы установили, что белок S14 способен связываться с двумя доменами этого онкопротеина, а именно: MHII и bHLH-LZ. Показано, что это связывание препятствует дальнейшей ассоциации комплекса онкопротеина с-Мус с его ко-фактором – белком TRRAP, с промоторами с-Мус-зависимых генов, тем самым способствуя подавлению с-Мус-зависимой пролиферации клеток.

Ещё одним рибосомным белком, обладающим обширным спектром экстрарибосомных функций, является белок SA. Следует отметить, что приобретение этим белком свойств, связанных с выполнением эктрарибосомальных функций, обусловлено значительными изменениями его физико-химических характеристик и пространственной структуры вследствие посттрансляционных модификаций, превращающих данный белок в полипептид, который уже сложно называть рибосомным белком. Поэтому неудивительно, что впервые белок SA был описан не как рибосомный белок, а как неинтегриновый рецептор ламинина 1 (белка внеклеточного матрикса) с молекулярной массой 67 кДа [236-238]. Оказалось, что этот рецептор является димером более мелкого белка с молекулярной массой 37 кДа [239], и только значительно позднее было установлено, что этот белок и рибосомный белок с кажущейся молекулярной массой 40 кДа являются продуктами одного гена [240]. В связи с этим, будучи обнаруживаемым в качестве участника различных клеточных процессов, рибосомный белок SA приобрёл несколько названий: LBP (от англ. laminin binding protein – белок, связывающий ламинин), LAMR1 (от англ. laminin receptor 1 – рецептор ламинина 1), 37LR и 67LR (от англ. 37 kDa and 67 kDa laminin receptors – рецепторы ламинина с массой 37кДа и 67кДа соответственно), р40 (рибосомный белок с массой 40 кДа), а также рибосомный белок SA или uS2.

В структуре рибосомного белка SA человека можно вычленить два самостоятельных домена. Большой N-концевой домен белка, включающий район с 1-го по 209-й аминокислотный остаток, представляет собой глобулярную структуру и имеет ярко выраженную гомологию с рибосомным белком S2 прокариот. С-концевой домен белка, включающий с 210-го по 296-й аминокислотный остаток и лишённый структурной упорядоченности, не имеет гомологии с белком S2 прокариот. Характерно, что этот домен, будучи консервативным в белках семейства SA у позвоночных, обладает низкой степенью гомологии среди белков этого семейства у других эукариот, особенно низших. Следует отметить, что в составе C-концевого домена белка SA преобладают отрицательно заряженные аминокислоты, и, вследствие этого, по-видимому, он не способен связываться с рРНК и сохраняет высокую подвижность в состав рибосомы, что препятствует его визуализации в рибосомах с помощью крио-ЭМ.

Именно с С-концевым доменом белка SA связана большая часть его экстрарибосомных функции. Одна из таких функций, как уже было отмечено, – это способность связывать ламинин 1. Такой способностью, как показано, обладает даже немодифицированный рекомбинантный белок SA, полученный в клетках *E. coli* [34], однако степень сродства к ламинину 1 у такого белка на два порядка ниже, чем у вышеупомянутого рецептора 67LR, выделенного из клеток человека [237]. Благодаря локализации на клеточной мембране и способности взаимодействовать с ламинином 1 этот рецептор вовлекается в процессы, связанные с клеточной адгезией, миграцией и инвазией, что в свою очередь определяет его роль в метастазировании при развитии опухолей. Кроме того, 67LR принимает участие в рецепции вирусов и связывании прионов. Было предпринято множество попыток выяснить, что собой представляет рецептор 67LR, однако на сегодняшний день структура и точный состав этого рецептора так и остаются не установленными; известно лишь, что одним из его компонентов является модифицированный рибосомый белок SA (подробнее на эту тему см. обзор [241]).

Расположение в белке SA участка, ответственного за связывание ламинина 1, также пока остаётся предметом дискуссий. Так, в ранних работах установлено, что пептиды, идентичные по составу участкам 161-180 [242] и 205-229 [243] в белке SA, способны связываться с ламинином-1, что позволило рассматривать соответствующие районы белка SA как участки, с которыми связывается ламинин-1. Позднее, в первом из этих участков была выделена так называемая минимальная последовательность, ответственная за связывание ламинина, – палиндромный участок 173-LMWWML-178 [244]. Однако в пространственной структуре белка SA эта последовательность не находится на белковой поверхности, поэтому трудно представить, как она может быть вовлечена в связывание ламинина-1. Возможным участком связывания ламинина-1 мог бы быть мотив (D/E)W(S/T), повторяющийся пятикратно в Сконцевом районе белка [245], однако экспериментальных свидетельств этому накоплено мало.

В качестве ламинин-связывающего белка, рибосомный белок SA может взаимодействовать с актином и тубулином – белками, формирующими цитоскелет [246, 247], что определённо открывает ряд функциональных возможностей для белка SA. Во-первых, он может быть вовлечён в процессы передачи сигнала между межклеточным матриксом и цитоскелетом, приводящие к реорганизации последнего [248], а во вторых, он может закреплять на клеточных микротрубочках рибосомы, способствуя их внутриклеточной локализации [248]. Тем не менее, участие белка SA в этих процессах остаётся слабоизученным.

Таким образом, исследования последних лет наглядно свидетельствуют, что отдельные рибосомные белки активно вовлечены в процессы, не сопряжённые с их участием в трансляции в качестве белков рибосом, т. е. обладают экстрарибосомными функциями. На эту тему недавно опубликовано несколько обзоров, в которых подробно изложены примеры экстрарибосомных функций эукариотических рибосомных белков и отмечен растущий интерес исследователей к указанной проблеме [157, 241, 249, 250]. Следует обратить внимание на то, что дополнительные функции у отдельных рибосомных белков появились, по-видимому, в ходе эволюции, когда эти белки оказались вовлечёнными в качестве кофакторов в модуляцию определённых клеточных процессов, появившихся у более развитых организмов. Следовательно, экстрарибосомные функции рибосомных белков должны быть характерны только для белков отдельных близкородственных групп эукариот, т. е. эти функции не должны быть универсальными для всех эукариотических организмов (напр., [27]).

В целом, из совокупности представленных в настоящем обзоре данных можно заключить, что структурные и функциональные исследования рибосомных белков как важнейших

компонентов клеток млекопитающих остаются актуальными и значимыми уже на протяжении более 4-х десятилетий, и интерес учёных к этой проблеме возрастает. На момент начала настоящей работы было понятно, что рибосомные белки млекопитающих имеют много общего в регуляции экспрессии их генов, что, в свою очередь, определяется основной функцией этих белков, связанной с их участием в формировании рибосомных субчастиц. Строгий многоуровневый контроль экспрессии генов рибосомных белков на каждом этапе клеточного обеспечивает необходимый уровень рибосом, требуемый цикла лля нормальной жизнедеятельности клетки. Нарушение этого контроля в том или ином виде обычно имеет тяжёлые последствия для всего организма. Вместе с тем, следует отметить, что отдельные рибосомные белки обладают также индивидуальными функциональными свойствами, которые проявляются в участии этих белков в трансляции специализированных мРНК, а также в связывании РНК вирусной природы. Кроме того, рибосомные белки способны взаимодействовать с различными клеточными белками. Модулируя их функциональные свойства, рибосомные белки оказываются втянутыми во многие процессы, не сопряженные непосредственно с трансляцией. Существенный рост числа публикаций на эту тему, наметившийся в последние годы [137, 251-253], позволяет ожидать новых свидетельств различных проявлений функциональных свойств рибосомных белков млекопитающих. Таким образом, цель настоящей работы, связанная с изучением структурных особенностей взаимодействий рибосомных белков человека с разными видами РНК, лежащих в основе клеточных процессов, не связанных непосредственно с трансляцией клеточных мРНК, полностью лежит в русле актуальных направлений исследований в современной биохимии.

86

Глава 2 Материалы и методы исследований (Экспериментальная часть)

2.1 Материалы

В работе использованы следующие препараты.

Реактивы: агароза, ампициллин, бензоилцианид (BzCN), биотин-гидразин, 2-[бис(2гидроксиэтил)амино]-2-(гидроксиметил)пропан-1,3-диол (Бис-Трис), бромистый этидий, гепарин, гуанидингидрохлорид, дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты (dNTP), дезоксихолат натрия, триптон, дидезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты (ddNTP), дитиотреитол (DTT), 4диметиламинопиридин, диметилсульфат (DMS), 2,2-дипириридилдисульфид, дрожжевой изопропил-β-D-тиогалактопиранозид экстракт, (ИПТГ),2-йодацетамид, канамицин, креатинфосфат, 2-меркаптоэтанол, 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота (MES), реагент "TRI-reagent", рибонуклеозид-5'-трифосфаты (NTP), пуромицин, спермидин, (TMAO), трифенилфосфин, тиогликолевая кислота, триметиламиноксид фенилметилсульфонилфторид (PMSF), 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)-карбодиимид мета*п*-толуолсульфонат (СМСТ), циклогексимид, этилнитрозомочевина (ENU) и биотин-16-UTP Fluka; производства компаний Sigma или акриламид, N,N'-метиленбисакриламид (бисакриламид), KCl. додецилсульфат нария (SDS). 4-(2-гидроксиэтил)-1пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES), 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол (Трис) – производства AppliChem; N-гидроксисукцинымидный эфир цианинового красителя Су3 (NHS-Cy3) – производства BioDye; реактив "Trizol" – производства Invitrogen. Остальные реактивы, неорганические кислоты, основания и соли были советского и российского производства марки х.ч. или о.с.ч.

Аффинные смолы и сорбенты: "StrataClean" (производства Stratagen), протеин Gсефароза (Amersham), "HIS-select" и стрептавидин-сефароза (Sigma), oligo(dT)-целлюлоза и сефадекс G-50 (Pharmacia Biotech).

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

Детергенты: Нонидет Р-40 (производства Sigma), Твин 20 и Тритон X-100 (Ferak).

Ферменты и белки: Таq ДНК-полимераза, обратные транскриптазы AMV и MMLV, щелочная фосфатаза CIP, трипсин (марки Sequence grade) и ингибитор рибонуклеаз PHКазин (все производства Promega); эндонуклеазы рестрикции Pst I, EcoRI, NdeI и BamHI и T4 ДНК- лигаза (New England Biolabs или Fermentas); ингибитор рибонуклеаз RiboLock (Fermentas) и обратная транскриптаза SuperScript RNase H⁻ (Invitrogen); пирофосфатаза, лизоцим, протеиназа К и РНКазы А и Т2 (Sigma); РНКазы Т1 и V1 (Boehringer); РНКаза Н (Fermentas); ДНКаза I (Ambion); бычий сывороточный альбумин (БСА) (Reanal). РНК-полимераза фага Т7 и РНК-транскрипт AdML любезно предоставлены проф. И. Эпероном (Лестерский университет, Великобритания).

Антитела и антисыворотки: конъюгированные с перексидазой хрена антитела против антител мыши и кролика (производства 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.

Олигодезоксирибонуклеотиды: oligo(dT)₁₂₋₁₈ и p(dN)₆ (производства Promega); остальные олигодезоксирибонуклеотиды синтезированы в Группе олигонуклеотидного синтеза Лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН.

Меченые нуклеозидтрифосфаты: [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), pBluescriptII KS(-) (Stratagen), pECFP-N1 (Clontech), pHr13 [254], pXL40-372.NS' [203] (любезно предоставлена проф. И.Н. Шатским), плазмида pAM18T7-2, содержащая 18S рДНК человека, получена в Лаборатории структуры и функции рибосом (ИХБФМ СО РАН).

В работе также использовали трансфектант jetPEI (Polyplus Transfection), ядерный экстракт клеток HeLa (СССС), PHK poly(U) и poly(AU) (Reanal), нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0.45 мкм (Amersham), мембрану VSWP 14250 (Millipore), микроколонки Illustra MicroSpin G-25 (GE Healthcare), концентраторы Centricon-3 (Amicon) и набор для проведения реакций ПЦР в реальном времени Platinum SYBR Green qPCR SuperMix (Invitrogen). 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензиламин (RCH₂NH₂) и N-гидроксисукцинимидный эфир *n*-азидотетрафторбензойной кислоты любезно предоставлены Т.М. Ивановой (ИХБФМ СО РАН).

В работе использованы компьютерные программы: Vector NTI 10 (Invitrogen), mMass 5.4 (Martin Strohalm), Gel-Pro Analyser 3.2 (Media Cybernetics), QuantityOne (BioRad), SigmaPlot (Systat Software), Prism 5 (GraphPad Software) и PyMOL 0.99 (DeLano Scientific LLC) и online сервисы: Mascot (http://www.matrixscience.com), GOR [255], PSIpred [256], Sspro [257], Sfold (http://sfold.wadsworth.org/cgi-bin/index.pl), ECR Browser (http://ecrbrowser.dcode.org) [258], Multalign [259], ESyPred3D [260] и EMBOSS-Align (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa).

Секвенирование ДНК и масс-спектрометрия белков проведены в Объединенном центре геномных, протеомных и метаболомных исследований (ИХБФМ СО РАН).

Составы стандартных растворов и буферов: среда LB (триптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л и NaCl 10 г/л), электродный буфер TAE (40 мМ Трис, 20 мМ уксусная кислота и 1 мМ ЭДТА), электродный буфер TBE (89 мМ Трис, 89 мМ борная кислота и 2 мМ ЭДТА), буфер TBS (50 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 150 мМ NaCl и 0.05% Твин 20).

2.2 Методы

2.2.1 Получение кДНК рибосомных белков человека и её клонирование в плазмидные векторы

Фрагменты кДНК рибосомных белков человека получали методом ПЦР с использованием в качестве матричной ДНК суммарной кДНК, полученной с помощью обратной транскрипции суммарной РНК, выделенной из плаценты или культивируемых клеток HeLa или HEK293 человека, по приведённому ниже протоколу.

Для получения суммарной плацентарной РНК брали 30 г замороженной в жидком азоте плаценты человека, измельчали в охлаждённой фарфоровой ступке и выделяли стандартным способом с помощью фенольной депротеинизации, как описано в [261]. Для выделения из полученного препарата poly(A)⁺-PHK 150 мг смолы oligo(dT)-целлюлозы промывали четыре раза 800 мкл элюирующего буфера (10 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 1 мМ ЭДТА и 0.05% SDS), уравновешивали буфером для связывания (0.5 М NaCl в элюирующем буфере) и инкубировали с 3.7 мг суммарной плацентарной РНК в течение 15 мин при 20 °С, периодическом встряхивая. По окончании инкубации смолу осаждали низкоскоростным (1000)об/мин) центрифугированием. После удаления надосадочной жидкости poly(A)⁺-PHK элюировали со смолы двукратным промыванием 250 мкл элюирующего буфера в течение 5 мин при 37 °С. Выход poly(A)⁺-РНК составлял около 1.25% от исходного количества суммарной РНК. Суммарную РНК клеток HeLa или HEK293 выделяли из 10 млн клеток с использованием коммерческого pearenta Trizol согласно протоколу производителя, основанному на методе Хомчинского [262].

Синтез первой цепи суммарной кДНК проводили с помощью обратной транскрипции $poly(A)^+$ -РНК или суммарной РНК, используя в качестве праймеров либо $oligo(dT)_{12-18}$, либо рандомизированный гексадезоксирибонуклеотид $p(dN)_6$ соответственно. В первом случае для синтеза кДНК смешивали 12 мкг $poly(A)^+$ -РНК и 2.5 мкг $oligo(dT)_{12-18}$ в 68 мкл воды, смесь инкубировали в течение 10 мин при 70 °C с последующим охлаждением во льду 2 мин. Затем к смеси добавляли 20 мкл 5-кратного буфера обратной транскриптазы (250 мМ Трис-HCl, pH 8.3, 373 мМ КСl и 15 мМ MgCl₂), 2 мкл 0.5 M DTT и 5 мкл 10мМ dNTP и далее смесь инкубировали с 5 мкл (1000 e.a.) обратной транскриптазы SuperScript RNase H⁻ в течение 1.5 ч при 37 °C. При

использовании для синтеза кДНК суммарной клеточной РНК и праймера $p(dN)_6 2$ мкг РНК в 20 мкл воды инкубировали в течение 10 мин при 70 °C с последующим охлаждением во льду 2 мин. Затем к раствору добавляли 4 мкл 10-кратного буфера (100 мМ Трис-HCl, pH 9.0, 500 мМ KCl и 1% Тритон X-100), 8 мкл 25 мМ MgCl₂, 4 мкл 10 мМ dNTP, 2 мкл (1 мкг) $p(dN)_6$ и 30 е.а. обратной транскриптазы AMV, и смесь инкубировали сначала 10 мин при 25 °C, затем 30 мин при 42 °C. Полученную кДНК хранили при -20 °C в течение не более 6 месяцев или при -80 °C в течение более длительного времени.

Синтез кДНК рибосомных белков человека проводили с помощью ПЦР, используя суммарную кДНК и пару олигодезоксирибонуклеотидных праймеров. Последовательности праймеров рассчитывали, исходя ИЗ следующих правил: участки праймеров, (i) комплементарные или соответствующие последовательностям в кодирующих частях рибосомных белков должны иметь температуру плавления в комплементарном ДНК-дуплексе в пределах 48-62 °C; (ii) праймеры не должны иметь на 3'-концах участков, комплементарных районам в самом праймере или в парном ему праймере, длиной более 3-х нуклеотидов; (iii) на 5'-концах праймеров должны находиться последовательности, позволяющие получать в соответствующих ПЦР-продуктах сайты рестрикции, необходимые для расщепления этих продуктов при клонировании в экспрессионные векторы. Последовательности праймеров, использованных для получения кДНК рибосомных белков приведены в таблице 2.1. Реакционные смеси (50 мкл) для проведения ПЦР содержали 75 мМ Трис-HCl, pH 8.9, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% Твин 20, 1.5 мМ MgCl₂, 0.2 мМ dNTP, 1 мкМ праймер (прямой и обратный), 1 мкл реакционной смеси после синтеза первой цепи кДНК и 1.25 е.а. Тад ДНК-полимеразы. ПЦР проводили в амплификаторе Progene (Techne) при следующем температурном режиме: 1 цикл -3 мин при 94 °C; 20 циклов – 30 с при 94 °C, 30 с при 60 °C (понижение температуры на 1 °C на каждом последующем цикле), 30 с при 72 °C; 30 циклов – 30 с при 94 °C, 30 с при 40 °C, 30 с при 72 °C; 1 цикл – 7 мин при 72 °C. Соответствие длины получаемых ПЦР-продуктов ожидаемой длине проверяли электрофорезом 5 мкл реакционной смеси в 1%- или 2%-ном агарозном геле в присутствии маркера длины ДНК в буфере ТАЕ при 10 V/см, прокрашивая ДНК бромистым этидием.

При прямом клонировании ПЦР-продуктов в вектор pET-15b их предварительно гидролизовали эндонуклеазами рестрикции NdeI и BamHI в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 2 мкг ДНК и 1 е.а. фермента в буфере, поставляемом производителем фермента, в течение 16 ч при 37 °C. Продукты реакции очищали электрофорезом в агарозном геле с последующим вырезанием участка геля, содержащего ДНК, его замораживанием в пробирке с эквивалентным объёмом водонасыщенного фенола в жидком азоте и центрифугированием (14000 g, 15 мин, 25 °C) для разделения фаз. Содержащуюся в водной фазе ДНК осаждали 3-мя

объёмами этанола и использовали в реакции лигирования с вектором pET-15b, предварительно линеаризованном по сайтам эндонуклеаз рестрикции NdeI и BamHI и очищенном тем же способом, что описан выше. Очищенные ПЦР-продукт и линеаризованную плазмидную ДНК лигировали в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 0.3 мкг ПЦР-продукта, 1 мкг линеаризованной плазмиды и 1 е.а. Т4 ДНК-лигазы в буфере, рекомендованном производителем фермента, при 16 °С в течение 16 ч. По окончании реакции этой смесью трансформировали клетки *E. coli*, штамм XL1-Blue. Для этого 5 мкл смеси добавляли к 100 мкл компетентных клеток с последующей их инкубацией последовательно 30 мин при 0 °C и 2 мин при 42 °C. Затем к клеткам добавляли 1 мл среды LB и инкубировали их 1 ч при 37 °C. Далее клетки высевали в чашки Петри на агаризованную среду LB, содержащую 0.1 мг/мл ампициллина, чашки инкубировали в течение 16 ч при 37 °C, и образовавшиеся колонии анализировали на наличие плазмиды со вставкой. Для этого каждую из 5-10-ти выбранных колоний подращивали в 1 мл среды LB, содержащей 0.1 мг/мл ампициллина, в течение 6 ч при 37 °C, и 1 мкл среды, содержащей клетки с плазмидной ДНК, использовали в реакции ПЦР с соответствующими праймерами в условиях, описанных выше. Образование ПЦР-продукта ожидаемой длины свидетельствовало о наличии вставки в плазмиде. Колонию клеток, содержащих плазмиду со вставкой, выращивали в 50-100 мл среды LB, содержащей 0.1 мг/мл ампициллина, и плазмиду выделяли согласно методу, описанному в [263].

Таблица 2.1.

N⁰	Индекс	Последовательность (5'-3')	Применение
п/п			
1	RS3F	GGGAATTCCATATGGCAGTG	Получение рекомбинантного
		CAAATATCCAAGA	рибосомного белка uS3.
2	RS3R	GGGAATTCGGATCCTTATGC	Получение рекомбинантного
		TGTGGGGACTGG	рибосомного белка uS3.
3	RS5F	GGGAATTCCATATGACCGAG	Получение рекомбинантного
		TGGGAGACA	рибосомного белка uS7.
4	RS5R	GGGAATTCGGATCCTCAGCG	Получение рекомбинантного
		GTTGGACTTGG	рибосомного белка uS7.
5	RS10F	GGGAATTCCATATGATGTTG	Получение рекомбинантного
		ATGCCTAAGAAGA	рибосомного белка eS10.
6	RS10R	GGGAATTCGGATCCTTACTG	Получение рекомбинантного

Олигодезоксирибонуклеотиды, использованные в работе

		AGGTGGCTGACCA	рибосомного белка eS10.
7	RS19F	GGGAATTCCATATGCCTGGA	Получение рекомбинантного
		GTTACTGTAAAAGA	рибосомного белка eS19
8	RS19R	GGGAATTCGGATCCTAATGC	Получение рекомбинантного
		TTCTTGTTGGCAGC	рибосомного белка eS19.
9	RS26F	GGGAATTCCATATGACAAAG	Получение рекомбинантного
		AAAAGAAGGAA	рибосомного белка eS26.
10	RS26FM	CGGGAATTCCATATGACAAA	Получение рекомбинантного
		GAAACGCAGGAACAATGGT	рибосомного белка eS26.
		CG	
11	RS26R	GGGAATTCGGATCCTTACAT	Получение рекомбинантного
		GGGCTTTGGTG	рибосомного белка eS26.
12	P40F	GAGAATTCCATATGTCCGGA	Получение рекомбинантного
		GCCCTTGAT	рибосомного белка uS2 и его
			мутантных форм с делециями по С-
			концу.
13	P40R	GAGAATTCGGATCCTTAAGA	Получение рекомбинантного
		CCAGTCAGTGGTT	рибосомного белка uS2 и его
			мутантной формы uS2ΔN.
14	P40D1R	GAGGATCCTTATGCAGACCA	Получение рекомбинантного белка
		GTCTTCCGT	uS2∆1.
15	P40D2R	GAGGATCCTTAGAATTGCTG	Получение рекомбинантного белка
		AATAGGCAC	uS2Δ2.
16	P40D3R	GAGGATCCTTAAGCGGGAG	Получение рекомбинантного белка
		CAGTCCATTG	uS2Δ3.
17	P40R∆C	GAGAATTCGGATCCTTAACG	Получение рекомбинантного белка
		CATGCGCAGAACTT	uS2ΔC.
18	P40ΔN	GAGAATTCCATATGATAAAT	Получение рекомбинантного белка
		CTCAAGAGGACCTG	uS2ΔN.
19	13F	AACTGCAGCATATGGGTCGC	Получение рекомбинантного
		ATGCATGCTC	рибосомного белка uS15 и плазмид
			pECFP-S13 и pECFP-S13-int1.
20	13R	AACTGCAGGGATCCTTATGC	Получение рекомбинантного
		GACCAGGGCAGA	рибосомного белка uS15 и плазмид

			pECFP-S13 и pECFP-S13-int1.
21	13-I-plF	CACCTCGAGACTGCTTCTCT	Получение плазмиды pECFP-S13-
		CCCCAGGAAGGGCCTGTCCC	int1.
		AGTC	
22	13-I-plR	GACTGGGACAGGCCCTTCCT	Получение плазмиды pECFP-S13-
		GGGGAGAGAAGC	int1.
23	S13Δ27N	AACTGCAGCATATGTTGACA	Получение рекомбинантного белка
		TCTGACGACGTGA	uS15∆N27.
24	S13∆80N	AACTGCAGCATATGGCTCCT	Получение рекомбинантного белка
		GATCTTCCTGAAGA	uS15ΔN80.
25	S13Δ29C	GGATCCTTAAATCCGGCTCT	Получение рекомбинантного белка
		CTATTAG	uS15∆C29.
26	S13∆54C	GGATCCTTAAGCAACTGCTT	Получение рекомбинантного белка
		TCTTAATT	uS15∆C54.
27	S13H101A	GTTCGAAAGGCTCTTGAGA	Получение рекомбинантного белка
			uS15H101A.
28	S13D108A	GAGAGGAACAGAAAGGCTA	Получение рекомбинантного белка
		AGGATG	uS15D108A.
29	S13Q62A	GTTGCAGCAGTACGTTTTG	Получение рекомбинантного белка
			uS15Q62A.
30	13FE-1	GCTAATACGACTCACTATAG	Получение фрагментов S13INT и
		GGCTTTCGTTGCCTGATCG	S13INTm.
31	13RE-2	CGCGCTACTTACAGTG	Получение фрагментов S13INT и
			S13INTm.
32	13-Mut1-F	CATGCTAGAGGGTGAGCTCG	Получение фрагмента S13INTm.
		GGGCATC	
33	13-Mut1-R	CAGGCCGGGCCTGGGGAGA	Получение фрагмента S13INTm.
		GAAGCAGT	
34	17FE-1	TAATACGACTCACTATAGGG	Получение фрагмента пре-мРНК и
		ACCAAGGACCCGCCAACAT	рекомбинантного рибосомного
		GGTAGGTGTTT	белка eS17.
35	17RE-2	CCCGACTCACCCTGCTATC	Получение фрагмента пре-мРНК и
			рекомбинантного рибосомного
			белка eS17

36	26FE-1	GGATCCTAATACGACTCACT	Получение фрагмента пре-мРНК и
		ATAGGGCCTGTCTCCGGTCC	рекомбинантного рибосомного
		GT	белка eS26 (S26INT).
37	26RE-2	AATAGGCTGCACGTGGCC	Получение фрагмента пре-мРНК и
			рекомбинантного рибосомного
			белка eS26 (S26INT).
38	16F	GGGAATTCCATATGCCGTCC	Получение рекомбинантного
		AAGGG	рибосомного белка uS9.
39	16R	GGGAATTCGGATCCTTATCG	Получение рекомбинантного
		GTAGGATTTCTGG	рибосомного белка uS9.
40	16FE-1	TAATACGACTCACTATAGGG	Получение фрагмента пре-мРНК
		CCTTTTCCGGTTGCGGC	рибосомного белка uS9 (S9INT).
41	16RE-1	GGATCCCAGCACCTTG	Получение фрагмента пре-мРНК
			рибосомного белка uS9 (S9INT).
42	16FE-2	GCAGCTAATACGACTCACTA	Получение укороченного фрагмента
		TAGGGAGCCATGCCGTCCAA	пре-мРНК рибосомного белка uS9
		G	(S9INT2).
43	16RE-2	GATGAGACCATTGCCGCGTT	Получение укороченного фрагмента
		TG	пре-мРНК рибосомного белка uS9
			(S9INT2).
44	18SCDF1	AAAAAGCTCGTAGTTGCCAG	Получение фрагмента 18SCD.
		GGACGGCCGGGGGCA	
45	18SCDF2	GCTAATACGACTCACTATAG	Получение фрагмента 18SCD.
		GGAGTTAAAAAGCTCGTAGT	
		TGCCA	
46	18SCDR	GGGAGAACCCAAAGACTTT	Получение фрагмента 18SCD.
		GGTT	
47	18S-A	GTAATACGACTCACTATAGG	Получение фрагмента 3Dc.
		GACGGAAGGGCACCACC	
48	18S-B	ATAACTGCAGGCCGGGTGA	Получение фрагмента 3Dc.
		GGTTT	
49	18S-C	TAATCTGCAGTCCGGGGCTG	Получение фрагмента 3Dc.
		CAC	
50	18S-D	AGGGACGGGAAACATGTG	Получение фрагмента 3Dc.

18S3DMF	TAATACGACTCACTATAGGG	Получение фрагмента 18S3DM.
	ACGGAAGGGCACCACC	
18S3DMR	GTGTACAAAGGGCAGGGA	Получение фрагмента 18S3DM.
18S3DmF1	AAGGGCACCACCAGGAGTG	Получение фрагмента 3Dm.
	GAGCCTGCGGATCCACGCGC	
	GCTAC	
18S3DmF2	AATACGACTCACTATAGGGA	Получение фрагмента 3Dm.
	CGGAAGGGCACCACC	
18S3DmR	GTGTACAAAGGGCAGGGA	Получение фрагмента 3Dm.
18S-1207	CGTCAATTCCTTTA	Расщепление 40S субчастиц.
18S-1693	GACGGGCGGTGTGTAC	Расщепление 40S субчастиц.
IRES-F	AAATTAATACGACTCACTAT	Получение IRES ВГС и его
(T7-IRES-	AGGGAGACTCCCCTGTGAGG	фрагментов.
BΓC)	AACTAC-3	
IRES-R∆	CATGGTGCACGGTCTACG	Получение IRES ВГС и его
(IRES-		фрагментов.
BΓC(AUG)		
-R)		
IRES-F∆	AATTAATACGACTCACTATA	Получение IRES ВГС и его
(T7-IRES-	GGGAGACCCTCCCGGGAGA	фрагментов.
BΓCdII)	GCC	
IRES120	GTCCTGGAGGCTGCACGA	Обратная транскрипция IRES BГС.
IRES350	CGTGCTCATGATGCACGGTC	Обратная транскрипция IRES ВГС.
IRES-	AAAGGTGCACGGTCTACG	Получение IRES ВГС и его
BΓC(UUU)		фрагментов.
-R		
IRES-	GGTTTTTCTTTGAGGTTTAG	Получение IRES ВГС и его
BΓC(FL)-R	G	фрагментов.

ВГС

И

его

IRES

Обратная транскрипция 18S рРНК.

Обратная транскрипция 18S рРНК.

Получение

фрагментов.

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

IRES

180

350,

BΓCdIVR

18S-161-

18S-331-

TACGAGACCTCCCGGGGCAC

CGGCATGTATTAGCTCTAGA

GTTCGAATGGGTCGTCGCCG

68	18S-506-	TATTTTTCGTCACTACCTCC	Обратная транскрипция 18S рРНК.
	525		
69	18S-655–	AAAGTGGACTCATTCCAATT	Обратная транскрипция 18S рРНК.
	674		
70	18S-821-	GGCGGGGGACGGGCGGTGGC	Обратная транскрипция 18S рРНК.
	840	Т	
71	18 S- 911–	GCCGTCCCTCTTAATCATGG	Обратная транскрипция 18S рРНК.
	930		
72	18S-1081-	CTTTCGCTCTGGTCCGTCTT	Обратная транскрипция 18S рРНК.
	1100		
73	18S-1228-	GTCAAATTAAGCCGCAGGCT	Обратная транскрипция 18S рРНК.
	1247		
74	18S-1348-	TGAGGTTTCCCGTGTTGAG	Обратная транскрипция 18S рРНК.
	1366		
75	18S-1503-	CGGGGGTCGCGTAACTAGT	Обратная транскрипция 18S рРНК.
	1521		
76	18S-1681-	CGAATGGGGTTCAACGGGT	Обратная транскрипция 18S рРНК.
	1699		
77	18S-1830-	CACCTACGGAAACCTTGTT	Обратная транскрипция 18S рРНК.
	1848		
78	R339	GCACGGTCTACGAGA	Получение алкилирующего
			производного для модификации
			IRES BFC.
79	R344	CATGGTGCACGGTCTACG	Получение алкилирующего
			производного для модификации
			IRES BFC.
	1		

В альтернативном варианте ПЦР-продукты предварительно субклонировали в промежуточную плазмиду pBluescript II KS(–) по сайтам рестрикции EcoRI или PstI с последующим вырезанием вставки эндонуклеазами рестрикции NdeI и BamHI. Для этого ПЦР-продукт (2 мкг) и плазмидную ДНК (2-5 мкг) обрабатывали эндонуклеазами рестрикции EcoRI или PstI, как описано выше. Далее плазмидную ДНК дефосфорилировали в 20 мкл смеси, содержащей 2-5 мкг ДНК и 1 е.а. щелочной фосфатазы СІР в буфере, рекомендованном производителем фермента, при 37 °C в течение 1 ч, и фермент инактивировали нагреванием

смеси до 65 °C в течение 20 мин. Лигирование очищенных ПЦР-продукта и линеаризованной плазмидной ДНК, трансформацию клеток *E. coli* и скрининг колоний проводили, как описано выше. Колонию клеток, содержащих плазмиду со вставкой, выращивали в 30-50 мл среды LB и плазмиду выделяли, как описано выше. Вставку, содержащую кДНК рибосомного белка, вырезали из полученной плазмиды с помощью эндонуклеаз рестриикции NdeI и Bam HI и клонировали в вектор pET-15b, как описано выше.

В каждом случае соответствие нуклеотидной последовательности вставки в полученной плазмиде нуклеотидной последовательности кДНК рибосомного белка проверяли секвенированием с использованием соответствующих праймеров.

2.2.2 Получение, очистка и ренатурация рекомбинантных рибосомных белков

Рекомбинантные рибосомные белки получали путём экспрессии плазмидных конструкций, полученных на основе вектора pET-15b и содержащих кДНК рибосомных белков, в клетках *E. coli*, штамм BL21(DE3). Трансформацию клеток проводили, как описано выше, используя 100 нг плазмиды. Отдельную колонию трансформированных клеток выращивали в среде LB в присутствии 0.1 г/л ампициллина при 37 °C до достижения средой уровня поглощения A_{600} =0.6; для наработки рекомбинантного белка проводили индукцию его синтеза добавлением в культуру ИПТГ до концентрации 0.4 мМ, после чего продолжали инкубацию еще 3 ч.

В случае препаративной наработки белка, клетки культивировали в 5–7 л среды в биореакторе БИОК (ЗАО "Саяны") в Лаборатории генной терапии (Институт молекулярной биологии и биофизики СО РАМН, Новосибирск). По окончании инкубации клетки осаждали центрифугированием при 4000 g в течение 20 мин при 4 °C, после чего клеточную биомассу ресуспендировали в растворе, содержащем буфер А (20 мМ Нереs-КОН, рН 7.6, 20 мМ КСl и 5 мМ 2-меркаптоэтанол) и 2 мМ PMSF, из расчёта 5 г биомассы на 20 мл раствора. К полученной суспензии добавляли лизоцим до концентрации 0.1 мг/мл, и смесь инкубировали при 30 °C в течение 15 мин. Клеточную ДНК разрушали в ультразвуковом дезинтеграторе на льду в течение 10 мин при 22 кHz. Раствор центрифугировали при 14000 g в течение 10 мин при 4 °C, и осадок, содержащий преимущественно тельца включения, растворяли в 4 мл 6 М гуанидингидрохлорида.

Для очистки рекомбинантного рибосомного белка на аффинной смоле HISselect, содержащей хелатированные ионы Ni²⁺, колонку длиной 15 см и объемом 5 мл, содержащую эту смолу, уравновешивали двумя объемами буфера А, после чего наносили образец белка в 6М гуанидингидрохлориде, и колонку промывали двумя объемами 6М гуанидингидрохлорида в

буфере А. Связавшийся со смолой белок элюировали 10 мл того же раствора, содержащего 200 мМ имидазол-HCl, pH 7.5, собирая фракции объёмом 1 мл. Наличие белка во фракциях анализировали электрофорезом в 14% ПААГ в присутствии 0.1% SDS.

Ренатурацию рекомбинантного рибосомного белка проводили методом ступенчатого диализа раствора белка в 6М гуанидингидрохлориде в буфере А, содержащем 200 мМ имидазол-HCl, pH 7.5, против растворов, содержащих последовательно понижающиеся концентрации гуанидингидрохлорида (1, 0.5, 0.25 и 0 М) в буфере диализа, содержащем 20 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 1 М KCl, 10 мМ MgCl₂ и 2 мМ 2-меркаптоэтанол. Каждую ступень диализа проводили в течение 2 ч при 0 °C в 8-луночном аппарате для диализа (Gibco) с использованием диализной мембраны, задерживающей белки с молекулярной массой >7 кДа. При небольших количествах белка (менее 5 мкл раствора белка в 6М гуанидингидрохлориде или 8М мочевине с концентрацией >20 мг/мл), его ренатурацию проводили методом быстрого разбавления [264], интенсивно размешивая образец в 100-кратном объёме воды и добавляя далее к полученному раствору необходимый буфер.

2.2.3 Выделение 40S и 60S субчастиц рибосом из плаценты человека

Рибосомные 40S и 60S субчастицы выделяли из нормальной послеродовой плаценты по методике, описанной в работе [261], с небольшими изменениями. Замороженную плаценту размалывали на миксере и суспендировали при 0 °C в равном по весу количестве буфера 50 мМ Трис-HCl, pH 7.5, содержащего 25 мМ КСl, 10 мМ MgCl₂, 0.4 мМ ЭДТА, 100 мМ NH₄Cl, 4 мМ 2-мекаптоэтанол, 250 мМ сахарозу, 1 г/л гепарина и 0.05 г/л циклогексимида. Полученный гомогенат центрифугировали с использованием ротора JA-14 (Beckman) в течение 40 мин при 4 °С и 12000 об/мин. К надосадочной жидкости (постмитохондриальному супернатанту) добавляли дезоксихолат натрия до концентрации 1% и перемешивали в течение 30 мин при 4 °С. Далее постмитохондриальный супернатант центрифугировали в роторе SW-28 (Beckman) в течение 4.5 ч при 4 °C и 25000 об/мин, и осадок полисом растворяли при 0 °C в 10 мл буфера 30 мМ Трис-HCl, pH 7.5, содержащего 25 мМ КСl, 5 мМ MgCl₂, 0.5 мМ ЭДТА и 10 мМ 2меркаптоэтанол. Нерастворившийся материал удаляли центрифугированием в роторе JA-21 (Beckman) в течение 15 мин при 18000 об/мин и 4 °С. Раствор полисом обрабатывали 0.4 мМ пуромицином последовательно 10 мин при 0 °C и 10 мин при 37 °C, затем к раствору добавляли 3 M KCl по каплям при постоянном помешивании до 0.5 М концентрации. Далее раствор центрифугировали в линейном градиенте плотности сахарозы (10-30%) в буфере 20 мМ Трис-HCl, pH 7.5, содержащем 500 мМ KCl, 4 мМ MgCl₂, 0.2 мМ ЭДТА и 10 мМ 2-меркаптоэтанол, в течение 16.5 ч при 4 °C и 21000 об/мин в роторе SW-28 (Beckman). Фракции, соответствующие пикам 40S и 60S рибосомных субчастиц, осаждали 0.7 объемами этанола при центрифугировании в роторе JA-14 (Beckman) в течение 30 мин при 4 °C и 4000 об/мин, предварительно повысив концентрацию ионов Mg^{2+} до 20 мМ и снизив концентрацию KCl до 120 мМ. Осадки рибосомных субчастиц растворяли в воде до концентрации 80-120 OE₂₆₀/мл и хранили в жидком азоте порциями по 25 мкл. Концентрацию субчастиц определяли по значению поглощения на 260 нм, принимая 1 OE₂₆₀ 40S и 60S субчастиц равным 50 и 25 пмоль соответственно.

2.2.4 Выделение суммарного белка из 40S рибосомных субчастиц

Рибосомные белки из 40S субчастиц рибосом человека выделяли, добавляя к охлажденному во льду раствору 40S рибосомных субчастиц (см. раздел 2.2.3) 2-меркаптоэтанол до концентрации 10 мМ, 1/20 объема 2 М MgCl₂ и два объема ледяной уксусной кислоты (по каплям при перемешивании). Полученную суспензию выдерживали при постоянном перемешивании 1 ч при 0 °C, осадок РНК отделяли центрифугированием на центрифуге Eppendorf 5804R (или аналог) в течение 30 мин при 4 °C и 14000 об/мин. К супернатанту добавляли 6 объемов ацетона и выдерживали 1 ч при –20 °C. Рибосомные белки осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 4 °C и 13000 об/мин, растворяли в 2%-ной уксусной кислоте, содержащей 10 мМ 2-меркаптоэтанол, и лиофилизовали.

2.2.5 Разделение рибосомных белков одномерным гель-электрофорезом в различных условиях

Для рибосомных разделения белков одномерным гель-электрофорезом В денатурирующих условиях [265] образец, содержащий 2-15 мкг белка, растворяли в 5 мкл буфера 60 мМ Трис-НСІ, рН 6.8, содержащего 20% глицерина, 0.05% бромфенолового синего, 1% 2-меркаптоэтанола и 2% SDS. Раствор инкубировали 10 мин при 60 °С и затем наносили на двухступенчатый полиакриламидный гель, состоящий из нижнего разделяющего геля, содержащего 15% акриламида, 0.4% бисакриламида, и 0.1% SDS в 375 мМ буфере Трис-HCl, рН 8.8, и верхнего концентрирующего геля, содержащего 4.5% акриламида, 0.125% бисакриламида и 0.1% SDS в 125 мМ буфере Трис-HCl, pH 6.8. В качестве электродного буфера применяли 25 мМ Трис-глицин, pH 8.3, содержащий 0.1% SDS. Электрофорез проводили при 10 В/см в концентрирующем геле и 20 В/см в разделяющем геле и прекращали после выхода бромфенолового синего из геля. Для определения положений белков гель окрашивали Кумасси бриллиантовым синим R250.

Для разделения рибосомных белков одномерным гель-электрофорезом в нативных условиях образец белка наносили на полиакриламидный гель, содержащий 15% акриламида, 0.4% бисакриламида, 50 мМ Трис-НОАс, pH 8.0 или 6.0, и 5 мкг/мл рибофлавина, применяя в качестве электродного буфера 50 мМ Трис-НОАс, pH 8.0 или 6.0 соответственно. Перед нанесением образца проводили предфорез в течение 1 ч при 0.5 В/см. Разделение белков проводили в течение 3 ч при 1 В/см. Для разделения рибосомных белков одномерным гельэлектрофорезом в полиакриламидном геле, содержащем горизонтальный градиент (0–8 М) мочевины, гель формировали между стеклянными пластинами, развёрнутыми на 90° относительно направления миграции белков, с помощью градиент-формера. Градиент мочевины формировали из двух акриламид-содержащих растворов указанного выше состава, один из которых содержал дополнительно 8М мочевину. Электрофорез проводили в условиях, аналогичных тем, что указаны выше.

2.2.6 Анализ рибосомных белков двумерным гель-электрофорезом

Разделение рибосомных белков двумерным гель-электрофорезом проводили согласно методике, описанной в [266]. Образец, содержащий 100-120 мкг суммарного рибосомного белка (если в экспериментальном образце белка было меньше, то добавляли белок-носитель до указанного количества), растворяли в 3 мкл 20 мМ буфера Трис-H₃BO₃, pH 8.3, содержащего 1 мМ ЭДТА, 8 М мочевину, 1% 2-меркаптоэтанола и 0.01% пиронина G. Разделение в полиакриламидном геле первого направления, содержащем 8% акриламида, 0.132% бисакриламида, 8 М мочевину и 10 мМ ЭДТА в 200 мМ буфере Трис-H₃BO₃, pH 8.6, проводили в стеклянных трубках с внутренним диаметром 1 мм при силе тока 0.5 мА в течение 2 ч. В качестве "верхнего" электродного буфера использовали 60 мМ Трис-H₃BO₃, pH 8.3, содержащий 3 мМ ЭДТА, а в качестве "нижнего" электродного буфера – тот же буфер, но с рН 8.6. После разделения белков в первом направлении, гель извлекали из трубки и проводили его диализ против 40 мМ буфера бис-Трис-НОАс, pH 6.0, содержащего 6 М мочевину, 1% SDS, 1% 2-меркаптоэтанола и 0.1% бромфенолового синего, в течение 20 мин при комнатной температуре, после чего укладывали на гель для электрофореза во втором направлении. Разделение белков во втором направлении проводили в двухступенчатом полиакриламидном геле, состоящем из концентрирующего геля, содержащего 4% акриламида, 0.07% бисакриламида, 6 М мочевину и 0.2% SDS в 40 мМ буфере Бис-Трис-НОАс, pH 6.0, и разделяющего геля, содержащего 12.5% акриламида, 0.25% бисакриламида и 6 М мочевину в 100 мМ буфере Бис-Трис-НОАс, рН 6.75. Верхний электродный буфер содержал 50 мМ Бис-Трис-MES, pH 6.5, 0.2% SDS и 0.02% тиогликолевой кислоты, а нижний электродный буфер -

20 мМ Бис-Трис-НОАс, pH 6.75. Электрофорез проводили при 10 В/см до выхода бромфенолового синего из геля.

2.2.7 Окрашивание белков в полиакриламидном геле после разделения электрофорезом

После разделения рибосомных белков электрофорезом гель окрашивали одним из двух способов – серебром и Кумасси бриллиантовым голубым. Для окрашивания серебром гель помещали на 8 мин в раствор, содержащий 30% ацетона, 0.75% трихлоруксусной кислоты и 0.01% формальдегида, после чего споласкивали дистиллированной водой и выдерживали 5 мин в водном растворе, содержащем 50% (v/v) ацетона. Далее гель споласкивали дистиллированной водой и переносили на 1 мин в водный раствор, содержащий 0.017% Na₂S₂O₃ после чего снова споласкивали дистиллированной водой и выдерживали 6.38% формальдегида и 0.285% AgNO₃. Для проявления белковых пятен на геле использовали раствор, содержащий 0.01% формальдегида, 0.0025% Na₂S₂O₃ и Na₂CO₃. Окраску фиксировали водным раствором, содержащим 1% уксусной кислоты.

При окрашивании белков Кумасси бриллиантовым синим R250 гель помещали на 30-60 мин в раствор, содержащий 0.025% Кумасси бриллиантового синего, 40% этанола и 7% уксусной кислоты, после чего в течение 1-16 ч фон отмывали раствором, содержащим 10% этанола и 7% уксусной кислоты. Окрашенный гель высушивали либо между листами целлофана, либо на листе ватмана.

2.2.8 Регистрация КД-спектров рибосомных белков

Для регистрации КД-спектров рекомбинантных рибосомных белков, белок переводили в буфер, содержащий 10 мМ буфер К₂НРО₄/КН₂РО₄, рН 6.0, и концентрировали с использованием концентраторов Centricon-3. Концентрацию белка определяли как методом Брэдфорда [267], используя В качестве стандартов лизоцим И БСА. так И спектрофотометрически, рассчитывая молярный коэффициент поглощения белка при длине волны 280 нм из его аминокислотной последовательности в программе Vector NTI. При записи спектров в денатурирующих условиях белок растворяли в 10 М мочевине. Спектры КД регистрировали на спектрополяриметре Jasco J400 (Jasco) в интервале длин волн 195-250 нм в кюветах шириной 1 см при температуре 25 °C. Каждый спектр являлся результатом усреднения 5-7 записей.

2.2.9 Иммуноблотинг рибосомных белков

Рекомбинантные рибосомные белки или суммарный белок 40S субчастиц рибосом после разделения в полиакриламидном геле (см. разделы 2.2.5 и 2.2.6) переносили на нитроцеллюлозную мембрану методом электропереноса в 192 мМ буфере Трис-глицин, pH 7.5, содержащем 0.05% SDS и 10% этанола, в течение 30 мин при силе тока 100 мА на 50 см² геля. Эффективность переноса проверяли, окрашивая белки на мембране красителем Понсо S. Мембрану блокировали 15 мин в буфере TBS, содержащем 5% обезжиренного молока, и инкубировали 1 ч при комнатной температуре при перемешивании со специфичной кроличьей антисывороткой против рибосомных белков крысы, разбавленной буфером TBS в 100-1000 раз (или с очищенными антителами). Затем мембрану промывали три раза по 5 мин буфером TBS, инкубировали 2 ч с раствором конъюгата антител против IgG кролика с пероксидазой хрена, 1000-кратно разбавленным тем же буфером, и промывали 3 раза по 5 мин буфером TBS. Положения белков на мембране определяли по регистрации сигнала хемилюминесценции в реакции пероксидазы хрена с субстратами из коммерческих наборов ECL Western Blotting subatrate kit (Pierce) или ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Amersham), используя рентгеновскую плёнку.

2.2.10 Очистка антител против рибосомного белка uS15 человека из соответствующей антисыворотки

Сто мг BrCN-агарозы инкубировали в 1 мМ HCl в течение 15 мин при 20 °C, после чего промывали 1 мл 0.1 M Na₂CO₃, pH 9.0 и инкубировали при перемешивании с 15.6 нмоль рекомбинантного белка uS15 в течение 2 ч при 20 °C. Затем смолу попеременно промывали 4 раза по 1 мл буферов 0.1 M NaOAc, pH 5.5, и 0.1 M Na₂CO₃, pH 9.0, содержащих 0.5 M NaCl. Далее смолу уравновешивали 100 мМ буфером Трис-HCl, pH 7.5, содержащим 150 мМ NaCl (буфер Б), и инкубировали в течение 16 ч при 4 °C с 1 мл антисыворотки, предварительно осветленной низкоскоростным центрифугированием. После этого смолу промывали 2 мл 50 мМ буфера Трис-HCl, pH 7.5, содержащего 120 мМ NaCl и 0.5% Нонидет P-40 (буфер В), 2 мл 50 мМ буфера Трис-HCl, pH 7.5, содержащего 1.0 M LiCl и 0.5% Нонидет-P40, 4 мл буфера В и 4 мл буфера Б. Связавшиеся со смолой антитела элюировали буфером 50 мМ глицин-HCl, pH 2.5, содержащим 150 мМ NaCl. Очищенные антитела анализировали с помощью иммуноблотинга (см. раздел 2.2.9).

2.2.11 Получение ДНК-матриц для синтеза РНК-транскриптов с помощью Т7 РНК-полимеразы

РНК-транскрипты, моделирующие различные районы пре-мРНК рибосомных белков и 18S рРНК, получали транскрипцией соответствующих ДНК-матриц с помощью РНК полимеразы фага Т7.

ДНК-матрицы для синтеза фрагментов S15INT, S9INT, S9INT2 и S26INT получали с помощью ПЦР (см. раздел 2.2.1), используя геномную ДНК клеток HeLa и пары специфических праймеров: 13FE-1 и 13RE-2, 16FE-1 и 16RE-1, 16FE-2 и 16FE-2, и 26FE-1 и 26RE-2 соотвественно (см. Таблицу 2.1).

ДНК-матрицу для синтеза РНК-транскрипта S13INTm, содержащего замены в положениях 44-46 (ССС на AGA) и 191-193 (ААG на ССС) РНК-транскрипта S13INT, получали с помощью последовательных ПЦР. Реакции проводили в условиях, описанных выше (см. раздел 2.2.1). В первой реакции использовали праймеры 13-Mut1-F и 13-Mut1-R и ДНК-матрицу для синтеза транскрипта S13INT. Полученный продукт использовали в последующих ПЦР как "мегапраймер". Вторым праймером в данных реакциях был либо 13FE-1, либо 13RE-2. Реакционные смеси инкубировали при 94 °С в течение 3 мин, при 72 °С в течение 10 мин и далее проводили 30 циклов инкубации (95 °С 30 с, 55 °С 40 с и 72 °С 45 с) с финальной инкубацией при 72 °С в течение 7 мин. Полученные продукты использовали в качестве "мегапраймеров" в последующих ПЦР. Реакционную смесь инкубировали в качестве "мегапраймеров" в последующих ПЦР. Реакционную смесь инкубировали в качестве "мегапраймеров" в последующих ПЦР. Реакционную смесь инкубировали в качестве "мегапраймеров" и поими, после чего добавляли праймеры 13FE-1 и 13RE-2 и амплифицировали, как описано выше (см. раздел 2.2.1). Во всех случаях продукты амплификации анализировали и очищали с помощью гель-электрофореза в 2%-ном агарозном геле. Нуклеотидные последовательности полученных ДНК-матриц определяли с помощью секвенирования.

ДНК-матрицу для синтеза РНК-транскрипта 18S3DM получали с помощью ПЦР в условиях, как описано в разделе 2.2.1, используя плазмиду pAM18T7-2 в качестве матрицы и праймеры 18S3DMF и 18S3DMR.

ДНК-матрицы для синтеза РНК-транскриптов 3Dm и 18SCD получали в ходе двух последовательных ПЦР каждую. В первых реакциях в качестве матрицы использовали плазмиду pAM18T7-2 и пары праймеров 18S3DmF1 и 18S3DmR или 18SCDF1 и 18SCDR соответственно. ПЦР проводили в условиях, как описано в разделе 2.2.1. Во вторых реакциях в качестве матриц использовали ПЦР-продукты, образовавшиеся в соответствующих первых реакциях, и пары праймеров 18S3DmF2 и 18S3DmR или 18SCDF2 и 18SCDR соответственно. Реакции проводили в условиях, как описано в разделе 2.2.1, используя 30 циклов инкубации при температурном режиме 95 °C 20 с, 45 °C 40 с и 72 °C 45 с.

ДНК-матрицу для синтеза РНК-транскрипта 3Dc получали в две стадии. На первой стадии ПЦР проводили в двух реакционных смесях объемом 50 мкл, содержащих

дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты dATP, dGTP, dTTP, dCTP (0.2 мМ каждый), ПЦР-буфер (75 мМ Трис-HCl, pH 8.9, 20 mM (NH₄)₂SO₄ и 0.01% Твин 20), 1.5 мМ MgCl₂, 2 e.a. Таq ДНКполимеразы, 1 нг плазмиды pAM18T7-2 в качестве матрицы и пары праймеров 18S-А и 18S-В (первая смесь) или 18S-С и 18S-D (вторая смесь) в количестве 50 пмоль каждый. ПЦР проводили в режиме "Touchdown": 20 циклов в условиях постепенного понижения температуры для гибридизации праймеров (94 °C – 30 с; 60 °C, с понижением температуры на 1 градус с каждым последующим циклом – 40 с; 72 °C – 45 с) и 30 циклов для наработки целевого продукта (94 °C – 30 с, 52 °C – 40 с, 72 °C – 45 с). Перед началом первого цикла осуществляли денатурацию кДНК при 94 °C в течение 3 мин, по окончании последнего цикла проводили финальную достройку амплифицированных фрагментов при 72 °C в течение 7 мин. После ПЦР 5 мкл раствора анализировали электрофорезом в 5%-ПААГ при 50 В/см в буфере ТВЕ. Гель окрашивали красителем "Stains-all". Далее, полученные ПЦР-продукты (3 мкг) подвергали расщеплению эндонуклеазой рестрикции PstI (5 е.а.) в 40 мкл буфера (10 мМ Трис-HCl pH 8.5, 10 мМ MgCl₂, 100 мМ KCl и 0.1 мг/мл БСА) в течение 2 ч при комнатной температуре в буфере рестрикции. По окончании реакции смесь инкубировали в присутствии 1.6 мкг протеиназы К 10 мин при 42 °С. Полученные ДНК-продукты лигировали с помощью Т4 ДНК-лигазы (400 е.а.) в буфере, поставляемом производителем фермента, в течение 3 ч при 25 °C; затем фермент инактивировали в течение 20 мин при 65 °C. Полученная таким образом ДНК была амплифицированна в ПЦР с использованием праймеров 18S-А и 18S-D, как описано выше.

ДНК-матрицу для синтеза РНК-транскрипта, соответствующего полноразмерному IRES ВГС (IRES₄₀₋₃₇₂) – фрагменту 40-372 геномной РНК ВГС, получали линеаризацией плазмиды pXL40-372.NS' эндонуклеазой рестрикции BamHI. Синтез ДНК-матриц для получения РНКтранскриптов, соответствующих делеционным формам IRES ВГС, проводили с помощью ПЦР с использованием плазмиды pXL40-372.NS' в качестве матрицы. Для синтеза ДНК-матрицы, соответствующей IRES_{ΔORF}, в котором отсутствовала последовательность 345-372 IRES ВГС, в качестве праймеров использовали олигодезоксирибонуклеотиды IRES-F и IRES-RA. Для синтеза матрицы, соответствующей IRES_{ΔDIIΔORF}, где наряду с последовательностью 345-372 отсутствовал и домен II IRES ВГС, использовали праймеры IRES-FΔ и IRES-RΔ.

2.2.12 Получение РНК-транскриптов с помощью Т7 РНК-полимеразы

Синтез немеченой РНК проводили в 200 мкл 120 мМ буфера HEPES-KOH, pH 7.5, содержащего 20 мМ MgCl₂, 4 мМ DTT, по 0.8 мкмоль ATP, CTP, GTP и UTP, 0.1 мг/мл БСА, 2 мМ спермидин, 5 мкг ДНК-матрицы, 5 е.а. РНКазина, 2 е.а. пирофосфатазы и 100 е.а. РНК-полимеразы фага T7. Реакционную смесь инкубировали 3-18 ч при 37 °C. После добавления 5

е.а. ДНКазы I смесь снова инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. Затем к смеси добавляли 0.1 объёма 3 М NaOAc, pH 5.2, и 3 объёма охлажденного этанола, и для формирования осадка смесь выдерживали в течение 3-5 ч при -20 °С. Осадок PHK отделяли центрифугированием на охлаждаемой центрифуге Eppendorf 5415С (12500 об/мин, 5 мин, 4 °С) или её аналоге, промывали 200 мкл 70%-ного охлажденного этанола, высушивали на воздухе (20-30 мин) и растворяли в 20 мкл воды. PHK очищали гель-фильтрацией на колонке со смолой Sephadex G-50. Для этого растворенный в 20 мкл воды осадок PHK наносили на колонку длиной 15 см и диаметром 0.5 см и элюировали буфером 10 мМ Трис-HCl, pH 7.5 в присутствии 1 мМ ЭДТА. Фракцию, содержащую PHK, собирали, и PHK осаждали этанолом. Осадок растворяли в воде и хранили при -20 °С. Гомогенность препарата PHK проверяли электрофорезом в 5%-ном денатурирующем ПААГ. По окончании электрофореза, PHK в геле окрашивали раствором Stains all (25 мг в 100 мл 50% деионизованного формамида) и гель высушивали.

Для получения ³²Р-меченых РНК-транскриптов реакцию проводили в 20 мкл 80 мМ буфера HEPES-KOH, pH 7.5, содержащего 6 мМ MgCl₂, 10 мМ DTT, ATP, CTP, UTP (в концентрации 1 мМ каждый), 0.1 мМ GTP, 1 мМ GMP, 2-4 МБк [α -³²P]GTP, 1-2 пмоль ДНК, 20 е.а. РНК-полимеразы фага T7 и 5 е.а. РНКазина. Смесь инкубировали 1 ч при 37 °C. Полученные РНК-транскрипты очищали от низкомолекулярных продуктов с помощью электрофореза в 5%-ном денатурирующем ПААГ. По окончании электрофореза гель радиоавтографировали на рентгеновскую пленку. Полосу геля, содержащую меченый РНК-транскрипт, вырезали; РНК из геля элюировали 0.3 М буфером NaOAc pH 5.5, содержащим 0.05% SDS и 1 мМ ЭДТА, осаждали этанолом и растворяли в 20 мкл воды.

Статистическое включение биотина в РНК проводили, используя аналог UTP – биотин-16-UTP. Для этого 100 мкл реакционной смеси, содержащей 0.2 мкг/мкл ДНК-матрицы, 300 мМ триметиламиноксид, 150 мМ HEPES-KOH, pH 7.5, 25 мМ MgCl₂, 10 мМ DTT, 3 мМ спермидин-HCl, 10 мМ NaCl, 1 мМ NTP, 0.2 мМ биотин-16-UTP, 2 е.а. РНКазина, 1 е.а. пирофосфатазы и 100 е.а. РНК-полимеразы фага T7 инкубировали в течение 20 ч при 37 °C. РНК очищали, как описано выше.

Включение биотина по 3'-концу РНК-транскрипта проводили с использованием биотингидразина. Для этого, к 1 нмоль РНК, растворённой в 100 мкл воды, добавляли 100 мкл 100 мМ NaJO₄ и смесь инкубировали в течение 30 мин при 25 °C в темноте. Затем к смеси добавляли 50 мкл 50%-ного глицерина и инкубировали в течение 5 мин в тех же условиях. РНК осаждали этанолом и осадок отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 14000 об/мин, как описано выше. Осадок растворяли в 100 мкл 10 мМ водного раствора биотин-гидразида. Полученный раствор инкубировали в течение 2 ч при 37 °C. Затем к раствору добавляли 100 мкл 200 мМ NaBH₄ и 50 мкл 1 М Трис-HCl, pH 8.0 для остановки реакции, и смесь выдерживали в течение 30 мин при 4 °C. Биотинилированную РНК осаждали этанолом и растворяли в воде.

2.2.13 Введение ³²Р-метки на 5'-конец олигодезоксирибонуклеотида

Мечение олигодезоксирибонуклеотидов ³²Р по 5'-концу проводили с помощью [γ -³²P]АТР и Т4 полинуклеотидкиназы. При получении необходимой удельной активности количества метки и олигонуклеотида в реакционной смеси варьировали в соответствующих диапазонах. Для этого реакционную смесь объемом 20 мкл, содержащую 50 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 10 мМ MgCl₂, 0.5 мМ ЭДТА, 0.1-1.5 нмоль олигодезоксирибонуклеотида, 1-10 МБк [γ -³²P]-АТР и 15 е.а. Т4 полинуклеотидкиназы, инкубировали в течение 30 мин при 37 °C. Нуклеотидный материал осаждали 10 объёмами 2%-ного LiClO₄ в ацетоне и выделяли с помощью ВЭЖХ на микроколонке объёмом 200 мкл со смолой Nucleosil 5C18, элюируя ступенчатым (по 400 мкл) градиентом концентрации метанола (10, 20, 30, 40 и 90%) в 50 мМ триэтиламмонийацетате, pH 7.5. Фракцию, содержащую олигодезоксирибонуклеотид, упаривали досуха в вакууме и растворяли в воде. Альтернативно, меченые олигонуклеотиды очищали на микроколоноках Illustra MicroSpin G-25 согласно инструкции производителя.

2.2.14 Измерение параметров связывания рибосомных белков с РНК-транскриптами методом фильтрования на нитроцеллюлозных фильтрах и определение кажущихся констант ассоциации

Связывание ³²Р-меченых РНК-транскриптов с рекомбинантными рибосомными белками человека проводили (если не указаны иные условия) в 10-20 мкл 20 мМ буфера Трис-HCl, pH 7.5, содержащего 10 мМ MgCl₂, 300 мМ KCl, 5 мМ DTT (буфер Г) и 1 мг/мл БСА, в течение 30 мин при 0 °C. Перед инкубацией РНК-транскрипты выдерживали в этом же буфере в течение 10 мин при 70 °C и затем охлаждали до 0 °C. Концентрация РНК в смесях с белками составляла 5-10 пМ, а концентрация белков находилась в пределах (как правило) от 0.1 нМ до 1 мкМ. Степень связывания РНК с белками определяли по сорбции комплексов на фильтрах с диаметром пор 0.45 мкм, которые были изготовлены в форме дисков диаметром 1.2 см из нитроцеллюлозной мембраны. После инкубации РНК-белковые смеси пропускали через фильтры при давлении 0.2 атм., и фильтры промывали 2 раза по 1 мл буфером Г. Количество радиоактивности, сорбировавшейся на фильтрах, просчитывали на приборе FX Pro Plus MultiImager (BioRad), и данные обрабатывали с помощью программы QuantityOne (BioRad). Кажущиеся константы ассоциации (*Ka*) PHK с белками рассчитывали, используя полученные данные, с помощью программ SigmaPlot (Systat Software) и Prism (GraphPad Software). При расчётах учитывали, что в условиях, когда концентрация РНК много меньше концентрации белка, *Ка* практически равна обратной величине концентрации белка, при которой половина РНК находится в комплексе.

2.2.15 Связывание суммарного белка 40S субчастиц рибосом человека с РНК-транскриптом 18S3DM

Биотинилированную PHK 18S3DM реактивировали нагреванием 2 мин при 90 °С и последующим охлаждением в течение 10 мин до 25 °С. Смолу Streptavidin Sepharose (20 мкл) дважды промывали 500 мкл воды и инкубировали с 25 пмоль PHK в 100 мкл буфера Д (20 мМ HEPES-KOH, pH 8,0, 400 мМ NH₄Cl, 16 мМ MgCl₂) на вращающейся платформе в течение 4-16 ч при 4 °С. После инкубации смолу промывали четыре раза 100 мкл того же буфера и добавляли 25 пмоль суммарного белка 40S субчастиц рибосом человека в 100 мкл буфера E (20 мМ HEPES-KOH, pH 8,0, 400 мМ NH₄Cl, 16 мМ MgCl₂, 3 мМ спермидин-HCl, 0.1% Твин 20, 500 мМ триметиламиноксид (TMAO) и 15% ДМСО). Связывание белков с PHK проводили в течение 1 ч при 25 °С при перемешивании. После инкубации смолу промывали четыре раза 100 мкл раствора для нанесения образцов на одномерный денатурирующий полиакриламидный гель, содержащий 0.1% SDS, и белки разделяли электрофорезом.

В случае свободной РНК 18S3DM, 100 пмоль ТР40 растворяли в 200 мкл буфера Е, не содержащего Твин 20, и смешивали со 100 пмоль РНК-транскрипта в 3 мкл воды, реактивированного, как указано выше. Сразу после смешивания раствор осветляли центрифугированием при 14000 g в течение 2 мин; супернатант переносили в новую пробирку и инкубировали 1 ч при 37 °C. Полученную смесь наносили на линейный градиент плотности сахарозы (10-30%) в буфере 20 мМ НЕРЕЅ-КОН, рН 8.0, содержащем 400 мМ NH₄Cl и 10 мМ MgCl₂, и центрифугировали при 52000 об/мин в течение 4.5 ч при 4 °C в роторе Весктапп TS-60. По окончании центрифугирования градиент фракционировали через проточную кювету микроспектрофотометра Милихром ("Эконова"). Фракции, соответствующие рибонуклеопротеинам, собирали и белки извлекали из фракций путем сорбирования на смолу StrataClean. Связавшиеся белки элюировали со смолы и анализировали, как указано выше.

2.2.16 Связывание рибосомного белка uS15 с фрагментами пре-мРНК в составе ядерного экстракта клеток HeLa

Рекомбинантный белок uS15 инкубировали в течение 5 мин при 30 °C в 30 мкл смеси, содержащей 50% ядерного экстракта клеток HeLa, 50 мМ буфер Трис-HCl, pH 7.5, 300 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА и 0.1% Тритона X-100 (буфер Ж). Смесь меченых РНК-транскриптов (S13INT и фрагментов пре-мРНК рибосомных белков eS17 и eS26), каждого по 0.5 фмоль с активностью 2000-4000 имп/мин, также инкубировали в буфере Ж в течение 10 мин при 30 °С. Далее смеси белка uS15 и PHK-транскриптов объединяли и инкубировали в течение 1 часа при 20 °C. Антитела, специфичные к белку uS15, иммобилизовали на смоле Protein G Sepharose, перемешивая 20 мг смолы с 10 мкл антисыворотки в течение 2 ч при 0 °С. Смолу с иммобилизованными антителами промывали 5 раз по 1 мл буфера 3 и добавляли к смеси, содержащей белок uS15 и PHK-транскрипты в ядерном экстракте, далее смесь выдерживали в течение 1 ч при 0 °С. Смолу со связавшимися РНК-белковыми комплексами, осаждали центрифугированием, промывали 5 раз по 1 мл буфера 3 и комплексы разрушали инкубацией в 100 мкл 100 мМ буфера Трис-HCl, pH 7.5, содержащего 10 мМ ЭДТА в роторе SW-28 (Beckman), 10 мМ DTT и 2% SDS, в течение 20 мин при 60 °C. РНК из раствора выделяли методом фенольной депротеинизации и анализировали в 5%-ном денатурирующем полиакриламидном геле.

2.2.17 Ферментативный футпринтинг РНК в комплексе с рибосомными белками

Реакцию ферментативного футпринтинга проводили согласно протоколу [268] с небольшими изменениями. Комплекс рибосомного белка с РНК-транскриптом получали, инкубируя 1 пмоль РНК с 30 пмоль белка в 10 мкл 20 мМ буфера HEPES-KOH, рН 7.5, содержащего 150 мМ КСl, 8 мМ MgCl2, 10 мМ DTT и 0.4 пмоль/мкл суммарной тРНК *E. coli*, в течение 15 мин при 20 °C. Затем к реакционным смесям добавляли 0.5 е.а. РНКазы T1, 0.2 е.а. РНКазы T2 или 0.05 е.а. РНКазы V1 и дополнительно инкубировали в течение 15 мин при 20 °C. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 0.5%-ного SDS и РНК очищали двукратной фенольной депротеинизацией.

2.2.18 Химический футпринтинг РНК в комплексе с рибосомными белками

Расщепление РНК гидроксил-радикалами осуществляли добавлением 1/10 части свежеприготовленного раствора, содержащего 12 мМ Fe(NH₄)₂(SO₄)₂, 62 мМ аскорбиновую кислоту, 25 мМ ЭДТА-КОН, рН 7.5, и 0.6% H₂O₂, к раствору соответствующего РНК-белкового комплекса. После инкубации в течение 3 мин при 25 °C реакцию останавливали добавлением 20 мл 0.1 М тиомочевины, и РНК выделяли путем фенольной депротеинезации.
Модификацию РНК DMS проводили в буферных растворах, приготовленных в отсутствие соединений с амино и сульфгидрильными группами, обычно в 20 мМ HEPES-KOH, рН 7.5, содержащем 100 мМ КС1 и 2.5 мМ MgCl₂. Модификацию РНК DMS осуществляли добавлением 1 мл свежеприготовленного раствора 0.8 М DMS в этаноле к 20 мл раствора РНК или её комплекса. После инкубации в течение 10 мин при 25 °C реакцию останавливали 1 мл 2-меркаптоэтанола, а РНК выделяли путем фенольной депротеинезации.

Модификацию РНК СМСТ проводили, добавляя к раствору, содержащему РНК, 0.5 объёма 200 мМ СМСТ в 50 мМ НЕРЕЅ-КОН, рН 7.5 и инкубируя смесь в течение 10 мин при 37 °C. По окончании инкубации реакцию останавливали добавлением β-меркаптоэтанола до 100 мМ, и РНК выделяли, как указано выше.

Модификацию РНК ENU проводили, добавляя к раствору, содержащему РНК, 0.25 объёма насыщенного раствора ENU в этаноле и инкубируя смесь 1.5 ч при 22 °C. Модифицированную РНК осаждали этанолом, растворяли в 10 мкл 100 мМ Трис-HCl, рН 9.0 и нкубировали в течение 5 мин при 50 °C. Продукты гидролиза осаждали добавлением 10 объёмов 2% LiClO₄ в ацетоне с последующим центрифугированием при 14000 об/мин в течение 10 мин.

2.2.19 Определение разрывов цепи и модифицированных нуклеотидных остатков в РНК с помощью обратной транскрипции

Образцы, содержащие смесь 3 пмоль ³²Р-меченого олигодезоксирибонуклеотидапраймера (см. раздел 2.2.13) и 2 пмоль РНК в 7 мкл воды, инкубировали в течение 2 мин при 90 °C и затем помещали в лёд. Далее образцы переводили в буфер 50 мМ Трис–HCl, pH 8.3, содержащий 75 мМ КОАс, 8 мМ Mg(OAc)₂, 10мМ DTT, 0.25 мМ dNTPs и 0.5-2 е.а. обратной транскриптазы AMV и инкубировали в течение 10-30 мин при 37 °C. Реакцию останавливали добавлением 1/10 объёма 3 М NaOAc, и продукты осаждали добавлением 3 объёмов этанола. Для определения нуклеотидной последовательности PHK в реакционные смеси добавляли один из четырёх ddNTP до конценрации 20-50 мкМ. Продукты обратной транскрипции анализировали электрофорезом в 8%-ном ПААГ в присутствии 8М мочевины.

2.2.20 Сплайсинг фрагментов пре-мРНК uS15 и uS9 in vitro и анализ продуктов сплайсинга

³²Р-меченые РНК-транскрипты (25000 имп/мин) были синтезированы и очищены, как описано выше (см. раздел 2.2.12). Ядерный экстракт клеток HeLa осветляли центрифугированием в течение 1 мин при 1000 об/мин. К смеси 45 мкл ядерного экстракта и 30

мкл буфера 20 мМ Трис-HCl, pH 7.5, содержащего 100 мМ КCl, 0.2 мМ ЭДТА и 5% глицерина, добавляли 4 мкл 80 мМ MgCl₂, 4 мкл 0.5 М креатинфосфата, 2 мкл 1 М НЕРЕЅ-КОН, pH 7.8 и 0.5 мкл 0.1 М АТР, и смесь инкубировали в течение 15 мин при 30 °C. Затем к смеси добавляли ³²Р-меченый РНК-транскрипт с последующей инкубацией при той же температуре. В отдельных экспериментах к реакционным смесям добавляли растворы рекомбинантных рибосомных белков до указанных концентраций (не более 1/10 от объема реакционной смеси). Через определенные промежутки времени из реакционной смеси отбирали аликвоты по 10-15 мкл, которые замораживали в жидком азоте. Далее к аликвотам добавляли по 50 мкл раствора, содержащего 0.15 М NaCl, 0.1% SDS, 12.5 мМ ЭДТА, 100 мМ Трис-HCl, pH 7.5, и 5 мкг протеиназы К, и инкубировали их 15 мин при 37 °C. PHK осаждали этанолом и анализировали электрофорезом в 6%-ном ПААГ в присутствии 8 М мочевины.

2.2.21 Трансфекция клеток НЕК293 плазмидными конструкциями и проведение ПЦР в реальном времени

ДНК, содержащую кодирующую часть кДНК рибосомного белка uS15 получали амплификацией геномной кДНК HeLa и пары праймеров 13F и 13R (см. Таблицу 2.1). ДНК, содержащую кодирующую часть кДНК белка uS15 и последовательность первого интрона, вставленную между первым и вторым экзонами, получали в две стадии. На первой стадии амплификацией геномной ДНК HeLa с парами праймеров (13F и 13-I-plR) и (13-I-plF и 13R) (см. Таблицу 2.1) получали два фрагмента, которые затем использовали в ПЦР в качестве матрицы с парой праймеров 13F и 13R. Полученные ПЦР-фрагменты гидролизовали с помощью рестриктаз PstI и BamHI и вставляли в плазмиду pECFP-N1, гидролизованную по тем же сайтам. Соответствие вставки в полученных таким образом плазмидах pECFP-S13 и pECFP-S13-int1 целевым фрагментам подтверждали секвенированием. Клетки НЕК293 (4×10⁵), выращенные в среде DMEM, содержащей 10% FBS, трансфицировали 10 мкг плазмидной ДНК с использованием трансфектанта jetPEI. Через 18 ч (когда уровень трансфекции по данным флуоресценции составлял ~10-15%) суммарную клеточную РНК выделяли с помощью реагента TRI-reagent. Обратную транскрипцию 2 мкг РНК проводили с использованием обратной транскриптазы M-MLV и 0,5 мкг праймера p(dN)₆. ПЦР в реальном времени проводили с использованием набора Platinum SYBR Green qPCR SuperMix и амплификатора Rotorgene 6 (Corbett Research). Для стандатизации количества РНК в образцах использовали праймеры, специфичные кДНК GAPDH. Все реакции проводились согласно инструкциям производителей.

2.2.22 Компьютерный анализ структуры белков и РНК

Вторичную структуру РНК рассчитывали с помощью интерактивной программы Sfold. Для предсказания расположения структурных элементов в белке были использованы программы GOR, PSIpred и SSpro. Выравнивание нуклеотидных последовательностей генов рибосомных белков и анализ идентичности их интронов выполняли с помощью программы ECR (Evolutionary Conserved Regions) Browser (http://ecrbrowser.dcode.org), и Multalin. Выравнивание аминокислотных последовательностей белков и расчет их идентичности выполняли с помощю программы EMBOSS-Align. Анализ трёхмерных структур биополимеров и их комплексов осуществлялся с использованием пакета программ РуМОL.

2.2.23 Диссоциация белков из 40S субчастицы рибосомы человека под действием моновалентных катионов

Диссоциацию 40S субчастиц проводили путем центрифугирования 40S субчастиц (20-150 пмоль) в градиентах плотности сахарозы (10-30%) и концентрации LiCl (0.3-1.5 M) в буфере И, содержащем 20 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 0.5 M KCl, 4 мМ MgCl₂ и 0.4 мМ ЭДТА с использованием ротора SW40 при 36 000 об/мин в течение 24 ч при 4 °C. После центрифугирования содержимое пробирки фракционировали на 16 фракций равного объема (см. раздел 2.2.15). Аликвоты по 200 мкл из каждой фракции встряхивали с 10 мкл суспензии смолы StrataClean в течение 2-6 ч при 22 °C. Смолу осаждали путем центрифугирования и промывали буфером И. Связавшийся со смолой материал элюировали добавлением 10 мкл 2%ного SDS, и белки разделяли гель-электрофорезом в денатурирующих условиях. Гель окрашивали раствором 0.04% Кумасси бриллиантового синего G250 в 3.5%-ной хлорной кислоте.

2.2.24 Расщепление 40S субчастицы рибосом человека на голову и тело

Смесь 100 пмоль 40S субчастиц, 1.5 нмоль олигодезоксирибонуклеотидов 18S-1207 и 18S-1693 (Таблица 2.1) и 50 е.а. РНКазы Н инкубировали в течение 48 ч при 37 °C в 40 мкл буфера 20 мМ Трис-НСІ, рН 7.5, содержащего 120 мМ КСІ и 10 мМ MgCl. Затем смесь центрифугировали в линейном градиенте плотности сахарозы (10-30%) в том же буфере с использованием ротора SW40 в течение 17 ч при 30000 об/мин и 4 °C. Градиент фракционировали (см. раздел 2.2.15), и фракции, содержащие фрагменты 40S субчастиц, собирали.

2.2.25 Расщепление белков трипсином и приготовление образцов для MALDI-TOF масс-

спектрометрии

Кусочек полиакриламидного геля (~5 мг), содержащий целевые белки, инкубировали в 200 мкл раствора 25 мМ NH₄HCO₃ в 50%-ном ацетонитриле при комнатной температуре и интенсивном встряхивании до тех пор, пока краситель в геле не обесцвечивался, и затем высушивали в течение 30 мин в вакууме. К высушенному гелю добавляли 30 мкл раствора, содержащего 10 мМ DTT и 25 мМ NH₄HCO₃, и гель инкубировали в этом растворе в течение 1 ч при 56 °С на водяной бане. По окончании инкубации жидкость удаляли, и к гелю добавляли 30 мкл раствора 55 мМ 2-йодацетамида в 25 мМ NH₄HCO₃; гель выдерживали в этом растворе в течение 45 мин при комнатной температуре в темноте. Затем жидкость удаляли, и гель отмывали поочерёдно в 200 мкл 25 мМ NH₄HCO₃ и 25 мМ NH₄HCO₃ в 50%-ном ацетонитриле. Отмытый гель высушивали в вакууме. К высушенному гелю добавляли 2 мкл раствора трипсина (0.5 мг/мл) при охлаждении льдом в течение 10 мин и 30 мкл 25 мМ NH₄HCO₃ с последующей инкубацией при 37 °С в течение ночи. По окончании инкубации жидкость над гелем удаляли, остатки жидкости испаряли на ротационном вакуумном испарителе SpeedVac, и сухой материал растворяли в 5 мкл раствора 0.1% трифторуксусной кислоты в 50%-ном ацетонитриле. Полученные для масс-спектрометрического анализа образцы передавали в Объединенный Центр геномных, протеомных и метаболомных исследований (ИХБФМ СО РАН). Масс-спектры снимали на тандемном времяпролётном масс-спектрометре MALDI-TOF Autoflex speed series LIFT (Bruker Daltonics) с использованием в качестве матриц 4гидроксицианоциннамоновой, синапиновой или 2,5-дигидроксибензойной кислот. Результаты масс-спектрометрии анализировали с помощью программы mMass 5.4 и сервиса Mascot.

2.2.26 Связывание рекомбинантного рибосомного белка uS2 человека и его и мутантных форм с 40S субчастицами рибосом

Рекомбинантные рибосомные белки переводили в буфер К, содержащий 20 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 120 мМ KCl, 2.5 мМ MgCl₂ и 0.25 мМ спермидин. Дефицитные по нативному белку uS2 40S субчастицы рибосом из плаценты человека реактивировали в этом же буфере в течение 10 мин при 37 °C, взвешенные частицы из раствора удаляли центрифугированием в течение 1 мин при 14000 об/мин. Связывание 40S субчастиц (10-20 пмоль) и белков в указанной концентрации проводили в 100 мкл буфера К в течение 1 ч при 24 °C. Отделение комплекса 40S субчастиц с белком от несвязавшегося белка проводили центрифугированием в линейном градиенте плотности сахарозы (10-30%) в буфере К с использованием ротора SW40 в течение 18 ч при 24000 об/мин и 4 °C или в градиенте плотности сахарозы 5-40% в том же буфере с использованием ротора Тіб0 в течение 3 ч при 52000 об/мин и 4 °C. После центрифугирования содержимое пробирок фракционировали (см. раздел 2.2.15), и комплекс 40S субчастиц с белком из соответствующих фракций осаждали, добавляя $MgCl_2$ до 20 мМ и 0.7 объема холодного этанола с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 4 °C и 14000 об/мин на центрифуге "Eppendorf 5403". Содержание белка во фракциях анализировали электрофорезом в 14%-ном полиакриламидном геле в присутствии SDS. Количество связавшегося белка определяли с помощью денситометрирования в программе Gel-Pro 3.2.

2.2.27 Анализ связывания IRES ВГС с 40S рибосомными субчастицами

Связывание 40S субчастиц (или их комплекса либо с белком, либо с антителами) с 32 Pмеченым IRES BГС (10-20 фмоль) проводили в 20 мкл буфера К, инкубируя смесь в течение 30 мин при 30 °C. Связывание IRES ВГС регистрировали методом фильтрования на нитроцеллюлозных фильтрах (см. раздел 2.2.14). В другом варианте, 40S рибосомные субчастицы (2 пмоля) в 200 мкл буфера К в присутствии, если указано, 60 пмоль рекомбинантного белка uS2 и/или 5 мкл мышиных антител против этого белка и/или 30 фмоль IRES ВГС инкубировали в течение 1 ч при 24 °C. Отделение комплексов от несвязавшихся компонентов проводили центрифугированием смеси в линейном градиенте плотности сахарозы (5-40%) в буфере К с использованием ротора Ti60 в течение 3 ч при 52000 об/мин и 4 °C. После центрифугирования содержимое пробирок фракционировали, собирая фракции по 400 мкл (см. раздел 2.2.15), и в каждой фракции измеряли оптическую плотность (на 260 нм) и количество радиоактивности.

2.2.28 Флуоресцентное зондирование экспонированных остатков лизина рибосомных белков в 40S субчастицах и их комплексах с IRES BГС и его делеционными формами

Связывание 40S субчастиц с ³²P-мечеными PHK-транскриптамии, соответствующими IRES BГС или его делеционным формам, проводили, инкубируя 4 пмоль 40S субчастиц и указанное количество PHK-транскрипта в 10 мкл буфера Л, содержащего 20 мМ HEPES-KOH, pH 7.5, 100 мМ KCl и 2.5 мМ MgCl₂, в течение 30 мин при 30 °C (в случае делеционных форм IRES BГС) или в течение 2 ч при 37 °C (в случае IRES₄₀₋₃₇₂). Степень связывания PHK с субчастицами определяли фильтрованием комплексов через нитроцеллюлозные фильтры (см. 2.2.14).

Для флуоресцентного мечения рибосомных белков к 10 пмоль 40S субчастиц или смеси 10 пмоль 40S субчастиц и 40 пмоль PHK-транскрипта в 25 мкл буфера Л, добавляли 0.5 мкл 1 MM раствора NHS-Cy3 в ДМСО. Смесь 40S субчастиц и PHK-транскрипта предварительно выдерживали в условиях их связывания (см. выше). Реакционные смеси инкубировали в течение 4 ч при 25 °C, после чего диализовали через мембрану VSWP 14250 против 10 мл 20 MM буфера Трис-HCl, pH 7.5, содержащего 100 мМ KCl и 10 мМ MgCl₂ в течение 16 ч. Рибосомные белки экстрагировали из 40S субчастиц двумя объёмами уксусной кислоты с последующим осаждением пятью объёмами ацетона (см. 2.2.4). Осадки рибосомных белков высушивали и растворяли в 10 мкл 125 мМ буфера Трис-HCl, pH 6.8, содержащего 2% SDS, 10% глицерина, 0.2% 2-меркаптоэтанола и 0.1% бромфенолового синего, после чего разделяли электрофорезом в 15%-ном полиакриламидном геле в присутствии SDS (см. 2.2.5). Флуоресценцию меченых белков регистрировали на сканере Molecular Imager Pro FX (BioRad) и денситометрировали с использованием программы QuantityOne; денситограммы нормировали, используя в качестве внутреннего контроля количество флуоресцентной метки в дорожке, соответствующей изолированным 40S субчастицам.

2.2.29 Селективное введение фотоактивируемых групп в IRES ВГС и характеризация полученных производных

Синтез производных олигодезоксирибонуклеотидов, несущих 4-(N-2-хлорэтил-Nметиламино)-бензиламидную группу на 5'-концевом фосфате, проводили в сухом ДМСО. Олигодезоксирибонуклеотид (1-3 OE₂₆₀) переводили в цетавлоновую соль, добавляя 1.5 эквивалента цетилтриметиламмонийбромида, высушивали в ротационном вакуумном испарителе SpeedVac и растворяли в 20 мкл ДМСО. К раствору добавляли высушенные над 10 мг 4-диметиламинопиридина, 7 мг 2,2-дипириридилдисульфида и 8 P_2O_5 МΓ трифенилфосфина и растворяли при интенсивном перемешивании. Затем к раствору добавляли 2 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензиламингидрохлорида, растворяли ΜΓ его при перемешивании, и раствор инкубировали 40 мин при 25 °C. По окончании реакции олигонуклеотидный материал осаждали добавлением 10 объёмов 2% LiClO₄ в ацетоне и центрифугировали 10 мин при 4 °C и 14000 g. Осадок растворяли в 50 мкл воды и переосаждали таким же образом. Полученное алкилирующее производное олигодезоксирибонуклеотида очищали с помощью ВЭЖХ (см. раздел 2.2.13) и хранили в жидком азоте.

Для проведения комплементарно-адресованной модификации IRES ВГС 300 пмоль ³²Рмеченой РНК и 3000 пмоль алкилирующего производного олигодезоксирибонуклеотида инкубировали при 25 °C в течение 18 ч в 150 мкл буфера 20 мМ Трис-HCl, pH 7.5, содержащего 200 KCl, 20 мМ MgCl₂ и 0.5 мМ ЭДТА. По окончании инкубации нуклеотидный материал осаждали этанолом. РНК с присоединенным производным олигодезоксирибонуклеотида (ковалентный аддукт) отделяли от немодифицированной РНК электрофорезом в 8%-ном денатурирующем полиакриламидном геле. Радиоактивные полосы, соответствующие ковалентным аддуктам, вырезали из геля; нуклеотидный материал элюировали буфером 50 мМ Трис-HCl, pH 7.5, содержащим 1% SDS и 1 мМ ЭДТА, в течение 18 ч при 25 °C, затем осаждали этанолом и растворяли в воде.

Для гидролиза фосфамидной связи ковалентные аддукты инкубировали в 300 мМ NaOAc, pH 4.1 в течение 6 ч при 50 °C. Реакцию останавливали, осаждая нуклеотидный материал этанолом, модифицированную PHK отделяли от олигодезоксирибонуклеотидов гельэлектрофорезом в 8%-ном денатурирующем полиакриламидном геле и элюировали из геля, как описано выше. О гидролизе фосфаминой связи в аддукте судили по изменению подвижности PHK, принимая во внимание то, что подвижность модифицированной PHK без ковалентно присоединенного нуклеотида совпадает с подвижностью исходной PHK.

Для введения перфторарилазидогруппы модифицированную РНК после гидролиза фосфамидной связи растворяли в 50 мкл 50 мМ НЕРЕЅ-КОН, рН 9.0 и смешивали с 50 мкл 20 мМ раствора N-гидроксисукцинимидного эфира *n*-азидотетрафторбензойной кислоты в ДМСО. Реакционную смесь инкубировали в течение 90 мин при 20 °C в темноте. По окончании инкубации РНК осаждали из водной фазы этанолом и дважды переосаждали из смеси вода/ДМСО 1:1.

Определение алкилированных нуклеотидов РНК проводили с помощью метода обратной транскрипции (см. раздел 2.2.19).

2.2.30 Аффинная модификация 40S субчастиц рибосом человека производными IRES ВГС и идентификация сшитых белков

Смесь 40S субчастиц (1.5 пмоль/мкл) с фотоактивируемым производным IRES BГС (3-4 пмоль/мкл) инкубировали в течение 2 ч при 37 °C в 20 мкл буфера Л. Для образования сшивок смесь облучали ультрафиолетовым светом в течение 5 мин при 0 °C, используя лампу SpotCure (UVP), через фильтр, отсекающий излучение с длиной волны менее 300 нм. Для выделения рибосомных белков облученные комплексы осаждали этанолом, растворяли в 20-40 мл раствора, содержащего 0.5% SDS и 5 мМ ЭДТА, и инкубировали при 37 °C в течение 20 мин для диссоциации рибосом на рРНК и белки. Полученную смесь обрабатывали 100 е.а. РНКазы Т1 в течение 2 ч при 37 °C с последующим добавлением 50 е.а. этого же фермента и инкубацией в тех же условиях для достижения исчерпывающего гидролиза РНК. В

экспериментах с мечеными производными IRES ВГС белки после обработки РНКазой Т1 осаждали 6-ю объёмами холодного ацетона и разделяли электрофорезом в 14%-ном SDS-ПААГ последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану И авторадиографией. с Количественная оценка радиоактивности на авторадиограммах была проведена на приборе ChemiDoc XRS (Bio-Rad). В случае немеченых производных IRES ВГС была применена процедура постмечения фрагментов РНК, сшитых с белками. Сначала белки отделяли от свободных олигорибонуклеотидов, полученных в результате гидролиза РНК путем гельфильтрации на колонке со смолой Sephadex G-50 в 6 М мочевине. Белковые фракции собирали, белки осаждали ацетоном, и осадок растворяли в 30 мл воды. Для З'-дефосфорилирования фрагментов РНК, сшитых с белками, раствор обрабатывали 2 е.а. щелочной фосфатазы Fast AP Thermosensitive (Fermentas) B Gydepe (100 MM Tris-HCl, pH 8.0, 50 MM MgCl₂, 1 M KCl, 0,2% Тритон X-100 и 1 мг/мл БСА) при 37 °С в течение 30 мин. После завершения реакции фосфатазу инактивировали инкубацией смеси при 75 °С в течение 10 мин. Мечение фрагментов РНК по 3'-концу проводили путем добавления к смеси 4 е.а. Т4 РНК-лигазы, 5 мкКи [5'-³²P]-рСр и 1/10 объёма буфера (500 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 100 мМ MgCl₂, 100 мМ DTT и 10 мМ ATP) с последующей инкубацией смеси при 8 °С в течение 16 ч. Мечение фрагментов РНК по 5'-концу проводили путем инкубации смеси с 5 мкКи [γ -³²P]-АТР и 20 е.а. Т4-полинуклеотидкиназы при 37 °С в течение 1 ч. Белки (как немодифицированные, так и меченые сшитые) осаждали добавлением 9-ти объёмов этанола и анализировали с помощью электрофореза в SDS-ПААГ, как описано выше.

Глава 3

Структурно-функциональные особенности взаимодействий рибосомных белков человека с различными видами РНК

(Результаты и обсуждение)

Толчком к началу исследований, представленных в настоящей главе, послужило бурное развитие в 90-х годах прошлого столетия различных методов молекулярной биологии, основанных на применении метода ПЦР, разработанного незадолго до этого. Открывшиеся возможности простого и быстрого получения фрагментов геномной ДНК и кДНК, а также встраивания желаемых последовательностей в заданные районы получаемых фрагментов позволили создавать ДНК-конструкции, применимые как для продуцирования индивидуальных рекомбинантных белков в клетках *E. coli*, так и для синтеза фрагментов РНК с использованием фаговых полимераз. Понятно, что владение такими методами существенно облегчает изучение взаимодействий между отдельными белками и РНК in vitro. Однако на момент начала настоящей работы описываемые методы, можно сказать, представляли передний край науки и только начинали свой путь в общелабораторную практику, а от исследователя каждый раз требовались существенные усилия для их адаптации под свои задачи. Поэтому материал, представленный в данной главе, помимо непосредственно самих результатов исследований, содержит описание методологических подходов к созданию генетических конструкций различного назначения, в том числе для синтеза рекомбинантных рибосомных белков человека и получения РНК-транскриптов, соответствующих разным структурным доменам рРНК, широко используемых сегодня при исследовании РНК-белковых взаимодействий.

3.1 Получение функционально активных рекомбинантных рибосомных белков человека и изучение их вторичной структуры

Изучение структуры и функциональных свойств любого белка требует его получения в изолированном виде в количестве, достаточном для планируемых экспериментов, что является отдельной исследовательской задачей. На момент начала настоящей работы был описан способ получения индивидуальных рибосомных белков человека, основанный на выделении рибосомных субчастиц из послеродовой плаценты, экстракции их них суммарного рибосомного белка и последующем разделения его на отдельные рибосомные белки с помощью препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [180]. Однако для получения миллиграммовых количеств рибосомных белков этот способ оказался довольно трудоёмким и дорогостоящим. Другим вариантом получения индивидуальных рибосомных белков являлся подход, основанный на экспрессии рекомбинантных ДНК-конструкций, содержащих копию целевого гена, в прокариотических клетках-продуцентах [269]. Такой способ начал активно применяться с середины 90-х годов для получения рекомбинантных эукариотических белков и стал хорошей альтернативой выделению целевых рибосомных белков из природных тканей. Принципиальным моментом получения рекомбинантных белков в прокариотических системах являляется добавление к одному из концов целевого белка короткой аминокислотной последовательности или целого белка (тэга, от англ. tag - хвост, обрывок), которые позволяют проводить аффинную очистку рекомбинантного белка. Однако свойства полученных рекомбинантных белков часто зависят от типа и положения выбранного тэга. Поэтому на начальном этапе настоящего исследования предстояло решить задачу выбора оптимального способа получения индивидуальных рекомбинантных рибосомных белков человека, позволяющего выделять их в количестве десятков миллиграммов. В этой связи требовалось разработать универсальный для рибосомных белков млекопитающих протокол получения высокоочищенных препаратов функционально активных рекомбинантных белков и на его основе получить представительный набор рибосомных белков человека.

3.1.1 Создание генетических конструкций и получение рекомбинантных рибосомных белков человека

При выборе системы для получения рекомбинантных рибосомных белков человека принимали во внимание скорость этого процесса и его стоимость. Поэтому окончательный выбор был сделан в пользу экспрессии в клетках E. coli, которые можно легко и быстро наращивать в больших количествах, ДНК-конструкций на основе плазмидного вектора рЕТ-15b. получать рекомбинантные белки co встроенной позволяющего N-концевой гексагистидиновой последовательностью (His₆-tag), удобной для их очистки с помощью аффинной хроматографии. С использованием такой системы был получен набор высокоочищенных препаратов рекомбинантных рибосомных белков uS3, uS7, eS10, eS19, eS26, иS15, uS9, uS13, uS2, eS28 и uL2 (S3, S5, S10, S19, S26, S13, S16, S18, SA, S28 и L8 соответственно) человека и делеционные формы некоторых из них.

Общая процедура получения плазмидных конструкций для трансформации клеток *E. coli* и получения штаммов-суперпродуцентов рекомбинантных рибосомных белков человека выглядела следующим образом. Последовательность кДНК, кодирующую рибосомный белок, получали ПЦР-амплификацией суммарной клеточной кДНК, синтезированной на основе выделенной из плаценты человека poly(A)⁺ PHK с помощью обратной транскрипции с

использованием праймера олиго-(dT)₁₂₋₁₈. В каждом случае для ПЩР-амплификации использовали пару праймеров, из которых один (прямой праймер) содержал участок, соответствующий 5'-части кодирующей последовательности мРНК рибосомного белка, а другой (обратный праймер) – участок, комплементарный 3'-части этой последовательности. Оба праймера дополнительно несли на 5'-концах последовательности для создания сайтов рестрикции в ПЩР-продукте. Последовательности специфичных для каждого рибосомного белка пар праймеров приведены в Таблице 2.1. В результате ПЩР происходило накопление, как правило, единственного продукта ожидаемой длины (Рисунок 14А), который предварительно клонировали в вектор pBluescript II KS(–) по сайтам рестрикции EcoRI или PstI. Далее полученную плазмиду нарабатывали и фрагмент, содержащий кДНК рибосомного белка, субклонировали в экспрессионный вектор pET-15b по сайтам рестрикции NdeI и BamHI. Полученная в результате таких манипуляций плазмидная конструкция содержала часть, кодирующую рибосомый белок, вставленную с сохранением рамки считывания после последовательности, кодирующей 20-звенный пептид, включающий шесть остатков гистидина (последовательность (His)₆-tag).

Для получения рекомбинантного рибосомного белка клетки E. coli штамма BL21(DE3) трансформировали соответствующей плазмидой, и отдельный клон наращивали в питательной среде до поздней логарифмической фазы клеточного роста. Индукцию синтеза рекомбинантного белка запускали добавлением в клеточную культуру ИПТГ. Как правило, через 3 ч после индукции количество рекомбинантного белка ожидаемого размера в клетках достигало максимального уровня и составляло ~10% от общего количества клеточного белка (Рисунок 14Б). Анализ показал, что полученные таким способом рекомбинантные рибосомные белки накапливаются в клетках преимущественно (свыше 90%) в виде телец включения, и различные попытки увеличить долю рекомбинантного белка в цитоплазматической фракции (например, проводить индукцию при пониженной температуре среды или снижать концентрацию ИПТГ) слабо влияли на этот показатель. Поэтому процедура очистки рекомбинантных рибосомных белков включала стадии выделения телец включения, их солюбилизации в хаотропном агенте и аффинную хроматографию белка на смоле, содержащей хелатированные ионы никеля. Этот способ позволял получать практически гомогенный препарат белка чистотой до 95-98% (Рисунок 15). Следует отметить, что электрофоретическая подвижность рекомбинантных рибосомных белков в SDS-ПААГ была несколько ниже, чем соответствующих им природных белков из-за наличия 20-звенной последовательности, содержащей (His)₆-tag.



120

Рисунок 14. Примеры получения кДНК рибосомных белков человека и анализа экспрессии генетических конструкций, несущих эти кДНК, в клетках *E. coli*. А, анализ подвижности ПЦР-продуктов, содержащих кДНК рибосомных белков (отмеченных сверху), электрофорезом в 2%-ном агарозном геле. Дорожка М – маркер длины ДНК (длина ДНК мажорных полос в п.н. указана слева). Б, анализ суммарного клеточного белка в клетках *E. coli* до (–) и через 3 ч после (+) экспрессии плазмид, содержащих кДНК рибосомных белков (отмеченных сверху), электрофорезом в 14%-ном SDS-ПААГ. Стрелки указывают на полосы, соответствующие рекомбинантным белкам.



Рисунок 15. Очистка рекомбинантных рибосомных белков человека. Анализ препаратов очищенных рекомбинантных белков (отмечены сверху) электрофорезом в 14%-ном SDS-ПААГ. Дорожки TP40 – суммарный белок 40S субчастиц рибосом. Стрелками слева от панелей отмечены положения в дорожках TP40 рибосомных белков, соответствующих анализируемым рекомбинантным белкам. Дорожки М – белковый маркер; справа от этих дорожек указаны массы маркерных белков в кДа.

Поскольку белок в препарате, полученном из телец включения, находился в денатурированном состоянии, требовалась отдельная стадия восстановления его нативной структуры (рефолдинга). Два подхода, часто используемых для рефолдинга белков, были оптимизированы для рекомбинантных рибосомных белков человека. Рефолдинг больших количеств белков (от 100 мкг) проводили методом ступенчатого диализа против буферного

раствора с высокой ионной силой, а для небольших количеств белка применяли метод быстрого разбавления в воде с последующим переводом в буферный раствор [264]. Оба метода давали примерно одинаковые результаты, хотя следует отметить, что общий выход ренатурированного рибосомного белка зависел от конкретного белка.

Одним из недостатков использования эубактериальных систем при экспрессии генов млекопитающих является редкая встречаемость отдельных кодонов в геномах эубактерий и соответственно узнающих их тРНК. Это приводит к длительным паузам в трансляции мРНК, кодирующих белки млекопитающих, и сдвигам рамки считывания в местах частого повторения таких кодонов при синтезе рекомбинантных белков в клетках эубактерий. По-видимому, такой эффект имел место при экспрессии в клетках E. coli конструкций pET-S26 и pET-S3, содержащих кДНК, кодирующие рибосомные белки eS26 и uS3, соответственно. Так, в первом случае наблюдали образование полипептидного продукта массой около 3 кДа вместо продукта с ожидаемой массой 15 кДа, а во втором случае наряду с полноразмерным продуктом (30 кДа) в значительном количестве нарабатывался также короткий полипептид с массой около 8 кДа. Анализ встречаемости кодонов в мРНК, кодирующих рибосомные белки eS26 и uS3 человека, выявил значительное число в них редких для E. coli аргининовых кодонов AGA и AGG. Более того, оказалось, что тандем редких аргининовых кодонов AGAAGG находится в начале кодирующей последовательности мРНК белка S26 в положениях от +13 до +18 (положение +1 соответствует первому нуклеотиду старт-кодона AUG). Наличие этого тандема, по-видимому, вызывало сдвиг рамки считывания на один нуклеотид вперёд при трансляции этой мРНК, приводя к образованию короткого продукта. Чтобы преодолеть этот эффект и получить полноразмерный рекомбинантный рибосомный белок eS26, в его кДНК аргининовый кодон AGA (нуклеотиды +13 - +15) был заменен кодоном CGC, также кодирующим аргинин, но чаще встречающимся в геноме E. coli. Такая замена была произведена путём использования соответствующего прямого праймера, RS26FM (см. Таблицу 2.1), при синтезе кДНК белка eS26 с помощью ПЦР. Все дальнейшие процедуры, связанные с клонированием синтезированной кДНК и её экспрессией в составе полученной плазмиды pET-S26m в клетках E. coli, остались теми же самыми. Анализ суммарного клеточного белка после индукции синтеза целевого белка ИПТГ показал, что в клетках происходило накопление единственного продукта, молекулярная масса которого соответствует полноразмерному рекомбинантному рибосомному белку eS26 (Рисунок 14). Таким образом, замещение редких для эубактерий кодонов в кДНК рибосомных белков млекопитающих их синонимичными кодонами с более высокой частотой встречаемости позволяет преодолеть эффект сдвига рамки считывания при получении рекомбинантных форм этих белков.

Что касается экспрессии конструкции pET-S3, выход полноразмерного продукта, соответствующего рекомбинантному рибосомному белку uS3, был достаточно высоким, поэтому замены редких кодонов в его кДНК не проводили, а очистку целевого белка от низкомолекулярного полипептида выполняли с помощью гель-фильтрации.

3.1.2 Подтверждение фолдинга рекомбинантных рибосомных белков

Важным этапом работы по получению рекомбинантных белков, как правило, является проверка соответствия их структур структурам соответствующих природных белков, поскольку правильность структуры является необходимым условием того, чтобы полученный рекомбинантный белок обладал свойствами, характерными для его природного аналога. Соответствие первичной структуры каждого ИЗ полученных в настоящей работе рекомбинантных рибосомных белков первичной структуре его природного аналога подтверждали путём секвенирования участка плазмидной конструкции, кодирующей данный белок. Таким образом, было показано, что аминокислотные последовательности рекомбинантных белков, выведенные из последовательностей нуклеотидов, установленных путём секвенирования этих участков, идентичны последовательностям соответствующих природных рибосомных белков.

Чтобы определить наличие вторичной структуры у рекомбинантных белков и оценить соотношение в ней α-спиральных участков и β-тяжей часто используют спектроскопию кругового дихроизма (КД). Такой подход для изучения фолдинга рекомбинантных рибосомных белков был применён и в данной работе. Следует отметить, что на момент получения препаратов индивидуальных рибосомных белков человека, описываемых здесь, какая-либо информация об их пространственной структуре отсутствовала, поэтому любые данные о структурной организации рибосомных белков человека являлись новыми. Кроме того, этот подход позволял также проводить сравнение структурированности (содержания участков, обладающих вторичной структурой) гомологичных рибосомных белков, человека и прокариот, используя для белков человека данные КД-спектроскопии, а для их прокариотических гомологов – данные о пространственной структуре, которые уже были на тот момент получены. Однако такое сравнение требовало учёта, во-первых, того, что рибосомные белки человека включают эукариот-специфичные участки (не имеющие гомологии в прокариотических белках), которые могут иметь вторичную структуру, и, во-вторых, того, что пространственная структура рибосомного белка в свободном состоянии может не вполне соответствовать его структуре в составе рибосомы.

В настоящей работе с помощью спектроскопии КД была изучена вторичная структура трёх рекомбинантных рибосомных белков: uS15, uS9 и uS13. КД-спектры в дальней (190-250 нм) и ближней (250-300 нм) областях УФ-диапазона получены для денатурированной и ренатурированной форм белка uS15. КД-спектр ренатурированной формы этого белка (Рисунок 16А) в дальней УФ-области имел характерные (отрицательные) пики на 208 и 222 нм, которые отсутствовали у его денатурированной формы. Согласно этому спектру, ренатурированный рибосомный белок uS15 обладает выраженной вторичной структурой. Количественная оценка содержания α -спиралей и β -тяжей во вторичной структуре этого белка, выполненная на основании этого спектра с помощью программы SELCON [270], показала, что 43±5% его последовательности уложено в α -спирали, а 11±3% образует β -структуры. Таким образом, рибосомный белок uS15 человека оказался, преимущественно, α -спиральным. КД-спектр в ближней области УФ-диапазона для ренатурированного белка uS15 содержал сильный сигнал на 280 нм (Рисунок 16Б), свидетельствуя о том, что ароматические аминокислотные остатки (вероятно, тирозин) в нем обездвижены в асимметричном окружении, что, в свою очередь указывает на то, что данный белок обладает стабильной конформацией.



Рисунок 16. КД-спектры рекомбинантного рибосомного белка uS15 человека в дальней (А) и ближней (Б) УФ-областях. Линия 1 – ренатурированный белок, линия 2 – белок в денатурирующих условиях (8М мочевина).

Предсказание расположения элементов вторичной структуры в аминокислотной последовательности белка uS15 было выполнено с помощью трёх программ GOR, PSIPRED и SSPro, использующих различные алгоритмы вычислений. Полученные данные находились в хорошем согласии между собой и показали, что около 47% аминокислотной последовательности белка uS15 формируют α-спирали и около 8% образуют β-структуры.

Таким образом, данные по структуре белка uS15, полученные с помощью КД-спектроскопии, хорошо коррелировали с расчётными данными, что указывало на наличие у полученного рекомбинантного белка uS15 человека фолдинга, соответствующего структуре природного белка.

Аналогичным образом была выполнена оценка количественных параметров вторичной структуры для рекомбинантных рибосомных белков uS9 и uS13. КД-спектры в дальней УФобласти для обоих белков в ренатурированной форме имели характерные пики на 208 нм и 222 нм, что свидетельствовало о структурированности этих белков (Рисунок 17 A и Б). Характерно, что в спектре рибосомного белка uS13 пик на 222 нм был более выражен, чем в спектре рибосомного белка uS13 пик на 222 нм был более выражен, чем в спектре рибосомного белка uS13 пик на 222 нм был более выражен, чем в спектре рибосомного белка uS13 пик на 222 нм был более выражен, чем в спектре рибосомного белка uS13 пик на 222 нм был более выражен, чем в спектре рибосомного белка uS9, что указывало на более высокую долю α -спиралей в структуре белка uS13, по сравнению со структурой белка uS9. Действительно, оценка количества аминокислотных остатков, вовлеченных в формирование элементов вторичной структуры в рибосомном белке uS9, выполненная на основе полученных КД-спектров с помощью программы SELCON, показала, что 21±4% первичной структуры этого белка участвует в формировании α -спиралей, а 24±3% — в образовании β -структур. В случае белка uS13 показатель содержания α -спиралей равнялся 54±7%, а содержание β -тяжей оказалось чрезвычайно низким.

КД-спектр рибосомного белка uS9 в ближней УФ-области был выражен слабо, видимо из-за того, что остатки триптофана в белке отсутствуют, а остатки тирозина не структурированы. Что касается рибосомного белка uS13, то в его спектре наблюдали сильный сигнал вблизи 280 нм (Рисунок 17В), что свидетельствует о том, что остатки тирозина и, возможно, триптофана обездвижены в асимметричном окружении, и что данный белок, как и рибосомный белок uS15, имеет устойчивую структуру. Действительно, остатки Tyr40 и Trp127 в рибосомном белке uS13, согласно предсказанию его структуры и на основании гомологии со структурой его прокариотического гомолога, расположены в α -спиральных участках, в то время как остатки Tyr77, Tyr95 и Trp82 находятся в эукариот-специфичной области в центральной части этого белка (Рисунок 18).

В целом, данные КД-спектра рибосомного белка uS13 в ближней УФ-области, показали, что центральная эукариот-специфичная часть этого белка также структурирована, по крайней мере, частично, что находилось в хорошем согласии с предсказанием α-спирали в этом районе.

Таким образом, основываясь на данных КД-спектроскопии, было установлено, что ренатурированные рибосомные белки человека, полученные способом, описанным в настоящем разделе, обладают выраженной пространственной структурой. Учитывая, что содержание элементов вторичной структуры в рекомбинантных рибосомных белках uS15, uS9 и uS13 человека, в общем, соответствует содержанию этих элементов в структурах гомологичных белков прокариот, можно заключить, что фолдинг этих белков соответствует фолдингу их природных форм. Кроме того, частично удалось предсказать содержание вторичной структуры в эукариот/архей-специфичных областях некоторых из этих белков.



Рисунок 17. КД-спектры рекомбинантных рибосомных белков uS9 (A) и uS13 (Б и В) человека в дальней (A и Б) и ближней (B) УФ-областях. Линия 1 – ренатурированный белок, линия 2 – белок в денатурирующих условиях (8М мочевина).



Рисунок 18. Множественное выравнивание первичных структур рибосомных белков семейства uS13 для некоторых эубактерий (пять верхних строк), архей (две строки в центре) и экариот (пять нижних строк). Инвариантные аминокислотные остатки приведены в красных столбиках. Расположение α-спиралей в структуре рибосомного белка uS13 *T.thermophilus* отмечено сверху. Голубыми точками отмечены положения остатков Y77, Y95 и W82 в центральной эукариот/архей-специфичной области рибосомного белка uS13 человека.

В настоящее время, с расшифровкой структуры рибосомы человека [14], оказалось возможным сравнить данные по вторичной структуре изолированных рибосомных белков uS15, uS9 и uS13, полученные в настоящем исследовании с помощью КД-спектроскопии, с вторичной

структурой этих белков в составе рибосомы. Так, из анализа пространственных структур рибосомных белков в крио-ЭМ структуре рибосомы человека, полученной в работе [14], рибосомный белок uS15 содержит только α-спирали, и доля аминокислотных остатков, занятых в их формировании составляет 66%. Вторичная структура рибосомного белка uS13 представлена также практически полностью α-спиралями, на долю которых приходится 39% последовательности белка, тогда как на долю β-структур – только 4%. Наконец, в рибосомном белке uS9 35% последовательности участвует в образовании α-спиралей и 18% – β-тяжей. Как видно из приведённых данных, количественная оценка структурированности рибосомных белков человека, выполненная с помощью КД-спектроскопии соответствующих рекомбинантных белков, достаточно близка значениям их структурированности, полученным на основе крио-ЭМ модели рибосомы человека. Некоторые наблюдаемые расхождения могут быть связаны с несовершенством алгоритма программы SELCON, позволяющей рассчитывать содержание элементов вторичной структуры белков на основании данных КД-спектров, а также с возможными различиями в структурах рибосомных белков в изолированном состоянии и в составе рибосомы.

3.1.3 Устойчивость структуры рибосомных белков к действию мочевины и кислотно-щелочной денатурации

Применение КД-спектроскопии для изучения структурной организации рекомбинантных рибосомных белков uS15, uS9 и uS13 человека позволило исследовать также стабильность их структурной организации при различных концентрациях белкового денатуранта (мочевины) и значениях pH. Устойчивость нативной конформации белков при различных условиях изучали путем фиксации изменений значения эллиптичности белка на 222 нм при изменении концентрации мочевины и в буферных растворах с различным pH. Оказалось, что для рекомбинантного белка uS15 значение эллиптичности, отражающее структурированность белка, не изменялось при увеличении концентрации мочевины до 3 M, а, следовательно, структура белка uS15 в этом диапазоне денатуранта стабильна. При дальнейшем увеличении концентрации мочевины до 8 M значение эллиптичности для данного белка постепенно снижалось, указывая на постепенное разворачивание его структуры (Рисунок 19А). Определение стабильности структуры этого рекомбинантного белка методом электрофореза в ПААГ с поперечным градиентом концентрации мочевины дало аналогичные результаты (Рисунок 19Б). В отличие от структуры рибосомного белка uS15, структуры рибосомных белков uS9 и uS13 оказались менее устойчивы к действию мочевины, и постепенное их разворачивание становилось заметно уже при низких концентрациях мочевины (начиная от 1 М) (Рисунки 19Г, Ж и 3).



Рисунок 19. Влияние денатурантов на структуру ренатурированных рибосомных белков. Зависимость значений КД (А, Б, Г-Ж) для белков uS15, uS9 и uS13 (отмечены слева) от концентрации мочевины (А, Г и Ж) и кислотности среды (В, Д и Е). Подвижность белков в условиях электрофореза в ПААГ с поперечным градиентом мочевины.

Структуры всех трёх рибосомных белков, uS15, uS9 и uS13, были устойчивы при pH среды вблизи нейтральных значений (5 – 8) (Рисунки 19 В, Д и Е). Однако структура белка uS9 оказалась устойчивой также и при закислении среды до pH 2, тогда как в случае белков uS15 и uS13 в этих условиях наблюдали постепенное разворачивание их структуры. При защелачивании среды (до pH 10) также происходило разворачивание структуры у всех трёх рибосомных белков, при этом структура белков uS15 и uS13 разворачивалась постепенно, а для белка uS9 наблюдали резкую денатурацию при pH 9. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что структура рибосомных белков человека достаточно стабильна при физиологических значениях pH и чувствительна к наличию высокой концентрации

денатурантов, однако пределы этой чувствительности в случае конкретных белков могут быть разными.

Суммируя описанные в настоящем разделе результаты, можно заключить, что платформа, разработанная для получения рекомбинантных рибосомных белков человека, оказалась достаточно продуктивной и эффективной. Полученные на её основе рекомбинантные белки обладают выраженным фолдингом, близким фолдингу соответствующих им природных рибосомных белков. Следовательно, такие белки являются пригодными для изучения PHKбелковых взаимодействий и использования в функциональных тестах.

3.2 Структурные основы взаимодействий рибосомных белков с 18S рРНК и её фрагментами

Процесс сборки рибосомных субчастиц из рРНК и белков имеет огромное значение для клетки, поскольку от безошибочности этого процесса зависит эффективность и точность трансляции. В клетках прокариот этот процесс контролируют несколько десятков различных белковых факторов сборки, а у эукариот за сборку рибосомных субчастиц отвечает свыше двух сотен участников (см. главу 1). Тем не менее, ещё в 60-ых годах прошлого века в группе Номуры было показано, что 30S субчастицы рибосом E. coli могут быть собраны in vitro из отдельных рибосомных белков и 16S рРНК без участия дополнительных факторов [271]. Позднее, подобным образом удалость осуществить сборку активных субчастиц рибосом других представителей эубактерий и архей (см., напр., [2-4]). Эти работы существенно расширили методологический арсенал исследователей, что сыграло впоследствии неоценимую роль в изучении структурно-функциональной топографии субчастиц рибосом прокариот и в расшифровке их структуры на атомарном уровне. Однако, несмотря на усилия многих лабораторий, попытки собрать in vitro активные субчастицы эукариотических рибосом вообще и рибосом млекопитающих в частности не увенчались успехом. Это, вероятно, было обусловлено сложностью самого процесса сборки, требующего участия большого числа вспомогательных факторов (см. главу 1), и особенностями РНК-белковых взаимодействий в эукариотических рибосомах.

Таким образом, на момент начала настоящей работы исследование РНК-белковых взаимодействий, реализующихся при сборке 40S субчастиц рибосом человека, представляло значительный научный интерес, поскольку оно могло прояснить вопрос относительно возможности их сборки *in vitro*. В этой связи, представлялось целесообразным определить рибосомные белки, образующие сердцевину 40S субчастицы рибосомы человека и изучить особенности РНК-белковых взаимодействий, обеспечивающих сборку отдельных её районов,

используя индивидуальные рибосомные белки и фрагменты рРНК, содержащие участки связывания этих белков.

3.2.1 Порядок диссоциации белков из 40S субчастицы рибосомы человека под действием моновалентных катионов

Известно, что обработка рибосомных субчастиц высокой концентрацией одновалентных катионов (например, Li⁺) приводит к диссоциации рибосомных белков из субъединиц. В частности, при повышении ионной силы раствора происходит ступенчатая диссоциация 30S субчастиц рибосом *E. coli* [272]. Белки, наиболее прочно удерживающиеся на pPHK, принято называть сердцевинными. Установлено, что эти белки в первую очередь связываются с pPHK и, таким образом, контролируют сборку рибосомных субчастиц как *in vivo*, так и *in vitro* [273, 274]. Предполагалось, что такое же поведение рибосомных белков могло иметь место при сборке эукариотических рибосомных субчастиц [275], и, следовательно, информация о порядке диссоциации эукариотических рибосомных белков из 40S субчастицы могла оказаться полезной для разработки методов её сборки *in vitro*.

Попытки изучения диссоциация белков из 40S субчастиц рибосом млекопитающих при увеличении концентрации LiCl предпринимались ранее на примере рибосом из печени крысы [276, 277]. Однако использование дискретных концентраций соли, а также некоторая неоднозначность в интерпретации экспериментальных данных не позволили авторам этих работ определить точную последовательность диссоциации рибосомных белков и установить сердцевинные белки. В настоящем исследовании для диссоциации 40S субчастиц рибосом, выделенных из плаценты человека, был применён метод центрифугирования субчастиц в линейном градиенте плотности сахарозы, содержащем градиент концентрации LiCl (Рисунок 20). В ходе миграции из области низкой концентрации соли в область более высокой концентрации белки диссоциировали из 40S субчастиц и оставались в тех же областях градиента, где произошла их диссоциация, из-за их низкого коэффициента седиментации и слабой диффузии в сахарозе. Помимо градиента концентрации LiCl (0.3-1.5 М) в составе буферного раствора присутствовал также KCl в концентрации 0.5 M, поэтому за концентрацию моновалентных катионов в градиенте принимали общую концентрацию соли. После центрифугирования содержимое пробирок фракционировали, собирая фракции равного объема; белки, содержащиеся во фракциях, выделяли и анализировали с помощью электрофореза в 14%-ном SDS-ПААГ, что позволило идентифицировать большинство белков (Рисунок 21).



Рисунок 20. Типичный профиль седиментации 40S субчастиц в градиенте плотности сахарозы (10% – 30%) и концентрации LiCl (0.3 M – 1.5 M). Сплошная линия – А₂₆₀; тонкая линия – концентрация соли.

Оказалось, что все рибосомные белки диссоциировали из 40S субчастиц в интервале концентрации соли между 0.8 М и 1.55 М. Хотя диапазон этих концентраций покрывал 11 фракций градиента, присутствие одних и тех же белков, как правило, наблюдали в 5–7 соседних фракциях (Рисунок 21). Например, белки uS17 и uS15 входили в состав фракций 10-16, белок eS10 был обнаружен во фракциях 7–13, и так далее. Таким образом, интервалы концентрации соли, в пределах которых диссоциируют рибосомные белки, оказались довольно широкими и сильно перекрывались. Большинство белков начинали диссоциировать из 40S субчастиц практически одновременно при концентрации соли 0.8 М, тогда как диссоциация остальных белков (таких как uS7, uS10, eS21, eS27, eS28 и uS14) начиналась несколько позже. Концентрация соли, при которой происходила полная диссоциация конкретного рибосомного белка из 40S субчастицы, была разной. Так, во фракции градиента с концентрацией соли 1.33 М отсутствовали белки uS4, uS17, eS26, uS8 и eS30, а фракция с концентрацией соли 1.4 М не содержала белков uS5, eS1, eS6, eS8 и uS15. В 1.48 М соли частично связанными с 18S рРНК оставались белки uS3, uS7, eS7, eS10, uS19, uS9, eS17/uS13/eS24/eS25, eS19, uS10 и eS28. Наконец, во фракции с концентрацией соли 1.55 М, были обнаружены в основном белки eS7, eS10, uS9 и eS19. Во фракциях, содержащих 18S pPHK, рибосомных белков найдено не было. Результаты анализа фракций градиента электрофорезом в SDS-ПААГ были подтверждены и уточнены с помощью анализа рибосомных белков, выделенных из этих фракций, двумерным гель-электрофорезом.

Таким образом, было установлено, что все белки диссоциируют из 40S субчастиц рибосом человека в диапазоне концентраций одновалентных катионов от 0.8 M до 1.55 M. C увеличением концентрации соли диссоциация белков происходит постепенно в широком интервале концентрации, а не ступенчато. Белки uS3, uS7, eS7, eS10, uS9, eS17, eS19 и eS28 наиболее устойчивы к высокой концентрации соли, из них белки eS7, eS10, uS9 и eS19 наиболее прочно связаны с 18S pPHK и, скорее всего, составляют сердцевину 40S субчастицы.



Рисунок 21. Анализ содержания белков во фракциях градиента. Белки, из фракций градиента, соответствующих номерам дорожек, разделены электрофорезом в 14%-ном SDS-ПААГ. Показан гель, окрашенный Кумасси R250. Дорожки М, суммарный белок 40S субчастиц. Положения индивидуальных белков, определенные в отдельных экспериментах, показаны слева. Общая концентрация соли (LiCl и KCl) во фракциях указана внизу.

Представляло интерес сравнить чувствительность к действию высокой концентрации одновалентных катионов малых субчастиц рибосом эубактерий (*E. coli*) и человека. Показано, что диссоциация большинства белков из 30S субчастиц происходит ступенчато (а не плавно, как для 40S субчастиц рибосом человека) в широком диапазоне концентраций LiCl (1 M - 3.5 M), приводя к образованию частиц, дефицитных по содержанию отдельных белков [273, 278]. Примечательно, что девять белков всё еще остаются связанными с 16S рPHK после обработки 30S субчастиц 2 M LiCl, при этом часть из них диссоциирует при увеличении концентраций

LiCl до 3.5 M, а для отщепления оставшихся белков требуется сочетание высоких концентраций соли и мочевины [273]. Таким образом, 40S субчастицы рибосом млекопитающих оказались гораздо более чувствительными к высокой концентрации моновалентных катионов, чем 30S субчастицы рибосом эубактерий. Диссоциация всех белков из 40S субчастиц происходит в более узком интервале концентраций соли и без образования промежуточных частиц с характерными наборами белков, причём порядок диссоциации рибосомных белков из 40S субчастиц не соответствует порядку диссоциации белков из 30S субчастиц.

3.2.2 Отщепление головы 40S субчастицы от тела и картирование рибосомного белка eS28 на голове субчастицы

До недавнего времени, когда структура эукариотической рибосомы ещё не была расшифрована с помощью методов РСА [16] и крио-ЭМ высокого разрешения [279], о расположении белков в её составе можно было судить только на основании косвенных данных. Так, например, считалось общепринятым, что гомологичные рибосомные белки прокариот и эукариот, расположены в гомологичных районах рибосомы. О расположении белков, у которых нет эубактериальных гомологов (например, белки eS26 и eL42) можно было судить на основании данных по аффинной модификации рибосом аналогами мРНК или тРНК соответственно [280]. В некоторых случаях (например, для белка eS19) удавалось выполнить докинг (от англ. docking – стыковка) электронной плотности, полученной для изолированного эукариот/архей-специфичного белка, с районом электронной плотности в крио-ЭМ структуре рибосомной субчастицы низкого разрешения, не имеющим соответствия с известными компонентами рибосомы [281]. Однако расположение большинства эукариот/архей-специфичных белков в составе рибосомы оставалось неизвестным.

Из 8-ми рибосомных белков, найденных как наиболее прочно удерживаемые в 40S субчастице (см. раздел 3.2.1), 4 белка (uS3, uS7, uS9, и eS19) были локализованы на её голове: первые 3 белка – на основании расположения их гомологов в 30S субчастице, а белок eS19 – методом докинга [281]. Расположение остальных 4-х эукариот/архей-специфичных белков (eS7, eS10, eS17 и eS28) в составе 40S субчастицы установлено не было. Поскольку голова 40S субчастицы рибосомы формируется вокруг большого 3'-концевого домена 18S рPHK и практически не взаимодействует с другими доменами этой рPHK (см. главу 1), представлялось возможным получить эту часть рибосомы в виде отдельной частицы и изучить её белковый состав.

Ранее, на 30S субчастице эубактериальной рибосомы было показано, что её голова может быть отделена от тела расщеплением 16S рРНК в районах между спиралями h27/h28 и

h28/h44 с помощью PHKазы H [282]. Аналогичный подход был применён к 40S субчастицам рибосом человека в настоящей работе. Было установлено, что для достижения 20%-го уровня расщепления 18S pPHK в составе 40S субчастиц с помощью PHKазы H по участкам, соединяющим этот домен с её центральным и малым 3'-концевым доменами, требуется инкубация в течение 2-х суток при 37 °C (Рисунки 22 А и Б). При более длительной инкубации значительно возрастал уровень спонтанного разрушения субчастиц. Фрагмент 40S субчастицы, образовавшийся в результате такого гидролиза, выделяли из реакционной смеси центрифугированием в градиенте плотности сахарозы, собирая частицы с коэффициентом седиментации от 10S до 15S. PHK, выделенная из таких частиц, мигрировала в условиях электрофореза в денатурирующем ПААГ в виде одной полосы и по длине практически точно соответствовала большому 3'-концевому домену 18S pPHK (480 н.) (Рисунок 22Г). Таким образом, можно было утверждать, что выделенные частицы соответствуют части 40S субчастицы, составляющей её голову.



Рисунок 22. Расщепление 40S рибосомных субчастиц человека с помощью РНКазы Н. (А) Анализ РНК, выделенной из 40S субчастиц, до (2) и после (3) расщепления РНКазой Н, электрофорезом в 4%-ном ПААГ; РНК-транскрипт длиной 400 н. (1) приведён в качестве маркера. Полноразмерная 18S рРНК и продукт расщепления длиной около 480 н. отмечены стрелками. (Б) Разделение продуктов расщепления 40S субчастиц РНКазой Н в сахарозном градиенте. Пики нерасщеплённых 40S субчастиц и частиц, соответствующих голове подписаны. (В) Анализ белков, выделенных из необработанных 40S субчастиц (1) и из фракций сахарозного градиента, подписанных как "40S" (2) и "голова" (3) на панели Б, электрофорезом в 14%-ном SDS-ПААГ. (Г) Анализ РНК, выделенной из фракций сахарозного градиента подписанных как "40S" (2) и "голова" (3) на панели Б, электрофорезом в 14%-ном SDS-ПААГ. (Г) Анализ РНК, выделенной из фракций сахарозного градиента подписанных как "40S" (2) и "голова" (3) на панели Б, электрофорезом в 14%-ном SDS-ПААГ. (Г) Анализ РНК, выделенной из фракций сахарозного градиента подписанных как "40S" (2) и "голова" (3) на панели Б, электрофорезом в 14%-ном SDS-ПААГ. (Г) Анализ РНК, выделенной из фракций сахарозного градиента подписанных как "40S" (2) и "голова" (3) на панели Б, электрофорезом в 14%-ном SDS-ПААГ. (Г) Анализ РНК, выделенной из фракций сахарозного градиента подписанных как "40S" (2) и "голова" (3) на панели Б, электрофорезом в денатурирующем 4%-ном ПААГ. Стрелка указывает на продукт расщепления, соответствующий большому 3'-домену 18S рРНК. Положения маркерных РНК подписаны справа.

Анализ белков в полученных частицах, выполненный электрофорезом в SDS-ПААГ, показал, что в них присутствует значительно меньший набор белков, чем в исходных 40S субчастицах рибосом (Рисунок 22B). Кроме того, анализ белков, выделенных из фракций градиента сахарозы, содержащих смесь не гидролизованных и обезглавленных 40S субчастиц, выявил, что эти фракции истощены по некоторым белкам (Рисунок 22 В). По-видимому, эти белки были потеряны субчастицами в процессе длительной инкубации при 37° С. Точная идентификация рибосомных белков, содержащихся в частицах, соответствующих голове 40S субчастицы, была выполнена с применением иммуноблотинга и масс-спектрометрии (Рисунок 23). С помощью антител против отдельных рибосомных белков было показано, что в изолированных частицах присутствовал белок eS19, белок eS8 в них отсутствовал, несмотря на его сохранение в 40S субчастицах после длительной инкубации, а белок uS15 диссоциировал из 40S субчастиц в ходе такой инкубации (Рисунок 23Д). Таким образом, были подтверждены данные работы [281] о локализации эукариот/архей-специфичного белка eS19 на голове 40S субчастицы.



Рисунок 23. Определение белкового состава головы 40S субчастицы. (А и Б) MALDI-TOF масс-спектры белков, выделенных из 40S субчастиц. (В и Г), MALDI-TOF масс-спектры белков, выделенных из частиц, соответствующих голове 40S субчастицы. Ионизованные пики MH⁺, соответствующие рибосомным белкам, подписаны. (Д) Анализ с помощью иммуноблотинга содержания рибосомных белков eS8, uS15 и eS19 в 40S субчастицах до (1) и после обработки PHКазой H (2) и в частицах, соответствующих голове 40S субчастицы (3).

Анализ белкового содержания частиц, соответствующих голове 40S субчастицы, с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии был выполнен только для белков с молекулярной массой ниже 20 кДа, поскольку низкое разрешение спектров в более высоком диапазоне молекулярных масс не позволило надёжно идентифицировать белки с молекулярной массой выше 20 кДа. Анализ спектров, полученных для белков, выделенных из частиц, соответствующих голове 40S субчастицы, и белков исходных 40S субчастиц показал, что в голове 40S субчастицы расположены рибосомные белки uS11, uS9 и uS14, у которых есть эубактериальные гомологи, и эукариот/архей-специфичние белки eS19 и eS28 (Рисунки 22 А-Г).

Таким образом, впервые было установлено, что один из самых маленьких белков 40S субчастицы рибосомы человека, белок eS28 (Mw=7883 Да), входит в состав её головы. Более того, с учётом данных по сшивкам тиоуридин-содержащего аналога мРНК с 40S субчастицами в 48S предынициаторном комплексе, показавших, что нуклеотид мРНК в положении –6 контактирует с этим рибосомным белком [283], можно было думать, что белок eS28 занимает положение в области головы вблизи участка выхода мРНК. Позднее, с установлением структуры эукариотической рибосомы, это предсказание о расположении белка eS28 в 40S субчастице рибосомы было полностью подтверждено [16].

Таким образом, тот факт, что большая морфологическая часть 40S субчастицы рибосомы – голова может быть отщеплена от её тела, позволяет заключить, что данная часть является структурно независимой. Очевидно, что эта особенность головы 40S субчастицы должна находить отражение в характере её сборки *in vivo* при биогенезе рибосомных субчастиц.

3.2.3 Подходы, использованные в настоящей работе для изучения связывания рибосомных белков человека с различными видами РНК

Прежде чем приступить к дальнейшему изложению результатов, полученных при изучении связывания рибосомных белков человека с РНК, представляется необходимым предварительно дать краткое описание использованных подходов и методов. В опытах по связыванию были применены, как правило, ³²Р-меченые РНК-транскрипты, которые были получены с помощью Т7-транскрипции в присутствии [α -³²P]GTP. Изменяя количество меченого трифосфата в реакции, можно было синтезировать РНК-транскрипты с различной удельной активностью. Для снижения уровня возможной неспецифической сорбции положительно заряженных рибосомных белков на отрицательно заряженной РНК концентрация моновалентных катионов (преимущественно К⁺) при связывании РНК с белками превышала обычно в 2–3 раза её физиологические значения. Степень РНК-белкового связывания определяли, в основном, методом фильтрования смесей РНК с белками на нитроцеллюлозных

фильтрах, которые сорбируют белки вместе со связавшейся с ними РНК и пропускают свободную РНК. Таким образом, количество связанной с белком РНК можно было определить по количеству сорбировавшейся на фильтрах радиоактивной метки. При определении кажущихся констант ассоциации (*Ka*) рибосомных белков с РНК для комплексообразования были использованы РНК-транскрипты с высокой удельной активностью и белки в концентрациях, на 2-6 порядков превышающих концентрацию РНК. В этих условиях при расчёте величины *Ka* равновесную концентрацию белка можно было принять практически равной его начальной концентрации, и поэтому та начальная концентрация белка, при которой половина от исходного количества РНК оказывалась связанной с белком, была численно равна обратной величине *Ka* комплекса. О специфичности связывания конкретного рибосомного белка с РНК можно было судить по более высокой величине его *Ka*, по сравнению с *Ka* рибосомных белков, связывающихся с той же РНК неспецифично. Обычно величины *Ka* при формировании специфичного комплекса в несколько раз или даже более чем на порядок превышали величину *Ka* для неспецифичного комплексообразования.

Для определения участка связывания белка на РНК был применён метод футпринтинга (от англ. footprinting – отпечатывание стопы), который основан на зондировании структуры РНК в участках, доступных химическим и ферментативным зондам, и способности белков, находящихся в комплексе с РНК, защищать (экранировать) нуклеотидные остатки РНК от химической модификации или РНКазного гидролиза. Таким образом, используя данный метод и сравнивая доступность нуклеотидных остатков действию зондов в изолированной РНК и в её комплексе с белками, можно было судить об участии тех или иных нуклеотидных остатков в белковом связывании. Снижение такой доступности указывало на вовлечение нуклеотидов в комплексообразование с белком или на возможное изменение конформации данного участка, тогда как увеличение доступности свидетельствовало об конформационных изменениях в данном участке. Сами нуклеотиды, изменяющие свою доступность зондам при связывании РНК с белком, называют футпринтами.

В качестве ферментативных зондов для футпринтинга были использованы специфические РНКазы: РНКаза Т1, специфично расщепляющая РНК с 3'-стороны от доступных ей остатков G, РНКаза Т2, гидролизующая РНК в одноцепочечных участках, и РНКаза V1, образующая разрывы в двуспиральных участках РНК. Положения разрывов в РНК были определены разделением продуктов гидролиза РНК, несущей метку ³²Р на 5'- или 3'-конце, электрофорезом в денатурирующем ПААГ. Сравнивая радиоавтографы гелей после разделения продуктов частичного гидролиза РНК (как правило, в условиях, при которых глубина реакции составляет один разрыв на молекулу) в составе РНК-белкового комплекса и в

изолированном состоянии, можно было судить о влиянии белка на доступность нуклеотидов выбранным РНКазам.

Набор зондов для химического футпринтинга РНК включал агенты, специфичные как азотистым основаниям РНК, так и её сахарофосфатному остову. В качестве зондов, которые специфично модифицируют азотистые основания РНК, были использованы DMS, модифицирующий остатки A по положению N1, остатки C по положению N3 и остатки G по положению N7, и CMCT, модифицирующий остатки G по положению N1 и остатки U по положению N3 [284]. Данные зонды модифицируют соответствующие нуклеотиды в том случае, если указанные положения в них не вовлечены в образование водородных связей. Положения модифицированных нуклеотидов в РНК устанавливали с помощью обратной транскрипции.

В качестве зондов, специфичных к сахарофосфатному остову РНК и вызывающих в нём разрывы, были использованы гидроксил-радикалы, генерируемые в реакции Фентона, и этилнитрозомочевина (ENU). Гидроксил-радикалы – короткоживущие частицы, которые, атакуя положение С4' рибозы в РНК, приводят к расщеплению её сахарофосфатного остова [285], а ENU образует разрывы в РНК, реагируя с фосфатными группами [286]. Нуклеотиды, по которым происходило расщепление, были установлены либо разделением продуктов расщепления РНК, несущей концевую радиоактивную метку, электрофорезом в денатурирующем ПААГ (см. выше), либо с помощью обратной транскрипции.

При определении модифицированных нуклеотидов обратной транскрипцией было использовано свойство фермента останавливаться на нуклеотидных остатках, прилегающих с 3'-стороны к основаниям, модифицированным по положениям, участвующим в формировании уотсон-криковских пар, или перед остатками, по которым произошёл разрыв цепи РНК. Обратная транскриптаза при этом может делать паузу непосредственно на остатках G, модифицированных по атому N7. В ходе реакции удлинения меченого праймера на модифицированной (разорванной) РНК происходит накопление продуктов определённой длины, соответствующих остановкам или паузам обратной транскриптазы, которые могут быть разделены электрофорезом в денатурирующем ПААГ.

3.2.4 Связывание рекомбинантного рибосомного белка uS2 человека с 40S субчастицами, дефицитными по белку uS2, и картирование участка связывания эукариот-специфичного Сконцевого домена белка uS2 на 40S субчастице

Рибосомный белок uS2 (известный согласно ранней номенклатуре как SA или p40) является одним из самых крупных белков 40S субчастицы рибосомы человека. Его N-концевая

и средняя части (аминокислотные остатки в положениях 1-186) консервативны у эукариот и имеют высокую степень гомологии с соответствующими частями эубактериального рибосомного белка uS2, однако в средней части белка uS2 отсутствует протяжённый 54звенный фрагмент, характерный для его гомолога у зубактерий [287]. С-концевой домен (CTD) белка uS2 (район 187-295), напротив, не имеет существенной гомологии со структурой эубактериального uS2 [287], и в её составе можно выделить два участка, специфичных для эукариот, – один их них (187-214) консервативен у всех эукариот, а второй (215-295) характерен только для позвоночных. В качестве предшественника рецептора ламинина рибосомный белок uS2 обладает рядом экстрарибосомных функций (см. главу 1), однако его функциональная роль в трансляции малоизучена. Известно, что разрушение полисом приводит к частичной диссоциации белка uS2 из 40S рибосомных субчастиц, а ассоциация этого белка с субчастицами, напротив, сопровождает формирование полисом при активном клеточном росте [288, 289]. Более того, уровень белка uS2 в 40S субчастицах не постоянен, как у большинства рибосомных белков, а изменяется в зависимости от степени активности трансляции. Так, при активном белковом синтезе уровень uS2 в рибосомах повышается, и напротив, понижается при общем снижении трансляционной активности в клетке [288-290].

Для определения содержания белка uS2 в препаратах 40S субчастиц рибосом человека, выделенных из различных образцов послеродовой плаценты, было проведено разделение суммарного белка 40S субчастицы электрофорезом в SDS-ПААГ (Рисунок 24А). Белок uS2 мигрирует в геле значительно медленнее остальных рибосомных белков, и ему соответствует самая верхняя полоса в окрашенном геле. Оказалось, что отношение интенсивности этой полосы к интенсивности полос, соответствующих другим рибосомным белкам (например, таким как uS7, eS8 и uS17, которые хорошо разрешены в геле), изменяется от препарата к препарату, свидетельствуя о разном содержании рибосомного белка uS2 в этих препаратах 40S субчастиц.

Чтобы оценить содержание нативного рибосомного белка uS2 в полученных препаратах 40S субчастиц, для каждого из препаратов определяли отношение интенсивности полосы рибосомного белка uS2, соответствующей 1 пмоль 40S субчастиц, к интенсивности полосы рекомбинантного uS2 в том же геле в расчёте на 1 пмоль белка (Рисунок 24Б). Видно, что в препарате №2 содержание рибосомного белка uS2 минимально (около 15% от эквимолярного количества), а в препарате №4 максимально (около 50%). На основании полученных данных, можно предположить, что у млекопитающих, в отличие от эубактерий, рибосомный белок uS2 не является постоянным компонентом малой субчастицы рибосомы, а связывается с ней в зависимости от клеточных условий, и что уровень этого связывания зависит от общего уровня трансляции в клетке. Клетки в послеродовой плаценте, как можно ожидать, не обладают

138

высоким уровнем трансляции, следовательно, общее содержание рибосомного белка uS2 в них должно быть пониженным, что также согласуется с приведёнными наблюдениями.



Рисунок 24. Определение содержания рибосомного белка uS2 в различных препаратах 40S субчастиц рибосом человека. (А) Анализ суммарного белка 40S субчастиц (10 пмоль) из препаратов 1 - 4 (дорожки 1 -4 соответственно) и рекомбинантного рибосомного белка uS2 (5 пмоль) электрофорезом в 14%-ном SDS-ПААГ. (Б) Сравнение содержания рибосомного белка uS2 в препаратах 40S субчастиц (в %) после денситометрирования окрашенного геля.

Способность рекомбинантного рибосомного белка uS2 связываться с 40S субчастицами, дефицитными по рибосомному белку uS2, проверяли путем титрования 40S субчастиц из препарата №2, содержащего минимальное количество нативного белка uS2, данным рекомбинантным белком. В параллельных экспериментах проводили титрование 40S субчастиц из этого препарата рекомбинантными белками, соответствующими мутантным формам рибосомного белка uS2, лишённым 48-ми и 109-ти аминокислотных остатков с N- и C- концов соответственно ($uS2_{AN}$ и $uS2_{AC}$), что позволяло определить область связывания в рибосомном белке uS2. Субчастицы после инкубирования с рекомбинантными белками в присутствии 2.5 мМ Mg²⁺ и 0.2 мМ спермидина (такие концентрации применяются обычно при функциональных исследованиях рибосом млекопитающих) выделяли ИЗ смеси центрифугированием в градиенте плотности сахарозы (10-30%).

Фракции градиента, соответствующие 40S субчастицам, собирали, и анализировали содержавшиеся в них рибосомные белки электрофорезом в SDS-ПААГ (Рисунок 25А). Видно, что в выбранных условиях при 30-ти кратном избытке ruS2 по отношению к 40S субчастицам, взятым в концентрации 0.2 мкМ, его содержание в субчастицах становится близким к

насыщающему (Рисунок 25Б). При таких же условиях инкубирования с 40S субчастицами связывался усечённый белок $uS2_{\Delta N}$, взятый в концентрации, при которой происходило насыщение 40S субчастиц белком ruS2, тогда как усечённый белок $uS2_{\Delta C}$ не проявлял способности к этому связыванию (Рисунок 25В).



Рисунок 25. Связывание рекомбинантных белков: полноразмерного uS2 (ruS2), uS2_{AN} и uS2_{AC} с 40S рибосомными субчастицами. (A) Электрофоретическое разделение в 14%-ном SDS-ПААГ суммарного белка, выделенного из фракций сахарозного градиента, соответствующих пикам 40S субчастиц, полученным после центрифугирования 40S субчастиц, инкубированных с ruS2. Для связывания с 40S субчастицами (концентрация 0,2 мкМ) ruS2 был взят в 2, 4, 7, 10, 17 и 30-ти кратных избытках по отношению к субчастицам (дорожки 1-6, соответственно). Для сравнения приведены дорожки, соответствующие электрофоретическому анализу суммарного белка 40S субчастиц (TP40) и белка ruS2. (Б) Изотерма связывания рекомбинантного белка uS2 (ruS2) с 40S рибосомными субчастицами, дефицитных по рибосомному белку uS2 (графическое представление результатов опыта, приведённого на панели A, после денситометрирования окрашенного геля). Относительная ошибка эксперимента составляла 15%. (B) Разделение в 14%-ном SDS-ПААГ суммарного белка, выделенного из фракций сахарозного градиента, содержащих 40S рибосомные субчастицы, после их связывания с белками uS2_{AC}, взятыми в 30-ти кратном избытке по отношению к субчастицам (дорожки TP40+ uS2_N и TP40+uS2_{AC}, соответственно). Белки uS2_{AN} и uS2_{AC} нанесены на гель для сравнения. Стрелкой отмечена полоса, соответствующая белку uS2_{AN}.

Таким образом, делеция 48-звенного N-концевого участка белка uS2, не отражалась на его способности связываться с 40S субчастицами, а при делеции СTD, напротив, белок терял способность к этому связыванию. Можно предположить, что делеция СTD разрушает пространственную структуру белка uS2 и тем самым лишает его способности связываться с 40S субчастицами, либо именно CTD белка uS2 играет ключевую роль в этом связывании посредством формирования контактов этого белка с 18S рPHK и/или соседними рибосомными белками. Действительно, помимо CTD, важным структурным отличием рибосомного белка uS2 млекопитающих от его эубактериального гомолога является отсутствие в нём участка,

гомологичного 50-звенному фрагменту в центральной части рибосомного белка uS2 эубактерий. Этот фрагмент формирует контакты рибосомного белка uS2 с 16S pPHK в голове 30S субчастицы. Поэтому казалось вероятным, что в рибосомном белке uS2 млекопитающих его CTD взял на себя функцию формирования контактов белка с головой 40S субчастицы.



Рисунок 26. Рекомбинантные белки, соответствующие усеченным формам рибосомного белка uS2 человека. (А) Аминокислитная последовательность рибосомного белка uS2, CTD подчёркнут. (Б) Схематическое изображение рекомбинантного полноразмерного рибосомного белка uS2 и его С-концевых усеченных мутантных форм. (В) Анализ рекомбинантных белков электрофорезом в 14%-ном SDS-ПААГ. ТР40 - суммарный белок 40S субчастиц, дефицитных по рибосомному белку uS2, положение которого указано стрелкой.

Чтобы проверить участие СТD рибосомного белка uS2 в его ассоциации с 40S субчастицей рибосомы и найти последовательность, ответственную за это связывание, были синтезированы мутантные формы этого белка, последовательно усечённые с С-конца. Мутантная форма uS2 Δ 1 была укорочена на 17 аминокислотных остатков, форма uS2 Δ 2 – на 33 остатка и форма uS2 Δ 3 – на 60 остатков (Рисунок 26). Ранее было отмечено, что удаление даже 75-ти аминокислотных остатков с С-конца белка uS2 не изменяет структуру его остальной части [34], то есть указанные С-концевые делеции также не должны были влиять на структуру оставшейся части белка. Как и в случае полноразмерного uS2, его делеционные формы были растворимы и их электрофоретические подвижности соответствовали их молекулярным массам (Рисунок 26). Насыщение 40S субчастиц рекомбинантными белками проводили, как описано выше; связанные с белками 40S субчастицы были отделены от избытка несвязавшегося белка центрифугированием в сахарозном градиенте. Суммарный белок, выделенный из 40S субчастиц после центрифугирования, был разделён электрофорезом в 14%-ном SDS-ПААГ, перенесён на

нитроцеллюлозную мембрану, и содержание природного рибосомного белка uS2 и его рекомбинантных форм было проанализировано с помощью иммуноблотинга (Рисунок 27). Для иммунодетекции были использованы моноклональные антитела, специфичные к району 187-210 рибосомного белка uS2 человека [291]. Поскольку этот район был представлен во всех формах этого белка, то в случае связывания рекомбинантного белка с 40S субчастицами в каждой дорожке должны были присутствовать два сигнала. Действительно, два сигнала отчетливо видны в дорожках 2-4, но не в дорожке 5 (Рисунок 27), указывая, что все белки, кроме делеционной формы uS2 Δ 3 способны связываться с 40S частицей. Эти данные свидетельствовали о том, что аминокислотная последовательность в районе 236-262 рибосомного белка uS2, отсутствующая только в форме uS2 Δ 3, является необходимой для связывания этого белка с 40S субчастицей.



Рисунок 27. Связывание делеционных мутантных форм белка uS2 с 40S рибосомными субчастицами, дефицитными по рибосомному белку uS2. (А) Окрашенная нитроцеллюлозная мембрана после электрофоретического разделения и переноса белков, выделенных из 40S субчастиц после их связывания с рекомбинантным рибосомным белком uS2 или его делеционными мутантами. (Б) Детекция природного рибосомного белка uS2 и связавшихся с 40S субчастицами рекомбинантных белков (отмечены звездочками), присутствующих на мембране (панель А), с использованием антител, специфичных к рибосомному белку uS2.

Чтобы найти участок 18S рРНК, отвечающий за формирование сайта связывания СТD рибосомного белка uS2 в голове 40S субчастицы, был использован метод гидроксилрадикального футпринтинга 18S рРНК в 40S субчастицах, дефицитных по белку uS2, которые были насыщены рекомбинантным белком – полноразмерным uS2 или его усеченной формой. Поиск нуклеотидов 18S рРНК, защищаемых от атаки гидроксил-радикалами, был ограничен областью 1250-1665, соответствующей большому 3'-концевому домену этой рРНК, формирующему голову 40S рибосомной субчастицы. Именно это регион 18S рРНК должен был содержать нуклеотиды, до которых мог бы доставать СТD белка рибосомного белка uS2, исходя из расположения его гомолога в структурах 30S субчастиц эубактериальных рибосом. Нуклеотиды, защищаемые от расщепления гидроксил-радикалами, были найдены только в спиралях h35 и h40 18S pPHK (Рисунок 28).

Следует отметить, что все обнаруженные uS2-специфичные футпринты были довольно слабыми по сравнению с сигналами, относящимися к открытым участкам в pPHK, из-за наличия в используемых препаратах 40S субчастиц значительной доли эндогенного рибосомного белка uS2. Футпринты по остаткам A1378 и G1381 в спирали h35 были ожидаемыми, поскольку аналогичная спираль контактирует с рибосомным белком uS2 в эубактериальной 30S субчастице [292]. Помимо них, были обнаружены также футпринты по остаткам A1465, U1462–C1464 и A1452–1454 в шпильке h40. Среди них наиболее сильным был футпринт по остатку A1465 (Рисунок 28). Интересно, что в 30S субчастице с этой шпилькой не связан ни один белок (за исключением самой её базальной части).



Рисунок 28. Гидроксил-радикальный футпринтинг 18S рРНК в 40S субчастицах, связанных с рекомбинантным рибосомным белком uS2 или его делеционными формами. (А и Б) Фрагменты радиоавтографа геля, содержащего футпринты, специфичные для СТD рибосомного белка uS2. Дорожки соответствуют 40S субчастицам, свободным или связанным с указанными белками после обработки гидроксил-радикалами; дорожка "-OH" – 40S субчастицы без обработки; U, C, G и A – сиквенсные дорожки, полученные в присутствии соответствующих ddNTP. Точками справа отмечены положения футпринтов. (В) Фрагмент вторичной структуры района 18S рРНК человека (согласно [293]) с указанными на нём положениями футпринтов, отмеченных на панелях A и Б. Стрелками с точками на концах отмечены футпринты, соответствующие связыванию с 18S рРНК СТD рибосомного белка uS2 человека, стрелками с квадратами – связыванию консервативной части белка, присутствующей в белке uS2 прокариот.

Нуклеотиды U1462–A1465 расположены в апикальной части шпильки h40, в то время как нуклеотиды A1452–A1454 лежат в её базальной части на расстоянии одного витка спирали (Рисунок 28). Все найденные футпринты являлись специфичными для рекомбинантных белков, способных связываться с 40S субчастицами (а именно, для полноразмерного uS2 и его укороченных форм uS2 Δ 1 и uS2 Δ 2). Это давало основание полагать, что именно CTD, отвечающий за связывание uS2 с 40S субчастицами, контактирует со шпилькой h40 18S pPHK.

Данные по определению нуклеотидов 18S pPHK, контактирующих с СТD белка uS2, позволили впервые предположить местонахождение этого домена белка на голове 40S субчастицы рибосомы грибов *Thermomyces lanuginosus* [281], разрешение структуры которой на тот момент было самым большим среди доступных структур рибосом эукариот. Так, СTD белка uS2 простирается, по-видимому, от консервативной части этого белка в направлении шпильки h40, и затем по её краю, обращённому наружу субчастицы, так что аминокислоты в области 236-262 CTD образуют контакты со шпилькой h40 (Рисунок 29). Примечательно, что район 236-262 в белке uS2 человека лишён положительно заряженных аминокислотных остатков, которыми обычно обогащены рибосомные белки, но зато он насыщен полярными аминокислотными остатками, которые также могут взаимодействовать с PHK. Поскольку одни и те же футпринты выявлены для полноразмерного рибосомного белка uS2 и его обеих мутантных форм, было сделано предположение, что область 263-295 белка uS2 не участвует в связывании с 18S pPHK, хотя и может взаимодействовать с соседними белками, например RACK1 или uS3 (Рисунок 29).



Рисунок 29. Позиционирование СТD белка uS2 на 40S субчастице рибосомы. Приведена модель головы 40S субчастицы рибосомы *T. lanuginosus* (PDB 3JYV) [281]. Нуклеотиды в шпильке h40, соответствующие футпринтам, характерным для СТD белка uS2, отмечены стрелками. Зеленая стрелка указывает направление предлагаемого расположения СТD белка uS2.
В настоящее время стали доступны крио-ЭМ структуры рибосом различных млекопитающих, включая человека, однако структура CTD белка uS2 в них по-прежнему не разрешена, поэтому вопрос о контактах CTD белка uS2 с соседними белками остаётся открытым.

3.2.5 Взаимодействие рибосомных белков uS7, uS15, uS9 и uS13 человека с фрагментами 18S рРНК, содержащими участки их связывания

Один из подходов к изучению РНК-белковых взаимодействий в рибосомных субчастицах основан на изучении комплексов отдельных рибосомных белков с фрагментами рРНК. Последние могут быть получены в системе транскрипции *in vitro*, а в качестве белков могут быть использованы рекомбинантные рибосомные белки. Такой подход ранее часто применяли для изучения взаимодействия прокариотических рибосомных белков с РНКтранскриптами, соответствующими фрагментам 16S рРНК, содержащим сайты связывания этих белков (см., напр., [294, 295]). В частности, РНК-транскрипт, соответствующий фрагменту 926-986/1219-1393 16S рРНК, использовали в работе [295] для изучения термодинамических характеристик связывания рибосомного белка uS7 эубактерий. В настоящем разделе описаны результаты исследований взаимодействия рекомбинантных рибосомных белков uS7, uS15, uS9 и uS13 человека с рРНК-фрагментами, содержащими участки связывания этих белков.

3.2.5.1 Связывание рибосомного белка uS7 с фрагментом 1203-1236/1521-1698 18S рРНК

На момент начала настоящего исследования информации о молекулярных контактах белка uS7 в 40S субчастице рибосомы не существовало, поскольку структуры эукариотических рибосом с высоким разрешением не были получены. Однако согласно данным крио-ЭМ 40S субчастиц рибосом дрожжей с низким разрешением [296], было известно, что положение эукариотического белка uS7 соответствует положению гомологичного ему белка uS7 в 30S субчастицах рибосом прокариот. Следовательно, можно было полагать, что белок uS7 в 40S субчастице и белок uS7 в 30S субчастице взаимодействуют с гомологичными участками рРНК малых субчастиц рибосом. С другой стороны, более сложное строение эукариотических рибосомных белков и РНК должно было отразиться на молекулярной организации этих биополимеров в рибосомной субчастице, что могло проявиться в появлении дополнительных РНК-белковых контактов.

Для изучения связывания рибосомного белка uS7 человека с 18S pPHK был выбран её фрагмент 1203-1236/1521-1698 (3Dm), который соответствует участку 16S pPHK, содержащему

участок связывания рибосомного белка uS7 эубактерий. Для синтеза фрагмента 3Dm сначала был получен ПЦР-продукт, содержащий ДНК-копию этого фрагмента, где протяжённый участок, соответствующий нуклеотидам в положениях 1237-1520, был замещён коротким фрагментом длиной 3 пары оснований. Затем этот продукт был применен в качестве матрицы для синтеза ДНК, содержащей копию фрагмента 3Dm, помещённую под контроль Т7промотора. Эта ДНК была использована для синтеза фрагмента 3Dm с помощью T7транскрипции. Фрагмент 3Dm был относительно коротким (217 н.) и включал спирали h28-h30 и h41-h43, которые в структуре 18S pPHK образуют компактный кластер с ярко выраженной вторичной структурой (Рисунок 30). Примечательно, что фрагмент 3Dm включал районы 18S рРНК, обладающие высокой филогенетической консервативностью. Наибольшей консервативностью обладали нуклеотиды, формирующие две внутренние петли, находящиеся у оснований шпилечных структур фрагмента. Апикальные части шпилек h42 и h43 также являлись консервативными. Всё это давало основание полагать, что с рибосомным белком uS7



Рисунок 30. Вторичная структура района 18S рРНК человека, соответствующего фрагменту 3Dm, согласно [293]. Нумерация нуклеотидов дана для 18S рРНК человека. Основания, защищаемые белком uS7 человека от PHКазного гидролиза, обведены в кружок, а участки PHK, включающие эти основания, отмечены римскими цифрами. Во вставке приведена вторичная структура участка рРНК малой субчастицы, соответствующего фрагменту 3Dm, отображающая консервативность нуклеотидов согласно [293]. Большими буквами отмечены основания, встречающиеся более чем у 98% рРНК малых субчастиц рибосом известных видов организмов, малыми буквами – у 90-98%, чёрными кружками – у 80-90% и белыми кружками – менее чем у 80%.

будут контактировать в основном районы РНК, образованные внутренними петлями.

Комплексообразование рекомбинантного рибосомного белка uS7 с фрагментом 3Dm было проведено при 0 °C в буфере, содержащем 250 мM KCl, в условиях многократного превышения концентрации белка над концентрацией PHK, и степень связывания PHK с белком измерена методом фильтрования на нитроцеллюлозных фильтрах. Из Рисунка 31 видно, что величина *Ka*, обратная величине *Kd*, для рекомбинантного рибосомного белка uS7 составляет $(2.5\pm0.5)\times10^8$ M⁻¹, тогда как при связывании этого же PHK-фрагмента с другими рекомбинантными рибосомными белками человека, eS10 и eS26, величины *Ka* были более чем на порядок ниже. Это свидетельствовало о специфичности связывания рибосомного белка uS7 с фрагментом 3Dm.



Рисунок 31. Изотермы связывания рекомбинантных рибосомных белков uS7, eS10 и eS26 человека с меченым фрагментом 3Dm. По оси ординат отложена доля связавшейся PHK в процентах. Относительная ошибка измерений составляла не более 10%.

Для определения участков фрагмента 3Dm, вовлекаемых в формирование области связывания белка uS7, использован метод ферментативного футпринтинга с помощью PHKa3 T1 и T2. Продукты расщепления 5'-, либо 3'-³²P-меченого фрагмента 3Dm были анализированы электрофорезом в денатурирующем ПААГ. Сравнение результатов расщепления фрагмента 3Dm, изолированного и связанного в комплекс с белком, позволило выявить участки PHK, доступность которых для PHKазного гидролиза изменялась при связывании с этим белком. Данные приведены на Рисунке 32. Видно, что белок uS7 наиболее сильно защищает от действия PHKa3 последовательности нуклеотидов A1532-G1535 (участок I) и G1598-A1601 (участок II), образующие часть внутренней петли фрагмента, прилегающую к основанию шпильки h41, а также фосфодиэфирную связь между G1224 и U1225 в спирали h29. Кроме этого, были найдены

4 участка с более слабой защитой. К ним относятся участок III (A1630-A1633 у основания шпильки h42), участок IV (G1669-G1674 в центральной части шпильки h43), участок V (G1618-U1621 у основания петлевой части шпильки h42) и участок VI (A1545, G1546 и G1548 вблизи центральной петли шпильки h41) (Рисунки 30 и 32).



Рисунок 32. Ферментативный футпринтинг комплекса рибосомного белка uS7 с фрагментом 3Dm. Гидролиз PHКазой T2 (A) и PHКазой T1 (Б) 5'-³²P-меченого фрагмента 3Dm свободного (-) и в комплексе с белком S5 (+). (В) – гидролиз PHКазами T2 и T1 3'-³²P-меченого фрагмента 3Dm свободного (-) и в комплексе с белком uS7 (+). G, A+U, и OH – сиквенсные дорожки, полученные путём расщепления денатурированного 3Dm с помощью PHКаз T1, PhyM и ограниченного щелочного гидролиза соответственно. Дорожки К и KB – меченый фрагмент 3Dm до и после инкубирования с белком uS7 в условиях связывания соответственно. Слева от каждой панели римскими цифрами отмечены участки защит PHK от гидролиза, справа – приведена нумерация оснований.

Результаты ферментативного футпринтинга комплекса рекомбинантного рибосомного белка uS7 человека с фрагментом 3Dm в целом согласуются с данными, полученными ранее при изучении взаимодействия рибосомного белка uS7 эубактерий с 16S pPHK [297-299]. Согласно этим данным, белок uS7 защищает район 16S pPHK, соответствующий участку I в 18S pPHK, от атаки гидроксил-радикалами [298], а район, соответствующий участку II, – от модификации нуклеозид-специфичными зондами [297]. Кроме того, основание U1240 в 16S pPHK, которое соответствует основанию U1535 в 18S pPHK, входящему в состав участка I, сшивается при УФ-облучении с белком uS7 в составе 30S рибосомной субчастицы *E. coli* [300]. Выполненные позднее кристаллографические исследования 30S субчастицы рибосомы *T. thermophilus* [292], в целом, подтвердили и уточнили ранние данные о расположении рибосомного белка S7 относительно 16S pPHK.

Что касается слабозащищённых участков III и V фрагмента 3Dm, то ранее с помощью химического футпринтинга было показано, что нуклеотидные основания 16S рРНК, соответствующие остаткам в этих участках, защищаются от модификации при связывании с рибосомным белком uS7 [297]. Однако по данным PCA [292], эти основания, как и те, что соответствуют участкам IV и VI фрагмента 3Dm, удалены от области контакта 16S рРНК с этим белком. Можно предположить, что обсуждаемые изменения в реакционной способности оснований отражают конформационные изменения, происходящие в 16S рРНК при связывании с рибосомным белком uS7. Этим же можно объяснить защиту участков III-VI в 18S рРНК от действия РНКаз при связывании с фрагментом 3Dm гомологичного белка. Другим объяснением может быть более сложное строение рибосомного белка uS7 у эукариот по сравнению со строением его эубактериального гомолога, что могло приводить к дополнительным контактам рибосомного белка uS7 человека с фрагментом 3Dm. Так, белок uS7 человека существенно больше (204 аминокислотных остатков), чем белок uS7 T. thermophilus (155 аминокислотных остатков). Гомология между ними существует только в центральной и С-концевой частях, а Nконцевой район белка uS7, состоящий примерно из 80-ти аминокислотных остатков, не имеет гомологичного района в белке uS7 эубактерий. Можно предположить, что N-концевая часть белка uS7 человека образует отдельный большой домен, который контактирует с основаниями участков IV и VI.

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод, что сайт связывания рибосомного белка uS7 человека на 18S pPHK имеет строение в целом аналогичное строению сайта связывания его эубактериального гомолога на 16S pPHK. Обнаруженные дополнительные контакты у рибосомного белка uS7 человека могли быть обусловлены конформационными изменениями, происходящими в PHK при связывании с белком, и/или связыванием с PHK большого N-концевого района этого белка, не имеющего гомологичного участка в N-концевом районе рибосомного белка uS7 эубактерий. Анализ современных моделей 40S субчастицы рибосомы, построенных на основании крио-ЭМ исследований структуры рибосомы человека [14, 301] подтвердил сделанные заключения. Согласно этим моделям часть белка uS7 человека, гомологичная белку uS7 эубактерий, занимает относительно 18S pPHK практически то же положение, что и эубактериальный белок относительно 16S pPHK, при этом эукариот-специфичная N-концевая часть белка лежит в районе спирали h43 18S pPHK. В частности, остаток H51 контактирует с нуклеотидом G1674, находящимся в участке IV. Нуклеотиды участка VI на крио-ЭМ моделях 40S субчастицы лежат в стороне от места связывания белка, однако они тесно примыкают к нуклеотидам участка IV, давая основания полагать, что защита участка VI обусловлена его экранированием спиралью h43, вследствие изменения её конформации при связывании с белком uS7.

3.2.5.2 Связывание рибосомного белка uS9 с фрагментом 1203-1236/1521-1698 18S рРНК

Фрагмент 3Dm, моделирующий участок 1203-1236/1521-1698 18S pPHK, оказался также полезным для изучения взаимодействия с этой PHK другого рибосомного белка человека – uS9. В разделе 3.2.1 показано, что белок uS9 является одним из наиболее прочно удерживаемых на 18S pPHK белков при диссоциации 40S субчастиц рибосом человека в градиенте концентрации моновалентных катионов. Однако его эубактериальный гомолог не относится к сердцевинным рибосомным белкам [302]. Поэтому интересно было выяснить, насколько сохранился в ходе эволюции характер взаимодействия гомологичных рибосомных белков с pPHK. Как и в случае с рибосомным белком uS7, для этой цели был использован метод футпринтинга, однако набор зондов кроме PHKa3 T1 и T2 дополнительно включал PHKa3y V1, специфичную к двуспиральным участкам PHK, а также химические зонды – ENU и гидроксил-радикалы, специфичные к сахарофосфатному остову PHK (см. раздел 3.2.3).

Как и рибосомный белок uS7, белок uS9 специфично связывался с фрагментом 3Dm, проявляя к нему довольно высокое сродство. Из данных, представленных на Рисунке 33, видно, что величина *Kd* комплекса рибосомного белка uS9 с фрагментом 3Dm составляет $(2 \pm 0.3) \times 10^{-7}$ M, соответствуя величине *Ka*, равной $(5 \pm 0.6) \times 10^{6}$ M⁻¹. Величины *Kd*, найденные при связывании этого же фрагмента с рибосомными белками eS10 и eS26, которые не взаимодействуют с регионом 1203-1236/1521-1698 18S pPHK в составе 40S субчастицы, были в несколько раз выше.



Рисунок 33. Изотермы связывания рекомбинантных рибосомных белков uS9, eS10 и eS26 человека с меченым фрагментом 3Dm. По оси ординат отложена доля связавшейся PHK в процентах. Относительная ошибка измерений составляла не более 10%.

В присутствии рибосомного белка uS9 наблюдали выраженное повышение степени расщепления фрагмента 3Dm ENU и PHКазой T2 по нуклеотиду C1544 (Рисунок 34 А и Б), расположенному во внутренней петле шпильки h41 (Рисунок 35). Кроме того, увеличивалась степень расщепления этого фрагмента химическими зондами по нуклеотидам С1521-С1523, U1530 и C1532 (Рисунок 34А) в спирали h30 (Рисунок 35) и по нуклеотидам C1645, C1646 и G1648 (Рисунок 34В) в основании шпильки h43 (Рисунок 35). В присутствии рибосомного белка uS9 наблюдали также повышение степени расщепления как ферментативными, так и химическими зонлами по участкам С1618-U1622 и C1629-A1634 (Рисунок 34B). расположенным в апикальной и базальной частях шпильки h42 соответственно (Рисунок 35). Наконец, рибосомный белок uS9 заметно защищал нуклеотиды C1670-A1675 фрагмента 3Dm от гидролиза РНКазой Т2 (Рисунок 34В).

Согласно данным РСА 30S субчастицы рибосомы *T. thermophilus* [292] сердцевина структуры белка uS9 представляет собой $\alpha+\beta$ сэндвич, который одним ребром контактирует с частью 3'-домена, образованной спиралями h38-40, а противоположным ребром – с другой частью этого же домена, состоящей из спиралей h29, h30 и h41-43 (Рисунок 36). Один из контактов рибосомного белка uS9 с этим районом 16S рPHK обеспечивается взаимодействиями его структурных элементов, тетрапептида G67-K70 и остатка Q73, расположенных на изломе полипептидной цепи, с сахарофосфатным остовом тринуклеотида A1229-A1231 (Рисунок 36).



Рисунок 34. Футпринтинг фрагмента 3Dm в комплексе с рибосомным белком uS9 человека. Радиоавтографы гелей после электрофоретического разделения продуктов расщепления фрагмента 3Dm, 5'-³²P-меченого (панели A и Б), либо 3'-³²P-меченого (панель В). Дорожки T1, T2 и V1 – гидролиз PHKазами T1, T2 и V1 соответственно фрагмента 3Dm, свободного (–) и в комплексе с белком uS9 (+). Дорожки ENU и Fe – модификация ENU и гидроксил-радикалами соответственно фрагмента 3Dm, свободного (–) и в комплексе с белком uS9 (+). G, A+U, и OH – сиквенсные дорожки, полученные путём расщепления денатурированного фрагмента 3Dm с помощью специфических PHKa3 T1, PhyM и ограниченного щелочного гидролиза соответственно. Дорожки К и KB – меченый фрагмент 3Dm до и после инкубирования с рибосомным белком uS9 в условиях связывания соответственно. Цифры справа от панелей Б и В – номера нуклеотидов. Стрелками отмечены участки наблюдаемого изменения доступности нуклеотидных остатков 3Dm различным агентам при образовании комплекса с рибосомным белком uS9.

Другой контакт образуют трипептид R10-E12, который находится в неструктурированном петлевом участке полипептидной цепи, и нуклеотидные остатки G1328, U1354, G1355, а также

152



Рисунок 35. Вторичная структура района 18S рРНК человека, соответствующего фрагменту 3Dm, согласно [293]. Нумерация нуклеотидов дана для 18S рРНК человека. Участки РНК, изменяющие свою доступность РНКазам, либо ENU и гидроксил-радикалам при связывании фрагмента 3Dm с рибосомным белком uS9, отмечены стрелками.



Рисунок 36. Вычлененный район пространственной структуры 30S субчастицы рибосомы *T. thermophilus* (PDB индекс 1J5E), включающий рибосомный белок uS9 и фрагмент 16S pPHK, соответствующий фрагменту 3Dm. Участки структуры, иллюстрирующие взаимодействия (пунктирные линии) аминокислотных остатков с нуклеотидами, вынесены отдельно. В скобках даны аминокислотные остатки uS9 и нуклеотиды 18S pPHK рибосом человека, соответствующие указанным на рисунке остаткам белка uS9 и нуклеотидам 16S pPHK рибосом эубактерий.

упомянутый выше остаток A1231. Кроме того, важную роль во взаимодействии рибосомного белка uS9 с 16S pPHK играет длинный неструктурированный С-концевой участок белка, который образует множественные контакты с pPHK в районе, включающем шпильку h43 и спираль h30 (Рисунок 36).

В 18S рРНК человека нуклеотиду А1231 соответствует нуклеотид А1545, т. е. остаток, примыкающий с 3'-стороны к C1544, степень расщепления по которому РНКазой Т2 (Рисунок 34Б) и ENU (Рисунок 34А) повышалась в присутствии рибосомного белка uS9. По-видимому, связывание этого белка изменяло структуру фрагмента 3Dm таким образом, что фосфодиэфирная связь между остатками С1544 и А1545 становилась более доступной действию РНКаз и ENU. Следует отметить, что нуклеотидный остаток A1545 (A1231) консервативен в рРНК всех организмов [293], что указывает на его важную роль в формировании структуры рибосомы. В 30S субчастице рибосомы T. thermophilus остаток A1231 образует сразу четыре водородные связи с белком uS9 (Рисунок 36). Филогенетический сравнительный анализ первичных структур рибосомного белка uS9 T. thermophilus и гомологичных ему белков у дрожжей и человека показал, что аминокислотным остаткам G67, G68 и Q73 рибосомного белка uS9 человека, контактирующим с A1545 (A1231), соответствуют такие же аминокислотные остатки в гомологичных белках. Следовательно, можно заключить, что в рибосомах человека консервативный динуклеотид СрА в положении 1544-1545 18S рРНК играет существенную роль в связывании рибосомного белка uS9 и что характер этого взаимодействия эволюционно консервативен.

Нуклеотидный остаток G1648 фрагмента 3Dm, доступность которого химическим зондам в присутствии рибосомного белка uS9 повышалась, и остатки U1673 и G1674, чья доступность PHKaзe T2, наоборот, уменьшалась, когда фрагмент 3Dm находился в комплексе с этим белком, соответствуют нуклеотидным остаткам G1328, U1354 и G1355 16S pPHK. Эти остатки 16S pPHK по данным PCA 30S субчастицы рибосомы *T. thermophilus* также вовлечены в связывание с рибосомным белком uS9 и контактируют с его аминокислотными остатками R10 и K11 [292] (Рисунок 36), которые соответствуют K15 и K16 в рибосомным белке uS9 человека. Основываясь на сходстве известных пространственных структур рибосомных белков uS9 зубактерий и человека (рассчитанной помощью программы ESyPred3D), можно предположить, что остатки G1648, U1673 и G1674 18S pPHK контактируют с K15 и K16 в белке uS9.

Что касается длинного неструктурированного С-концевого участка рибосомного белка uS9 эубактерий, то по данным PCA [292] он образует контакты, в основном, с сахарофосфатным остовом 16S pPHK, образованным нуклеотидными остатками в положениях 1211-1214 (спираль h30), 1323-1332 (h29 и базальная часть h43) и 1348-1355 (шпилька h43). В 18S pPHK человека этим положениям соответствуют положения 1525-1528, 1643-1652 и 1667-

1674. Нетрудно заметить, что часть этих нуклеотидных остатков перекрывается с остатками C1645 (h29) и C1646, G1648 и C1670-A1675 (h43), которые изменяли свою доступность ферментативным и химическим зондам при связывании фрагмента 3Dm с рибосомным белком uS9 человека (Рисунок 34). Следовательно, можно предположить, что расположение Сконцевого участка рибосомного белка uS9 человека в комплексе с фрагментом 3Dm соответствует расположению С-концевого участка его гомолога в 30S субчастице рибосомы. Нуклеотиды C1521-C1523, U1530 и C1532 спирали h30 18S pPHK, которые также изменяли свою доступность РНКазам и химическим зондам при футпринтинге фрагмента 3Dm, расположены рядом с нуклеотидами C1525-G1528, соответствующими нуклеотидам 16S рРНК, принимающим участие в связывании с рибосомным белком uS9 [292]. Тот факт, что вышеупомянутые нуклеотиды 18S рРНК не соответствуют прямо нуклеотидам 16S рРНК, вовлеченным в связывание с рибосомным белком uS9, можно объяснить отсутствием обширного прилегающего к спирали h30 участка 18S pPHK с 1237-го по 1520-й нуклеотид (содержащего h39) во фрагменте 3Dm. Последнее могло повлиять на пространственную структуру 3Dm в районе этой спирали, что, в свою очередь, могло отразиться на контактах рибосомного белка uS9 человека с этой спиралью.

Наблюдаемые изменения в интенсивности расщепления фрагмента 3Dm в районе шпильки h42 (нуклеотиды C1618-U1622 и C1629-A1634) в присутствии рибосомного белка uS9 (Рисунок 34В) не соответствуют данным о контактах его гомолога с 16S pPHK в 30S субчастице рибосом эубактерий согласно PCA [292]. Это несоответствие вряд ли можно объяснить дополнительными контактами этого белка с 18S pPHK. Единственный участок низкой гомологии, выявленный при филогенетическом сравнении первичных структур рибосомных белков uS9 человека и эубактерий, который мог бы контактировать с этим районом 3Dm, расположен в белке uS9 человека вблизи той части $\alpha+\beta$ -сэндвича, которая у белка uS9 эубактерий контактирует не с h42, а с h39 [292], отсутствующей в 3Dm (Рисунок 35). Наиболее вероятным объяснением наблюдаемого несоответствия могло бы быть неоднозначное связывание C-концевого района рибосомного белка uS9 человека с фрагментом 3Dm из-за отсутствия у этого района белка вторичной структуры. Соответственно, в одной части комплексов C-концевой район uS9 мог бы контактировать с 3Dm в районе шпильки h43 и спиралей h29 и h30 по аналогии с соответствующим районом его гомолога в 30S субчастицах рибосом эубактерий, а в другой части комплексов – в районе шпильки h42.

Полученные недавно структуры эукариотических рибосом с высоким разрешением (напр., [14]) позволили рассмотреть расположение рибосомного белка uS9 в 40S субчастице. Молекулярные контакты этого белка оказались, в целом, в хорошем согласии с контактами, предсказанными в настоящей работе. Таким образом, несмотря на принципиально различные

пути сборки субчастиц рибосом эубактерий и эукариот и разную роль гомологичных рибосомных белков в этом процессе, молекулярные контакты, лежащие в основе взаимодействия рибосомного белка uS9 с pPHK малых субчастиц рибосом у эубактерий и человека, в общем, сходны.

3.2.5.3 Кооперативное связывание рибосомных белков uS7 и uS9 с фрагментом 1203-1236/1521-1698 18S pPHK

Известно, что для связывания рибосомного белка uS9 с 16S рРНК при сборке малой субчастицы рибосомы *E. coli* является необходимым участие рибосомного белка uS7, который первым связывается с 3'-доменом этой рРНК и обеспечивает дальнейшее связывание белков так называемой второй группы [297]. Однако согласно исследованиям, представленным в разделах 3.2.5.1 и 3.2.5.2, человеческие гомологи рибосомных белков uS7 и uS9 способны самостоятельно связываться с фрагментом 3'-концевого домена 18S рРНК. Более того, рибосомный белок uS7 значительно легче диссоциирует из 40S субчастицы под действием высокой концентрации моновалентных катионов, чем белок uS9, и поэтому не может рассматриваться как сердцевинный белок 40S субчастицы (см. раздел 3.2.1). Поэтому, для изучения взаимного влияния рибосомных белков uS7 и uS9 на их связывание с 18S рРНК было исследовано совместное связывание рекомбинантных белков uS9 и uS7 с РНК-транскриптом 3Dm.

Чтобы проверить, способны ли рибосомные белки uS5 и uS16 связываться с фрагментом 3Dm одновременно, было измерено их связывание с этой PHK в условиях, когда оба белка находились в одной и той же смеси (Рисунок 37). Оказалось, что кривая совместного связывания двух белков заметно круче, чем идеальная кривая, рассчитанная для независимого связывания этих белков с фрагментом 3Dm, что указывало на существование синергетического эффекта при совместном связывании этих белков. Это, в свою очередь, позволяло предположить, что тройной комплекс, образующийся при совместном связывании рибосомных белков uS7 и uS9 с фрагментом 3Dm, является более жёстким, чем соответствущие бинарные комплексы.

Следовательно, представляло интерес узнать, какие изменения происходят в участках связывания этих белков при их совместной ассоциации с этой РНК. В качестве зондов при футпринтинге фрагмента 3Dm в комплексе с этими белками использовали РНКазы T1 и T2 (Рисунок 38 и Таблица 3.1). Футпринты, наблюдаемые в бинарном комплексе рибосомного белка uS9 с фрагментом 3Dm были также обнаружены при его связывании с 3Dm в присутствии рибосомного белка uS7 (за исключением футпринтов в участке С и положения 1544) (Таблица

3.1). В частности, умеренные футпринты в положениях 1650 и 1651 (участок V), наблюдаемые при связывании изолированного uS9, выглядели довольно слабыми, как и футпринты в соседних положениях. В 30S субчастице рибосомы нуклеотиды 16S pPHK, соответствующие этим футпринтам, находятся вблизи гибкого С-концевого "хвоста" рибосомного белка uS9 (Рисунок 39). Этот положительно заряженный район белка образует множественные контакты с остовом PHK. По-видимому, повышенную защиту нуклеотидов в участке V в присутствии белка uS7 можно объяснить стабилизацией структуры белка uS9 в этих условиях. Защиты по нуклеотидам 1670-1675 (участок VI) также можно отнести к белковым контактам, так как соответствующие нуклеотиды 16S pPHK в 30S субчастице рибосомы *T. thermophilus* находятся вблизи белков uS7 и uS9. Усиление футпринтов в этих положениях предположительно связано со стабилизацией структуры фрагмента 3Dm в присутствии пары белков.



Рисунок 37. Связывание белков uS7 (1) и uS9 (2) по отдельности или вместе (3) с меченым фрагментом 3Dm; линия 4 соответствует идеальной рассчётной кривой для одновременного независимого связывания uS7 и uS9 с фрагментом 3Dm. По оси ординат отложена доля связавшейся PHK в процентах.



Рисунок 38. Футпринтинг фрагмента 3Dm в комплексе с рибосомными белками uS9 и uS7. Радиоавтограф геля после разделения продуктов расщепления 5'- (А) или 3'-меченого (Б) фрагмента 3Dm, изолированного (–) или в комплексе с белками (+) после обработки PHКазами T1 и T2 (дорожки T1 и T2 соответственно). Дорожки G и A+U, секвенирование фрагмента 3Dm с помощью PHKaз T1 и PhyM; дорожка OH – ограниченный щелочной гидродиз 3Dm; дорожки C и CB, фрагмент 3Dm, изолированный и в комплексе с белками соответственно. Футпринты обозначены стрелками.

Таблица 3.1.

участок	положение	$uS9^b$		uS7+uS9		$uS7^c$	
		T1	T2	T1	T2	T1	T2
	1530				$\downarrow\downarrow$		
	1531				$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$		
	1532				$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$		
	1533				$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$		$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$
Ι	1534				$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$		$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$
	1535				$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$		$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$

Данные по футпринтингу фрагмента 3Dm в комплексе с рибосомными белками uS7 и/или uS9^a

	1536			↓↓↓	↓↓↓	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$
	1537				$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$	•••	•••
	1538				$\downarrow\downarrow$		
	1544		$\downarrow\downarrow$				
А	1545						$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$
	1546					\downarrow	\downarrow
	1549				$\downarrow\downarrow$		
II	1550			$\downarrow\downarrow$	↓↓		
	1551				$\downarrow\downarrow$		
	1552			$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$		
	1598					$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$
В	1599						$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$
	1600					$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$
	1618	\downarrow	\downarrow				$\downarrow\downarrow$
С	1619		\downarrow				$\downarrow\downarrow$
	1620		$\downarrow\downarrow$				$\downarrow\downarrow$
	1621		$\downarrow\downarrow$				$\downarrow\downarrow$
	1622		$\downarrow\downarrow$				
	1628		$\downarrow\downarrow$		$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$		
	1629		$\downarrow\downarrow$		$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$		
III	1630		$\downarrow\downarrow$		$\downarrow \downarrow \downarrow \downarrow$		\downarrow
	1631		$\downarrow\downarrow$		$\downarrow \downarrow \downarrow \downarrow$		\downarrow
	1632		$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow \downarrow \downarrow \downarrow$	$\downarrow\downarrow$	\downarrow
	1633		$\downarrow\downarrow$		$\downarrow \downarrow \downarrow \downarrow$		\downarrow
	1634		$\downarrow\downarrow$		$\downarrow\downarrow\downarrow\downarrow$		
	1638			$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$		
	1639			$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$		
IV	1640				$\downarrow\downarrow$		
	1641				$\downarrow\downarrow$		
	1642				$\downarrow\downarrow$		
	1647		\downarrow				
	1648		\downarrow				
V	1649		\downarrow				
	1650		\downarrow		$\downarrow\downarrow$		
	1651		\downarrow		$\downarrow\downarrow$		
	1652		<u> </u>				
	1670		Ļ		$\downarrow\downarrow$		Ļ
	1671		\downarrow	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$	\downarrow	\downarrow
VI	1672		\downarrow		$\downarrow\downarrow$		\downarrow
	1673		\downarrow		$\downarrow\downarrow$		\downarrow
	1674		\downarrow	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$	\downarrow	\downarrow
	1675		\downarrow		$\downarrow\downarrow$		

^{*a*} Уменьшение доступности нуклеотидов отмечено стрелками, направленными вниз. Число стрелок обозначает силу футпринта ^{*b,c*} Приведены данные по футпринтингу фрагмента 3Dm в комплексе с белком uS7 или uS9 из разделов 3.2.5.1 и 3.2.5.2.

Наконец, умеренные защиты нуклеотидов 1628-1634 (участок III), наблюдаемые для бинарных комплексов 3Dm с рибосомными белками uS9 и в меньшей степени с uS7, стали довольно сильными в тройном комплексе с этими белками. Однако это усиление, по-видимому,

связано со структурными перестройками во фрагменте 3Dm, вызванными совместным связыванием белков uS9 и uS7, а не вовлечением участка III в это связывание, поскольку в 30S субчастице эубактериальной рибосомы оба гомологичных белка находятся далеко от области, соответствующей этому участку (Рисунок 39).



Рисунок 39. Схематическое представление области пространственной структуры 30S субчастицы рибосомы *T. thermophilus* (индекс PDB 1FJG [303]), включающей рибосомные белки uS7 и uS9 и участки их связывания на 16S pPHK. Часть остова 16S pPHK, соответствующая фрагменту 3Dm, выделена светло-коричневым цветом с цветными вставками, отражающими футпринты, наблюдаемые для тройного комплекса фрагмента 3Dm с рибосомными белками uS7 и uS9 человека (Таблица 3.1); спирали h38-h40, участвующие в связывание рибосомного белка uS9, показаны серым цветом.

Таким образом, на основании данных по связыванию рекомбинантных рибосомных белков uS7 и uS9 с фрагментом 3Dm и данных по диссоциации 40S субчастицы рибосомы, можно заключить, что связывание рибосомного белка uS9 человека с 18S рРНК не требует предварительного связывания белка uS7. Это отличает рибосомный белок uS9 человека от его эубактериального гомолога, для правильного связывания которого с 16S рРНК требуется предварительное связывание белка uS7. При совместном связывании рибосомных белков uS9 и uS7 человека с фрагментом 3Dm имеет место взаимная стабилизация белковых участков связывания на РНК, и структура образующегося тройного комплекса больше напоминает соответствующей области эубактериальной рибосомы, структуру чем структуры соответствующих бинарных комплексов. Учитывая кооперативный эффект при одновременном связывании рибосомных белков uS7 и uS9 с 3Dm и данные футпринтинга, показывающие значительное расширение участков 3Dm, защищаемых белками в тройном комплексе, можно предположить, что связывание этих белков с данным фрагментом рРНК усиливается в

присутствии друг друга. Возможно, такие же процессы происходят при связывании этих белков с 18S pPHK при сборке 40S рибосомных субчастиц в эукариотической клетке.

3.2.5.4 Рибосомный белок uS13 как молекулярная "скрепка" центральной части большого 3-концевого домена 18S рРНК

Рибосомный белок uS13 человека гомологичен белку uS13 эубактерий и архей, и, согласно этой гомологии, ещё до определения структуры рибосомы эукариот он был отнесён к голове 40S субчастицы, формируемой вокруг большого 3'-концевого домена 18S рPHK. Поэтому, для изучения связывания белка uS13 с 18S рPHK был использован PHK-транскрипт (фрагмент 3Dc), соответствующий её области 1201-1272/1510-1698, содержащей спирали h28-32 и h41-43. Таким образом, 263-звенный фрагмент 3Dc был несколько длиннее фрагмента 3Dm, описанного в разделе 3.2.5.1; фрагмент 3Dc соответствовал району 16S pPHK, содержащему участок связывания рибосомного белка uS13, и включал эволюционное ядро 3'-домена pPHK малой субчастицы рибосомы [304].



Рисунок 40. Связывание рекомбинантных рибосомных белков человека с фрагментом 3Dc, соответствующим части большого 3'-концевого домена 18S рРНК. Изотермы связывания белков uS13 (1), uS15 (2) и eS26 (3) с ³²P-меченым фрагментом 3Dc. По оси ординат отложена доля связавшейся PHK в процентах.

Связывание рекомбинантного рибосомного белка uS13 с фрагментом 3Dc проводили в буфере, содержащем более низкую (2 мМ) концентрацию Mg^{2+} , в отличие от 4 мМ концентрации Mg^{2+} , применявшейся для изучения связывания белков в разделах 3.2.5.1-3.2.5.3, чтобы уменьшить структурную жёсткость РНК (Рисунок 40). Величина *Ка*, характеризующая связывание рибосомного белка uS13 с фрагментом 3Dc, оказалась довольно высокой, составляя

 $(3.5\pm0.7)\times10^7$ M⁻¹. На специфичность этого связывания указывали на порядок более низкие значения *Ka*, полученные для комплексообразования этого фрагмента с белками uS15 и eS26, которые не имеют участков связывания в 3Dc. Примечательно, что рибосомный белок uS13 был способен связываться с фрагментом 3Dc самостоятельно, без помощи каких-либо других рибосомных белков, тогда как для специфичного связывания с 16S pPHK его эубактериального гомолога требуются белки bS20 [302] и uS7 [305].

Чтобы определить, влияет ли связывание рибосомного белка uS13 на конформацию фрагмента 3Dc, был использован метод гидроксил-радикального футпринтинга (Рисунок 41).



Рисунок 41. Гидроксил-радикальный футпринтинг фрагмента 3Dc в комплексе с рибосомным белком uS13. Анализ с помощью обратной транскрипции фрагмента 3Dc с использованием ³²P-меченых праймеров. Дорожки, отмеченные "-" и "+" соответствуют образцам, полученным обработкой гидроксил-радикалами фрагмента 3Dc, изолированного и связанного с белком uS13, соответственно в течение 5 мин (дорожки 5 и 6) и в течение 10 мин (дорожки 7 и 8). Дорожки, обозначеные К и К⁺, соответствуют необработанному фрагменту 3Dc, изолированному и связанному с белком uS13, соответственно. А, U, G, C – сиквенсные дорожки, полученные в реакциях с использованием соответствующих ddNTP. Нумерация нуклеотидов 18S pPHK человека дана слева. Денситометрический

анализ полос 7 и 8 приведён справа от панелей с радиоавтографами. Положения футпринтов обозначены справа чёрными (защиты) и светлыми (усиления) точками.

Оказалось, что изолированный фрагмент 3Dc имеет много нуклеотидных остатков, доступных для атаки гидроксильными радикалами. После связывания с белком, некоторые из этих остатков становились менее доступными, в то время как доступность некоторых других, наоборот, увеличивалась, указывая на изменение конформации фрагмента 3Dc при связывании с uS13. Изменение доступности 3Dc наблюдали не только в тех местах, которые гомологичны участкам 16S pPHK, вовлеченным в формирование области связывания белка uS13 в 30S субчастице (нуклеотиды спиралей h30 и h42), но также и в спиралях h41, h43 и h31 (Рисунок 42).



Рисунок 42. Представление данных по футринтингу фрагмента 3Dc в комплексе с белком uS13 на вторичной структуре фрагмента 18S pPHK человека [293], соответствующего фрагменту 3Dc. Положения футпринтов отмечены красными (защиты) и синими (усиления) стрелками. Нумерация нуклеотидов приведена для 18S pPHK человека; соответствующая нумерация для *T. lanuginosus* представлена в скобках. Спирали 18S pPHK изображены в различной цветовой маркировке. Спираль h32 замкнута тетрануклеотидом как во фрагменте 3Dc.

Для анализа конформационных изменений 3Dc, вызванных связыванием с рибосомным белком uS13, была использована крио-ЭМ модель 40S субчастицы рибосомы грибка *T. lanuginosus* [281]. Часть, соответствующая фрагменту 3Dc и белку uS13, была вычленена из этой модели, и в ней отмечены положения, соответствующие наблюдаемым футпринтам (Рисунок 43). В соответствии с этой моделью защиту нуклеотидов G1603-G1605 в спирали h42 и нуклеотидов G1611-G1613, расположенных от них на расстоянии примерно одного витка спирали, можно объяснить тесными контактами этих нуклеотидов с глобулярной частью белка. То же самое может иметь место и в случае нуклеотидов A1630-A1633, расположенных в другой цепи этой спирали. Спираль h30 контактирует с длинной С-концевой частью белка, и защиты по нуклеотидам G1520 и G1521 могут быть вызваны этим контактом. Интересно, что нуклеотиды C1527-C1529 в этой спирали расположены чуть в стороне от C-конца белка uS13 в модели 40S субчастицы рибосомы *T. Lanuginosus* (Рисунок 43). Тем не менее, принимая во внимание, что C-концевой район белка uS13 человека длиннее, кажется вероятным, что его C-конец, насыщенный остатками аргинина и лизина, может достигать нуклеотидов C1527-C1529.



Рисунок 43. Фрагмент пространственной структуры 40S субчастицы рибосомы *T. lanuginosus* (PDB ID: 3JYV), содержащий фрагмент 18S pPHK, соответствующий 3Dc, и рибосомный белок uS13 (отмечен зеленым). Части цепи 18S pPHK, соответствующие положениям футпринтов uS13 на 3Dc, отмечены красным (защиты) и синим (усиления) цветом. Для лучшего представления соответствующие проекции PHK с такой же цветовой кодировкой, как на рисунке 41, приведены на вставках.

Следует отметить, что значительная часть N-концевой части этого белка отсутствует в данной модели; в рибосомном белке uS13 человека этой части соответствуют 13 аминокислотных остатков. Учитывая, что рекомбинантный рибосомный белок uS13 дополнительно содержит 20 N-концевых аминокислот, защиту вышеупомянутых нуклеотидов можно было объяснить их контактами с N-концевой частью этого белка.

Шпилька h41 на рассматриваемой модели делает поворот, так что ее апикальная часть примыкает к большой бороздке спирали h42; таким образом, нуклеотид G1566 оказывается рядом с h42 и с эукариот/архей-специфичным участком в центральной части рибосомного белка uS13. То есть, этот участок может контактировать с апикальной частью шпильки h41. На такой поворот шпильки h41 в структуре фрагмента 3Dc при связывании с белком uS13 также указывают защиты остова PHK по нуклеотидам G1570/G1571 и C1558/C1559, которые становятся обращены внутрь структуры 3Dc при этом повороте. Интересно, что хотя сама спираль h43 не участвует в связывании белка uS13, футпринты по нуклеотидам G1652-G1657 указывают на то, что эта часть данной спирали защищена другой частью фрагмента 3Dc, вероятно, шпилькой h41 (Рисунок 42).

Таким образом, участок связывания рибосомного белка uS13 на 18S pPHK, в основном, аналогичен участку связывания его эубактериального гомолога на 16S pPHK в 30S субчастице, однако этот участок включает также районы, которые можно отнести к связыванию эукариот/архей-специфичных частей белка uS13. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что связывание рибосомного белка uS13 с фрагментом 3Dc делает структуру PHK компактной и способствует её фиксации в комплексе. Об этом также свидетельствует увеличение доступности для атаки гидроксильными радикалами нуклеотидов периферийных районов фрагмента 3Dc, таких как C1532-U1535, C1582-A1588, и нуклеотидов спирали h31, удалённых от участка связывания белка uS13. Следовательно, можно заключить, что фрагмент 3Dc при связывании с рибосомным белком uS13 претерпевает существенные перестройки, позволяющие спиралям h29/h30 и h41-h43 располагаться вдоль друг друга так, как они уложены в 40S субчастице рибосомы (Рисунок 43).

Следует отметить, что рибосомным белкам семейства uS13, свойственна существенная структурная гибкость. Так, согласно структуре белка uS13 в составе 30S субчастицы [306, 307], в нём практически отсутствуют внутримолекулярные полярные связи, способные соединять его N-концевую (спирали $\alpha 1-\alpha 3$), центральную (спираль $\alpha 4$) и C-концевую части (см. Рисунок 18), которые, вследствие этого, в изолированном белке должны обладать значительной конформационной подвижностью. Однако в 30S субчастице рибосом эубактерий, где эти части белка контактируют с 16S pPHK, они фиксированы. Так же структурно фиксированы в составе 40S рибосомной субчастицы соответствующие части рибосомного белка uS13 у

млекопитающих [14]. Учитывая, что как было сказано выше, структура фрагмента 3Dc в комплексе с рибосомным белком uS13 также становится более жёсткой, чем у изолированного 3Dc, можно заключить, что при связывании этого белка с 18S рPHK происходит взаимная фиксация структуры в их участках связывания. Таким образом, рибосомный белок uS13 действует как уникальная молекулярная скрепка, фиксирующая центральную часть большого 3'-концевого домена 18S pPHK.

3.2.5.5 Связывание рибосомного белка uS15 человека с центральным доменом 18S рРНК

Известно, что на ранних этапах сборки 30S субчастицы рибосомы *E. coli* её отдельные районы формируются независимо друг от друга вокруг определенных доменов 16S pPHK [308], при этом те рибосомные белки, которые связываются первыми с этими доменами, обеспечивают последующее правильное связывание других белков. Рибосомный белок uS15 человека является гомологом эубактериального рибосомного белка uS15, который при сборке 30S субчастицы первым связывается с центральным доменом 16S pPHK, формирующим район 30S субчастицы в области платформы [308]. Поэтому, представляло интерес выяснить, сохраняются ли закономерности, характерные для связывания эубактериального рибосомного белка uS15 с 16S pPHK, при связывании его эукариотического гомолога с 18S pPHK.

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей белков семейства uS15 из различных видов эубактерий, архей и эукариот, находящихся в далёком эволюционном родстве позволило выявить структурные черты рибосомного белка uS15 человека, имеющие сходство в рибосомных белках семейства uS15, либо отличающие его от этих белков (Рисунок 44). Так, эукариотические (как и архейные) представители этого семейства значительно длиннее своих эубактериальных гомологов и обладают длинным N-концевым районом, не имеющим выраженной гомологии у эубактерий, а С-концевая часть у белков этого семейства, напротив, характеризуется высокой степенью гомологии. У эубактериального uS15 в Nконцевом районе находятся инвариантные остатки His42 и Asp49, контактирующие со h22 И консервативные положительно спиралью 16S рРНК, заряженные остатки, взаимодействующие с сахарофосфатным остовом 16S pPHK (Arg35, His50 и Arg68) и 23S pPHK (His53 и Arg64) (нумерация для uS15 T. thermophilus) [292].

Для изучения связывания рибосомного белка uS15 человека с 18S pPHK был получен PHK-транскрипт (фрагмент 18SCD), соответствующий части центрального домена 18S pPHK. В нём отсутствовали участки, соответствующие шпильке h21 и сегменту экспансии ES6 18S pPHK. Эти районы структурно обособлены от основной части центрального домена 18S pPHK, поэтому их отсутствие не должно было влиять на формирование пространственной структуры фрагмента 18SCD, в котором указанные районы были замещены двумя остатками цитозина. Для определения структурных детерминант белка uS15 человека, участвующих в его связывании с 18S pPHK, был получен набор его мутантных форм с делециями или заменами в разных частях белка. У мутантных форм с делециями отсутствовали 27 (S15 Δ N27) или 80 (S15 Δ N80) аминокислотных остатков в N-концевой части, либо 29 (S15 Δ C29) или 54 (S15 Δ C54) аминокислотных остатка в C-концевой части. Другие мутантные формы несли точечные замены по ультраконсервативным остаткам His101 (форма S15H101A) и Asp108 (форма S15D108A), соответствующим His42 и Asp49 в uS15 *T. thermophilus*. Наконец, мутантная форма S15Q62A содержала замену на аланин консервативного у эукариот остатка Gln62 в N-концевой части белка.



Рисунок 44. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей в рибосомных белках семейства uS15. Выбраны наиболее эволюционно удалённые представители эубактерий (В), архей (А) и эукариот (Е). Консервативные аминокислотные остатки выделены жирным шрифтом, инвариантные остатки помещены в чёрные столбцы. Сверху представлено расположение элементов вторичной структуры в рибосомном белке uS15 *T. thermophilus* согласно [292], и отмечены точками его аминокислотные остатки, контактирующие с 16S pPHK в 30S рибосомной субчастице. Внизу приведена нумерация аминокислотных остатков в рибосомном белке uS15 человека.

Для изучения влияния мутаций в белке uS15 на характер его связывания с центральным доменом 18S pPHK проводили титрование меченого фрагмента 18SCD рекомбинантным белком uS15 и его мутантными формами в условиях, когда концентрация белка многократно

превышала концентрацию фрагмента (Рисунок 45). Видно, что замена Q62A практически не влияла на характер связывания белка uS15 с фрагментом 18SCD (величины *Ka* составляли $(10\pm1.5)\times10^6$ M⁻¹ и $(8.0\pm1.2)\times10^6$ M⁻¹ для белка uS15 и его формы S15Q62A соответственно). Замены по ультраконсервативным остаткам H101 и D108, напротив, существенно понижали сродство белка к фрагменту 18SCD (*Ka* = $(1.7\pm0.3)\times10^6$ M⁻¹ и *Ka* = $(2.5\pm0.4)\times10^6$ M⁻¹ для белковых форм S15H101A и S15D108A соответственно). Это понижение свидетельствовало об участии данных остатков в формировании комплекса рибосомного белка uS15 с 18SCD. Мутантные формы S15 Δ N27 и S15 Δ C29 рибосомного белка uS15 также проявляли пониженное сродство к фрагменту 18SCD (*Ka* = $(2.5\pm0.4)\times10^6$ M⁻¹ и *Ka* = $(4.2\pm0.7)\times10^6$ M⁻¹ соответственно) по сравнению с полноразмерным белком uS15. Наконец, мутанты S15 Δ N80 и S15 Δ C54 практически полностью теряли способность к связыванию с фрагментом 18SCD.



Рисунок 45. Связывание рекомбинантного рибосомного белка uS15 человека и его мутантных форм с фрагментом 18SCD. Представлены изотермы адсорбции для полноразмерного белка uS15 (1, белые квадраты), его мутантов, содержащих точечные замены: S15Q62A (2, чёрные кружки), S15H101A (3, белые кружки) и S15D108A (4, белые треугольники) и мутантов, содержащих делеции: S15ΔN27 (5, чёрные квадраты), S15ΔC29 (6, чёрные ромбы), S15ΔN80 (7, белые ромбы) и S15ΔC54 (8, чёрные треугольники). Относительная ошибка измерений составляла не более 10%.

Интересно, удаление 80 N-концевых остатков у рибосомного белка uS15 сказывалось на связывании оставшейся части белка с фрагментом 18SCD таким же катастрофическим образом, как и удаление 54 С-концевых остатков (Рисунок 45), включая все консервативные остатки, необходимые для связывания эубактериального белка uS15 с 16S рPHK (Рисунок 44). Можно предположить, что N-концевая часть рибосомного белка uS15 имеет значение для сохранения

его конформационной стабильности, что не исключает возможного участия этой части белка в связывании с 18S pPHK и/или рибосомными белками, соседствующими с ней в 40S субчастице. Примечательно, что вклад 27-звенного N-концевого района белка uS15 в связывание с 18S pPHK, сопоставим с вкладом ультраконсервативного остатка Asp108. В то же время, консервативный у эукариот остаток Gln62, по-видимому, не вовлечён в связывание рибосомного белка uS15 с фрагментом 18SCD, поскольку его замена не влияла на это связывание.

Чтобы выявить влияние связывания рибосомного белка uS15 на структуру 18S pPHK, и определить участок, с которым мог бы взаимодействовать N-концевой район uS15, было выполнено зондирование гидроксил-радикалами структуры фрагмента 18SCD, изолированного и в присутствии полноразмерного белка uS15 или его мутантной формы S15ΔN27 (Рисунок 46). В случае свободного фрагмента 18SCD разрывы в цепи PHK, вызванные атакой гидроксил-радикалами её рибозофосфатного остова, наблюдали практически по всей его длине. Доступность всего остова 18SCD действию гидроксил-радикалов свидетельствует о том, что отрицательно заряженные спирали фрагмента практически не контактируют друг с другом. При связывании фрагмента 18SCD с полноразмерным рибосомным белком uS15 доступность цепи PHK в некоторых участках понижалась, что, вероятно, было вызвано экранирующим действием белка. В частности, наиболее выраженные защиты от атаки гидроксил-радикалами наблюдали в обеих цепях спирали h22 (положения 924-926, 928, 1007 и 1009-1011) и в районе её сочленения со спиралью h20 (положения 1019, 1021, 1022 и 1024) (Рисунок 46).

При связывании с фрагментом 18SCD мутантной формы S15ΔN27 наблюдали защиты сахарофосфатного остова по тем же самым участкам, что и в случае полноразмерного белка uS15, за исключением положений 928 и 1024 (Рисунок 46). Отсутствие защит по этим положениям указывало либо на то, что мутантная форма S15ΔN27 не содержала аминокислотных остатков, контактирующих с соответствующими участками PHK, либо на изменение пространственной ориентации спиралей PHK в районе этих участков по сравнению с их ориентацией при связывании с полноразмерным белком.

Данные по футпринтингу фрагмента 18SCD в присутствии рибосомного белка uS15 человека, как оказалось, хорошо согласуются с результатами, полученными ранее при изучении связывания белка uS15 *T. thermophilus* с фрагментом центрального домена 16S pPHK [309]. Участки во фрагменте 18SCD, защищавшиеся белком uS15 от атаки гидроксил-радикалами, и футпринты, наблюдавшиеся для белка uS15 *T. thermophilus* в работе [309], расположены, в основном, в одних и тех же районах центрального домена pPHK малой субчастицы. Однако число футпринтов в случае белка uS15 человека больше, чем в случае белка uS15 *T. thermophilus* (Рисунок 47). Это свидетельствует о консервативном характере связывания белков



Рисунок 46. Гидроксил-радикальный футпринтинг фрагмента 18SCD. Панели А-Г – разделение в ПААГ продуктов обратной транскрипции фрагмента 18SCD до (-) и после (+) его обработки гидроксилрадикалами. А, С, G и U – сиквенсные дорожки, полученные в реакциях с использованием соответствующих дидезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Слева приведена нумерация нуклеотидов в 18S рРНК, справа – положения спиралей в 18S рРНК. Панели Д-Ж – разделение в ПААГ продуктов обратной транскрипции фрагмента 18SCD до (-) и после его обработки гидроксил-радикалами в присутствии uS15 (1) или S15ΔN27 (2) и в отсутствие белков (+). Положения футпринтов отмечены точками.

170

семейства uS15 с pPHK малой субчастицы рибосомы и в то же время указывает на дополнительные контакты в случае эукариотических представителей этого семейства.



Рисунок 47. Участок вторичной структуры 18S рРНК, соответствующий фрагменту 18SCD. Указаны положения гидроксил-радикальных футпринтов, специфичных для рибосомного белка uS15 человека (чёрные квадраты), и положения, соответствующие гидроксил-радикальным футпринтам, наблюдавшимся при связывании рибосомного белка uS15 *T. thermophilus* с 16S рРНК [309] (белые квадраты).

Появившиеся позднее модели структуры 40S субчастицы рибосомы с высоким разрешением [14, 301] позволили проверить сделанные выводы. Из этих моделей следовало, что 80-звенный N-концевой район белка uS15 человека формирует отдельный домен, аминокислотные остатки в центральной части которого контактируют с нуклеотидом в положении 1019, тогда как с соответствующим нуклеотидом в 16S pPHK в 30S субчастице контактирует петлевой участок рибосомного белка uS15, расположенный между спиралями α 1 и α 2 и не имеющий гомологии в белке uS15 человека. Кроме того, N-концевой район рибосомного белка uS15 в 40S субчастице образует контакты с эукариот/архей-специфичным белком eS31. Ультраконсервативные остатки His101 и Asp108 действительно формируют контакты с 18S pPHK, а остаток Gln62 не участвует во взаимодействии белка uS15 с 18S pPHK. Таким образом, результаты по зондированию с помощью гидроксил-радикалов структуры PHK в комплексе рекомбинантного рибосомного белка uS15 с фрагментом 18S pPHK, содержащим участок его связывания, нашли подтверждение при анализе крио-ЭМ структуры 40S субчастицы рибосомы человека.

Суммируя сказанное выше, можно заключить, что основные мотивы рибосомного белка uS15 человека, обеспечивающие его связывание с 18S pPHK, консервативны и соответствуют мотивам его эубактериального гомолога, формирующим контакты с нуклеотидными остатками 16S pPHK в малой субчастице рибосомы эубактерий. Специфичная для эукариот и архей N-концевая часть uS15 контактирует с 18S pPHK слабо. Основная роль этой части, по-видимому, состоит в поддержании конформационной стабильности белка и в формировании контактов с рибосомными белками, соседствующими с ней в 40S субчастице, и, возможно, с лигандами, которые связываются с рибосомой в процессе биосинтеза белка.

3.2.5.6 Роль ионов Mg^{2+} и белка uS15 в формировании структуры центрального домена 18S рРНК

Данные, полученные в предыдущем разделе, выявили сходство в организации участков связывания на РНК малых рибосомных субчастиц у рибосомных белков uS15 эубактерий и человека. Для белка uS15 эубактерий ранее было обнаружено, что его связывание с фрагментом центрального домена 16S рРНК стабилизирует структуру рРНК в районе спиралей h20 и h22; такой же эффект наблюдали при повышении в растворе концентрации ионов Mg^{2+} [310-312]. Так, в отсутствие белка uS15 и ионов Mg^{2+} угол между этими спиралями составлял ~120°, а в присутствии данного белка или 10 мМ Mg^{2+} эти спирали становились сближенными, что приводило к значительному уменьшению угла между ними. Поэтому представляло интерес выяснить, оказывают ли ионы Mg^{2+} аналогичный эффект на формирование структуры 18S рРНК в районе участка связывания рибосомного белка uS15 человека.

Для изучения роли ионов Mg^{2+} в формировании структуры центрального домена 18S pPHK, содержащего участок связывания белка uS15, как и в предыдущем разделе, был использован фрагмент 18SCD и рекомбинантный uS15. Степень связывания белка с PHK определяли с помощью фильтрования PHK-белковых комплексов через нитроцеллюлозные фильтры (Рисунок 48). Оказалось, что при концентрации ионов Mg^{2+} до 2 мМ степень связывания белка с PHK практически не изменялась и составляла примерно 90%, в то время как дальнейшее повышение концентрации ионов Mg^{2+} приводило к существенному понижению степени связывания (до 35% при 20 мМ концентрации).

Для подтверждения соответствия вторичной структуры фрагмента 18SCD структуре центрального домена 18S pPHK в 40S субчастице было проведено зондирование его структуры с помощью DMS в буфере, содержащем ионы Mg²⁺ в диапазоне 0.5-20 мМ (Рисунок 49). Анализ модифицированных нуклеотидов действительно показал, что метилированию подвергаются нуклеотиды, большинство из которых расположено в участках, соответствующих

одноцепочечным районам вторичной структуры 18S рРНК. В частности, модифицированными были нуклеотиды в апикальных и внутренних петлях спиралей h23, h24 и h25, а также в участках, находящихся между спиралями h19 и h20 и спиралями h24 и h25, что свидетельствовало о соответствии структуры фрагмента 18SCD структуре центрального домена 18S рРНК. Одновременно с этим оказалось, что при повышении концентрации ионов Mg^{2+} увеличивается доступность нуклеотидов A1049, A1050, A1062 и A1070 в спирали h24 и н24 и н25 уменьшалась. Это в свою очередь подразумевает, что ионы Mg^{2+} могли влиять на структуру фрагмента 18SCD, вызывая в нём конформационные перестройки, затрагивающие район участка связывания белка uS15.



Рисунок 48. Связывание рекомбинантного рибосомного белка uS15 человека с фрагментом 18SCD. Концентрация белка составляла 5×10⁻⁷ М. Доверительные интервалы указывают стандартное отклонение значений.

Для того чтобы выяснить, как изменяется структура сахарофосфатного остова 18S pPHK вблизи участка связывания uS15 при повышении концентрации ионов Mg^{2+} , было проведено зондирование структуры 18SCD с помощью гидроксил-радикалов (Рисунок 50). Оказалось, что повышение концентрации Mg^{2+} приводит к изменению доступности для атаки гидроксил-радикалами у трёх районов рибозофосфатного остова фрагмента 18SCD, расположенных в спиралях h20 (нуклеотиды в положениях 1023, 1024 и 1026-1028) и h22 (нуклеотиды в положениях 933-937 и 1006-1009).

В частности, доступность участка 933-937 значительно повышалась при достижении 5 мМ концентрации Mg^{2+} и практически не изменялась при более высоких концентрациях. Увеличение доступности участка 1006-1009 наблюдали уже при 2 мМ концентрации ионов Mg^{2+} , а доступность нуклеотидов С1006, С1007 и А1009 дополнительно повышалась при 20 мМ концентрации. Напротив, доступность нуклеотидов в участке, расположенном в спирали h20,

заметно понижалась при 5 мМ концентрации ионов Mg²⁺, при этом особенно сильный эффект наблюдали для нуклеотидов A1023 и A1027.



Рисунок 49. Зондирование вторичной структуры фрагмента 18SCD с помощью DMS. Продукты обратной транскрипции фрагмента 18SCD до (дорожка К) и после его обработки DMS в буфере, содержащем 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 и 20.0 мМ MgCl₂ (дорожки 1, 2, 3, 4, 5 и 6 соответственно), разделённые электрофорезом в 18%-ном ПААГ. Дорожки А, С, G и U – сиквенсные дорожки, полученные в присутствии соответствующих ddNTP (А и В). На панелях Б и Г схематически представлена эффективность модификации нуклеотидов при 1.0 (2), 2 (3), 5 (4), 10 (5) и 20 (6) мМ концентрации ионов Mg²⁺ относительно эффективности модификации этих нуклеоитидов при 0.5 мМ концентрации ионов Mg²⁺ в районах G986-G999 и U1049-A1081 соответственно. Нуклеотиды, чья доступность изменялась при повышении концентрации ионов Mg²⁺, отмечены полосками слева от панелей; нумерация нуклеотидов в 18S pPHK приведена справа.

Представление о расположении спиралей h20 и h22 18S pPHK в 40S субчастице можно получить, анализируя кристаллическую структуру 40S субчастицы рибосомы *S. cerevisiae* [15] (Рисунок 51). Так, можно видеть, что участок спирали h22, включающий районы, соответствующие нуклеотидам G933-C937/C1006-A1009 в 18SCD, участвует малой бороздкой в связывании белка uS15 и при этом не контактирует ни с какими другими районами 18S pPHK, т.



Рисунок 50. Зондирование структуры РНК-транскрипта 18SCD с помощью гидроксил-радикалов. Продукты обратной транскрипции 18SCD до (дорожка К) и после обработки гидроксил-радикалами в буфере, содержащем 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 и 20.0 мМ MgCl₂ (дорожки 1, 2, 3, 4, 5 и 6 соответственно),

разделённые в 8%-ном ПААГ (А, В и Д). Дорожки А, С, G и U – сиквенсные дорожки, полученные в присутствии соответствующих ddNTP. На панелях Б, Г и Е схематически представлена эффективность расщепления РНК при 1.0 (1), 2 (3), 5 (4), 10 (5) и 20 (6) мМ Mg^{2+} относительно эффективности ее расщепления при 0.5 мМ Mg^{2+} в районах G931-A938 (Б), G1005-A1011 (Г) и U1022-G1029 (Е). Остальные обозначения как на Рисунке 49

Таким образом, данные о доступности нуклеотидов 18SCD для атаки гидроксилрадикалами в присутствии высоких концентраций ионов Mg^{2+} (10-20 мМ) соответствуют структуре аналогичного участка 18S pPHK в 40S субчастице. Что касается слабой доступности участка G933-C937/C1006-A1009 спирали h22 гидроксил-радикалам при низкой концентрации ионов Mg^{2+} (0.5–2 мМ), то этот участок, скорее всего, был закрыт большой бороздкой базальной части спирали h24. Это могло быть вызвано тем, что спираль h24 в данных условиях оказалась расположенной не коллинеарно спиралям h22 и h23, как в 40S субчастице, а под углом 45° к ним. Спираль h20, расположенная коаксиально с базальной частью спирали h24, при этом должна быть выведена из контакта со спиралью h25, чтобы район A1023-A1028 был доступен для гидроксил-радикалов (Рисунок 51). Таким образом, относительное расположение спиралей h20, h22, h23 и h24 в центральном домене 18S pPHK в районе участка связывания uS15 зависит от концентрации ионов Mg^{2+} .



Рисунок 51. Сопоставление результатов зондирования структуры 18SCD со структурой центрального домена 18S pPHK в 40S субчастице рибосомы дрожжей согласно данным ренгеноструктурного анализа (индекс в Protein Data Bank – 2xzn) [15]. Слева – фрагмент пространственной структуры 18S pPHK в 40S субчастице, соответствующий 18SCD; участки, доступность которых гидроксил-радикалам изменялась с повышением концентрации Mg^{2+} , выделены черным. Справа – схематическое представление изменения ориентации спиралей в 18SCD в зависимости от концентрации ионов Mg^{2+} .

Разным взаимным расположением спиралей h23 и h24 при низкой и высокой концентрациях Mg^{2+} можно объяснить различия в доступности гетероциклических оснований нуклеотидов A1049, A1050, A1062 и A1070 спирали h24, наблюдаемые опытах с DMS при повышении концентрации Mg^{2+} (Рисунок 49). Низкая доступность этих оснований при концентрации ионов Mg^{2+} 0.5-2 мM, по-видимому, связана с их экранированием от модификации спиралью h23, вследствие поворота спирали h24.

Обращает на себя внимание то, что с повышением концентрации ионов Mg^{2+} падает сродство uS15 к фрагменту 18SCD, несмотря на то, что доступность района G933-C937/C1006-A1009, включающего остатки C1007 и A1009, которые принимают участие в связывании uS15 (см. раздел 3.2.5.5), повышается. По-видимому, это обусловлено тем, что район A1023-A1028, чья доступность понижается с повышением концентрации ионов Mg^{2+} , перекрывается с районом C1019-A1024, расположенным в спирали h20 и её сочленении со спиралью h22, который, наряду с упомянутым выше районом G933-C937/C1006-A1009, участвует в связывании uS15.

Таким образом, данные по химическому зондированию структуры фрагмента 18SCD при разных концентрациях ионов Mg^{2+} показали, что ионы Mg^{2+} оказывают на структуру 18S pPHK в районе участка связывания белка uS15, в целом, такой же эффект, что и на структуру соответствующего региона 16S pPHK [309, 310, 313]. Суммируя сказанное, можно заключить, что ионы Mg^{2+} при высокой концентрации вызывают конформационные перестройки в 18S pPHK, затрагивающие участок связывания белка uS15 в ее центральном домене. Эти перестройки сопровождаются пространственной переориентацией элементов вторичной структуры 18S pPHK в районе этого участка, делая его структуру похожей на структуру данного района 18S pPHK в 40S субчастице. По-видимому, насыщение координированными ионами Mg^{2+} центрального домена 18S pPHK приводит к стабилизации его структуры в той же конформации, что и связывание uS15, и это хорошо объясняет понижение сродства uS15 к фрагменту 18SCD при высоких концентрациях ионов Mg^{2+} .

3.2.6 Роль гидроксилирования рибосомного белка uL2 в поддержании функционально активной структуры 60S субчастицы рибосомы человека

Как уже было сказано в разделе 1.4.2, три рибосомных белка млекопитающих, uL2, uL15 и uS12, гидроксилированы в условиях нормоксии, тогда как при гипоксии эти белки не несут такой модификации. Рибосомный белок uL2 человека несёт гидроксильную группу на остатке гистидина в положении 216. Согласно крио-ЭМ модели 60S субчастицы рибосомы этот остаток находится вблизи пептидилтрансферазного центра (ПТЦ) в области места связывания ССА-

конца тРНК в Р-сайте и контактирует с сахарофосфатным остовом спирали H93 28S pPHK [14]. Однако расположение гидроксильной группы остатка His216 на данной модели не было отображено, по-видимому, из-за недостаточного её разрешения (5.4 Å). Поэтому представляло интерес выявить влияние гидроксильной группы остатка His216 в рибосомном белке uL2 человека на структуру 28S pPHK и тем самым установить роль гидроксилирования этого белка в формировании структуры 60S субчастицы рибосомы человека. Для этого были использованы природная (модифицированная) и рекомбинантная (немодифицированная) формы белка uL2, uL2n и uL2r соответственно.

Индивидуальный природный белок uL2n был получен с помощью ВЭЖХ суммарного белка 60S субчастиц рибосом из плаценты человека. Анализ трипсинового гидролизата uL2n с помощью масс-спектроскопии MALDI TOF показал наличие в его составе пептида с молекулярной массой 2753.37 Да, соответствующей массе пептида 201-226 с дополнительной гидроксильной группой, которая должна находиться на остатке His216 (Рисунок 52). Немодифицированный белок uL2r был получен из клеток *E. coli*, трансформированных соответствующей плазмидной конструкцией, содержащей кДНК этого белка, согласно методу, описанному в разделе 3.1, и очищен с помощью аффинной хроматографии до практически гомогенного состояния с последующей ренатурацией.



Рисунок 52. MALDI-TOF масс-спектр трипсинового гидролизата белка uL2n. Пик пептида 201-226, содержащего гидроксилированный остаток His216, отмечен звёздочкой.

В 60S рибосомной субчастице белок uL2 контактирует с нуклеотидами 28S pPHK, расположенными в доменах II-V, при этом основные его контакты лежат в доменах IV и V [14]. Для дальнейшего исследования был выбран сегмент домена V, где расположены спирали H73, H80-82, H88 и H90, с которыми взаимодействует С-концевой район белка uL2, включающий гидроксилированный остаток His216, а также спирали H74, H75 и H93, участвующие в формировании каталитического центра рибосомы (см. Рисунок 53А и Б) [14]. РНК длиной 266 н. (фрагмент 28S/DV), моделирующая указанный сегмент домена V 28S рРНК, была получена с помощью Т7-транскрипции ПЦР-продукта, в котором участки, соответствующие всем вышеупомянутым спиралям, были объединены (Рисунок 53А).



Рисунок 53. Вторичная структура фрагмента 28S/DV. (А) Вид вторичной структуры 28S рРНК человека [14]. Участки, находящиеся в контакте с белком uL2, отмечены красными овалами. Район домена V, соответствующий 28S/DV, обведён синим овалом. (Б) Вторичная структура фрагмента 28S/DV с нумерацией нуклеотидов, соответствующей нумерации нуклеотидов 28S рРНК. Номерами 1-5 обозначены границы фрагментов 28S рРНК, объединённые в 28S/DV. Нуклеотиды, контактирующие с белком uL2 в 60S субчастице, отмечены красными кружками. Изотермы связывания с ³²P-меченым фрагментом 28S/DV белка uL2n (В) и uL2r (Г). Относительная ошибка измерений составляла не более 10%.

Поскольку благодяря гидроксильной группе на остатке His216 белок uL2n имеет возможность образовывать дополнительную водородную связь, было интересно узнать, влияет ли эта группа на связывание фрагмента 28S/DV с белками uL2n или uL2r. Соответствующие изотермы связывания при 20 °C и низкой концентрации ионов Mg^{2+} (4 мМ) показали (Рисунок 53B и Г), что белки uL2n или uL2r имеют одинаковое сродство к фрагменту 28S/DV (*Ka* = $2.3\pm0.4\times10^6$ M⁻¹), что свидетельствует о сходстве структур этих белков, несмотря на разные способы их приготовления, и указывает на отсутствие существенного вклада гидроксильной группы на остатке His216 в сродство белка uL2 к 28S pPHK.

Чтобы выяснить, участвует ли гидроксильная группа белка uL2 в его связывании с 28S pPHK, и определить сайты в PHK, на структуру которых могла бы влиять эта группа, был выполнен химический футпринтинг фрагмента 28S/DV в комплексах с белками uL2n и uL2r. В качестве зондов были использованы DMS, CMCT, BzCN и гидроксил-радикалы. Положения модифицированных нуклеотидов и разрывов цепи в PHK были установлены с помощью обратной транскрипции. Химическое зондирование свободного фрагмента 28S/DV с помощью DMS и CMCT, специфичных к азотистым основаниям, показало, что модификации в основном подвергаются те нуклеотиды, которые не участвуют в образовании уотсон-криковских пар согласно вторичной структуре фрагмента 28S/DV в составе 18S pPHK (Рисунок 54). Это подтверждало, что трехмерная структура изолированного фрагмента 28S/DV подобна структуре соответствующего района 28S pPHK в составе рибосомы.

Сравнение результатов футпринтинга, полученных для изолированного фрагмента 28S/DV и для его комплексов с белками uL2n или uL2r, выявило четыре дискретные области, в которых нуклеотиды изменяли свою доступность зондам при связывании PHK с белками (Рисунок 54). Наиболее выраженные изменения происходили в регионах I и особенно III, которые на вторичной структуре 28S/DV расположены, в основном, в районе спиралей H90 и H93. Регион I, а именно нуклеотид C4447 в его составе, проявлял повышенную доступность к гидроксил-радикалам при связывании фрагмента 28S/DV с белком uL2n, но не с белком uL2r; при этом ни один из белков не экранировал данный регион от модификации. Оба белка защищали регион II (односпиральный участок 4520-4529) от атаки зондами, специфичными к азотистым основаниям. В регионе III (нуклеотиды 4531-4533) наблюдали резкое усиление доступности рибозы нуклеотида U4532 к гидроксил-радикалам при связывании белка uL2n, и умеренную защиту от модификации DMS и CMCT, детектируемую для обоих белков. Наконец, в регионе IV (нуклеотиды 4534-4548) были обнаружены защищали нуклеотиды 4544-4548 от модификации DMS.


Рисунок 54. Химический футпринтинг фрагмента 28S/DV в комплексах с белками uL2n и uL2r. На панелях A-B представлены результаты гель-электрофореза продуктов, полученных с помощью обратной транскрипции фрагмента 28S/DV, обработанного гидроксил-радикалами, BzCN, CMCT или DMS (дорожки "OH", "BzCN", "CMCT" и "DMS" соответственно). Дорожки "28S/DV", "28S/DV+uL2r" и "28S/DV+uL2n" соответствуют фрагменту 28S/DV, свободному или в комплексе с белками uL2r и uL2n. Участки, в которых нуклеотиды изменяли свою доступность зондам, отмечены как I – IV. Положения защит от атаки DMS и CMCT отмечены кружками и квадратами соответственно. (Г) Часть вторичной структуры фрагмента 28S/DV с указанием положений нуклеотидов, увеличивающих (белые кружки) или уменьшающих (чёрные кружки) свою доступность гидроксил-радикалам в присутствии uL2n или uL2r, отмечены чёрными квадратами. (Д) Часть вторичной структуры фрагмента 28S/DV с указанием положений иL2г.

Защиты нуклеотидов в регионе II обеими формами белка uL2 указывают на участие этого региона в связывании белка, однако спираль H90 28S pPHK, соответствующая этой области, не участвует в связывании с uL2 в 60S рибосомной субчастице [14]. По-видимому, эта область может быть сайтом предварительного связывания белка uL2 с доменом V на начальном этапе сборки 60S субчастиц. Возможность связывания рибосомных белков в подобных участках обсуждалась в работе [314], где было выдвинуто предположение, что структура PHK-белковых

181

комплексов, сформированных на начальных этапах сборки рибосомных субчастиц, может быть перегруппирована во время окончательного созревания их структуры.

Примечательно, что регион IV почти полностью совпадает с участком спирали H93, контактирующим с белком uL2 в 60S субчастице, и поэтому футпринты от белка uL2n в этой области отражают связывание белка uL2 с 28S pPHK. Это означает, что гидроксилирование uL2 по остатку His216 необходимо для распознавания спирали H93 C-концевым районом белка. Большое количество защит от атаки гидроксил-радикалами по сравнению с незначительным количеством защит от модификации DMS, наблюдаемых в регионе IV, указывает на то, что сахарофосфатный остов PHK участвует в связывании белка в большей степени, чем основания нуклеотидов, что согласуется с крио-ЭМ структурой 60S субчастицы [14]. Нуклеотиды U4532 и C4447, чьи рибозные остатки повышали свою доступность гидроксил-радикалам в присутствии белка uL2n, лежат несколько в стороне от сайта связывания uL2 в 60S субчастице. Их экспонирование в комплексе 28S/DV с uL2n может относиться к аллостерическим изменениям структуры в соответствующих областях, вызванным связыванием C-концевого района uL2n, содержащего гидроксилированный His216, со спиралью H93.

Известно, что эубактериальный uL2 участвует в ассоциации рибосомных субчастиц и связывании тРНК с Р- и А-сайтами рибосомы, помимо этого, этот белок важен для активности ПТЦ, расположенного в 60S субчастице рибосомы [315]. Интересно, что uL2 в 70S рибосомах E. coli может быть успешно замещён in vivo его архейным (H. marismortui) или человеческим гомологом без потери трансляционной активности гибридных рибосом [316], что говорит о высокой консервативности структуры этого рибосомного белка у всех организмов. Действительно, несмотря на то, что идентичность первичной структуры белка uL2 E. coli со структурами его гомологов у *H.marismortui* и человека не превышает 36% [316], выравнивание пространственных структур этих белков показало их высокое сходство (Рисунок 55). Особенное сходство можно наблюдать в глобулярной части uL2, расположенной на периферии большой рибосомной субчастицы, и в части С-концевого района белка, которая почти не структурирована и образует вытянутую петлю, направленную к ПТЦ [317]. Примечательно, что верхушка этой петли в белке uL2 человека, содержащая гидроксилированный остаток His216, включает также высококонсервативный остаток His209 (His229, здесь и далее в скобках дана нумерация для гомологичных остатков в E. coli). Замещение этого остатка в гомологичном белке E. coli вызывает потерю активности ПТЦ, но не влияет на сборку 50S субчастицы рибосомы [316, 318]. Анализ атомарных моделей больших субчастиц рибосом эубактерий (PDB 3R8T [319]), архей (PDB 3CC2 [320]) и человека (PDB 3J3B [14]) не выявил контактов остатка His209 (His229) с pPHK, что исключало его важность для связывания белка uL2 с 23S/28S рРНК. Однако роль этого аминокислотного остатка могла бы заключаться в поддержании

пространственной структуры белка uL2. Из упомянутых моделей видно, что вершина Сконцевой петли uL2 контактирует с консервативной спиралью H93, так что аминокислотные остатки 214-220 (234-240) белка попадают в большую бороздку этой спирали. Защиты в спирали H93 от гидроксил-радикалов, наблюдаемые в комплексе фрагмента 28S/DV с белком uL2n, но не uL2r, свидетельствуют о том, что контакты вершины C-концевой петли uL2 с этой спиралью реализуются благодаря присутствию гидроксильной группы на остатке His216 в белке uL2.



Рисунок 55. Выравнивание трёхмерных структур рибосомного белка uL2 эукариот, эубактерий и архей. Левая панель, выравнивание структур белков uL2 человека (PDB 3J3B_A) и *E. coli* (PDB 3R8T_C). Правая панель, выравнивание структур белков uL2 человека (PDB 3J3B_A) и *H. marismortui* (PDB 3CC2_A). Участок С-концевой петли отмечен жёлтым овалом. Участки белков с совпадающей структурой обозначены голубым и коричневым цветом. Выравнивание выполнено с использованием программы "RSCB PDB protein comparison tool" (http://www.rcsb.org/pdb/workbench/workbench.do).

Примечательно, что аминокислотные остатки в области 214-220 (234-240) С-концевой петли uL2 не полностью идентичны в соответствующих белках эубактерий, архей и эукариот. Так, в белках uL2 *E. coli*, *H. marismortui* и человека эта область представлена соответственно последовательностями GEGRNFG, GGRQHPG и GNHQHIG, при этом His216 в uL2 человека соответствует Gly236 в uL2 *E. coli* и Arg206 в uL2 *H. marismortui*. Это означает, что гистидин в положении 216 сам по себе не является обязательной аминокислотой. Следовательно, можно предположить, что контакт С-концевой петли белка uL2 со спиралью H93 23/28S pPHK в рибосомах обеспечивается архитектурой области 214-220 (234-240), которая должна быть однородной во всех белках этого семейства. В рибосоме млекопитающих для поддержания правильной архитектуры этой области, гидроксильная группа в His216 могла бы быть вовлечена либо в связывание с pPHK, либо во внутримолекулярные взаимодействия в белке.

Анализируя атомарную структуру 60S субчастицы рибосомы человека (PDB 3J3B и 3J3F [14]), можно предсказать пространственное расположение гидроксильной группы на атоме Сβ



Пространственная структура 60S субчастицы рибосомы Рисунок 56. человека в районе гидроксилированного остатка His216 белка uL2. (A) 60S субчастица (PDB 3J3B and 3J3F) с указанием рРНК (синий цвет), рибосомных белков (зелёный цвет) и белка uL2 (красный цвет). (Б) Увеличенный вид области, обведённой на панели А, где белок uL2 обозначен красным, участок 28S pPHK, соответствующий фрагменту 28S/DV, - синим, а его цепи, содержащие футпринты в регионах II и IV, показаны голубым и жёлтым соотвественно. (В) Увеличенный вид области, обведённой на панели Б, где верхушка С-концевой петли белка uL2 отмечена красным. Спираль H93 (выделена жёлтым), остаток His216 (выделен фиолетовым) и остаток U4532 (выделен голубым) указаны стрелками. Водородные связи между H216 и H93 показаны пунктиром. Предполагаемое расположение гидроксилльной группы на остатке His216 отмечено зелёной линией, а предполагаемая водородная связь между этой группой и атомом Nδ в остатке His218 изображена жёлтым пунктиром и отмечена стрелкой. (Г) Расположение нуклеотидных остатков, формирующих внутреннее ядро ПТЦ (отмечены красным), и нуклеотидов, увеличивающих свою доступность гидроксил-радикалам в комплексе фрагмента 28S/DV с белком uL2n (отмечены голубым).

остатка His216 в белке uL2 с учетом её стереохимии, описанной в [182]. Как видно из рисунка 56, атом О гидроксильной группы His216 расположен относительно атома С β так, что он занимает положение на стороне, противоположной сахарофосфатному остову pPHK, и образует водородную связь между водородом группы ОН и атомом N δ в остатке His218 (расстояние

184

около 3 Å). Эта водородная связь предотвращает вращение остатка His216 вокруг связи Cα-Cβ, позволяя имидазольному кольцу легко образовывать водородные связи с азотистым основанием U4539 и фосфатной группой C4537 в большой бороздке спирали H93 (Рисунок 56). Таким образом, анализ структуры 60S субчастицы показал, что роль гидроксильной группы на остатке His216 заключается в поддержании правильной фиксации верхушки C-концевой петли белка uL2 на спирали H93 28S pPHK, а не в непосредственном контакте с 28S pPHK.

Примечательно, что на крио-ЭМ структуре 60S субчастицы рибосомы человека (PDB 3J3F [14]) нуклеотиды C4447 и U4532, чьи рибозы проявляли повышенную доступность к гидроксил-радикалам в комплексе фрагмента 28S/DV с белком uL2n, расположены рядом с нуклеотидами, которые образуют внутреннее ядро ПТЦ [321] (Рисунок 56). В частности, C4447 является универсально-консервативным и способен формировать Хугстиновскую пару с универсально-консервативным нуклеотидом A4396, находящимся в стекинге с A4397 – центральным нуклеотидом ПТЦ. Второй нуклеотид U4532 сближен с универсально-консервативным и спосредственно связан с активностью пептидилтрансферазы [322]. То есть, нуклеотиды C4447 и U4532 в значительной степени способствуют стабилизации конформации нуклеотидов, образующих внутреннее ядро ПТЦ в рибосоме. Исходя из этого, становится ясным, что связывание верхушки С-концевой петли uL2, включающей гидроксилированный His216, со спиралью H93 28S pPHK при сборке 60S субчастицы придает нуклеотидам C4447 и U4532 такую конформацию, которая благоприятна для поддержания третичной структуры 28S pPHK вблизи каталитического центра в зрелой 60S субчастице.

На основании полученных результатов можно заключить, что гидроксильная группа в аминокислотном остатке His216, расположенном в верхушке С-концевой петли рибосомного белка uL2 человека, стабилизирует конформацию этой части белка, делая её подходящей для связывания со спиралью H93 28S pPHK во время сборки 60S субчастицы рибосомы. Это связывание, в свою очередь, индуцирует структурные перестройки нуклеотидов C4447 и U4532 28S pPHK, что позволяет универсально консервативным нуклеотидам C3909, C4397 и U4531 обеспечивать каталитическую активность ПТЦ в зрелой рибосоме. Таким образом, можно думать, что гидроксилирование His216 в uL2 играет критическую роль в поддержании надлежащей архитектуры ПТЦ в рибосомах млекопитающих. С учетом этого, можно предположить, что снижение степени гидроксилирования uL2 в клетках при гипоксии, сопровождающей практически любое заболевание, должно приводить к уменьшению трансляционной активности рибосом из-за нарушений в локальной структуре ПТЦ.

3.2.7 Схожие структурные мотивы в эубактериальных рибосомных белках bS20, bS18 и bS16 и в эукариотических рибосомных белках eS25, eS26 и eS31 соответственно

Результаты исследований, описанные в предыдущих разделах (см. 3.2.5.1, 3.2.5.2, 3.2.5.4 и 3.2.5.5), позволили сделать важное заключение о том, что мотивы pPHK, с которыми связываются гомологичные рибосомные белки зубактерий и зукариот, в целом, эволюционно консервативны так же, как и аминокислотные остатки белков, обеспечивающие это связывание. Опираясь на это заключение, в работе была предпринята попытка найти эукариотические гомологи эубактериальных рибосомных белков bS20, bS18 и bS16. Эти три белка 30S субчастицы рибосомы эубактерий, наряду с белком bS6, являлись единственными белками, не имеющими гомологов в рибосомах эукариот. С учётом известных атомарных моделей 30S субчастицы рибосомы T. thermophilus были установлены аминокислотные остатки в белках bS20, bS18 и bS16, принимающие участие в формировании контактов с 16S pPHK. Затем, с помощью множественного выравнивания последовательностей этих эубактериальных белков и последовательностей эукариотических белков малой субчастицы рибосомы, не имеющих эубактериальных гомологов, был выполнен поиск тех последовательностей в эукариотических обладали бы наибольшей гомологией белках. которые с эубактериальными последовательностями, участвующими в связывании с рРНК. Для множественного выравнивания были выбраны рибосомные белки различных видов эубактерий, архей и эукариот, наиболее эволюционно удалённых друг от друга. Оказалось, что в эубактериальных рибосомных белках bS20, bS18 и bS16 последовательности, которые содержат аминокислотные остатки, контактирующие с 16S рРНК, похожи на таковые в эукариотических рибосомных белках eS25, eS26 и eS31 соответственно (Рисунок 57). Эти участки могли бы рассматриваться как опознавательные последовательности (сигнатуры, от англ. signature – характерная черта) родственных белков, подобно сигнатурам других гомологичных рибосомных белков.

Описанный подход был дополнительно проверен на эубактериальных представителях рибосомных белков семейства uL16 и его архейных и эукариотических представителях, которые стали считать гомологичными только после расшифровки атомарной структуры 50S субчастиц рибосом эубактерий и архей [323]. Оказалось, что белки этих семейств также имеют одинаковую сигнатуру в области, контактирующей с 23S pPHK. Таким образом, описанный подход давал основания считать гомологами рибосомные белки bS18 и eS26, bS16 и eS31, а также bS20 и eS25.

Тем не менее, с расшифровкой атомарных структур рибосом дрожжей [15, 17] и человека [14] стало понятно, что эуариотические рибосомные белки eS25, eS26 и eS31 расположены в других районах малой рибосомной субчастицы, чем эубактериальные белки bS20, bS16 и bS18. В частности, эукариотические белки eS25, eS26 и eS31 контактируют с другими спиралями pPHK, чем эубактериальные белки bS20, bS16 и bS18, и их фолдинг в 40S

рибосомных субчастице не похож на фолдинг соотвествующих эубактериальных белков в 30S рибосомных субчастицах. То есть, белки в приведённых выше парах рибосомных белков эубактерий и эукариот гомологами не являются. Однако сравнительный анализ последовательностей в этих парах показал, что аминокислотные остатки белков eS25, eS26 и eS31, соответствующие согласно сигнатурам остаткам bS20, bS16 и bS18, контактирующим с 16S pPHK в 30S субчастицах (Рисунок 57), как правило, вовлечены в связывание с 18S pPHK в



Рисунок 57. WebLogo-диаграммы, указывающие представленность аминокислотных остатков в определённых положениях, для фрагментов выравненных аминокислотных последовательностей рибосомных белков bS18 эубактерий и eS26 эукариот (А), bS16 эубактерий и eS31 эукариот (Б) и bS20 эубактерий и eS25 эукариот (В). Внизу приведены сигнатуры для указанных белков.

40S субчастицах. Последнее наводит на мысль, что рибосомные белки эукариот eS25, eS26 и eS31 могли иметь общих предшественников с эубактериальными белками bS20, bS16 и bS18 соответственно. В результате дивергенции, эти эукариотические рибосомные белки могли утратить своё прежнее расположение на pPHK малой субчастицы и связаться с новыми участками, которые появились или изменились в 18S pPHK в ходе эволюции. Подобное

поведение рибосомных белков, а именно перемена места связывания на pPHK, недавно было описано для отдельных рибосомных белков некоторых архей [324]. Так, установлено, что в 50S субчастицах рибосом *Methanobacterium thermoautotrophicus, Sulfolobus acidocaldarius, Staphylothermus marinus* и *Pyrobaculum aerophilum* белок eL8, помимо участка связывания в сегменте экспансии ES5L 23S pPHK, характерного для всех белков этого семейства у эубактерий и эукариот, имеет участок связывания в районе спирали H25. У архей *Methanococcus igneus* дополнительное место связывания этого белка обнаружено на 30S субчастице в районе спирали h33 16S pPHK, в месте связывания белка eS12, имеющего с белком eL8 схожий мотив. Более того, в рибосомах архей *Pyrococcus furiosus* и *Thermococcus kodakaraensis* белок eL8 связывается во всех трёх описанных местах. Дополнительные участки связывания в рибосомах архей обнаружены также для белков eS24 и eL14 [324].

Таким образом, присутствие схожих структурных мотивов в эубактериальных рибосомных белках bS20, bS18 и bS16 и в эукариотических рибосомных белках eS25, eS26 и eS31 соответственно может указывать на их эволюционное родство, хотя сами по себе эти белки гомологами не являются. Это наблюдение может оказаться полезным при построении эволюционных сценариев, описывающих формирование рибосом у живых организмов при переходе от древних форм жизни к современным.

3.2.8 Связывание суммарного белка 40S субчастицы рибосомы человека с большим 3'концевым доменом 18S pPHK

Отсутствие методов сборки активных субчастиц эукариотических рибосом, подобных методам сборки субчастиц рибосом эубактерий, связано, по всей вероятности, с более сложным устройством и составом рибосом эукариот. Действительно, в состав эукариотической рибосомы входит примерно в два раза больше белков, чем в состав эубактериальной, а суммарная длина её pPHK тоже приблизительно вдвое больше, из-за чего термодинамический барьер, который требуется преодолеть при сборке эукариотической рибосомы, существенно выше, чем при сборке эубактериальной рибосомы. Живая клетка преодолевает такой барьер путём привлечения сотен дополнительных факторов сборки (см. главу 1); однако, для того чтобы реконструировать эукариотическую рибосому *in vitro*, простой манипуляции температурой и концентрацией соли, как при сборке эубактериальных рибосом, по-видимому, оказывается недостаточно. Чтобы продвинуться в разработке способа сборки 40S субчастицы рибосомы человека и понять, какие принципиальные трудности стоят на этом пути, можно было бы упростить задачу и попытаться собрать отдельный морфологический домен субчастицы. Известно, что отдельные морфологические части 30S субчастицы рибосомы могут быть собраны *in vitro* с использованием соответствующих РНК-транскриптов и наборов рибосомных белков с помощью подходов, применяемых для сборки целой 30S субчастицы [325-327]. Опыт, полученный при определении белкового состава головы 40S субчастицы рибосомы человека (разделы 3.2.2 и 3.2.3) и при изучении связывания рибосомных белков с РНК-транскриптами, соответствующими фрагменту большого 3'- домена 18S рРНК (разделы 3.2.4.1 – 3.2.4.4), был использован при сборке головы этой субчастицы.

Голова 40S субчастицы рибосомы представляет собой её большую морфологическую часть, включающую 18 из 33-х белков и большой 3'-концевой домен 18S pPHK. Для выяснения возможности реконструирования *in vitro* рибонуклеопротеида, соответствующего голове этой субчастицы, было изучено взаимодействие суммарного белка 40S субчастицы с PHK-транскриптом, моделирующим этот домен, и определены те белки, которые могут селективно связываться с ним. PHK-транскрипт (фрагмент 18S3DM) длиной 498 н. содержал область, соответствующую фрагменту 1203-1698 18S pPHK человека, а также два дополнительных остатками гуанозина на 5'-конце (Рисунок 58). Суммарный белок 40S субчастиц рибосом (TP40) был получен депротеинизацией 40S субчастиц, выделенных их плаценты человека, с использованием высокой концентрации соли (2 M LiCl).

Для связывания с ТР40 использовали биотинилированную по 3'-концу РНК, иммобилизованную на стрептавидин-агарозе. Буфер связывания содержал высокую концентрацию одновалентных катионов (400 мМ $\rm NH_4^+$), которую обычно применяют в опытах по сборке *in vitro* субчастиц прокариотических рибосом, чтобы увеличить специфичность связывания рибосомных белков с рРНК (напр., [271, 328]). Кроме того, в буфер были добавлены 0.5 М ТМАО в качестве осмолита, известного стимулятора сборки 50S субчастиц [329], и 15% ДМСО, чтобы предотвратить агрегацию белка. Иммобилизованный фрагмент 18S3DM был инкубирован с ТР40, взятым в эквимолярном соотношении, и не связавшиеся с РНК белки были отмыты тем же буфером. Белки, связавшиеся с иммобилизованной РНК, были элюированы раствором, содержащим SDS, и разделены электрофорезом в ПААГ в присутствии SDS (Рисунок 59А).

Анализ электрофоретического паттерна выявил довольно большой набор рибосомных белков, связавшихся с фрагментом 18S3DM. Эти белки были идентифицированы с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF. Оказалось, что из 33 белков 40S субчастицы 21 белок способен связываться с данным фрагментом (Таблица 3.2). Это – 15 белков (uS5, uS3, uS7, eS10, eS12, uS13, uS9, eS17, uS13, eS19, uS10, eS25, eS26, uS14 и eS31), контактирующих с большим 3'-концевым доменом 18S pPHK в 40S субчастице, и 6 белков (eS1, eS7, eS8, uS15, uS11 и uS8), не имеющих таких контактов. В полученном наборе, однако, отсутствовали три белка (RACK1, uS2 и eS28), контактирующих с вышеуказанным регионом 18S pPHK в 40S частице. Эти

результаты показали, что хотя большинство рибосомных белков, способных связываться с PHK-транскриптом18S3DM, специфичны для большого 3'-концевого домена 18S pPHK, доля рибосомных белков 40S субчастицы, связывающихся с этой PHK неспецифично, относительно велика.



Рисунок 58. Фрагмент 18S3DM, используемый для сборки головы 40S субчастицы рибосомы человека. Слева, вторичная структура 18S рРНК человека [14], где выделен большой основной 3'-концевой домен. Справа, вторичная структура фрагмента 18S3DM с нумерацией нуклеотидов и спиралей.

Чтобы проверить, не являлось ли использование иммобилизованной РНК причиной неспецифического связывания рибосомных белков, ТР40 и фрагмент 18S3DM, меченный ³²P, взятые в эквимолярном соотношении, были инкубированы в таком же буферном растворе (см. выше), что был использован в опыте с иммобилизованной РНК. По завершении их инкубации до 50% радиоактивной метки было обнаружено в виде нерастворимого материала, что свидетельствовало о частичной агрегации образующихся РНК-белковых комплексов, которая происходила несмотря на использование ТМАО и ДМСО. Для выделения комплекса ³²P-меченого фрагмента 18S3DM с белками, супернатант подвергали ультрацентрифугированию в линейном градиенте плотности 10-30%-ной сахарозы (Рисунок 60). Видно, что формы пиков,

содержащих фрагмент 18S3DM, в профилях седиментации изолированной РНК и РНК, инкубированной с рибосомными белками, отличаются, что указывает на связывание белков с фрагментом 18S3DM. Однако пик, соответствующий фрагменту 18S3DM в комплексе с белками, содержал существенно меньшее количество ³²P-метки, чем ожидалось, что могло быть вызвано осаждением фрагмента 18S3DM в составе РНК-белковых агрегатов с высокой молекулярной массой, образовавшихся в процессе центрифугирования. Действительно, недостающее количество ³²P-меченого материала было найдено на дне центрифужной пробирки.



Рисунок 59. Электрофоретический анализ белков 40S субчастиц рибосом человека, связавшихся с фрагментом 18S3DM PHK, в 15%-ном ПААГ в присутствии SDS. А, рибосомные белки, связавшиеся с иммобилизованным фрагментом 18S3DM. Дорожка –РНК, белки, связавшиеся со стрептавидинсефарозой в отсутствие фрагмента 18S3DM; дорожка +PHK, белки, связавшиеся с биотинилированным фрагментом 18S3DM, иммобилизованным на стрептавидин-сефарозе. Б, рибосомные белки, связывающиеся со свободным фрагментом 18S3DM PHK. Дорожка RNP, белки, выделенные из комплекса с фрагментом 18S3DM, очищенного центрифугированием в сахарозном градиенте. Дорожка TP40, суммарный белок 40S субчастиц. Положения идентифицированных рибосомных белков в геле отмечены справа (согласно данным раздела 3.2.1).

Белки, выделенные из градиентных фракций, содержащих фрагмент 18S3DM (Рисунок 60Б), были разделены электрофорезом в ПААГ в присутствии SDS (Рисунок 59Б). Сравнение полученного электрофоретического паттерна белков с аналогичным паттерном белков,

связавшихся с иммобилизованным фрагментом 18S3DM (Рисунок 59А), показало, что, в целом, эти паттерны похожи. Тем не менее, можно заметить, что паттерн белков, связавшихся с 18S3DM в растворе (Рисунок 59Б), не содержит полосу неспецифического белка eS8 и включает полосу белка uS2, контактирующего с 3'- доменом 18S pPHK. Анализ рибосомных белков, связавшихся с фрагментом 18S3DM в растворе, с помощью масс-спектрометрии MALDI TOF (Таблица 3.3) выявил, что этот паттерн, в дополнениек к белку uS2, содержит также белок eS28, специфичный к 3'- домену 18S pPHK. Кроме того, оказалось, что он не включает неспецифичного белка uS11, наблюдавшегося в паттерне, полученном с иммобилизованным фрагментом 18S3DM. Таким образом, специфичность связывания рибосомных белков с фрагментом 18S3DM в растворе (Таблица 3.3) была заметно выше, чем с иммобилизованным PHK-фрагментом (Таблица 3.2), хотя общий выход PHK-белкового комплекса был ниже из-за значительной агрегации комплекса.



Рисунок 60. Выделение комплекса фрагмента 18S3DM с рибосомными белками центрифугированием в линейном градиенте плотности сахарозы. А, профиль седиментации свободного фрагмента 18S3DM. В, профиль седиментации фрагмента 18S3DM в комплексе с рибосомными белками. Фракции, взятые для анализа содержания рибосомных белков, обозначены стрелками.

Таблица 3.2.

Рибосомные белки, связавшиеся с фрагментом 18S 3DM, иммобилизованным на стрептавидинсефарозе, и идентифицированные с помощью масс-спектрометрии

#	Наименование	Число	Покрытие	Достоверность
	белка ^а	идентифицированных	последовательности	
		пептидов	(%)	
1	uS2	6	22	40
2	eS1	10	44	51

3	uS3	10	45	80
4	uS7	5	21	43
5	eS7	11	26	163
6	eS8	10	47	82
7	eS10	6	41	59
8	eS12	3	10	52
9	uS15	5	32	59
10	uS11	4	34	52
11	uS19	11	44	149
12	uS8	4	39	56
13	uS9	7	55	41
14	eS17	6	25	86
15	uS13	6	29	47
16	eS19	9	53	152
17	uS10	7	27	104
18	eS25	5	29	64
19	eS26	13	66	193
20	eS31	8	37	141
21	uS14	3	30	46

^{*а*} Белки, контактирующие с большим 3'-концевым доменом 18S рРНК в 40S субчастице согласно [14], выделены полужирным шрифтом.

Таблица 3.3.

Рибосомные белки, связывающиеся с фрагментом 18S3DM в растворе и идентифицированные с помощью масс-спектрометрии

#	Наименование	Число	Покрытие	Достоверность
	белка ^а	идентифицированных	последовательности	
		пептидов	(%)	
1	uS5	9	26	143
2	eS1	10	40	120
3	uS3	18	69	84
4	uS7	7	21	109
5	eS7	22	61	68
6	eS10	8	52	91
7	eS12	4	18	71

8	uS15	7	43	60
9	uS19	8	32	130
10	uS8	7	52	70
11	uS9	9	56	89
12	eS17	7	27	98
13	uS13	12	57	182
14	eS19	11	60	93
15	uS10	11	55	184
16	eS25	8	42	119
17	eS26	4	40	67
18	eS31	3	11	58
19	eS28	3	30	59
20	uS14	4	28	66
21	$\mathbf{uS2}^{\delta}$			

^{*а*} Белки, контактирующие с большим 3'-концевым доменом 18S рРНК в 40S субчастице согласно [14], выделены полужирным шрифтом.

⁶ Белок uS2 не анализировали с помощью масс-спектрометрии, поскольку этот белок в составе TP40 мигрирует при электрофорезе в геле отдельной полосой и может быть однозначно идентифицирован.

Для выяснения вопроса о специфичности связывания рибосомных белков с фрагментом 18S3DM в растворе требовалось сравнить наборы нуклеотидов, контактирующих с белками в голове 40S субчастицы и комплексе 18S3DM с TP40. Для этой цели было выполнено зондирование структуры фрагмента 18S3DM в комплексе с TP40 с использованием химических зондов DMS, CMCT и гидроксильных радикалов. Было обнаружено, что в присутствии рибосомных белков значительная часть нуклеотидов фрагмента 18S3DM становится защищённой от атаки гидроксил-радикалами и меньшая часть нуклеотидов защищена от атаки DMS и CMCT. Чтобы проверить, коррелируют ли обнаруженные защиты с контактами соответствующих нуклеотидов с белками в 40S субчастице рибосомы, было проведено сравнение данных футпринтинга с информацией о контактах рибосомных белков с нуклеотидами 3'-концевого домена 18S pPHK, полученной из модели пространственной структуры 40S субчастицы рибосомы человека (Рисунок 61). Кроме того, результаты гидроксил-радикального футпринтинга были сопоставлены с вышеизложенными данными об открытых районах 18S pPHK в голове 40S субчастицы (см. раздел 3.2.3).

В результате проведенного анализа, было установлено, что большая часть нуклеотидов фрагмента 18S3DM, соответствующих нуклеотидам 3'-домена 18S рРНК, взаимодействующим с белками в голове 40S-субчастицы, оказалась защищенной от модификации или расщепления

194



Рисунок 61. Данные химического футпринтинга фрагмента 18S3DM, связанного с рибосомными белками. Нуклеотиды, защищаемые в комплексе 18S3DM с белками от действия DMS, CMCT и гидроксил-радикалов, отмечены красными, синими или зелёными кружками соответственно. Области 18S pPHK, контактирующие с рибосомными белками согласно структуре 40S субчастицы человека (PDB: 3J3A и 3J3D, [14]), обозначены названиями соответствующих белков. Регионы 18S pPHK, экспонированные в голове 40S субчастицы согласно этой же структуре, отмечены пурпурными линиями. Последовательность, для которой информация не была получена вследствие значительной удалённости от праймера, использованного для обратной транскрипции, или наоборот близости к нему, отмечена пурпурным цветом.

после связывания с рибосомными белками. Это, в свою очередь, указывало на присутствие в комплексе практически всех рибосомных белков головы субчастицы и на корреляцию между наблюдаемыми защитами и контактами соответствующих нуклеотидов с белками в малой субчастице рибосомы. В то же время, некоторые участки фрагмента 18S3DM, экспонированные в 40S субчастице, были также защищены от атаки гидроксил-радикалами в его комплексе с рибосомными белками. Следовательно, можно было заключить, что основная часть рибосомных связанных с фрагментом 18S3DM белков. располагается в местах. соответствующих их расположению в 40S субчастице, т. е. связывание этих белков является специфичным. Что касается защит, не связанных со специфическим взаимодействием фрагмента 18S3DM с рибосомными белками, они могли возникнуть либо из-за сворачивания РНК при формировании комплекса с белками, либо вследствие связывания неспецифических белков с этим фрагментом; возможность неправильного сворачивания некоторых частей фрагмента 18S3DM также не может быть исключена. Таким образом, рибонуклеопротеид, соответствующий голове 40S субчастицы рибосомы человека, может быть реконструирован из РНК-транскрипта, соответствующего большому З'-концевому домену 18S рРНК, и суммарного белка 40S субчастицы.

Несмотря достаточно удовлетворительные результаты реконструкции на по вышеупомянутого рибонуклеопротеида, существенной проблемой, оставшейся нерешенной, была существенная агрегация, которая сопровождала образование РНК-белковых комплексов. Это поднимало вопрос: почему подобные непродуктивные ассоциаты рибосомных белков с рРНК не образуются в процессе сборки рибосомных субчастиц в живой клетке. Можно предположить, что многочисленные посттрансляционные модификации рибосомных белков, которые были обнаружены во многих протеомных исследованиях клеток млекопитающих (см., напр., [330]), защищают белки от образования таких ассоциатов. Эти модификации (преимущественно фосфорилирование и ацетилирование), которым, в основном, подвергаются неструктурированные участки рибосомных белков, способны понижать их высокий положительный заряд и, тем самым, облегчать их специфическое связывание с рРНК. Возможно, что при сборке рибосомных субчастиц млекопитающих происходят процессы, подобные тому, что реализуются при связывании белка uS3 с пре-40S субчастицей рибосом дрожжей [331]. Показано, что правильное позиционирование белка uS3 на пре-40S субчастице сложный многоступенчатый процесс, требующий участия двух белковых факторов сборки и протеинкиназы, которая фосфорилирует как сам рибосомный белок, так и один из факторов сборки. При этом в ходе позиционирования белка на пре-40S субчастице он претерпевает значительные конформационные пререстройки. Стоит отметить, что рибосомные белки, выделенные из зрелых рибосомных субчастиц, как правило, не содержат посттрансляционных модификаций [179, 180, 332]. Это наводит на мысль, что по завершении сборки рибосомных субчастиц, посттрансляционные модификации, облегчающие сборку, должны быть удалены, чтобы позволить неструктурированным участкам рибосомных белков точно расположиться в рибосомных субчастицах. Однако пока остается неясным, какой клеточный механизм мог бы регулировать этот процесс.

3.3 Роль рибосомных белков 40S субчастицы в инициации трансляции геномной РНК ВГС

Геномная РНК ВГС, как уже отмечалось в разделе 1.5.2, несёт в составе своей 5'-НТО IRES-элемент, который обеспечивает инициацию трансляции этой РНК в обход классического механизма сканирования, реализуемого на клеточных мРНК, без участия большинства факторов инициации трансляции. На момент начала исследований, описываемых в настоящем разделе, с помощью крио-ЭМ низкого разрешения уже было получено приблизительное представление об архитектуре бинарного комплекса IRES ВГС с 40S субчастицей. Более того, с помощью методов аффинного химического сшивания были установлены многие рибосомные белки, контактирующие с IRES ВГС и его отдельными доменами (см. раздел 1.5.2). Все эти белки оказались расположенными с внешней стороны головы 40S субчастицы в её части, соответствующей району 30S субчастицы рибосомы Thermus thermophilus, расположенному вблизи участка выхода мРНК (Yusupova et al., 2001). Однако оставался открытым ряд вопросов, без ответа на которые было невозможно прийти к пониманию молекулярного механизма, обеспечивающего селекцию инициаторной Met-tRNA;^{Met} 40S субчастицами, связанными с IRES ВГС в отсутствие факторов инициации трансляции. В частности, была неизвестна конкретная роль белков и их структурных элементов в связывании IRES ВГС с 40S субчастицей, и было неясно, какой вклад вносит 18S рРНК в это связывание.

3.3.1 Роль рибосомного белка uS2 в связывании IRES ВГС с 40S рибосомными субчастицами

При определении рибосомных белков, участвующих в связывании IRES BГС с 40S субчастицей при образовании соответствующего бинарного комплекса, с помощью метода аффинной модификации с использований производных IRES, несущих фотоактивируемые группы в заданных положениях, было установлено соседство субдомена IIIе с рибосомным белком uS2 (см. раздел 1.5.2). Учитывая описанную в разделе 3.2.4 способность рекомбинантного белка uS2 насыщать 40S субчастицы, дефицитные по этому белку, было интересно выяснить роль рибосомного белка uS2 в связывании IRES-элемента PHK BГС с 40S субчастицами.



Рисунок 62. Связывание меченного ³²Р IRES ВГС с 40S субчастицами рибосом человека. 1 – изотерма адсорбции с 40S субчастицами, дефицитными по белку uS2. 2 – изотерма адсорбции IRES ВГС с 40S субчастицами, насыщенными рекомбинантным белком uS2. Относительная ошибка измерений составляла 15%.

Для изучения влияния белка uS2 на это связывание использовали субчастицы рибосом человека, либо дефицитные на 85% по этому белку (см. раздел 3.2.4), либо предварительно насыщенные рекомбинантным uS2 до эквимолярного содержания. Было установлено, что в случае субчастиц, дефицитных по белку uS2, величина *Ка* для связывания IRES BГC составила $(1.6\pm0.3)\times10^7$ M⁻¹, тогда как в случае субчастиц, насыщенных рекомбинантным uS2, её величина оказалась в 5 раз выше ($(8.8\pm1.6)\times10^7$ M⁻¹) (Рисунок 62). Сам рекомбинантный белок uS2, взятый в концентрациях, использованных для насыщения 40S субчастиц, не связывался с IRES BГC. Таким образом, 40S субчастицы, содержащие белок uS2 в эквимолярном количестве, связывались с IRES BГC значительно эффективнее, чем субчастицы, обеднённые по этому белку, причём семикратное уменьшение содержание белка в 40S субчастицах приводило к пятикратному снижению величины *Ка* IRES BГC.

Поскольку эффективность связывания IRES ВГС с 40S субчастицами зависела от содержания в них белка uS2, можно было выяснить, способны ли моноклональные антитела 4F6 против CTD этого белка препятствовать связыванию IRES-элемента с субчастицами. С этой целью 40S субчастицы инкубировали с моноклональными антителами и далее связывали с меченым PHK-транскриптом, соответствующим IRES ВГС. После связывания комплекс 40S субчастиц отделяли от несвязавшейся PHK центрифугированием в сахарозном градиенте, градиент фракционировали и просчитывали радиоактивность во фракциях (Рисунок 63). Оказалось, что радиоактивная метка во фракциях 40S субчастиц присутствовала только в том

случае, когда 40S субчастицы не были связаны с антителами, тогда как после обработки субчастиц этими антителами метка во фракции 40S субчастиц практически отсутствовала. В контрольных опытах было проверено влияние моноклональных антител против белка uS2 в poly(U)-зависимом связывании Phe-тPHK^{Phe} с 80S рибосомами, полученными ассоциацией 60S субчастиц со свободными, либо предварительно связанными с антителами 40S субчастицами с 50% содержанием рибосомного белка uS2. Связывание антител с 40S субчастицами в этих опытах практически не изменяло характера изотерм адсорбции [¹⁴C]Phe-тPHK^{Phe} с 80S рибосомами в присутствии poly(U), указывая на то, что CTD белка uS2 не участвует в кодонзависимом связывании аминоацил-тPHK, приводящем к формированию претранслокационного комплекса рибосом.



Рисунок 63. Связывание IRES ВГС с 40S субчастицами рибосом, предынкубированными с моноклональными антителами 4F6 против рибосомного белка uS2. Профили седиментации в сахарозном градиенте комплексов меченного ³²P IRES ВГС с 40S субчастицами в отсутствие (1) и в присутствии (2) антител. Положение 40S субчастиц указано стрелкой.

Таким образом, приведённые в настоящем разделе данные указывают на то, что рибосомный белок uS2 вовлечён в связывание IRES ВГС рибосомами и, следовательно, в механизм инициации трансляции геномной РНК этого вируса.

3.3.2 Рибосомные белки 40S субчастицы, участвующие в связывании IRES ВГС через экспонированные остатки лизина

В составе рибосомных белков человека (как было уже упомянуто в главе 1) присутствует большое число положительно заряженных аминокислотных остатков, в том числе лизина. Эти

остатки часто оказываются вовлечёнными в связывание с отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом РНК. Остаток лизина несёт аминогруппу, чья доступность может быть определена с помощью зондирования амин-специфичными реагентами, например Nгидроксисукцинимидными (NHS) эфирами. Представляло интерес, используя подходящие зонды, установить, какие рибосомные белки участвуют в связывании 40S субчастиц с IRES ВГС. Для модификации первичных аминогрупп рибосомных белков (аминогрупп в боковых цепях остатков лизина и неблокированных N-концевых аминогрупп), экспонированных в 40S субчастицах, изолированных и в составе их комплексов с IRES ВГС и его делеционными мутантами, был использован флуоресцентный реагент NHS-Cy3. Анализ меченых белков проводили с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии SDS. NHS-Cy3 легко взаимодействует с депротонированными аминогруппами, поэтому модификацию проводили в слабощелочном буфере (рН 8.5) в отсутствие компонентов, содержащих первичные аминогруппы. Субчастицы и NHS-Cy3 были взяты в относительно низких концентрациях, чтобы избежать избыточной модификации белков и, как следствие, существенного влияния массы сшитых с белками остатков красителя на подвижность белков в SDS-ПААГ. Для выявления белков 40S субчастицы рибосомы, участвующих в связывании IRES ВГС, проводили сравнение величин эффективности их модификации NHS-Cy3 в 40S субчастицах в отсутствие и в присутствии IRES ВГС или его делеционных мутантов. Такой подход методологически похож на футпринтинг РНК в составе рибонуклеопротеиновых коплексов с помощью химических зондов, поэтому его можно назвать белковым футпринтингом.



Рисунок 64. Схематическое представление вторичных структур IRES ВГС и его укороченных форм, использованных в работе.

Для определения белков 40S субчастиц, взаимодействующих с IRES ВГС, использовали три PHK-транскрипта, один из которых соответствовал IRES ВГС, а два других являлись его укороченными формами (Рисунок 64). В частности, PHK-транскрипт IRES₄₀₋₃₇₂ (полноразмерный IRES) содержал участок геномной PHK ВГС с 40-го по 372-ой н., который включает большой фрагмент 5'-HTO и начальную часть открытой рамки считывания (ORF, от англ. open reading frame) (последовательность 345-372) сразу после AUG кодона (положения 342-344) (см. Рисунок 11). PHK-транскрипт IRES_{ΔORF} соответствовал фрагменту IRES ВГС, в

котором отсутствовала последовательность 345-372, включающая часть ORF. Эта последовательность, хотя и не вносит заметного вклада в связывание IRES BГС с 40S субчастицами [207], является необходимой для его функциональной активности [203]. Наконец, РНК-транскрипт IRES_{ADIIAORF} соответствовал фрагменту IRES BГС, где вместе с ORF отсутствовал домен II (вклад которого в сродство IRES BГС к 40S субчастицам также несущественен [207]).

Участие рибосомного белка в связывании 40S субчастиц с IRES ВГС не означает, что все экспонированные остатки лизина в нём также вовлечёны в это связывание. Очевидно, что разница в уровнях модификации данного белка в изолированных 40S субчастицах и в их комплексах с PHK-транскриптами может оказаться сравнимой с погрешностью измерений. Поэтому для достижения максимальных различий в уровнях модификации рибосомных белков реагентом NHS-Cy3 в свободных 40S субчастицах и их бинарных комплекасх с IRES BГС и его делеционными мутантами были использованы 40S субчастицы, насыщенные соответствующими PHK-транскриптами до стехиометрического соотношения.

Препараты 40S субчастиц рибосом из плаценты человека оказались способными связывать PHK-транскрипты IRES_{ΔORF} и IRES_{$\Delta DII\Delta ORF$} практически до полного насыщения при инкубации в течение 30 мин при 30 °C (Рисунок 65). Однако для насыщения 40S субчастиц PHK-транскриптом IRES₄₀₋₃₇₂ потребовалась более длительная инкубация при более высокой температуре (37 °C, 2 ч), что, по-видимому, вызвано необходимостью расплавления шпильки домена IV в IRES ВГС (Рисунок 11) для последующего связывания входящих в его состав AUG-кодона и участка ORF в мPHK-связывающем центре рибосомы.



Рисунок 65. Связывание РНК-транскриптов IRES₄₀₋₃₇₂, IRES_{ΔORF} и IRES_{$\Delta DII\Delta ORF$} с 40S субчастицами рибосом человека. Приведены изотермы адсорбции IRES₄₀₋₃₇₂ (A), IRES_{ΔORF} (Б, 1) и IRES_{$\Delta DII\Delta ORF$} (Б, 2) на 40S субчастицах. ν – степень связывания моль РНК/моль 40S субчастиц. Относительная ошибка измерений – 10%.

Результаты зондирования экспонированных первичных аминогрупп рибосомных белков с помощью NHS-Cy3 в свободных 40S субчастицах рибосом человека и в их комплексах с IRES₄₀₋₃₇₂, IRES_{ΔORF} и IRES_{$\Delta DII\Delta ORF$} представлены на Рисунке 66. Анализ денситограмм флуоресценции, полученных сканированием гелей после разделения меченых рибосомных белков в SDS-ПААГ, показал, что практически все белки 40S субчастицы способны модифицироваться NHS-Cy3. Это соответствует общему представлению о структуре рибосомы, согласно которому белки занимают в ней периферийное положение (см. главу 1).

интенсивность флуоресценции Различная белковых полос, наблюдаемая на флуореграммах гелей, отражает разное количество экспонированных остатков лизина в соответствующих белках и их разную доступность для NHS-Cy3. Видно, что связывание РНКтранскриптов с 40S субчастицами приводит к заметному снижению интенсивности флуоресценции некоторых белковых полос (Рисунок 66), что свидетельствует об участии остатков лизина соответствующих белков в связывании с IRES ВГС. Однако только для трёх белковых полос это снижение составляло более 10% по сравнению с интенсивностью флуоресценции соответствующих полос, наблюдаемой в опыте с изолированными субчастицами. Так, связывание всех трёх РНК-транскриптов приводило к снижению интенсивности флуоресценции полосы в верхней части геля (Рисунок 66), которое было наиболее выраженным в случае IRES_{AORF} (около 15%). Масс-спектрометрический анализ белкового состава этой полосы геля выявил наличие в ней рибосомных белков uS5, eS1 (S2, S3a) и RACK1, что, в общем, согласуется с определением белкового состава этой полосы (см. раздел 3.2.1). Из этих белков только eS1 контактирует с IRES BГС (см. раздел 3.3.2), тогда как uS5 и RACK1 согласно структурным моделям рибосом (напр., [14]) находятся на значительном удалении от участка выхода мРНК на 40S субчастице – предполагаемом месте связывания IRES ВГС. То есть, IRES-зависимое снижение интенсивности флуоресценции полосы в верхней части геля обусловлено его связыванием с белком eS1 40S субчастицы.

Кроме того, в случае комплекса 40S субчастиц с IRES₄₀₋₃₇₂, происходило заметное снижение интенсивности флуоресценции белковой полосы в средней части геля, составлявшее около 22%, тогда как для комплексов с остальными PHK-транскриптами, в которых отсутствовала область, соответствующая ORF, интенсивность этой полосы не изменялась (Рисунок 66). Согласно данным, описанным в разделе 3.2.1, эта полоса в геле соответствует белку eS10 (S10) и то, что интенсивность её флуоресценции сохранялась в комплексах с фрагментами IRES BГС, лишёнными ORF, свидетельствовало о вовлечении этого белка в связывание ORF. Наконец, в нижней части геля находилась белковая полоса, интенсивность флуоресценции которой в изолированных 40S субчастицах хотя и была небольшой, тем не менее, в присутствии каждого из PHK-транскриптов снижалась более, чем на 70% (Рисунок 66).

Масс-спектрометрический анализ белков в этой полосе геля показал наличие в ней только белка eS27 (S27). Сильная защита этого белка от модификации в присутствии каждого из трёх PHKтранскриптов указывает на то, что большая часть экспонированных остатков лизина в этом белке участвует в связывании IRES BГС. Защита от флуоресцентного мечения самым коротким PHK-транскриптом (IRES_{ADIIAORF}) свидетельствует о том, что белок eS27 не принимает участия в связывании домена II или участка ORF IRES BГС. Следовательно, фактически, этот белок связывается только с доменом III IRES BГС.



Рисунок 66. Флуоресцентное мечение 40S субчастиц в бинарных комплексах с IRES ВГС и его фрагментами. Панель A – флуореграмма геля после разделения рибосомных белков в 14%-ном ПААГ в присутствии SDS, выделенных из 40S субчастиц, свободных и находящихся в комплексе с IRES_{40.372} или IRES_{ΔORF}, после обработки реагентом NHS-Cy3 (дорожки 1, 2 и 3 соответственно). Дорожка TP40 – белки 40S субчастицы, разделённые в том же геле и окрашенные Кумасси R250. Положения белков в геле отмечены слева. Справа – денситометрические профили дорожек 1 (сплошная линия), 2 (длинный пунктир) и 3 (короткий пунктир). Звёздочками отмечены пики, интенсивность которых изменяется. В выносках представлены участки, соответствующие белкам eS10 и eS27 (S10 и S27). Панель Б – флуореграмма геля после разделения в 14%-ном ПААГ в присутствии SDS рибосомных белков, выделенных из 40S субчастиц, свободных и ассоциированных с IRES_{ΔORF} или IRES_{ΔDIAORF} (дорожки 1, 2 и 3 соответственно), после обработки реагентом NHS-Cy3. Справа, денситометрические профили дорожек 1 (сплошная линия), 2 (длинный пункир) и 3 (короткий линия), 2 (длинный пункир) и 3 (короткий пунктир). Обозначения такие же, как на панели А.

Таким образом, с помощью метода белкового футпринтинга с использованием флуоресцентного реагента, специфичного к NH₂-группам, удалось установить, что остатки

лизина рибосомных белков eS1, eS10 и eS27 (S3a, S10 и S27), у которых нет эубактериальных гомологов, принимают участие в связывании IRES ВГС на 40S субчастице рибосомы человека.

3.3.3 Структурная организация участка связывания IRES ВГС на 40S субчастице

Результаты по идентификации рибосомных белков 40S субчастицы, участвующих в связывании IRES BГС (см. разделы 3.3.1 и 3.3.2), в сочетании с данными о строении 40S субчастиц и их комплексов с IRES (см. раздел 1.5.2) позволили определить структурные элементы IRES, контактирующие с конкретными рибосомными белками (Рисунок 67). Это, в свою очередь, дало возможность более точно локализовать участок связывания IRES BГС на 40S субчастице.

Таким образом, было установлено, что апикальная часть субдомена IIIe IRES располагается вблизи рибосомных белков uS2, eS1, uS7 и uS9 (SA, S3a, S5 и S16). Субдомен IIId при этом соседствует с белками eS1, uS11 и uS9 (S3a, S14 и S16), а апикальная часть субдомена IIb - с белками uS11 и uS9 (S14 и S16). Рибосомный белок uS2 непосредственно участвует в связывании 40S субчастиц с IRES ВГС, причём его СТD вовлекается в это связывание. Экспонированные на поверхности 40S субчастицы остатки лизина в эукариот/архейспецифичных рибосомных белках eS1, eS10 и eS27 (S3a, S10 и S27) также прямо вовлечены в связывание IRES ВГС. Остатки лизина в белке eS27 участвуют в связывании домена III IRES. Часть остатков лизина в белке eS10 вовлечена в связывание района, соответствующего начальному участку открытой рамки считывания геномной PHK ВГС, а остатки лизина в белке eS1 принимают участие в связывании доменов II и III IRES ВГС.

Следует заметить, что ни один из методов не позволил обнаружить контактов или соседства рибосомного белка uS7 (S5) с апикальной частью субдомена IIb IRES, что можно было ожидать на основании данных ранних работ по крио-ЭМ комплексов IRES BГС с 40S субчастицами [11] и 80S рибосомами [10]. Однако отсутствие сшивки между PHK, несущей сшивающую группу, и соседним с ней белком не означает отсутствия контакта между ними. Во-первых, сшивающая группа, даже расположенная рядом с белком uS7, могла не сшиваться с ним из-за отсутствия подходящих для сшивки мишеней (аминокислотных остатков), а вовторых, связывание IRES BГС с этим белком могло блокировать доступ к нему сшивающей группы. Что касается флуоресцентного мечения, то белок uS7 могли бы экранироваться взаимодействующим с ним участком IRES BГС. Поэтому изложенные результаты не исключают контактов рибосомного белка uS7 в 40S субчастице с субдоменом IIb IRES BГС в соответствующем бинарном комплексе.



Рисунок 67. Схема структурной организации участка связывания IRES ВГС на 40S субчастице рибосомы. Расположение доменов и субдоменов IRES ВГС (светлые прямоугольники) представлено на структуре 40S субчастицы рибосомы дрожжей, расшифрованной первой среди эукариотических рибосом [15]. 18S рРНК изображена в виде зелёных спиралей, рибосомные белки даны в виде шаровых моделей, 40S субчастица представлена в стандартной ориентации, стороной обратной межсубъединичной поверхности. Цветовая индикация белков: uS2 - жёлтый, eS1 - красный, uS7 голубой, eS10 - оранжевый, uS11 - зелёный, uS9 - сиреневый, eS27 - синий. Пунктирным прямоугольником обозначен участок IRES ВГС, предположительно расположенный в мРНКсвязывающем канале 40S субчастицы с противоположной стороны.

3.3.4 Молекулярный механизм IRES-зависимой инициации трансляции ВГС и ВГС-подобных вирусов

Определение белков 40S субчастицы рибосомы млекопитающих, непосредственно вовлечённых в связывание IRES-элемента ВГС, позволило вплотную приблизится к установлению молекулярного механизма инициации трансляции, используемого данным вирусом, а также другими вирусами, содержащими IRES-элемент подобный IRES-элементу ВГС. Однако оставалось неясным, участвует ли 18S рРНК в координированном связывании IRES ВГС. Ранние исследования показали отсутствие прямых УФ-сшивок IRES ВГС с 18S рРНК в составе бинарного комплекса [7]. Сшивок с 18S рРНК не было зарегистрировано и при

205

использовании для аффинной модификации 40S субчастиц производного IRES BГС, несущего статистически встроенные остатки 4-тиоуридина [6]. Это даже дало основание исследователям выдвинуть предположение об отсутствии конкретной роли у 18S pPHK в связывания IRES BГС с рибосомой [6]. Принимая во внимание, что отсутствие химических сшивок не является критерием отсутствия физического контакта между лигандами, для поиска нуклеотидов 18S pPHK, которые могли бы быть вовлечены в связывание IRES BГС, был использован метод гидроксил-радикального футпринтинга.

Ранее при исследовании функциональной роли доменов IRES ВГС было показано, что для эффективного связывания с 40S субчастицей рибосомы IRES-элементу ВГС не требуются домены II, IV и субдомен IIIb [207]. Домен IV IRES ВГС образует короткую шпильку, в апикальной части которой содержится старт-кодон AUG. Для того чтобы при связывании IRES с 40S субчастицей этот кодон в составе ORF был помещён в мРНК-связывающий канал, шпилька домена IV (как уже отмечалось в разделе 3.3.1) должна быть расплетена. В связи с этим, чтобы иметь возможность соотнесения возможных сигналов, вызванных связыванием с 40S субчастицей ORF IRES ВГС, и сигналов, обусловленных связыванием его остальной части, в экспериментах по футпринтингу наряду с полноразмерным IRES (IRES₄₀₋₃₇₂) была использована его усечённая форма IRES_{ΔORF}, лишённая ORF. Известно, что такой усечённый IRES сохраняет функциональную активность вплоть до образования 80S комплекса инициации [218]. Кроме того, чтобы проследить за возможным влиянием домена II IRES ВГС на структуру 18S pPHK, были также использованы формы IRES, в которых домен II был удален (IRES_{ΔDII} и IRES_{ΔDII} так же, как и IRES₄₀₋₃₇₂, IRES_{ΔORF} и IRES_{ΔDII} см. 9 см.

В опытах по гидроксил-радикальному футпринтингу 40S субчастиц в комплексах IRES_{ΔORF} или IRES_{$\Delta DII\Delta ORF$} была исследована практически вся последовательность 18S pPHK. Исключение составили её крайняя 3'-концевая область 1831-1869 (участвующая в гибридизации праймера для обратной транскрипции) и область 1221-1247 (участвующая в гибридизации праймера с 5' стороны от гипермодифицированного основания в положении 1248). В результате для комплексов 40S субчастиц с вышеуказанными усеченными формами IRES были обнаружены два участка в 18S pPHK, которые изменяли свою доступность атаке гидроксилрадикалами по сравнению со свободными 40S субчастицами (Рисунок 68).

Первая область (нуклеотиды A1113-C1118, соответствующие остановкам обратной транскрипции на нуклеотидах в положениях 1114-1119) расположена в апикальной петле сегмента экспансии 7 (ES7^S) в шпильке h26 18S pPHK. Эта область, доступная для атаки гидроксил-радикалами в свободных 40S субчастицах, была практически полностью экранирована в их комплексах с IRES_{ΔORF} и IRES_{ΔDIIΔORF}. Вторая область (нуклеотиды G1638-



Рисунок 68. Зондирование структуры 18S рРНК в составе комплекса 40S субчастиц рибосом человека с IRES_{AORF}, IRES_{ADIIAORF} или IRES₄₀₋₃₇₂ с помощью гидроксил-радикалов. Электрофоретическое разделение продуктов обратной транскрипции районов 18S рРНК 1070-1130 (A), 1600-1660 (Б), 495-554 (В) и 522-558 (Г) с использованием соответствующих ³²P-меченых праймеров. Сиквенсные дорожки обозначены как A, C, G и U. Остальные дорожки соответствуют 18S рРНК из свободных 40S субчастиц (40S), необработанных или обработанных гидроксил-радикалами (OH•), и 18S рРНК из обработанных гидроксил-радикалами 40S субчастиц, ассоциированных с IRES_{AORF} (40S-IRES_{AORF}), IRES_{ADIIAORF} (40S-IRES_{ADIIAORF}) или IRES₄₀₋₃₇₂ (40S-IRES₄₀₋₃₇₂). Положения остановок обратной транскрипции на нуклеотидах 18S рРНК с 3'-стороны от нуклеотидов, чьи рибозные остатки изменяли свою доступность гидроксил-радикалами (чёрные точки), и нуклеотидов, увеличивающих свою доступность гидроксил-радикалами (чёрные точки), и нуклеотидов, увеличивающих свою доступность гидроксил-радикалами (светлые точки), отмечены на вторичной структуре 18S рРНК человека [17, 293].

А1640, соответствующие остановкам обратной транскрипции на нуклеотидах в положениях 1639-1641), наоборот, была слабо доступна для гидроксил-радикалов в свободных 40S субчастицах, но её доступность сильно повышалась в присутствии IRES_{ΔORF}. Этот эффект был особенно заметным на G1639, в то время как эффекты на A1640 и особенно на G1638 были менее выражены. В комплексе 40S субчастиц с IRES_{ΔDIIΔORF} увеличение доступности нуклеотидов в этой области было слабовыраженным.

Следует также отметить, что связывание IRES_{$\Delta ORF}$ (равно как и IRES₄₀₋₃₇₂) с 40S субчастицами не влияло на доступность гидроксил-радикалам нуклеотидов в спирали h16 18S pPHK (Рисунок 68 Г). Изменение доступности этого участка можно было ожидать на основании имеющихся к моменту выполнения настоящего исследования данных крио-ЭМ низкого разрешения, согласно которым домен II IRES BГС индуцирует структурные перестройки в этой области 40S субчастицы [11]. Более того, эти данные послужили основой для гипотезы о возникновении связи между h16 и рибосомным белком uS3, индуцируемой этой перестройкой, что не получило подтверждения ни в одной из последующих работ, касающихся структуры комплексов IRES BГС с 40S субчастицами (см. напр., [227, 333]).</sub>

Нуклеотидные основания в положениях 1116-1118 в апикальной петле сегмента экспансии ES7S 18S pPHK человека являются цитозинами, тогда как в апикальной петле субдомена IIId IRES BFC, который, как уже отмечалось в разделе 3.3.1, критически важен для связывания IRES с 40S субчастицей, расположен триплет GGG. Чтобы проверить возможность этих триплетов контактировать друг с другом при образовании соответствующего бинарного комплекса, был выполнен футпринтинг шпильки h26 18S pPHK в комплексе 40S субчастиц с IRES_{ΔORF} с помощью DMS (Рисунок 69). Было обнаружено, что в присутствии IRES_{ΔORF} доступность остатков C1118 и C1117 (остановки на нуклеотидах в положениях 1119 и 1118 при обратной транскрипции) для модификации DMS оказалась сильно сниженной по сравнению с их доступностью в изолированных 40S субчастицах. В несколько меньшей степени был снижен уровень модификации остатка C1116 (остановка на нуклеотиде в положении 1117).

Таким образом, IRES ВГС при связывании с 40S субчастицей защищает от действия химических зондов как сахарофосфатный остов, так и азотистые основания остатков цитидина в апикальной части спирали h26 18S pPHK ES7S, что указывает на вовлечение этих оснований в образование комплементарных пар с другими нуклеотидами. По данным визуализации комплекса 80S рибосом с IRES ВГС, выполненной с помощью крио-ЭМ с низким разрешением, напротив района спирали h26 лежит субдомен IIId IRES [10]. Кроме того, известно, что триплет GGG в апикальной части этого субдомена защищён от гидролиза PHКазой T1 в комплексе IRES BГС с 40S субчастицами [334]. Сопоставляя эту информацию с полученными данными, можно было заключить, что триплет ССС спирали h26 18S pPHK образует комплементарную пару с триплетом GGG субдомена IIId в комплексе 40S субчастиц с IRES BГС.



Рисунок 69. Анализ с помощью обратной транскрипции спирали h26 18S pPHK в изолированных 40S субчастицах, необработанных (40S, –DMS) или обработанных DMS (40S, +DMS), и в комплексе 40S субчастиц с IRES_{ΔORF}, обработанном DMS (40S-IRES_{ΔORF}, +DMS). А, С, G, и U – сиквенсные дорожки. Положения остановок обратной транскрипции на нуклеотидах 18S pPHK с 3' стороны от нуклеотидов, защищаемых от модификации DMS IRES_{$\Delta ORF}, отмечены слева.</sub>$

Чтобы прояснить причину сильного увеличения доступности области 18S рРНК в районе нуклеотида G1639 в комплексах 40S субчастиц с IRES_{ΔORF}, гидроксил-радикальный футпринтинг был выполнен для комплексов 40S субчастиц с РНК-транскриптами IRES₄₀₋₃₇₂ и IRES_{$\Delta DII}$. Кроме того, для той же цели были использованы РНК транскрипты IRES_{ΔDIV}, в котором домен IV IRES ВГС был удалён полностью, и IRES_{UUU}, отличающийся от IRES_{ΔORF}, тем, что в нем инициаторный кодон AUG был замещён кодоном UUU. Сравнение интенсивности сигнала на нуклеотиде A1640 (соответствующем атаке гидроксил-радикалов по нуклеотиду G1639) показало, что увеличение этого сигнала происходит только тогда, когда в составе IRES ВГС присутствует домен II и инициаторный кодон AUG (Рисунок 70). Удаление</sub></sub> из структуры IRES ВГС домена II или домена IV, содержащего инициаторный кодон AUG, или даже замена этого кодона на кодон UUU, не являющийся инициаторным, приводило к резкому снижению доступности гидроксил-радикалам нуклеотидов G1638-A1640.



Рисунок 70. Гидроксил-радикальное зондирование области нуклеотида G1639 18S рРНК в 40S субчастицах рибосом человека в комплексе с IRES BГС. (А) Анализ с помощью обратной транскрипции 18S рРНК из изолированных 40S субчастиц, необработанных (40S) и обработанных гидроксил-радикалами (40S, OH•), и 18S рРНК из обработанных гидроксил-радикалами комплексов 40S субчастиц с IRES₄₀₋₃₇₂, IRES₄₀₋₃₇₂, IRES₄₀₋₃₇₂, IRES₄₀₋₃₇₂, IRES₄₀₋₃₇₂, 40S-IRES₄₀₋₃₇₂, 40S-IRES₄₀₋₃₇₂, IRES₄₀₋₃₇₂, c обработанных гидроксил-радикалами комплексов 40S субчастиц 18S рРНК из изолированных 40S субчастиц, необработанных с помощью обратной транскрипции 18S рРНК из изолированных 40S субчастиц, необработанных с помощью обратной транскрипции 18S рРНК из изолированных 40S субчастиц, необработанных (40S) и обработанных гидроксил-радикалами (40S, OH•), и 18S рРНК из обработанных гидроксил-радикалами (40S- IRES₄₀₀, 40S- IRES₄₀₀, 40S- IRES₄₀₀, 40S- IRES₄₀₀, или 40S- IRES₄₀₀, 40S- IRES₄₀₀, или 40S- IRES₄₀₀, 40S- IRE

Основываясь на этих данных, можно было заключить, что структурные изменения в районе нуклеотида G1639 18S pPHK, происходящие в 40S субчастице при связывании IRES BГС, обеспечиваются взаимодействием двух удалённых друг от друга районов IRES-элемента, а именно домена II и инициаторного кодона AUG в домене IV. Следует отметить, что данных, указывающих на какие-либо контакты между доменами II и IV IRES BГС на 40S субчастице в области мPHK-связывающего центра, не получено, поэтому можно было предположить, что взаимодействие этих двух структурных элементов IRES BГС на 40S субчастице происходит аллостерически с участием какого-то посредника. На роль такого посредника больше всего подходил рибосомный белок uS7 (S5). Как упоминалось выше, этот белок способен образовывать прямые УФ-сшивки с полноразмерным IRES BГС в составе его бинарного комплекса с 40S субчастицей [5, 7], при этом IRES ВГС, лишённый домена IV, не сшивался с белком [5]. Кроме того, отмечено, что белок uS7 сшивается с первым нуклеотидом кодона мРНК, связанного в Е-участке рибосомы, несущим перфторарилазидную группу или замещённым на тиоуридин [283, 335], т. е. для сшивки белка с мРНК требуется фазирование кодона в Р-сайте.

Важно отметить, что нуклеотид G1639 18S pPHK является универсальным нуклеотидом в pPHK малых субчастиц рибосом [293], и в 16S pPHK *E. coli* ему соответствует нуклеотид G1338, для которого выявлен ряд функциональных свойств. В частности, показано, что G1338 наряду с соседним нуклеотидом A1339 участвуют в IF3-зависимой селекции инициаторной тPHK в P-сайте рибосомы посредством взаимодействия с характерными для этой тPHK парами G-C в её антикодоновой стебле [336]. С помощью PCA функциональных комплексов бактериальных рибосом установлено, что G1338 и A1339 выступают в качестве своеобразных ворот, которые, будучи закрытыми, предотвращают транслокацию тPHK из P-сайта в E-сайт и которые открываются при повороте головы малой субчастицы. Иными словами остатки G1338 и A1339 действуют как молекулярный переключатель во время инициации трансляции и транслокации [306]. Поэтому полученные данные о структурных изменениях в районе нуклеотида G1639 18S pPHK, происходящие в 40S субчастице при связывании IRES BFC, позволяют предположить, что данный конформационный переход необходим также при IRESопосредованной инициации трансляции, в отсутствие факторов инициации, участвующих в выборе и распознавании AUG-кодона.

Примечательно, что область связывания неструктурированных N- и C-концевых участков инициаторного фактора eIF1a на 40S рибосомной субчастице, определённая с помощью производных данного фактора, содержащих сайт-направлено присоединённые гидроксил-радикал-генерирующие зонды, оказалась перекрывающейся с районом нуклеотида G1639 [337]. Кроме того, показано, что оба концевых участка eIF1a сильно стимулируют связывание тройного комплекса eIF2•Met-tRNA_i^{Met}•GTP с 40S субчастицами [337]. Известно также, что из факторов инициации eIF1a и eIF1 только eIF1a стабилизирует взаимодействие тройного комплекса с 40S субчастицей, но оба фактора вместе стабилизируют конформационное изменение, которое открывает "защелку" (от англ. "latch") канала связывания мРНК [338]. Поэтому, с учётом сказанного выше, можно считать, что совместное действие домена II IRES ВГС и старт-кодона AUG в его домене IV при IRES-опосредованной инициации трансляции функционально заменяет действие факторов eIF1a и eIF1 при канонической инициации трансляции путем конформационной перестройки 18S рРНК в области нуклеотида G1639.

Таким образом, полученные данные позволили предложить молекулярный механизм, обеспечивающий способность 40S субчастицы в комплексе с IRES ВГС, узнавать Met-tRNA;^{Met} без участия факторов инициации eIF1 и eIF1a, обеспечивающих узнавание старт-кодона при канонической инициации трансляции (Рисунок 71). В соответствии с этим механизмом, на начальном этапе инициации трансляции геномной РНК ВГС происходит связывание её IRES с 40S субчастицей через взаимодействие домена III, обладающего жёсткой структурой, с рибосомными белками вблизи участка выхода мРНК (Рисунок 71, состояние I). Далее, это связывание дополнительно стабилизируется координированным взаимодействием между апикальными петлями субдомена IIId IRES и шпильки h26 18S pPHK (Рисунок 71, состояние II). Такая стабилизация приводит к тому, что домен II IRES оказывается расположенным на голове 40S субчастицы и образует контакт с рибосомным белком uS7, который, в свою очередь, позволяет домену IV IRES расплестись и поместить часть ORF в мРНК-связывающем канале. Дальнейшие шаги могут происходить по следующему сценарию. Как только AUG-кодон оказывается в области декодирования, происходит конформационный переход 18S рРНК в области G1639, опосредованный взаимодействием апикальной петли домена II с рибосомным белком uS7, что активирует 40S субчастицу, делая её способной к последующей дискриминации инициаторной тРНК и её закреплению Р-участке (Рисунок 71, состояние III). Далее происходит узнавание AUG-кодона инициаторной тРНК и фиксация рамки считывания геномной РНК ВГС в мРНК-связывающем канале, что завершает образование 48S предынициаторного комплекса (Рисунок 71, состояние IV).

Изложенные в разделе 3.3 данные, касающиеся роли рибосомных белков 40S субчастицы в инициации трансляции геномной РНК ВГС, нашли подтверждение в работах зарубежных коллег по установлению атомарной структуры комплекса 40S субчастицы с IRES ВГС и определению функциональной значимости отдельных его участков. Так, детализированные крио-ЭМ модели IRES ВГС-содержащих рибосомных комплексов были недавно опубликованы группами К. Шпана [217] и Н. Бана [333]. В первой из этих работ с разрешением 8.6 Å была расшифрована структура 80S комплекса инициации млекопитающих (кролика), содержащего 80S рибосому, IRES ВГС, Met-tRNA_i^{Met}, фактор eIF5B и негидролизуемый аналог GTP – GMPPNP, а во второй с разрешением 3.9 Å была установлена структура 40S субчастицы рибосомы человека, связанной с IRES ВГС, в составе комплекса 80S рибосомы с этим IRES. Несмотря на различный состав комплексов, описываемых в этих работах, расположение IRES ВГС на 40S субчастице в полученных крио-ЭМ моделях, в целом, схоже. Согласно этим моделям, основной стебель домена III IRES ВГС простирается на 40S субчастице вдоль её стороны, находящейся под платформой, и контактирует с рибосомными белками eS27 (нуклеотиды субдоменов IIIa и IIIc) и eS1 (нуклеотиды субдомена IIIe). Белок eS1 также находится вблизи субдомена IIId, а триплет GGG апикальной петли этого субдомена образует комплементарные пары с триплетом ССС в апикальной петле спирали h26 18S pPHK. Белок



Рисунок 71. Модель адаптации IRES ВГС к 40S субчастице рибосомы человека до образования 48S предынициаторного комплекса. Положения рибосомного белка uS7 (показан зеленым цветом), сегмента ES7^S шпильки h26 (выделен синим цветом и показан стрелкой) и G1639 (отмечен красным) обозначены на 40S субчастице в соответствии с моделью [17]. Промежуточные состояния, через которые происходит аккомодация IRES ВГС к 40S субчастице, обозначены римскими цифрами и описаны в тексте. Регионы 40S субчастицы, где происходят ключевые события, отмечены красными кружками.

eS11, хотя непосредственно и не контактирует с доменом III IRES ВГС, расположен в непосредственной близости от его субдомена Ше, который лежит на платформе субчастицы в области выхода мРНК. Домен II IRES ВГС делает изгиб вдоль головы 40S субчастицы и его субдомен IIb занимает пространство тРНК, связанной в Е-участке, при этом нуклеотиды апикальной петли этого субдомена контактируют с белками uS11 и uS7, а белок uS9 оказывается в непосредственной близости от этой части IRES ВГС. Что касается белка uS2, его глобулярная часть находится на значительном удалении от IRES BГС. Вместе с тем, расположение на рибосоме протяжённого эукариот-специфичного CTD этого белка попрежнему не удаётся установить с помощью крио-ЭМ, что свидетельствует о значительной подвижности этого участка. Согласно данным, описанным в разделе 3.2, в свободной 40S субчастице участок CTD белка uS2 расположен в районе спирали h40 18S рРНК (экспонированной на голове субчастицы со стороны участка выхода мРНК). Однако учитывая его подвижность и отсутствие устойчивой структуры можно ожидать, что эта часть белка также способна вовлекаться в связывание IRES ВГС на субчастице. Предсказанная в модели адаптации IRES ВГС к 40S субчастице рибосомы (см. выше) критическая роль комплементарного взаимодействия между триплетом GGG апикальной петли субдомена IIId IRES ВГС и триплетом ССС в апикальной петле спирали h26 18S pPHK была подтверждена в [339] с помощью функциональных тестов. В этой работе показано, что любое нарушение комплементарности между указанными триплетами, вызванное мутацией либо со стороны IRES ВГС, либо со стороны 18S рРНК, многократно снижает функциональную активность IRES, тогда как при компенсаторных мутациях в обоих триплетах его активность сохраняется. Последние работы по исследованию структуры комплекса IRES ВГС с рибосомой с помощью крио-ЭМ также свидетельствуют в пользу комплементарного взаимодействия между субдоменом IIId IRES ВГС и спиралью h26 18S pPHK [215, 333].

Важно отметить, что предположение о том, что апикальная часть домена II IRES ВГС контактирует с инициаторным AUG кодоном на 40S субчастице, сделанное в упомянутой выше модели, не нашло подтверждения в крио-ЭМ структурах рибосомных комплексов этого IRES [217, 333]. Согласно этим структурам, контакты домена II на 40S субчастице ограничиваются рибосомным белком uS7, который, в свою очередь, взаимодействует с нуклеотидами в положениях от -3 до -5 (относительно остатка аденозина старт-кодона AUG, находящегося в Р-участке). С учётом этих данных, можно предположить, что, контактируя с рибосомным белком uS7, домен II, скорее всего, оказывает влияние на взаимодействие этого белка с нуклеотидами IRES с 5'-стороны от AUG-кодона и тем самым стабилизирует позиционирование этого кодона на 40S субчастице. Роль рибосомного белка uS7 в опосредованном взаимодействии между апикальной частью домена II IRES BГС и нуклеотидами его домена IV в мPHK-связывающем

канале 40S субчастицы была недавно изучена в работе [219]. В ней, при изучении влияния различных замен в белке uS7 и IRES BГС на эффективность их сшивки в бинарном комплексе IRES с рибосомами было показано, что для проявления функциональной активности IRES BГС необходима вытянутая β-шпилька белка uS7 и специфичная структура участков доменов II и IV, контактирующих с ней.

3.3.5 Расположение нуклеотидов, фланкирующих старт-кодон ORF IRES BГС, в бинарном комплексе IRES BГС с 40S субчастицами рибосом

Несмотря на интенсивные исследования по установлению архитектуры бинарного комплекса IRES ВГС с 40S субчастицей рибосомы с помощью различных методов, до последнего времени оставался неясным вопрос о расположении в составе этого комплекса начального участка ORF в составе IRES ВГС. Пионерская работа по изучению такого комплекса с помощью метода тоупринтинга (от англ. toeprint – отпечаток пальца ноги) [7] выявила сигналы (тоупринты) от остановки обратной транскриптазы при синтезе кДНК по матрице IRES ВГС в положениях +14 и +15 (где +1 – положение аденина стартового кодона AUG в Р-сайте). Эти сигнали точно соответствовали переднему краю 40S субчастицы, что позволило авторам выдвинуть идею о том, что начальный участок ORF IRES BГС фиксирован стабильно в рибосомном мРНК-связывающем канале в составе бинарного комплекса 40S субчастиц с IRES ВГС. Однако данные более поздних исследований бинарного комплекса 40S субчастиц с IRES ВГС с помощью метода тоупринтинга показали наличие сигналов в других положениях [340-342]. Учитывая известный факт, что при канонической инициации трансляции на 40S субчастице помещается фрагмент мРНК длиной более 28 нуклеотидов с Рсайт-связанным кодоном посередине, эти данные можно классифицировать на две группы. Одна из этих групп содержит тоупринты, соответствующие переднему краю 40S-субъединицы, а именно тоупринты в положениях +14/+15 [340], где ранее были найдены сигналы в работе [7], и в положениях +20/+21 [341, 342]. Другая группа включает тоупринты в положениях +3/+4 [342], +2/+5 [341] и +9/+11 [340], которые не могут быть отнесены к мРНК, находящейся в мРНК-связывающем канале; тоупринты этого типа являлись самыми сильными в работе [341]. Как было отмечено в этой же работе [341], изменение положений тоупринтов, соответствующих передней кромке 40S субчастицы, и появление другой группы тоупринтов в данных исследованиях, может быть обусловлено различиями в условиях их анализа и источниках 40S субчастиц рибосом (клетки HeLa или ретикулоциты кролика). Что касается работ по исследованию архитектуры рибосомных комплексов IRES ВГС методом крио-ЭМ [217, 333, 343], то специфические контакты триплетов фрагмента ORF с 3'-стороны от стартового кодона AUG с 40S субчастицей в них не упоминались. Вероятно, трудности в их идентификации с помощью крио-ЭМ, были обусловлены неструктурированностью и гибкостью этой части ORF.

Чтобы прояснить вопрос о расположении на 40S рибосомной субчастице области IRES ВГС, включающей окружение инициаторного кодона AUG, была проведена аффинная производных модификация субчастиц с использованием IRES. 40S содержащих фотоактивируемую сшивающую группу в заданном положении. Эти производные IRES BГС были получены с применением разработанного ранее подхода (см. раздел 1.5.2) и содержали перфторарилазидную группу на нуклеотидных остатках в положении -3 (IRES(-3)) или +4/+5 (IRES(+4/+5)) относительно остатка аденозина стартового кодона AUG (Рисунок 72 А и Б). Сшивки ³²Р-меченых производных IRES ВГС с 40S субчастицами получали, облучая соответствующие смеси мягким УФ-светом. После облучения 40S субчастицы были разрушены с помощью SDS и ЭДТА и обработаны РНКазой Т1 для гидролиза РНК, в том числе IRES, сшитого с белками. Анализ сшитых белков проводили с помощью разделения полученных смесей электрофорезом в SDS-ПААГ с последующим переносом белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану и её радиоавтографированием. Поскольку РНКаза Т1 не расщепляет РНК по остатку гуанозина, алкилированного по атому N7 [344], ожидалось, что в бинарных комплексах 40S субчастиц с IRES(-3), с рибосомными белками окажется сшитым 7звенный фрагмент CA*UCAUGp, а с IRES (+4/5) – либо димер A*Gp, либо гексамер AG*CACGp (остатки, несущие сщивающую группу обозначены звездочкой) в зависимости от того, в каком положении (+4 или +5) находится нуклеотид, несущий сшивающую группу. Известно, что сшитые с белками олигомеры замедляют электрофоретическую подвижность рибосомных белков в SDS-ПААГ; величины сдвига полос сшитых белков в геле относительно полос соответствующих им немодифицированных белков установлены [12, 345]. При идентификации сшитых белков учитывали белковое окружение на 40S субчастице участков IRES, содержащих нуклеотиды в положениях -3 и +4/+5, в соответствии с данными молекулярного моделирования [216] и крио-ЭМ [333, 343]. Согласно этим данным окружение нуклеотида IRES ВГС в положении -3 на 40S субчастице составляют рибосомные белки uS7, eS26, eS28 и uS11. Нуклеотид IRES в положении +4/+5 должен сшиваться с белком uS19 в соответствии с данными по аффинной модификации рибосом аналогами мРНК с дериватизованными нуклеотидами в тех же положениях [12, 227, 228, 283, 345]. Кроме того, рибосомные белки uS3 и eS30, соседствующие с нуклеотидами мРНК с 3'-стороны от положения +5 [283, 345-347], также могли быть рассмотрены как дополнительные (хотя и маловероятные) мишени для IRES(+4/5).


Рисунок 72. Сайт-направленная модификация IRES ВГС. (А) Вторичная структура IRES ВГС и схема модификации сайт-направленной IRES ВГС алкилирующими производными олигодезоксирибонуклеотидов. Старт-кодон шрифтом; выделен полужирным участки, комплементарные олигонуклеотидным производным отмечены сплошной линией со стрелкой, мишени модификации выделены серым квадратом. (Б) Определение модифицированных нуклеотидов с помощью обратной транскрипции. Дорожки 1 и 2 – IRES ВГС, алкилированный производными ДНКолигомеров, комплементарных соответственно участкам 324-338 и 327-344 IRES; дорожка К немодифицированный IRES ВГС; U, G, C и А – сиквенсные дорожки. Стрелками отмечены положения остановок обратной транскрипции. Следует заметить, что в IRES(+4/5) точное положение модифицированного нуклеотида установить не удалось. Сигнал на G346 (дорожка 2) может соответствовать алкилированию либо этого остатка по атому N7 (пауза), либо остатка A345 по атому N1 (остановка) (см. определение положений модифицированных нуклеотидов с помощью обратной транскрипции в разделе 3.2.3).

Анализ рибосомных белков, сшитых с IRES(-3), выявил две различные радиоактивные полосы, отсутствующие в опытах с IRES(+4/5) и контрольной РНК (IRES-K) (Рисунок 73, левая панель А). Положения этих полос хорошо согласуются с ожидаемыми положениями белков uS11 (верхняя полоса) и eS26 (нижняя полоса), сшитых с остатком гептарибонуклеотида [12, 335]. С другой стороны, эти полосы не могли быть отнесены ни к каким другим сшитым белкам из вышеупомянутого набора белков-кандидатов. В частности, немодифицированные белки uS7 и uS3 мигрируют медленнее, чем соответствующие меченые белки, и поэтому они не могут

быть белками, сшитыми с IRES(-3). Белки eS28 и eS30 также не могли рассматриваться как модифицированные, поскольку расстояния между полосами этих белков и наблюдаемыми радиоактивными полосами оказались в несколько раз больше, чем можно было ожидать из работ по сшивкам белков с короткими аналогами мРНК в составе рибосомных комплексов [12, 345, 348]. Таким образом, белки, сшитые с IRES(-3), можно было однозначно идентифицировать как uS11 и eS26.

Более слабая радиоактивная полоса, находящая в области полосы, соответствующей сшивке IRES(-3) с белком eS26 (Рисунок 73, левая панель А), не может относиться к сшивке IRES(+4/5) с этим белком, поскольку белок eS26 расположен далеко от рибосомного сайта декодирования на другой стороне 40S субчастицы. Рибосомным белком, к которому могла бы быть отнесена обсуждаемая полоса, мог быть uS12 на основании сдвига этой полосы относительно полосы данного белка в окрашенном геле и с учётом его близости к рибосомному сайту декодирования (см., напр., [347]). Однако белок uS12 никогда ранее не обнаруживали сшивающимся с фотоактивируемыми аналогами мРНК. Этот белок был предложен в качестве вероятной мишени модификации в дополнение к главной мишени – белку uS19 только при сшивании укороченного IRES ВГС с окисленной 3'-концевой рибозой в положении +4 в бинарном комплексе с 40S субчастицей [228]. Тем не менее, эти данные не были рассмотрены в [228] как функционально значимые, поскольку укороченный IRES ВГС содержал только четыре нуклеотида в ORF. Таким образом, согласно вышеизложенным данным в бинарном комплексе с 40S субчастицами рибосом человека IRES(-3) сшивался с рибосомными белками uS11 и eS26, а IRES(+4/5) - c белком uS19. Выход сшивки в случае IRES(+4/5) был ниже, по крайней мере, на порядок, чем выход сшивок для IRES(-3). Следовательно, можно было заключить, что нуклеотид в положении -3 IRES BГС соседствует с белками uS11 и eS26, а нуклеотид в положении +5 - с белком uS19. Однако доля комплексов, где нуклеотид в положении +5 оказывается вблизи uS19, значительно ниже, по сравнению с долей комплексов, в которых нуклеотид в положении –3- расположен вблизи белков uS11 и eS26.

Результаты сшивок, полученных с IRES(-3), согласуются с данными молекулярного моделирования [216] и крио-ЭМ комплексов IRES ВГС с 80S рибосомой [343], согласно которым нуклеотиды в положениях -3/-5 IRES располагаются на 40S субчастице в участке выхода мРНК вблизи белков uS11 и eS26. С другой стороны, вблизи этих же нуклеотидов находится рибосомный белок uS7, модификацию которого ранее наблюдали в комплексах 80S рибосом человека аналогом мРНК с той же самой сшивающей группой, что и в IRES(-3), на нуклеотиде в положении -3 относительно первого нуклеотида кодона в P-сайте [335]. Кроме того, белок uS7 сшивался с модельной мРНК, несущей остаток s⁴U в положении -3, как в 48S предынициаторном, так и в 80S постынициаторном рибосомных комплексах [283].

Следовательно, можно заключить, что в бинарном комплексе IRES BГC с 40S субчастицей расположение нуклеотида, занимающего позицию –3, отличается от расположения нуклеотида в той же позиции для рибосомных комплексов с канонической мРНК. Это отличие, скорее всего, обусловлено кодон-антикодоновым взаимодействием в P-сайте, которое встречается во всех рибосомных комплексах с каноническими мРНК, но отсутствует в бинарном комплексе IRES BГC с 40S субчастицей.



Рисунок 73. Радиоавтографы гелей после электрофоретического разделения суммарного белка 40S рибосомных субчастиц, сшитых с ³²P-мечеными IRES(-3) и IRES(+4/5), в SDS-ПААГ. Сверху указаны нуклеотиды IRES ВГС, несущие сшивающую группу. Дорожка К – белки, выделенные из облученного комплекса 40S субчастиц с немодифицированным IRES ВГС. Дорожка TP40 – белки, окрашенные Ponseau S; положения 40S рибосомных белков указаны, как в разделе 3.2.1. Левая панель, результаты экспериментов с равномерно мечеными производными IRES ВГС; секции A и B панели соответствуют одному и тому же гелю и отличаются только уровнем экспозиции. Правая панель, результаты экспериментов, выполненных с немеченым IRES(+4/5), и последующим постмечением сшитых белков.

Что касается белка uS19, то только недавно на крио-ЭМ структурах эукариотических рибосом и их комплексов был визуализован его С-концевой фрагмент в области сайта декодирования [347], хотя о контактах этого района белка с мРНК в рибосомных комплексах было известно давно из данных биохимических исследований. В частности, нуклеотиды мРНК в положениях от +4 до +7 с разной природой сшивающих групп (s⁴U [283], перфторфенилазид [12, 13, 345] или окисленная 3'-концевая рибоза [227, 228, 348]) эффективно образовывали

сшивки с uS19 в различных типах 48S и 80S комплексов рибосом со свободным А-сайтом. Тем не менее, роль С-концевого фрагмента белка uS19 в трансляции пока остается неясной. Ранее высказывались предположения, что этот фрагмент участвует в декодировании кодона мРНК в А-сайте рибосомы [31] и вносит вклад в распознавание родственной аминоацил-тРНК [347] на стадии элонгации трансляции. Согласно данным работ [12, 228, 283, 345, 348], кодон в А-сайте контактирует с С-концевым фрагментом белка uS19 только в тех рибосомных комплексах, где А-сайт не занят подходящим лигандом (тРНК или eRF1). Когда такой лиганд оккупирует А-сайт, взаимодействие С-конца uS19 с кодоном мРНК в этом сайте полностью исчезает, вероятно, из-за "переключения" С-конца этого белка с мРНК на лиганд. По-видимому, высокая подвижность С-конца uS19 в рибосомных комплексах позволяет ему участвовать в формировании разного типа контактов, которые кажутся маловероятными по стерическим причинам в том случае, если С-концевой пептид жёстко закреплен на рибосоме.

Примечательно, что белок uS19 был также мишенью сшивки для производного IRES BГС, укороченного до нуклеотида в положении +4 и несущего окисленную 3'-концевую рибозу, в составе 48S предынициаторного комплекса, полученного в бесклеточной системе трансляции на основе лизата ретикулоцитов кролика [227]. То есть даже несмотря на то, что домен IV был не способен формировать 3'-концевую шпильку из-за укорочения ORF, это производное IRES могло образовывать 48S комплекс, в котором нуклеотид, расположенный после старт-кодона AUG, был в состоянии контактировать с белком uS19, по аналогии с каноническими мPHK. Эти данные прямо свидетельствовали, что в 48S предынициаторном комплексе часть ORF IRES BГС, находящаяся после инициаторного кодона, оказывается правильно расположенной в мPHK-связывающем канале.

Результаты, полученные в настоящей работе с производным полноразмерного IRES ВГС, позволили заключить, что при связывании IRES ВГС с 40S субчастицами, предшествующем образованию 48S предынициаторных комплексов, ORF IRES занимает правильное положение в мРНК-связывающем канале только в очень небольшой доле соответствующих бинарных комплексов (Рисунок 74). Этот вывод следует из сравнения результатов настоящей работы с данными более ранних исследований, где показана высокая эффективность образования сшивок между белком uS19 и производными различных типов модельных канонических мРНК и укороченного IRES ВГС со сшивающей группой на нуклеотиде с 3'-стороны от кодона в Р-сайте. В этих работах обсуждаемая сшивка выглядела как сильная радиоактивная полоса при анализе сшитых белков с помощью электрофореза в SDS-ПААГ [12, 227, 283, 345]. Уровень сшивки IRES(+4/5) с белком uS19 был многократно ниже уровней, обычно наблюдавшихся с перфторфенилазидо-содержащими аналогами модельных канонических мРНК (10-40% от количества мРНК в комплексе), и составлял <0.3% от общего количества производного IRES,

связанного с 40S субчастицами. Долю белка uS19, сшитого с IRES(+4/5), оценивали, сравнивая количество радиоактивной метки в полосе сшитого белка с количеством метки, соответствующей общему количеству IRES(+4/5), связанного с 40S субчастицами. Что касается уровня связывания IRES(+4/5) с 40S субчастицами, он был приблизительно таким же (0.7 моль/моль субчастиц), как уровни связывания вышеупомянутых аналогов мРНК с 80S рибосомами, при которых эффективность их сшивания с uS19 была намного выше, чем у IRES(+4/5) [12, 345]. Маловероятно, что низкий выход сшивки IRES(+4/5) с uS19 был обусловлен какой-либо особенностью взаимодействия перфторфенилазидо-группы на нуклеотиде в данных положениях с С-концом uS19, поскольку та же группа, присоединенная к нуклеотидам мРНК в соответствующих положениях, эффективно сшивалась с uS19 в 80S рибосомных комплексах [12, 13].



Рисунок 74. Предполагаемое расположение кодирующей последовательности IRES ВГС в бинарном комплексе IRES с 40S субчастицей рибосомы. Слева, структура комплекса 40S субчастицы с IRES ВГС, выведенная из крио-ЭМ структуры 80S комплекса инициации млекопитающих с IRES ВГС [217] (PDB: 4UJC); справа – увеличенный вид области, соответствующей сегменту, обведённому сплошной линией, на структуре, показанной слева. IRES ВГС показан красным; нуклеотиды в положениях -3 и +4/+5 представлены сферами. Белки, сшивающиеся с производными IRES ВГС, несущими сшивающую группу на нуклеотидах в положениях -3 и +4/+5, окрашены и также представлены сферами. Возможное положение С-концевого фрагмента uS19, который не представлен в структуре, показано зеленой пунктирной линией. Расположение нуклеотидов IRES ВГС после стартового кодона показано таким образом, что они могут взаимодействовать с С-концевым фрагментом uS19, как было обнаружено для крошечной доли бинарных комплексов. Предполагаемое расположение ORF IRES ВГС, когда она не контактирует с uS19, показано красной пунктирной линией. Двойная стрелка подчеркивает гибкость участка IRES ВГС после стартового кодона, из-за которой он не может быть зафиксирован в мРНКсвязывающем канале 40S субчастицы.

Следовательно, бинарный комплекс IRES ВГС с 40S субчастицей представляет собой гетерогенную смесь состояний, отличающихся расположением участка ORF домена IV после стартового кодона. В связи с этим, разумно предположить, что те тоупринты, которые не могут быть отнесены к части ORF IRES ВГС, находящейся в мРНК-связывающем канале 40S субчастицы [340–342], отражают комплексы, в которых часть IRES ВГС после старт-кодона находится вне этого канала. Доля бинарных комплексов, где триплет IRES после старт-кодона правильно связан с каналом связывания мРНК, то есть так же, как и кодон мРНК в А-сайте 80S рибосомных комплексов, является мизерной.

Таким образом, на этапе формирования бинарного комплекса ORF-часть IRES BГС не является строго фиксированной в мРНК-связывающем канале 40S субчастицы. В основной массе таких комплексов эта часть ориентирована иначе, чем в рибосомных комплексах с каноническими мРНК и тРНК в P-сайте или в 48S-подобном предынициаторном комплексе, образованном с участием IRES ВГС (Рисунок 74). Принимая во внимание вышеупомянутые данные о контакте нуклеотида в положении +4 IRES ВГС с рибосомным белком uS19 в 48Sподобном инициаторном комплексе [228], можно заключить, что правильное связывание начального участка ORF IRES ВГС в мРНК-связывающем канале, приводящее к образованию тесных контактов, достигается, когда старт-кодон распознаётся инициаторной тРНК. В этом отношении инициация трансляции IRES ВГС имеет выраженное сходство с механизмами инициации трансляции у эубактерий и канонического пути инициации трансляции у эукариот, когда распознавание старт-кодона в мРНК сильно облегчает укладку её части после этого кодона в мРНК-связывающий канал (см., напр., [227, 349]).

Результаты исследований, изложенные в разделе 3.3, позволили идентифицировать структурные элементы 40S субчастицы, отвечающие за взаимодействие с IRES BГC в составе соответствующего бинарного комплекса: аминокислотные остатки белков, образующие физический контакт с IRES, и нуклеотиды 18S рРНК, вовлечённые в комплементарные взаимодействия с консервативными нуклеотидами субдомена IIId IRES. Более того, удалось выявить структурные перестройки 18S рРНК, обеспечивающие селекцию инициаторной Met-tRNA_i^{Met} 40S субчастицами в составе бинарного комплекса с IRES, и установить роль взаимодействия домена II IRES с рибосомным белком uS7 в этих перестройках. Всё это в итоге дало возможность предложить молекулярный механизм, посредством которого IRES BГС подчиняет трансляционный аппарат клетки для синтеза вирусного полипептида. Выполненные исследования прояснили также вопрос о расположении ORF IRES BГС на 40S субчастице в соответствующем бинарном комплексе. Оказалось, что, несмотря на позиционирование старт-кодона AUG IRES BГС в районе P-сайта, расположение ORF IRES в этом комплексе отличается от расположения кодирующей части канонической мРНК в комплексе с кодон-антикодоновым

взаимодействием в P-сайте. С учетом того, что IRES-элементы, структурно подобные IRES ВГС, встречаются в гРНК ряда других вирусов (например, таких как упомянутые в литературном обзоре CSFV, BVDV, PTV и др.), выводы, сделанные в настоящем разделе, могут быть распространены также и на IRES-элементы этих вирусов.

3.4 Роль рибосомных белков человека в регуляции собственного биосинтеза на уровне сплайсинга кодирующих их пре-мРНК

В клетках высших эукариот практически все белок-кодирующие гены имеют экзонинтронную структуру, и пре-мРНК, образующиеся в результате транскипции этих генов, подвергаются сплайсингу – процессу, обеспечивающему удаление из пре-мРНК незначащих последовательностей – интронов. Очевидно, что такой дополнительный уровень экспрессии генов, отсутствующий в прокариотических клетках, даёт эукариотам дополнительную возможность регуляции экспрессии собственных генов. Эта возможность может, например, реализоваться через нарушение сплайсинга первичного транскрипта отдельного гена, что приведёт к снижению уровня соответствующей зрелой мРНК (напр., [57]). Особо следует выделить один из способов регуляции экспрессии генов на уровне сплайсинга, который основан на принципе обратной связи – когда продукт экспрессии гена, белок, влияет на эффективность сплайсинга собственной пре-мРНК. Такой вариант регуляции экспрессии описан, в частности, для генов многих PHK-связывающих белков млекопитающих, например: PTB [350], SMN [351] и hnRNP L [352].

Информации о способности рибосомных белков млекопитающих осуществлять регуляцию экспрессии собственных генов на уровне сплайсинга на момент начала настоящей работы было накоплено мало. По существу было выполнено единственное исследование, в котором было показано, что рекомбинантный рибосомный белок eS26 человека способен связываться с фрагментом своей пре-мРНК в районе 3'-сайта сплайсинга первого интрона и ингибировать сплайсинг этого фрагмента *in vitro* [353]. В связи с этим представлялось интересным установить, могут ли другие рибосомные белки человека ингибировать сплайсинг кодирующих их пре-мРНК. Для прояснения этого вопроса в настоящей работе изучено взаимодействие белков малой субчастицы рибосомы uS9 и uS15 с PHK-транскриптами, соответствующими фрагментам их пре-мРНК, исследована их способность ингибировать сплайсинг *in vitro*, в том числе для одного из белков – *in vivo*, и установлены участки связывания белков на пре-мРНК. Кроме того, было целесообразно выяснить, имеется ли сходство в строении участков связывания рибосомных белков на рРНК и пре-мРНК. Представляется полезным вначале дать краткое представление о механизме сплайсинга пре-мРНК у млекопитающих и описать основных участников этого процесса (в дополнение к тому, что уже было сказано в разделе 1.2.2.2). Согласно современным представлениям (Рисунок 75) интроны – подлежащие удалению участки пре-мРНК имеют несколько основных консенсусных последовательностей. К ним относятся последовательности 5'- и 3'-сайтов сплайсинга (как правило, GU и AG соответственно) и точка ветвления, представляющая собой остаток аденозина в участке YNYURAY, удалённый от 3'-сайта сплайсинга на несколько десятков нуклеотидов, в пределах которых расположен олигопиримидиновый тракт (Py)_n [354, 355]. За узнавание консенсусных последовательностей, определение границ интрона и катализ реакций трансэтерификации, обеспечивающих удаление интрона и лигирование концов смежных экзонов, отвечает множество участников системы сплайсинга, среди которых в первую очередь следует выделить различные малые ядерные рибонуклеопротеиды (мяPHII) и белки, принимающие участие в формировании сплайсосомы. Кроме того, белки семейств SR и hnRNP, узнающие энхансерные и ингибиторные последовательности в пре-мPHK, также принимают участие в уточнении границ интронов и экзонов.

На первом этапе сплайсинга U1 мяРНП распознает участок интрона при 5'-сайте сплайсинга, а комплекс белков, включающих белок U2AF, – участок при 3'-сайте сплайсинга, что сопровождается формированием так называемого Е-комплекса. Далее, с помощью белка U2AF происходит узнавание точки ветвления в интроне U2 мяРНП и катализируемое образование расщеплением ATP А-комплекса. Связывание этим комплексом с мультикомпонентного комплекса из трёх мяРНП (U4, U5 и U6) катализирует расщепление премРНК в районе 5'-сайта сплайсинга с одновременным образованием связи между 5'-концевым фосфатом на остатке G и 2'-гидроксилом остатка А в точке ветвления (первая реакция трансэтерификации). Дальнейшее расщепление 3'-сайта сплайсинга и лигирование 5'-концевого фосфата экзона 2 с 3'-концевой гидроксильной группой экзона 1 (вторая реакция трансэтерификации) приводят к высвобождению вырезанного из пре-мРНК интрона в виде "лассо" (Рисунок 75). Понятно, что от того, насколько точно определены границы экзонов, зависит последовательность нуклеотидов в мРНК. Следствием ошибочного определения этих границ является альтернативный сплайсинг, приводящий к образованию альтернативных изоформ мРНК, которые, тем не менее, иногда могут оказываться продуктивными (см. раздел 1.2.2.2).



Рисунок 75. Упрощённая схема сплайсинга пре-мРНК у млекопитающих. Отмечены консервативные консенсусные последовательности, управляющие установлением границ интрона. Лигирование экзонов осуществляется в ходе двух реакций трансэтерификации и требует участия 5-ти мяРНП (U1, U2, U4, U5 и U6), которые собираются на пре-мРНК с образованием больших макромолекулярных ансамблей.

3.4.1 Способность рибосомных белков uS15 и uS9 связываться с их кодирующими пре-мРНК и ингибировать их сплайсинг

Для участия РНК-связывающего белка в регуляции собственного биосинтеза требуется, чтобы кодирующая его РНК содержала участок, узнаваемый данным белком, и чтобы этот участок сохранял гомологию у близкородственных видов живых организмов. Чтобы найти такой участок в пре-мРНК рибосомного белка uS15 человека, было выполнено множественное выравнивание последовательностей гомологичных генов, кодирующих uS15 у человека, других млекопитающих (в частности, у собаки (*Canis familiaris*), крысы (*Rattus norvegicus*) и мыши (*M. musculus*)) и курицы (*Gallus gallus*). Сравнительный анализ этих генов показал, что их первые интроны обладают более высокой степенью гомологии, чем остальные интроны (Рисунок 76), что указывало на функциональную важность области гена рибосомного белка uS15 человека, включающей интрон 1.



Рисунок 76. Интрон 1 в генах рибосомного белка uS15 у млекопитающих и птиц является эволюционно консервативным. Сформированное браузером ECR графическое представление геномного выравнивания и сравнительного анализа генов, кодирующих белок uS15 у собаки, мыши, крысы и курицы. Уровень идентичности нуклеотидных последовательностей отражает высота сглаженных пиков; экзоны представлены синим цветом, интроны – розовым. Интрон 1 отмечен скобкой (при транскрипции этого гена считывание информации происходит с "+"-цепи, что на схеме соответствует направлению справа налево).

Для исследования функционального значения интрона 1 пре-мРНК белка uS15 человека клетки НЕК 293 транзиентно трансфицировали плазмидными конструкциями, кодирующими миниген рибосомного белка uS15, сцепленный с геном, кодирующим репортерный флуоресцентный белок ЕСГР (Рисунок 77А). Первая конструкция (pECFP-S13) содержала кодирующую часть кДНК рибосомного белка uS15, вставленную в вектор pECFP-N1 в одной транслируемой рамке с геном белка ECFP под управлением сильного промотора CMV. Вторая конструкция (pECFP-S13-int1) была похожа на pECFP-S13, но дополнительно содержала первый интрон гена рибосомного белка uS15, вставленный в кодирующую часть его кДНК между последовательностями, соответствующими экзонам 1 и 2. Таким образом, в результате экспрессии первой плазмиды в клетках сразу должна была получаться зрелая мPHK,

кодирующая химерный белок uS15-ECFP, а при экспрессии второй плазмиды для образования зрелой мРНК требовался сплайсинг первого интрона. В качестве контроля клетки трансфицировали исходным вектором pECFP-N1. Действительно, в клетках, трансфицированных обеими конструкциями, pECFP-S13 и S13-pECFP-int1, происходила наработка химерного белка uS13-ECFP, что свидетельствовало об образовании зрелой мРНК, кодирующей данный белок, в обоих случаях.

Как и ожидалось, этот химерный белок локализовался в клеточном ядре и ядрышке, что характерно для рибосомных белков, эктопически экспрессируемых в эукариотических клетках [96, 356]. Относительное клеточное содержание мРНК, кодирующей белок uS15 (включая его эндогенную и химерную формы), было определено с помощью ПЦР в реальном времени (Рисунок 77Б). Было найдено, что уровни мРНК рибосомного белка uS15 в клеточных культурах, обработанных плазмидами, кодирующими данный белок, были значительно выше, чем в клеточных культурах, обработанных либо исходным вектором, либо в необработанной культуре, поскольку кДНК этого белка в плазмидах находилась под контролем сильного промотора. Это означало, что в клетках, трансфицированных плазмидами, содержащими миниген рибосомного белка uS15, пул мРНК, кодирующих uS15, состоял в основном из мРНК, экспрессируемых с плазмидных генов.



Рисунок 77. Сверхэкспрессия гена рибосомного белка uS15 в клетках млекопитающих подавляет экспрессию минигена этого белка, содержащего интрон 1. (А) Диаграммы векторов pECFP-S13 и pECFP-S13-int1. (Б) Относительные количества мРНК, кодирующей рибосомный белок uS15 (как эндогенный, так и экзогенный) в клетках НЕК 293: нетрансфицированных (столбец 1), трансфицированных исходной плазмидой pECFP-N1 (столбец 2), плазмидой pECFP-S13 (столбец 3, принят как 100 условных единиц) и плазмидой pECFP-S13-int1 (столбец 4). Величина ошибки приведена по трём биологическим повторам. Для стандартизации количества РНК в образцах использованы данные ПЦР в реальном времени с праймерами, специфичными для кДНК GAPDH. Разброс количества кДНК GAPDH в образцах, отражающий разброс общего количества кДНК, не превышал 25% от среднего значения.

Примечательно, мРНК рибосомного белка uS15 клетках, что уровень R трансфицированных плазмидой pECFP-S13-int1, содержащей первый интрон гена этого белка, был практически в четыре раза меньше, чем в клетках, трансфицированных конструкцией pECFP-S13, не содержащей этого интрона. При этом уровень контрольной мРНК, кодирующей эндогенный белок GAPDH, не зависел от типа плазмиды, используемой для трансфекции клеток. Эти результаты позволили предположить, что при избыточной экспрессии гена, кодирующего рибосомный белок uS15, продукт его экспрессии может снижать эффективность сплайсинга первого интрона пре-мРНК, кодирующей данный белок, приводя к образованию непродуктивной формы мРНК с неудалённым интроном. То есть, между уровнем рибосомного белка uS15 в клетке и скоростью экспрессии его гена может существовать обратная связь, регулирующая уровень экспрессии данного гена на стадии сплайсинга его пре-мРНК, и первый интрон этой пре-мРНК мог бы быть вовлечён в механизм регуляции сплайсинга по принципу обратной связи.

Чтобы проверить, может ли рибосомный белок uS15 человека связываться непосредственно с первым интроном кодирующей его пре-мРНК, и чтобы изучить влияние этого белка на сплайсинг кодирующей его пре-мРНК in vitro, с помощью ПЦР был амплифицирован и вставлен под контроль Т7 промотора участок гена этого белка, содержащий интрон 1, и участки фланкирующих его экзонов. На основе полученной ДНК-конструкции был синтезирован соответствующий РНК-транскрипт (транскрипт S13INT) (Рисунок 78А). Способность рекомбинантного рибосомного белка uS15 человека связываться с этим транскриптом, меченным ³²Р, была изучена с помощью метода фильтрования через нитроцеллюлозные фильтры (Рисунок 78Б) с использованием рекомбинантных рибосомных белков eS10 и uS9 в контрольных опытах. Чтобы снизить уровень неспецифического связывания рибосомного белка с РНК за счет электростатических взаимодействий между положительно заряженными аминокислотными остатками белка и отрицательно заряженными фосфатными группами РНК ионная сила буфера, в котором проводилось связывание, была увеличена (250 mM KCl). Величина Ка для связывания рибосомного белка uS15 с транскриптом S13INT составила $(5.0\pm0.8)\times10^7$ M⁻¹, что оказалось в 4 раза выше, чем соответствующее значение Ка для рибосомного белка uS9, а рибосомный белок S10 проявил слабую способность к связыванию с S13INT. Немеченый транскрипт S13INT, взятый в качестве конкурента, эффективно вытеснял меченый S13INT из комплекса с рибосомным белком uS15, тогда как эффект неспецифических РНК, таких как фрагмент аденовирусной РНК (AdML) или poly(AU), был существенно слабее (Рисунок 78В).

Специфичность связывания рибосомного белка uS15 человека с фрагментом S13INT была также продемонстрирована в ряде других экспериментов. Так, с помощью фильтрования

228



Рисунок 78. Рибосомный белок uS15 человека обладает сродством к фрагменту своей собственной мРНК с неудалённым интроном 1 (S13INT). (A) Схематическое представление гена рибосомного белка uS15 человека с указанием расположения экзонов (пронумерованные серые прямоугольники) и схема синтеза S13INT. (Б) Изотермы связывания ³²Р-меченого РНК-транскрипта фрагмента S13INT с рекомбинантными рибосомными белками uS15 (чёрные точки), uS9 (светлые точки) and eS10 (чёрные треугольники). (В) Вытеснение ³²Р-меченого фрагмента S13INT из его комплекса с белком uS15 немечеными РНК: S13INT (чёрные точки), AdML (светлые точки) и поли(AU) (чёрные треугольники). (Г) Изотермы связывания различных ³²Р-меченых фрагментов пре-мРНК, содержащих интрон 1, с белком uS15: фрагмент S13INT (чёрные точки), фрагмент S13INTm (светлые точки) и фрагменты премРНК рибосомных белков uS9 (чёрные треугольники) и eS26 (светлые треугольники). (Д) Иммунопреципитация рибосомного белка uS15, связанного с мечеными РНК в ядерном экстракте. Смесь

фрагмента S13INT и фрагментов пре-мРНК белков eS17 и eS26, выделенная из ядерного экстракта с помощью иммунопреципитации на смоле с антителами против белка uS15 (дорожка 1) и без антител (дорожка 2) и разделённая электрофорезом в денатурирующем ПААГ. Дорожка 3 – аликвота исходной смеси; дорожка 4 – аликвота РНК, не связавшейся со смолой, содержащей антитела. Столбцы, отражающие долю каждого из РНК-транскриптов в исходной смеси ("до") и смеси, выделенной из ядерного экстракта с помощью антител ("после").

на нитроцеллюлозных фильтрах было показано, что сродство белка uS15 к "неродственным" пре-мРНК, в частности, к интрон-содержащим фрагментам пре-мРНК, кодирующим рибосомные белки uS9 и eS26, было существенно ниже, чем к S13INT (Рисунок 78Г). Кроме того, в качестве контрольной РНК был использован модифицированный фрагмент S13INT, в который были внесены нуклеотидные замены в участки мРНК, примыкающие к 5'- и 3'-сайтам сплайсинга. В частности, последовательности ССС в положении 44-46 и ААG в положении 191-193 были заменены соответственно на AGA и ССС (фрагмент S13INTm). Сродство uS15 к этому фрагменту также оказалось ниже, чем к S13INT. Наконец, способность белка uS15 к связыванию своей собственной пре-мРНК в ядерном экстракте клеток HeLa была проверена методом иммуноселекции с использованием антител против этого белка. Для этого рекомбинантный белок uS15 был инкубирован в ядерном экстракте с добавлением смеси ³²Рмеченых фрагментов пре-мРНК, кодирующих рибосомные белки eS17 и eS26, и транскрипта S13INT, затем белок uS15 и связанные с ним РНК были выделены с помощью иммунопреципитации с использованием специфических антител против этого белка. Связавшиеся с белком РНК были разделены электрофорезом в денатурирующем ПААГ, и количество меченых РНК-транскриптов определено по радиоавтографу этого геля (Рисунок 78Д). Оказалось, что доля S13INT в выделенном таким способом образце РНК была существенно выше, чем доля этого транскрипта в исходной смеси РНК, что указывакт на селективное связывание S13INT белком uS15 в ядерном экстракте.

Полученные данные показали, что рибосомный белок uS15 способен селективно связываться с фрагментом кодирующей его пре-мРНК, содержащим первый интрон. Аналогичные опыты, выполненные с рибосомным белком uS9 человека, также показали его довольно высокое сродство ($Ka = (1.1\pm0.3)\times10^7$ M⁻¹) в отношении PHK-транскрипта, содержащего последовательность первого интрона его пре-мРНК, фланкированную фрагментами соседних экзонов (S9INT) (Рисунок 79А). Как и в случае рибосомного белка uS15, неспецифическая PHK, poly(AU), слабо игибировала связывание этого фрагмента с белком uS9 (Рисунок 79Б), что свидетельствовало в пользу специфичности связывания этого белка с фрагментом своей пре-мРНК.



Рисунок 79. Связывание рекомбинантного рибосомного белка uS9 человека с фрагментом S9INT. (A) Изотермы связывания ³²P-меченого фрагмента S9INT с рекомбинантными рибосомными белками uS9 (чёрные точки) и eS10 (чёрные квадраты). (Б) Вытеснение ³²P-меченого фрагмента S9INT из его комплекса с белком uS9 немечеными PHK: S9INT (чёрные точки) и poly(AU) (светлые точки). v – степень связывания PHK. Ошибка измерений не превышала 15%.

Таким образом, учитывая вышеизложенные данные можно было заключить, что именно специфическое связывание рибосомного белка uS15 с первым интроном своей пре-мРНК приводило к снижению эффективности сплайсинга данного интрона, наблюдаемому в опытах по трансфекции клеток плазмидами, несущими минигены белка uS15 (см. выше). Кроме того, можно было предположить, что специфичное связывание рибосомного белка uS9 с упомянутым фрагментом его пре-мРНК также должно снижать эффективность сплайсинга первого интрона. Данное предположение было проверено в экспериментах по сплайсингу in vitro с использованием рекомбинантных рибосомных белков и ³²Р-меченых фрагментов пре-мРНК. Сплайсинг in vitro был проведен в системе, содержащей ядерный экстракт клеток HeLa, в котором присутствовали все компоненты, необходимые для сплайсинга пре-мРНК. При инкубации в такой системе меченого РНК-субстрата, содержащего фрагмент пре-мРНК, включающий интрон, фланкированный частями экзонов, должно происходить расщепление субстрата с накоплением образующегося продукта сплайсинга – лигированных экзонов и вырезанного интрона, имеющего форму "лассо". За протеканием реакции следили, снимая кинетику расщепления субстрата, по образованиию продуктов сплайсинга, которые разделяли электрофорезом в ПААГ с последующим радиоавтографированием геля. Кроме того, при таком анализе было заметно образование промежуточных продуктов (интермедиатов), соответствующих первой стадии реакции сплайсинга: 5'-концевого экзона и сцепленного с 3'концевым экзоном интрона в форме лассо (см. схему на Рисунке 75).

Для установления эффекта, оказываемого рибосомными белками uS15 и uS9 на сплайсинг собственных пре-PHK, были использованы PHK-транскрипты, соответствующие фрагментам этих пре-мPHK, несущим первый интрон, фланкированный экзонами, которые применяли в опытах по изучению связывания этих рибосомных белков с их пре-мPHK (см. выше). Оба ³²P-меченых транскрипта были активны в экспериментах по сплайсингу *in vitro*, то есть были способны к расщеплению с образованием характерных продуктов и интермедиатов сплайсинга при инкубации в растворе, содержащем ядерный экстракт клеток HeLa (Рисунок 80А, дорожки1-4; Рисунок 81, дорожки 1-4).



Рисунок 80. Рибосомный белок uS15 специфично ингибирует сплайсинг *in vitro* фрагмента S13INT. Радиоавтографы продуктов сплайсинга после разделения электрофорезом в денатурирующем 6%-ном ПААГ. (А) Кинетика сплайсинга PHK-транскриптов S13INT и S9INT (uS9 пре-мPHK) в условиях

сплайсинга in vitro (дорожки 1 – 4 и 10 – 13) и смеси этих транскриптов через 2 ч инкубации в присутствии белка uS15, взятого в концентрации 0.3 мкМ (дорожка 6), 1 мкМ (дорожка 7), 3 мкМ (дорожка 8) и 8 мкМ (дорожка 9), или в его отсутствие (дорожка 5). Положение фрагментов РНК в геле и их длина отмечены слева (для S13INT) и справа (для S9INT). Стрелками (дорожка 9) отмечены: вверху - полоса мРНК-продукта, образующегося при сплайсинге фрагмента пре-мРНК белка uS9, внизу отсутствие полосы мРНК-продукта, образующегося при сплайсинге фрагмента S13INT. (Б) Эффект рибосомных белков uS15 (rpS13), eS10 (rpS10) и uS9 (rpS16) на сплайсинг фрагмента S13INT. Продукты сплайсинга S13INT после инкубации в течение 2 ч в условиях сплайсинга in vitro в присутствии белков uS15 (дорожки 2 – 4), eS10 (дорожки 5 – 7) и uS9 (дорожки 8 – 10), взятых в концентрации 1 мкМ (дорожки 2, 5, 8), 5 мкМ (дорожки 3, 6, 9) и 8 мкМ (дорожки 4, 7, 10), либо в отсутствие белков (дорожка 1). Положения различных фрагментов РНК указаны справа. (В) Сранение эффектов белка uS15 на сплайсинг фрагментов S13INT и S13INTm. Дорожки 1 – 3 и 10 – 12 – кинетика реакции сплайсинга указанных фрагментов. Дорожки 4 – 6 и 7 – 9 – образование продуктов сплайсинга фрагментов S13INT и \$13INTm соответственно после 2 ч инкубации в условиях реакции в присутствии белка u\$15, взятого в концентрации 1 мкМ (дорожки 4 и 7), 3 мкМ (дорожки 5 и 8) и 6 мкМ (дорожки 6 и 9). Стрелками указаны мРНК-продукты соотвествующих фрагментов, образовавшиеся в присутствии белка uS15. Столбцы на диаграмме представляют отношение интенсивностей полос мРНК-продукта и исходной премРНК в соответствующих дорожках геля вверху в условных единицах. Светлые столбцы соответствуют фрагменту S13INT, серые – S13INTm.

Добавление рекомбинантных рибосомных белков uS15 или uS9 человека в реакционные смеси для сплайсинга *in vitro* соответствующих фрагментов пре-мРНК, вызывало понижение эффективности их сплайсинга. Так, добавление в реакционную смесь белка uS15 в концентрации 1 или 3 мкМ приводило к значительному уменьшению скорости образования продуктов сплайсинга фрагмента пре-мРНК этого белка, а при концентрации белка 8 мкМ происходило полное блокирование сплайсинга этого фрагмента (Рисунок 80А). Примечательно, что "чужеродные" рекомбинантные рибосомные белки человека, eS10 и uS9, добавленные в реакционную смесь в тех же концентрациях, что и белок uS15, не влияли на сплайсинг фрагмента его пре-мРНК (Рисунок 80Б), что указывает на специфичность ингибирования сплайсинга этого фрагмента в присутствии белка uS15. Кроме того, эффективность ингибирования сплайсинга транскрипта S13INTm (содержащего тринуклеотидные замены в районах 5' и 3' сайтов сплайсинга) белком uS15 была существенно ниже, чем транскрипта S13INT (Рисунок 80В), хотя эффективность сплайсинга этого PHK-транскрипта (S13INTm) практически не отличалась от таковой для S13INT.

Аналогичную картину наблюдали также для рибосомного белка uS9 и фрагмента его пре-мРНК, содержащего первый интрон. В частности, эффект снижения эффективности

сплайсинга фрагмента пре-мРНК белка uS9 усиливался при повышении концентрации этого белка от 0.3 до 3.0 мкМ, а в концентрации 8 мкМ белок uS9 полностью ингибировал её сплайсинг (Рисунок 81). При этом рибосомные белки uS15 и eS10 в концентрации 0.3 – 3 мкМ не влияли на эффективность сплайсинга пре-мРНК белка uS9, а при увеличении их концентрации до 8 мкМ происходило лишь слабое ингибирование её сплайсинга.



Рисунок 81. Анализ с помощью гель-электрофореза в денатурирующих условиях продуктов сплайсинга ³²P-меченого фрагмента S9INT, образующихся в присутствии 0.3, 1.0, 3.0 и 8.0 мкМ рибосомных белков uS9 (дорожки 5–8), uS15 (дорожки 9–12) или eS10 (дорожки 13–16) и в отсутствие рибосомного белка (дорожки 1–4). Инкубацию проводили в ядерном экстракте клеток HeLa в течение 0, 1 и 2 ч (дорожки 1– 3 соответственно) и 2.5 ч (дорожки 4–16). Справа указаны положения и размеры исходного фрагмента S9INT (I) и продуктов его сплайсинга (II – интермедиат, содержащий интрон и второй экзон, III – лигированные экзоны (мPHK-продукт), IV – продукт, соответствующий вырезанному интрону, и V – интермедиат, соответствующий первому экзону).

Таким образом, данные исследований, приведённые в настоящем разделе, показали, что рибосомные белки uS15 и uS9 человека способны специфично связываться с кодирующими их пре-мРНК в районе первого интрона и ингибировать их сплайсинг в ядерном экстракте клеток. Иными словами, между уровнем каждого из этих рибосомных белков и эффективностью вырезания первого интрона из соответствующих этим белкам пре-мРНК существует отрицательная обратная связь. Можно было полагать, что связывание рибосомного белка со

своей собственной пре-мРНК каким-то образом нарушает узнавание компонентами аппарата сплайсинга консенсусных последовательностей сплайсинга в пре-мРНК, а именно: 5'- и 3'- сайтов сплайсинга, олигопиримидинового тракта или точки ветвления. Поэтому, чтобы прояснить механизм ингибирования сплайсинга пре-мРНК соответствующими им рибосомными белками, было необходимо установить участки связывания этих белков на пре-мРНК.

3.4.2 Определение участков связывания рибосомных белков uS15, uS9 и eS26 на фрагментах соответствующих им пре-мРНК, и механизм контроля экспрессии генов этих белков на уровне сплайсинга

связывания рибосомных белков uS15 uS9 Для определения участка И на соответствующих им пре-мРНК был использован метод футпринтинга, принцип которого был описан выше (см. раздел 3.2.3). В качестве нуклеотид-специфичных зондов в обоих случаях были использованы РНКазы Т1, Т2 и V1. Расщепление РНК-транскрипта S13INT РНКазными зондами было проведено в изолированном состоянии и в составе его бинарного комплекса с рекомбинантным рибосомным белком uS15 человека в условиях, когда более 90% PHK находилось в комплексе с белком. Положения разрывов в РНК определяли с помощью обратной транскрипции и далее анализировали изменения в доступности нуклеотидов РНКазам, вызванные связыванием фрагмента S13INT с данным белком.

Оказалось, что в результате связывания с белком uS15 в транскрипте S13INT оказываются защищёными от гидролиза семь фосфодиэфирных связей, расположенных с 5'стороны от нуклеотидных остатков С46, G53, C76, A192, G193, C162 и A164 (Рисунок 82). Видно, что первые два из этих остатков расположены вблизи 5'-сайта сплайсинга первого интрона, а два последних – вблизи З'-сайта сплайсинга, тогда как остатки С162 и А164 находятся рядом с предполагаемой точкой ветвления первого интрона. Как уже отмечалось, в условиях in vitro эффективность сплайсинга фрагмента S13INTm, несущего замены по 44-46 и 191–193, практически не отличалась от таковой для S13INT, однако ингибирование сплайсинга S13INTm в присутствии рибосомного белка uS15 было существенно менее выраженным, чем для S13INT (Рисунок 80B). Следовательно, полученные результаты однозначно свидетельствовали о том, что ингибирование сплайсинга фрагмента пре-мРНК рибосомного белка uS15, наблюдаемое при избыточном уровне этого белка, обусловлено его связыванием с участками пре-мРНК, расположенными вблизи консенсусных последовательностей сплайсинга в её первом интроне.



Рисунок 82. Ферментативный футпринтинг фрагмента S13INT в комплексе с рибосомным белком uS15. (А) Усреднённая вторичная структура S13INT, рассчитанная программой Sfold 2.0. Положения, защищаемые от атаки PHКазами, указаны стрелками, отмеченными соответствующими нуклеотидами. Прямоугольниками со стрелками отмечены 5'- и 3'-сайты сплайсинга. (Б) Анализ положений нуклеотидов, по которым происходит расщепление PHКазами T1, T2 и V1 фрагмента S13INT, изолированного (-) или в комплексе с белком uS15 (+), с помощью обратной транскрипции. Дорожки А, С, G и T - сиквенсные дорожки. Положения нуклеотидов, защищаемых от атаки PHКазами, отмечены стрелками. Для обратной транскрипции были использованы праймеры комплементарные нуклеотидам в положениях 103–116 (панель 1) и 235–250 (панели 2 and 3) фрагмента S13INT.

Похожим способым с использованием в качестве зондов РНКаз Т1, Т2 и V1 был определён участок связывания рибосомного белка uS9 на фрагменте S9INT2 (укороченном варианте S9INT), включающем первый интрон и фланкирующие его участки экзонов (но в отличие от S9INT, не содержащем большей З'-части второго экзона). Положения футпринтов определяли с помощью разделения продуктов частичного гидролиза транскрипта, меченного ³²Р по 5'- или по 3'- концу, в денатурирующем 12%-ном ПААГ. Введение метки по разным концам потребовалось для того, чтобы проанализировать всю последовательность 242-звенного

236

транскрипта, поскольку разрешающая способность электрофореза в денатурироющем ПААГ не превышает, как правило, 150 звеньев РНК.

Следует также отметить, что с 3'-меченым транскриптом, в отличие от 5'-меченого, при расщеплении РНКазами наблюдали образование двойных полос для каждого продукта гидролиза (Рисунок 83). Скорее всего, это было связано с тем, что используемый препарат РНК был неоднороден по 3'-концу и содержал часть транскриптов с дополнительным 3'-концевым нуклеотидом, который способна добавлять Т7 РНК-полимераза при синтезе РНК независимо от ДНК-матрицы [357]. Поэтому при анализе результатов футпринтинга принимали во внимание интенсивность только тех полос, которые соответствовали продуктам гидролиза РНК, не содержащей на 3'-конце дополнительного нуклеотида. Кроме того, из рассмотрения были исключены полосы, соответствующие продуктам неспецифического гидролиза РНК (Рисунок 83А, дорожка К). Результаты анализа продуктов гидролиза З'-меченой РНК показали, что белок uS9 наиболее эффективно защищает фосфодиэфирные связи после нуклеотидов G160, G194 и G203 от действия РНКазы T1, а после A159 и U161 - от РНКазы T2. При использовании РНКазы V1 белок-зависимых изменений в эффективности расщепления фосфодиэфирных связей не наблюдали. Анализ продуктов гидролиза 5'-меченой РНК не выявил каких-либо заметных отличий в эффективности расщепления фосфодиэфирных связей в 5'-концевом районе у свободной РНК и РНК, связанной с uS9. Результаты ферментатиного зондирования фрагмента пре-мРНК рибосомного белка uS9 при этом достаточно хорошо соответствовали вторичной структуре этого фрагмента, рассчитанной с помощью программы Sfold (Рисунок 83Б), указывая на его правильный фолдинг.

Анализ нуклеотидной последовательности первого интрона пре-мРНК белка uS9 выявил два участка, G135–C141 и A159–C165 (Рисунок 83Б), которые в наибольшей степени соответствуют консенсусной последовательности YNYURAY вблизи точки ветвления интрона, где расположен остаток аденозина, образующий ковалентную связь с 5'-концом интрона в процессе сплайсинга [358]. По данным ферментативного футпринтинга рибосомный белок uS9 защищал от гидролиза PHКазами T1 и T2 три фосфодиэфирные связи (между нуклеотидами A159–G160, G160–C161 и C161–U162), расположенные в одном из этих участков, и две фосфодиэфирные связи (между нуклеотидами A193–G194 и A202–G2030) вблизи 3'–сайта сплайсинга. Во вторичной структуре участки G135–C141 и A159–C165 расположены рядом, поэтому можно заключить, что основной участок связывания белка uS9 на кодирующей его пре-мРНК находится в районе точки ветвления первого интрона. Таким образом, ингибирование сплайсинга фрагмента пре-мРНК рибосомного белка uS9, включаещего первый интрон, наблюдаемое при избыточном уровне этого белка, обусловлено его связыванием с участком вблизи точки ветвления в этом интроне, что, очевидно, препятствует её узнаванию аппаратом сплайсинга.



Рисунок 83. Ферментативный футпринтинг фрагмента S9INT2 в комплексе с рибосомным белком uS9. (А) Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения продуктов расщепления 3'-³²Pмеченого фрагмента S9INT2, свободного (-) и в комплексе с белком uS9 (+). Дорожки T1, T2 и V1 – гидролиз PHКазами T1, T2 и V1 соответственно; дорожки 1 и 2 – расщепление в условиях, отличающихся на порядок концентрацией PHКаз; G и OH –сиквенсные дорожки, полученные в реакциях с помощью PHказы T1 и ограниченного щелочного гидролиза соответственно; К – фрагмент S9INT после инкубации в условиях связывания. Слева от радиоавтографа приведены номера нуклеотидов в последовательности S9INT; справа – номера нуклеотидных остатков S9INT, доступность которых PHКазам изменялась в присутствии белка uS9. (Б) Схематическое изображение рассчитанной вторичной структуры фрагмента S9INT. Стрелками указаны межнуклеотидные фосфодиэфирные связи, защищаемые белком uS9 от гидролиза PHКазами. Серым цветом выделены последовательности, содержащие теоретически-возможные точки ветвления в первом интроне пре-мPHK белка uS9.

Как уже упоминалось, в работе [353] было показано, что рибосомный белок eS26 человека способен связываться с фрагментом своей пре-мРНК в районе 3'-сайта сплайсинга

первого интрона. В этой работе для определения участка связывания белка был применен метод, основанный на определении положений остановок обратной транскрипции при синтезе кДНК по РНК-матрице, связанной с белком. Считалось, что в месте связывания белка обратная транскриптаза, наталкиваясь на белок, делает паузу в синтезе кДНК. Однако из-за значительных физических размеров как самого белка, так и обратной транскриптазы, данный метод нельзя признать достаточно точным при определении участков связывания белков на РНК. Чтобы получить более точную информацию о нуклеотидах РНК, формирующих участок связывания eS26, была выполнено зондирование структуры фрагмента пре-мРНК белка S26 человека (S26INT) в комплексе с этим белком с помощью гидроксил-радикалов с последующим сравнением полученных результатов с аналогичными данными для изолированного фрагмента. Положения разрывов в S26INT, как и ранее, определяли с помощью обратной транскрипции с использованием комплементарных этой РНК ³²Р-меченых праймеров (см. 3.2.3) (Рисунок 84).

Поскольку степень связывания белка eS26 с S26INT в условиях гидроксил-радикального футпринтинга составляла 0.6 молей белка на моль РНК, то наблюдаемое понижение интенсивности сигнала на нуклеотидах, участвующих в связывании белка, не должно было превышать 60% от интенсивности соответствующих сигналов, наблюдаемых с изолированной РНК. Видно, что в изолированном фрагменте S26INT большинство нуклеотидов доступно действию гидроксил-радикалов, что свидетельствует о низкой степени жёсткости его пространственной структуры (Рисунок 84 А и Б, дорожки 2). В присутствии белка eS26 доступность гидроксил-радикалам у части нуклеотидов этой РНК была заметно (на 30-50%) снижена (Рисунок 84 А и Б, дорожки 3). Оказалось, что наибольшее число таких нуклеотидов (G279, C283, G285-A288, A290 и G291) сконцентрировано в районе, который непосредственно перекрывается с 3'-сайтом сплайсинга первого интрона. Второй район включает нуклеотиды (U306, G307, C309 и G310), расположенные во втором экзоне на некотором удалении от 3'сайта сплайсинга. Наконец, нуклеотиды третьего района (G30 и U36-U39) расположены вблизи 5'-сайта сплайсинга. Те нуклеотиды, которые оказались защищёнными от модификации в присутствии eS26, могли быть непосредственно вовлечены в связывание с этим белком или находиться вблизи участка связывания. Следовательно, можно заключить, что участок связывания eS26 на фрагменте S26INT формируют, в основном, нуклеотиды, расположенные в районе З'-сайта сплайсинга первого интрона.

Чтобы выявить структурные особенности районов пре-мРНК белка eS26, в которых расположены нуклеотиды, защищаемые этим белком от атаки гидроксил-радикалами, мы рассчитали возможную вторичную структуру фрагмента S26INT с использованием набора программ, основанных на разных алгоритмах расчета структуры РНК [359, 360]. Визуальный анализ наборов структур, полученных с помощью этих программ, показал, что все структуры, в

общем, сходны между собой, и величины их ∆G находятся в пределах –125…–132 ккал/моль. На этих структурах район 3'-сайта сплайсинга, включающий нуклеотиды PHK, защищаемые от атаки гидроксил-радикалами, оказывается в области сочленения двух двухцепочечных участков и протяженной пурин-богатой петли между ними, а район 5'-сайта сплайсинга значительно удален от этой области. В качестве примера на Рисунке 85 представлена вторичная структура фрагмента S26INT, рассчитанная с помощью программы RNA123, и показано расположение на ней нуклеотидов, защищаемых от атаки гидроксил-радикалами белком eS26.



Рисунок 84. Гидроксил-радикальный футпринтинг фрагмента S26INT в комплексе с белком eS26. Панели А и Б - радиоавтографы гелей после электрофоретического разделения продуктов обратной транскрипции фрагментов PHK, образующихся в результате расщепления гидроксил-радикалами фрагмента S26INT, изолированного (дорожка 2) и в комплексе с eS26 (дорожка 3); дорожка 1 – продукты обратной транскрипции S26INT, необработанной гидроксил-радикалами. Дорожки А, С, G и U –продукты секвенирования PHK1-345 с использованием соответствующих ddNTP. Точками справа от панелей отмечены те остановки обратной транскрипции, которые соответствуют нуклеотидам в положении 3' по отношению к нуклеотидам, защищаемым от модификации (указанным рядом).

Для сравнения структур участов связывания белка eS26 на фрагменте S26INT и на 18S рРНК в составе 40S субчастицы был проведён анализ крио-ЭМ структуры рибосомы человека [14] и были выявлены нуклеотиды 18S рРНК, контактирующие с eS26. Оказалось, что наиболее обширные области контактов eS26 с 18S рРНК находятся в одноцепочечной З'-концевой последовательности 18S рРНК и пурин-богатой петле в центральном домене 18S рРНК в участке сочленения спиралей h22 и h23. В этих участках белок eS26 контактирует как с основаниями нуклеотидов, так и рибозофосфатным остовом 18S pPHK. Кроме того, eS26 касается сахарофосфатного остова 18S РНК в районах спиралей h26 и h28. Сопоставляя структуры участков связывания белка eS26 на фрагменте S26INT и на 18S pPHK, можно выделить одинаковый структурный элемент, присутствующий в обеих РНК в области их контакта с белком, а именно: протяжённую пурин-богатую петлю в районе сочленения двух спиралей (Рисунок 85). В S26INT такая 22-звенная петля располагается в районе нуклеотидов 285-306, а в 18S рРНК 18-звенная петля в районе 986-1003 находится между спиралями h22 и h23. Пары G:C, присутствующие в обеих петлях (одна в S26INT и две в 18S pPHK), не должны существенно влиять на структуру соответствующих участков РНК, потому что одиночные комплементарные пары, расположенные внутри протяжённых одноцепочечных участков РНК, как правило, не стабильны. Можно видеть, что нуклеотиды фрагмента S26INT, защищаемые eS26 от действия гидроксил-радикалов, и нуклеотиды 18S рРНК, контактирующие с eS26 в рибосоме, расположены, преимущественно, в 5'-концевых участках соответствующих петель (Рисунок 85). Следовательно, структурный элемент РНК, содержащий пурин-богатую петлю в районе сочленения двух спиралей, мог бы быть тем характерным мотивом, который узнаёт eS26 при связывании с кодирующей его пре-мРНК при регуляции её сплайсинга и с 18S рРНК в процессе сборки малой субчастицы рибосомы. Район S26INT вблизи 5'-сайта сплайсинга, который включает небольшое число нуклеотидов, защищаемых от атаки гидроксил-радикалами в присутствии eS26, во вторичной структуре РНК расположен на значительном удалении от района З'-сайта сплайсинга. Однако в третичной структуре РНК эти районы могут оказаться сближенными, и в этом случае нуклеотиды вблизи 5'-сайта сплайсинга могли бы принимать участие в связывании eS26.

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что белок eS26 человека узнаёт свои участки связывания на разных видах PHK по принципу структурной мимикрии, подобно тому, как ранее это было показано для белков uS11 и eL30 *S. cereviasiae* [361-366]. Так, белок uS11 распознаёт в своей пре-мPHK протяжённый участок, образующий в её рассчитанной вторичной структуре несовершенную шпильку, похожую на шпильку h23 18S pPHK, где расположен участок связывания этого белка, а белок eL30 – участок, формирующий так называемый K-turn-мотив, который, как оказалось, присутствует также во вторичной структуре



Рисунок 85. Схематическое представление рассчитанной вторичной структуры S26INT и вторичной структуры 18S рРНК человека [293]. На структуре S26INT выделены районы 3'- (слева) и 5'- (справа) сайтов сплайсинга первого интрона, содержащие нуклеотиды (отмечены серыми квадратами), чья доступность гидроксил-радикалам уменьшалась при связывании S26INT с eS26. На структуре 18S рРНК выделен район, с которым связывается eS26 в 40S субчастице, где отмечены (серыми квадратами) нуклеотиды, контактирующие с этим белком.

участка связывания eL30 на 18S pPHK. Оба этих белка связываются со своими пре-мPHK вблизи конкретного консенсусного района сплайсинга в участке, способном формировать структуру, напоминающую таковую в его участке связывания на pPHK. Однако консенсусные районы сплайсинга, вблизи которых расположены такие участки, отличаются у белка eS26 человека и рибосомных белков дрожжей. В частности, uS11 и eL30 связываются с кодирующими их пре-мPHK в районе 5'-сайта сплайсинга [361, 363, 365, 366], а eS26 узнаёт

участок пре-мРНК вблизи З'-сайта сплайсинга, что может указывать на разные механизмы ингибирования сплайсинга своих пре-мРНК у рибосомных белков дрожжей и млекопитающих.

В целом, результаты по определению участков связывания рибосомных белков uS15, uS9 и eS26 на фрагментах, соответствующих им пре-мРНК выявили интересную закономерность: оказалось, что эти участки находятся вблизи функциональных консенсусных последовательностей сплайсинга в первых интронах этих пре-мРНК. Учитывая, что связывание указанных белков с фрагментами соответствующих им пре-мРНК приводит к ингибированию сплайсинга этих фрагментов в ядерном экстракте клеток, можно утверждать, что это связывание нарушает взаимодействие компонентов аппарата сплайсинга с вышеуказанными консенсусными последовательностями.



Рисунок 86. Механизм авторегуляции экспрессии генов рибосомных белков на уровне сплайсинга. Рибосомные белки (гр) контролируют экспрессию своих генов по принципу обратной связи: будучи в концентрации избыточной для сборки рибосомных субчастиц, рибосомные белки связываются с консенсусными последовательностями сплайсинга в первом интроне кодирующих их пре-мРНК. Это связывание нарушает взаимодействие факторов сплайсинга с данными последовательностями, что приводит в итоге к ингибированию формирования зрелых мРНК.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют в пользу существования в клетках высших эукариот специального механизма регуляции экспрессии генов рибосомных белков на уровне сплайсинга, реализующегося по принципу обратной связи. Согласно этому механизму (Рисунок 86), при избыточном количестве рибосомный белок способен связываться с кодирующей его пре-мРНК в районе консенсусных последовательностей сплайсинга первого интрона, ингибируя образование зрелой мРНК и, тем самым, приостанавливая собственный биосинтез. Можно заметить, что консенсусные последовательности интронов, вблизи которых происходит связывание белков uS15, uS9 и eS26 со своими пре-мРНК, различаются (для белка

uS15 – 5'- и 3'-сайты сплайсинга и точка ветвления, для uS9 – точка ветвления, а для eS26 – 3'сайт сплайсинга). Следовательно, детали предложенного выше механизма тоже могут различаться.

Заключение

Настоящая работа представляет собой, по сути, первое систематическое исследование свойств индивидуальных рибосомных структурно-функциональных белков человека. Применение в данном исследовании набора современных подходов к изучению белков и РНКбелковых комплексов, включающих молекулярно-биологические, химические и физические методы исследований, дало возможность не только выявить характерные свойства рибосомных белков человека, но и определить ранее не известные черты их взаимодействий с различными видами РНК. Полученные данные позволили существенно расширить имевшиеся на момент начала данной работы знания о функциональном предназначении рибосомных белков и установить особенности некоторых клеточных процессов, таких как сборка рибосомных субчастиц, инициация трансляции гРНК ВГС и регуляция экспрессии генов рибосомных белков, в которых эти белки играют определяющую роль. Достижения этой многолетней работы, которые внесли значительный вклад в развитие современных представлений о свойствах рибосомных белков высших эукариот и их функционировании в вышеупомянутых процессах, рассмотрены ниже.

Следует особо отметить, что выполнение данной работы было бы невозможно без получения в необходимых количествах функционально активных рекомбинантных рибосомных белков человека, поскольку на момент начала настоящего исследования не существовало универсального подхода для приготовления таких белков. Поэтому именно решение задачи по созданию соответствующей платформы на начальном этапе работы обеспечило успех последующих исследований. С использованием разработанной платформы был получен большой набор рекомбинантных рибосомных белков человека, включающий белки uS2, uS3, uS7, uS9, eS10, uS13, uS15, eS19, eS26, eS28 и uL2 а также мутантные формы некоторых из этих белков. Отдельные методические находки, использованные для преодоления трудностей, возникших при получении этих белков в очищенном виде и обусловленных особенностями их структуры, могут быть применены для получения и очистки других PHK-связывающих белков млекопитающих.

Хотя структура эубактериальной рибосомы с атомарным уровнем разрешения на момент начала настоящей работы была установлена с помощью РСА (напр., [36, 37]), вопрос о структуре рибосом эукариот вообще и млекопитающих в частности всё ещё был далёк от решения. Выявленные в ходе исследования существенные отличия в порядках диссоциации белков под действием моновалентных катионов из малых субчастиц рибосом человека и эубактерий и соответственно в наборах сердцевинных белков этих субчастиц дали основания предполагать наличие у рибосомных белков млекопитающих характерных особенностей, влияющих на их связывание с рРНК.

Дальнейшие исследования показали, что универсальные рибосомные белки uS7, uS9 и uS13 человека способны к самостоятельному связыванию с 3'-концевым доменом 18S рРНК, содержащим их участки связывания, в отличие от их эубактериальных гомологов, связывание которых с 16S рРНК требует её предварительного комплексообразования с другими рибосомными белками. При этом участки связывания белков uS7, uS13 и uS9 с 3'-доменом 18S рРНК и белка uS15 с её центральным доменом, в целом, эволюционно консервативны и соответствуют участкам связывания гомологичных рибосомных белков на 16S рРНК. Оказалось, что связывание белков uS7 и uS9 с 18S pPHK происходит кооперативно, а белок uS13 при связывании с 18S рРНК действует как молекулярная скрепка, фиксируя структуру рРНК в районе участка связывания белка в конформации, похожей на конформацию этого района в 40S субчастице. Примечательно, что районы белков uS7, uS15 и uS9, не имеющие гомологии в рибосомных белках эубактерий, не вовлечены в связывание с 18S рРНК, тогда как район белка uS13, отсутствующий у его эубактериального гомолога, формирует контакты со шпилькой h41 18S pPHK. Критическая роль эукариот-специфичного района рибосомного белка в связывании с pPHK была установлена для белка uS2. Было найдено, что уровень данного белка в 40S субчастицах варьирует, что позволяло использовать 40S субчастицы с низким содержанием природной формы белка uS2 и рекомбинантный аналог uS2, который был способен насыщать их до эквимолярного содержания белка, для изучения особенностей связывания этого белка с 40S субчастицей. Оказалось, что связывание белка uS2 с 40S субчастицами происходит через взаимодействие района 236-262 в специфичном для позвоночных С-концевом фрагменте (СТD) этого белка со спиралью h40 18S pPHK. Консервативная глобулярная часть белка uS2 при этом связывается с рибосомными белками, как можно теперь судить из крио-ЭМ моделей рибосом человека [14, 301]. В целом, полученные результаты показали, что, несмотря на значительные видимые сходства в связывании гомологичных рибосомных белков эубактерий и человека с соответствующими участками рРНК малой субчастицы, эукариот-специфичные фрагменты рибосомных белков вносят значительные коррективы в это связывание. К настоящему времени участие эукариот/архей специфичных фрагментов рибосомных белков человека в связывании с рРНК и формировании структуры рибосомных субчастиц доказано с помощью крио-ЭМ [14, 279]. Тем не менее, положение CTD белка uS2 на 40S субчастице до сих пор не удалось установить с использованием этого метода.

Проблема полной сборки *in vitro* рибосомных субчастиц млекопитающих, как и эукариот вообще, на сегодняшний день не решена. В настоящей работе была предпринята попытка

сборки отдельного морфологического фрагмента 40S субчастицы рибосомы человека – головы. Вначале было установлено, что голова 40S субчастицы, включающая большой 3'-концевой домен 18S pPHK, может быть отщеплена от остальной её части с помощью гидролиза 18S pPHK РНКазой Н по участкам, соединяющим этот домен с двумя другими доменами. Это указывало на принципиальную возможность сборки соответствующего рибонуклеопротеида из отдельных компонентов головы. Определение белкового состава головы выявило в ней эукариот/архейспецифичный белок eS28, расположение которого в 40S субчастице на тот момент было неизвестно. С использованием РНК-транскрипта, моделирующего большой З'-концевой домен 18S pPHK, и суммарного белка 40S субчастицы был реконструирован рибонуклеопротеид, в котором присутствовал практически весь набор рибосомных белков, характерных для головы 40S субчастицы. Однако, несмотря на то, что по своему белковому составу собранный рибонуклеопротеид хорошо коррелировал с головой 40S субчастицы, некоторые участки 18S 40S рРНК, экспонированные в субчастице, оказались защищёнными в этом рибонуклеопротеиде, что указывало на его неполное соответствие голове 40S субчастицы. Повидимому, из-за высокой степени агрегации РНК-белковых комплексов, обусловленной, скорее всего, неструктурированными эукариот/архей-специфичными участками белков, проблема сборки полных субчастиц рибосом эукариот in vitro в принципе не может быть решена вариацией температуры, ионной силы среды и концентрации денатуранта, как в случае эубактерий. В частности, в одной из недавних работ, выполненной на рибосомном белке uS3 дрожжей, показано, что для правильного связывания этого белка на пре-40S субчастице необходимо участие вспомогательных белков – фактора сборки и протеинкиназы, гомологичной казеин киназе 18/є у млекопитающих. Фактор сборки препятствует преждевременной ассоциации N-домена белка uS3 с пре-40S субчастицей до её связывания с Сдоменом этого белка. а протеинкиназа обеспечивает последующее корректное позиционирование N-домена белка uS3 на 18S пре-рРНК путём фосфорилирования фактора сборки и его последующей диссоциации [331]. Кроме того, в более ранней работе [367] показано, что для формирования зрелой 40S субчастицы рибосомы дрожжей требуется также фосфорилирование самого белка uS3 вышеупомянутой протеинкиназой. Очевидно, в связывании с пре-рРНК других рибосомных белков могут также участвовать подобные вспомогательные белки, что делает проблему реконструкции in vitro активных субчастиц рибосом эукариот трудной или даже вообще неразрешимой задачей.

Посттрансляционная модификация – гидроксилирование у рибосомных белков uL2, uL15 и uS12 человека была открыта сравнительно недавно [182], однако её роль оставалась неизвестной. Примечательно, что в условиях гипоксии гидроксилирования этих белков не происходит, но, тем не менее, они встраиваются в рибосомы, указывая на то, что данная модификация не влияет на сборку рибосомных субчастиц. В настоящей работе удалось показать, что связывание гидроксилированного рибосомного белка uL2 с фрагментом 28S pPHK, содержащим спираль H93, контактирующую с этим белком вблизи рибосомного каталитического центра в 60S субчастице, вызывает сильные изменения структуры PHK в районах, прилегающих к универсально консервативным нуклеотидам, формирующим этот центр. Таким образом, можно заключить, что гидроксильная группа на остатке His216 в рибосомном белке uL2 млекопитающих способствует стабилизации конформации белка, благоприятной для его связывания со спиралью H93 28S pPHK при сборке 60S субчастицы рибосомы. По-видимому, это связывание вызывает такие структурные перестройки, которые необходимы для поддержания правильной архитектуры каталитического центра в зрелой рибосоме.

К началу настоящей работы в нескольких лабораториях уже велись исследования механизма IRES-зависимой инициации трансляции гРНК ВГС. В частности, было получено некоторое представление о структуре бинарного комплекса IRES ВГС с 40S субчастицей рибосомы (напр., [11]) и были определены отдельные белки, контактирующие с IRES в этом комплексе (напр., [6]). Однако конкретная роль структурных элементов 40S субчастицы в образовании бинарного комплекса оставалась неясной, без чего было невозможно прийти к пониманию молекулярного механизма процесса, посредством которого РНК ВГС подчиняет белоксинтезирующий аппарат человека для синтеза собственного полипротеина. Результаты настоящей работы позволили пролить свет на структурные основы IRES-зависимой инициации трансляции. Так, с помощью флуоресцентного мечения экспонированных на поверхности рибосомы остатков лизина было показано, что в белках eS1, eS10 и eS27, не имеющих эубактериальных гомологов, эти остатки прямо вовлечены в связывание 40S субчастицы с IRES ВГС. Обнаружено, что практически все экспонированные остатки лизина белка eS27 участвуют в связывании района IRES, образованного сочленением субдоменов IIIa, IIIb и IIIc с центральным стеблем домена III. Часть остатков лизина в белке eS10 оказывается вовлечённой в связывание района, соответствующего начальному участку открытой рамки считывания гРНК ВГС, а часть остатков лизина белка eS1 принимает участие в связывании доменов II и III IRES ВГС. Таким образом, рибосомным белкам eS1 и eS27 принадлежит определяющая роль в связывании IRES BГС с 40S субчастицей рибосомы на начальной стадии инициации трансляции его гРНК. В это связывание вовлекается также специфичный для позвоночных CTD домен рибосомного белка uS2. Белки uS11 и eS26 в бинарном комплексе IRES BГС с 40S субчастицей тесно сближены с нуклеотидом в положении -3 IRES, тогда как белок uS19 компонент рибосомного декодирующего центра соседствует с нуклеотидами, фланкирующими старт-кодон AUG с 3'-стороны лишь в незначительной доле таких комплексов. Последнее

указывает на то, что в подавляющем большинстве бинарных комплексов IRES BГС с 40S субчастицей кодирующая часть IRES не фиксирована стабильно в мРНК-связыващем канале, как предполагалось в одной из ранних работ [7] на основании данных тоупринтинга IRES ВГС в аналогичном комплексе. Другим принципиальным моментом в связывании IRES BГС с 40S субчастицей, впервые установленным в настоящей работе, является непосредственное взаимодействие IRES с 18S рРНК и последующие структурные перестройки в ней, обусловленные этим связыванием. При связывании домена III IRES ВГС с рибосомными белками 40S субчастицы апикальная часть субдомена IIId оказывается вовлечённой в комплементарные взаимодействия с нуклеотидами сегмента экспансии ES7 спирали h26 18S рРНК. Это связывание стабилизирует весь комплекс IRES ВГС с 40S субчастицей и, повидимому, способствует взаимодействию домена II и нуклеотидов с 5'-стороны от инициаторного кодона с белком uS7 в мРНК-связывающем канале, что индуцирует конформационный переход 18S рРНК в области нуклеотида G1639. Таким образом, происходит активация 40S субчастицы, делающая её способной к селекции инициаторной тРНК с последующим образованием 48S предынициаторного комплекса. Многие из полученных в настоящей работе данных по изучению бинарного комплекса IRES ВГС с 40S субчастицей уже нашли подтверждение при исследовании его структуры методом крио-ЭМ, а также в исследованиях, выполненных с использованием сайт-направленного мутагенеза. В частности, с помощью этих методов подтверждены интенсивные контакты субдомена IIIa/с IRES ВГС с белком eS27 [333], а также комплементарные взаимодействия между триплетами GGG в петле субдомена IIId IRES ВГС и ССС в петле спирали h26 18S pPHK [333, 339].

Результаты настоящей работы по изучению авторегуляции экспрессии генов рибосомных белков человека на стадии сплайсинга являются пионерскими даже на сегодняшний день. Ранее подобные данные были известны только для двух генов рибосомных белков низших эукариот – дрожжей [362, 363] и одного гена рибосомного белка нематоды [368]. Что касается генов рибосомных белков млекопитающих, то имелись лишь единичные работы, где были получены указания, что подобный тип регуляции мог бы осуществляется и у некоторых из этих генов [117, 353], в частности у гена рибосомного белка eS26 человека [353]. Таким образом, результаты, полученные в настоящей работе для белка uS15 в опытах *in vivo*, явились первым прямым доказательством существования клеточного механизма, посредством которого продукты генов рибосомных белков человека могут вовлекаться в регуляцию их экспрессии на уровне сплайсинга. В основе этого механизма лежит принцип обратной связи: рибосомные белки, будучи в избыточной концентрации, связываются с консенсусными последовательностями сплайсинга в первом интроне кодирующих их пре-мPHK, и тем самым ингибируют формирование зрелых MPHK. Выявленные в настоящей работе общие черты в

организации участков связывания рибосомного белка eS26 человека на пре-мРНК и 18S pPHK, наряду с аналогичными данными, известными для двух рибосомных белков дрожжей, позволили сделать вывод об узнавании рибосомными белками разных видов PHK по принципу структурной мимикрии. Этот принцип, по-видимому, исключительно важен для реализации рибосомными белками так называемых внерибосомных функций, проявляемых в различных клеточных процессах, поскольку позволяет им узнавать универсальные структурные элементы на различных PHK. Действительно, в настоящее время появляется всё больше информации о контактах рибосомных белков млекопитающих с различными видами клеточных PHK, что делает функциональные проявления отдельных рибосомный белок uS1 человека принимает непосредственное участие в процессинге предшественника U11 мяPHK и сплайсинге минорного типа [369], и что структура участка связывания uS1 на U11 пре-мяPHK напоминает структуру его участка связывания на 18S pPHK.

Подводя итог, можно заключить, что совокупность полученных в настоящей работе результатов даёт новое представление о функциональных свойствах рибосомных белков человека, открывая свежие горизонты в изучении конкретных ролей рибосомных белков в биогенезе и функционировании важнейших клеточных структур. Фундаментальные основы знаний о функциональных свойствах рибосомных белков человека и способах их исследования, заложенные в данной работе, в будущем, несомненно, позволят получить исчерпывающую информацию о сложнейшей сети внутриклеточных связей, вовлекающих эти белки, и об их отдельных "партиях", которые они исполняют в слаженном "клеточном оркестре". Обладая такой информацией, в дальнейшем можно приступить к разработке подходов, направленных на борьбу с заболеваниями, в основе которых лежат дефекты экспрессии генов рибосомных белков, сборки рибосомных субчастиц или трансляция чужеродных для клетки мРНК.

Выводы

1. Разработана универсальная платформа для получения рекомбинантных рибосомных белков человека, и с её использованием получен репрезентативный набор таких белков и их мутантных форм, пригодных для структурно-функциональных исследований.

2. Установлены существенные различия в порядках диссоциации белков из малых субчастиц рибосом человека и эубактерий под действием моновалентных катионов. Рибосомы млекопитающих гораздо более чувствительны к высокой концентрации моновалентных катионов, чем эубактериальные рибосомы, что указывает на наличие у рибосомных белков млекопитающих характерных особенностей, определяющих их взаимодействие с рРНК.

3. Выявлены характерные черты РНК-белковых взаимодействий в различных районах 40S субчастицы с использованием рекомбинантных рибосомных белков и фрагментов 18S рРНК, содержащих участки связывания этих белков. Показано, что рибосомные белки могут стабилизировать структуру рРНК, действуя подобно ионам Mg²⁺ или как "молекулярная скрепка", что должно способствовать их кооперативному связыванию с рРНК. Установлено, что участки связывания универсальных рибосомных белков на 18S рРНК, в целом, эволюционно консервативны. Фрагменты белков, не имеющие гомологии в соответствующих белках эубактерий, либо образуют дополнительные контакты с 18S рРНК, участвуя тем самым в формировании структуры рибосомы, либо остаются свободными, что позволяет им участвовать во взаимодействии с лигандами рибосомы – участниками трансляции.

4. Получены доказательства роли посттрансляционной модификации – гидроксилирования рибосомного белка uL2 по остатку His216 в формировании структуры каталитического центра рибосомы человека. Показано, что связывание гидроксилированого uL2, в отличие от его немодифицированного аналога, с фрагментом 28S pPHK, участвующим в формировании каталитического центра на 60S субчастице, способствует конформационным перестройкам 28S pPHK, делающим её структуру такой, как в зрелых 60S субчастицах. Следовательно, гидроксилирование рибосомного белка uL2 человека может играть ключевую роль в поддержании функционально активной структуры рибосомы.

5. Получены свидетельства независимого характера сборки морфологической части 40S субчастицы рибосомы – головы, включающей большой 3'-концевой домен 18S pPHK. Показано, что голова может быть отщеплена от остальной части 40S субчастицы и что соответствующий голове рибонуклеопротеид может быть реконструирован на основе PHK-транскрипта, соответствующего большому 3'-концевому домену 18S pPHK, и суммарного белка 40S субчастицы. Собранный рибонуклеопротеид по своему белковому составу относительно хорошо коррелирует с головой 40S субчастицы, но не полностью соответствует ей по

экспонированности нуклеотидных остатков 18S pPHK, что может быть обусловлено её неспецифическим связыванием с неструктурированными эукариот/архей-специфичными участками белков.

40S 6. Определены структурные элементы субчастицы рибосомы человека, взаимодействующие со специфическим структурным участком (IRES) геномной РНК вируса гепатита С (ВГС), в составе бинарного комплекса с IRES ВГС. Впервые продемонстрировано, что наряду с рибосомными белками во взаимодействие с IRES вовлекаются конкретные нуклеотиды 18S рРНК. Предложен молекулярный механизм, обеспечивающий селекцию инициаторной Met-tRNA_i^{Met} IRES-связанными 40S субчастицами, в основе которого лежат конформационные перестройки 18S рРНК. Рибосомный белок uS7 может играть центральную роль в промотировании взаимодействий между доменами II и IV IRES ВГС, индуцирующих эти перестройки.

7. Открыт новый способ авторегуляции экспрессии генов рибосомных белков человека на уровне сплайсинга их пре-мРНК. В основе этого способа лежит способность рибосомных белков связываться с консенсусными участками сплайсинга в первом интроне кодирующих их пре-мРНК, и тем самым ингибировать вырезание этого интрона. Показано, что консенсусные участки связывания для разных рибосомных белков могут различаться. Общие черты в структурах участков связывания рибосомных белков человека на пре-мРНК и рРНК указывают на то, что эти белки узнают свои участки на разных видах РНК по принципу структурной мимикрии.
Список литературы

- Nomura M., Traub P., Bechmann H. Hybrid 30S ribosomal particles reconstituted from components of different bacterial origins // Nature. – 1968. – V. 219. – P. 793–799.
- Green R., Noller H. F. Reconstitution of functional 50S ribosomes from in vitro transcripts of Bacillus stearothermophilus 23S rRNA // Biochemistry. – 1999. – V. 38. – P. 1772–1779.
- Londei P., Teixido J., Acca M., Cammarano P., Amils R. Total reconstitution of active large ribosomal subunits of the thermoacidophilic archaebacterium *Sulfolobus solfataricus* // Nucleic Acids Res. – 1986. – V. 14. – P. 2269–2285.
- Sanchez M. E., Londei P., Amils R. Total reconstitution of active small ribosomal subunits of the extreme halophilic archaeon *Haloferax mediterranei* // Biochim. Biophys. Acta. – 1996. – V. 1292. – P. 140–144.
- Fukushi S., Okada M., Stahl J., Kageyama T., Hoshino F. B., Katayama K. Ribosomal protein S5 interacts with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus // J. Biol. Chem. – 2001.
 V. 276. – P. 20824–20826.
- Otto G. A., Lukavsky P. J., Lancaster A. M., Sarnow P., Puglisi J. D. Ribosomal proteins mediate the hepatitis C virus IRES-HeLa 40S interaction // RNA. - 2002. - V. 8. - P. 913-923.
- Pestova T. V., Shatsky I. N., Fletcher S. P., Jackson R. J., Hellen C. U. A prokaryotic–like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs // Genes Dev. 1998. V. 12. P. 67–83.
- 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. – P. 1141–1151.
- 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. – P. 2027–2036.
- Boehringer D., Thermann R., Ostareck–Lederer A., Lewis J. D., Stark H. Structure of the hepatitis C virus IRES bound to the human 80S ribosome: remodeling of the HCV IRES // Structure. – 2005. – V. 13. – P. 1695–1706.
- Spahn C. M., Kieft J. S., Grassucci R. A., Penczek P. A., Zhou K., Doudna J. A., Frank J. Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40S ribosomal subunit // Science. - 2001. - V. 291. - P. 1959–1962.

- Graifer D., Molotkov M., Styazhkina V., Demeshkina N., Bulygin K., Eremina A., Ivanov A., et al. Variable and conserved elements of human ribosomes surrounding the mRNA at the decoding and upstream sites // Nucleic Acids Res. – 2004. – V. 32. – P. 3282–3293.
- 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. – P. 820–825.
- 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. – P. 80–85.
- Ben–Shem A., Garreau de Loubresse N., Melnikov S., Jenner L., Yusupova G., Yusupov M. The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 A resolution // Science. – 2011. – V. 334. – P. 1524–1529.
- Ben–Shem A., Jenner L., Yusupova G., Yusupov M. Crystal structure of the eukaryotic ribosome // Science. – 2010. – V. 330. – P. 1203–1209.
- Rabl J., Leibundgut M., Ataide S. F., Haag A., Ban N. Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1 // Science. 2011. V. 331. P. 730–736.
- Ban N., Nissen P., Hansen J., Capel M., Moore P. B., Steitz T. A. Placement of protein and RNA structures into a 5 A–resolution map of the 50S ribosomal subunit // Nature. – 1999. – V. 400. – P. 841–847.
- Harms J., Schluenzen F., Zarivach R., Bashan A., Gat S., Agmon I., Bartels H., et al. High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium // Cell. 2001. V. 107. P. 679–688.
- Pioletti M., Schlunzen F., Harms J., Zarivach R., Gluhmann M., Avila H., Bashan A., et al. Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3 // EMBO J. – 2001. – V. 20. – P. 1829–1839.
- Wimberly B. T., Brodersen D. E., Clemons W. M., Jr., Morgan–Warren R. J., Carter A. P., Vonrhein C., Hartsch T., et al. Structure of the 30S ribosomal subunit // Nature. – 2000. – V. 407. – P. 327–339.
- Melnikov S., Ben–Shem A., Garreau de Loubresse N., Jenner L., Yusupova G., Yusupov M. One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2012. – V. 19. – P. 560–567.
- Ban N., Beckmann R., Cate J. H., Dinman J. D., Dragon F., Ellis S. R., Lafontaine D. L., et al. A new system for naming ribosomal proteins // Curr. Opin. Struct. Biol. – 2014. – V. 24. – P. 165–169.

- 24. Perry R. P. Balanced production of ribosomal proteins // Gene. 2007. V. 401. P. 1–3.
- 25. Uechi T., Tanaka T., Kenmochi N. A complete map of the human ribosomal protein genes: assignment of 80 genes to the cytogenetic map and implications for human disorders // Genomics. – 2001. – V. 72. – P. 223–230.
- 26. Yoshihama M., Uechi T., Asakawa S., Kawasaki K., Kato S., Higa S., Maeda N., et al. The human ribosomal protein genes: sequencing and comparative analysis of 73 genes // Genome Res. 2002. V. 12. P. 379–390.
- Warner J. R., McIntosh K. B. How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? // Mol. Cell. 2009. V. 34. P. 3–11.
- 28. Gueydan C., Wauquier C., De Mees C., Huez G., Kruys V. Identification of ribosomal proteins specific to higher eukaryotic organisms // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 45034–45040.
- Chang W. L., Lee D. C., Leu S., Huang Y. M., Lu M. C., Ouyang P. Molecular characterization of a novel nucleolar protein, pNO40 // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2003. – V. 307. – P. 569–577.
- The UniProt C. UniProt: the universal protein knowledgebase // Nucleic Acids Res. 2017. V. 45. P. D158-D169.
- Wool I. G., Chan Y. L., Gluck A. Structure and evolution of mammalian ribosomal proteins // Biochem. Cell. Biol. – 1995. – V. 73. – P. 933–947.
- 32. Nishimura M., Kaminishi T., Takemoto C., Kawazoe M., Yoshida T., Tanaka A., Sugano S., et al. Crystal structure of human ribosomal protein L10 core domain reveals eukaryote–specific motifs in addition to the conserved fold // J. Mol. Biol. 2008. V. 377. P. 421–430.
- Kawaguchi A., Ose T., Yao M., Tanaka I. Crystallization and preliminary X-ray structure analysis of human ribosomal protein L30e // Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. – 2011. – V. 67. – P. 1516–1518.
- Jamieson K. V., Wu J., Hubbard S. R., Meruelo D. Crystal structure of the human laminin receptor precursor // J. Biol. Chem. – 2008. – V. 283. – P. 3002–3005.
- 35. Lee K. M., Yu C. W., Chiu T. Y., Sze K. H., Shaw P. C., Wong K. B. Solution structure of the dimerization domain of the eukaryotic stalk P1/P2 complex reveals the structural organization of eukaryotic stalk complex // Nucleic Acids Res. – 2012. – V. 40. – P. 3172–3182.
- 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. – P. 905–920.
- 37. Yusupov M. M., Yusupova G. Z., Baucom A., Lieberman K., Earnest T. N., Cate J. H., Noller H. F. Crystal structure of the ribosome at 5.5 A resolution // Science. 2001. V. 292. P. 883–896.

- Peng Z., Oldfield C. J., Xue B., Mizianty M. J., Dunker A. K., Kurgan L., Uversky V. N. A creature with a hundred waggly tails: intrinsically disordered proteins in the ribosome // Cell. Mol. Life Sci. 2014. V. 71. P. 1477–1504.
- Dyson H. J., Wright P. E. Intrinsically unstructured proteins and their functions // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. – 2005. – V. 6. – P. 197–208.
- 40. Warner J. R. The economics of ribosome biosynthesis in yeast // Trends Biochem. Sci. 1999.
 V. 24. P. 437–440.
- 41. Gupta V., Warner J. R. Ribosome–omics of the human ribosome // RNA. 2014. V. 20. P. 1004–1013.
- 42. Kenmochi N., Kawaguchi T., Rozen S., Davis E., Goodman N., Hudson T. J., Tanaka T., et al. A map of 75 human ribosomal protein genes // Genome Res. 1998. V. 8. P. 509–523.
- 43. Perry R. P. The architecture of mammalian ribosomal protein promoters // BMC Evol. Biol. 2005. V. 5. P. 15.
- 44. Parry T. J., Theisen J. W., Hsu J. Y., Wang Y. L., Corcoran D. L., Eustice M., Ohler U., et al. The TCT motif, a key component of an RNA polymerase II transcription system for the translational machinery // Genes Dev. – 2010. – V. 24. – P. 2013–2018.
- 45. Zhang Z., Harrison P.Gerstein M. Identification and analysis of over 2000 ribosomal protein pseudogenes in the human genome // Genome Res. 2002. V. 12. P. 1466–1482.
- 46. Lopes A. M., Miguel R. N., Sargent C. A., Ellis P. J., Amorim A., Affara N. A. The human RPS4 paralogue on Yq11.223 encodes a structurally conserved ribosomal protein and is preferentially expressed during spermatogenesis // BMC Mol. Biol. – 2010. – V. 11. – P. 33.
- Andres O., Kellermann T., Lopez–Giraldez F., Rozas J., Domingo–Roura X., Bosch M. RPS4Y gene family evolution in primates // BMC Evol. Biol. – 2008. – V. 8. – P. 142.
- 48. He H., Sun Y. Ribosomal protein S27L is a direct p53 target that regulates apoptosis // Oncogene. – 2007. – V. 26. – P. 2707–2716.
- Uechi T., Maeda N., Tanaka T., Kenmochi N. Functional second genes generated by retrotransposition of the X–linked ribosomal protein genes // Nucleic Acids Res. – 2002. – V. 30. – P. 5369–5375.
- Makarova J. A., Kramerov D. A. Noncoding RNAs // Biochemistry (Mosc). 2007. V. 72. P. 1161–1178.
- Hirose T., Shu M. D., Steitz J. A. Splicing-dependent and -independent modes of assembly for intron-encoded box C/D snoRNPs in mammalian cells // Mol. Cell. - 2003. - V. 12. - P. 113-123.

- 52. Nosrati N., Kapoor N. R., Kumar V. Combinatorial action of transcription factors orchestrates cell cycle–dependent expression of the ribosomal protein genes and ribosome biogenesis // FEBS J. 2014. V. 281. P. 2339–2352.
- 53. Butler J. E., Kadonaga J. T. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression // Genes Dev. 2002. V. 16. P. 2583–2592.
- 54. Juven–Gershon T., Kadonaga J. T. Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery // Dev. Biol. 2010. V. 339. P. 225–229.
- 55. Wang Y. L., Duttke S. H., Chen K., Johnston J., Kassavetis G. A., Zeitlinger J., Kadonaga J. T. TRF2, but not TBP, mediates the transcription of ribosomal protein genes // Genes Dev. 2014. V. 28. P. 1550–1555.
- 56. Pan Q., Shai O., Lee L. J., Frey B. J., Blencowe B. J. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing // Nat. Genet. 2008. V. 40. P. 1413–1415.
- 57. Wang Z., Burge C. B. Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code // RNA. 2008. V. 14. P. 802–813.
- 58. Xu L., He G. P., Li A., Ro H. S. Molecular characterization of the mouse ribosomal protein S24 multigene family: a uniquely expressed intron-containing gene with cell-specific expression of three alternatively spliced mRNAs // Nucleic Acids Res. - 1994. - V. 22. - P. 646-655.
- 59. Xu W. B., Roufa D. J. The gene encoding human ribosomal protein S24 and tissue–specific expression of differentially spliced mRNAs // Gene. 1996. V. 169. P. 257–262.
- Brawand D., Soumillon M., Necsulea A., Julien P., Csardi G., Harrigan P., Weier M., et al. The evolution of gene expression levels in mammalian organs // Nature. 2011. V. 478. P. 343–348.
- 61. Perry R. P., Meyuhas O. Translational control of ribosomal protein production in mammalian cells // Enzyme. 1990. V. 44. P. 83–92.
- 62. Meyuhas O. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level // Eur.
 J. Biochem. 2000. V. 267. P. 6321–6330.
- Levy S., Avni D., Hariharan N., Perry R. P., Meyuhas O. Oligopyrimidine tract at the 5' end of mammalian ribosomal protein mRNAs is required for their translational control // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1991. – V. 88. – P. 3319–3323.
- Aloni R., Peleg D., Meyuhas O. Selective translational control and nonspecific posttranscriptional regulation of ribosomal protein gene expression during development and regeneration of rat liver // Mol. Cell. Biol. – 1992. – V. 12. – P. 2203–2212.

- 65. Avni D., Biberman Y., Meyuhas O. The 5' terminal oligopyrimidine tract confers translational control on TOP mRNAs in a cell type– and sequence context–dependent manner // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. P. 995–1001.
- 66. Avni D., Shama S., Loreni F., Meyuhas O. Vertebrate mRNAs with a 5'-terminal pyrimidine tract are candidates for translational repression in quiescent cells: characterization of the translational cis-regulatory element // Mol. Cell. Biol. – 1994. – V. 14. – P. 3822–3833.
- Ruvinsky I., Meyuhas O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size // Trends Biochem. Sci. – 2006. – V. 31. – P. 342–348.
- Pellizzoni L., Cardinali B., Lin–Marq N., Mercanti D., Pierandrei–Amaldi P. A *Xenopus laevis* homologue of the La autoantigen binds the pyrimidine tract of the 5' UTR of ribosomal protein mRNAs in vitro: implication of a protein factor in complex formation // J. Mol. Biol. – 1996. – V. 259. – P. 904–915.
- Pellizzoni L., Lotti F., Maras B., Pierandrei–Amaldi P. Cellular nucleic acid binding protein binds a conserved region of the 5' UTR of *Xenopus laevis* ribosomal protein mRNAs // J. Mol. Biol. – 1997. – V. 267. – P. 264–275.
- Crosio C., Boyl P. P., Loreni F., Pierandrei–Amaldi P., Amaldi F. La protein has a positive effect on the translation of TOP mRNAs in vivo // Nucleic Acids Res. 2000. V. 28. P. 2927–2934.
- 71. Cardinali B., Carissimi C., Gravina P., Pierandrei–Amaldi P. La protein is associated with terminal oligopyrimidine mRNAs in actively translating polysomes // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 35145–35151.
- 72. Zhu J., Hayakawa A., Kakegawa T., Kaspar R. L. Binding of the La autoantigen to the 5' untranslated region of a chimeric human translation elongation factor 1A reporter mRNA inhibits translation in vitro // Biochim. Biophys. Acta. 2001. V. 1521. P. 19–29.
- Schwartz E. I., Intine R. V., Maraia R. J. CK2 is responsible for phosphorylation of human La protein serine–366 and can modulate rpL37 5'–terminal oligopyrimidine mRNA metabolism // Mol. Cell. Biol. 2004. V. 24. P. 9580–9591.
- 74. Thomas G., Siegmann M., Kubler A. M., Gordon J., Jimenez de Asua L. Regulation of 40S ribosomal protein S6 phosphorylation in Swiss mouse 3T3 cells // Cell. 1980. V. 19. P. 1015–1023.
- Jefferies H. B., Reinhard C., Kozma S. C.Thomas G. Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1994.
 V. 91. P. 4441–4445.

- Amaldi F., Pierandrei–Amaldi P. TOP genes: a translationally controlled class of genes including those coding for ribosomal proteins // Prog. Mol. Subcell. Biol. – 1997. – V. 18. – P. 1–17.
- Jefferies H. B., Fumagalli S., Dennis P. B., Reinhard C., Pearson R. B., Thomas G. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k // EMBO J. 1997. V. 16. P. 3693–3704.
- 78. Terada N., Patel H. R., Takase K., Kohno K., Nairn A. C., Gelfand E. W. Rapamycin selectively inhibits translation of mRNAs encoding elongation factors and ribosomal proteins // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1994. V. 91. P. 11477–11481.
- 79. Sabatini D. M. mTOR and cancer: insights into a complex relationship // Nat. Rev. Cancer. –
 2006. V. 6. P. 729–734.
- 80. Shima H., Pende M., Chen Y., Fumagalli S., Thomas G., Kozma S. C. Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase // EMBO J. 1998. V. 17. P. 6649–6659.
- 81. Pende M., Um S. H., Mieulet V., Sticker M., Goss V. L., Mestan J., Mueller M., et al. S6K1(– /–)/S6K2(–/–) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin–sensitive 5'–terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen–activated protein kinase–dependent S6 kinase pathway // Mol. Cell. Biol. – 2004. – V. 24. – P. 3112–3124.
- 82. Hagner P. R., Mazan–Mamczarz K., Dai B., Balzer E. M., Corl S., Martin S. S., Zhao X. F., et al. Ribosomal protein S6 is highly expressed in non–Hodgkin lymphoma and associates with mRNA containing a 5' terminal oligopyrimidine tract // Oncogene. 2011. V. 30. P. 1531–1541.
- Thoreen C. C., Chantranupong L., Keys H. R., Wang T., Gray N. S., Sabatini D. M. A unifying model for mTORC1–mediated regulation of mRNA translation // Nature. – 2012. – V. 485. – P. 109–113.
- 84. Jackson R. J., Hellen C. U., Pestova T. V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2010. V. 11. P. 113–127.
- 85. Imataka H., Olsen H. S., Sonenberg N. A new translational regulator with homology to eukaryotic translation initiation factor 4G // EMBO J. 1997. V. 16. P. 817–825.
- Lee S. H., McCormick F. p97/DAP5 is a ribosome-associated factor that facilitates protein synthesis and cell proliferation by modulating the synthesis of cell cycle proteins // EMBO J. – 2006. – V. 25. – P. 4008–4019.
- Zarogoulidis P., Lampaki S., Turner J. F., Huang H., Kakolyris S., Syrigos K., Zarogoulidis K. mTOR pathway: A current, up-to-date mini-review // Oncol. Lett. - 2014. - V. 8. - P. 2367-2370.

- Cautain B., Hill R., de Pedro N., Link W. Components and regulation of nuclear transport processes // FEBS J. – 2015. – V. 282. – P. 445–462.
- Marfori M., Mynott A., Ellis J. J., Mehdi A. M., Saunders N. F., Curmi P. M., Forwood J. K., et al. Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – V. 1813. – P. 1562–1577.
- 90. Xu D., Farmer A., Chook Y. M. Recognition of nuclear targeting signals by Karyopherin–beta proteins // Curr. Opin. Struct. Biol. 2010. V. 20. P. 782–790.
- 91. Gorlich D., Kutay U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm // Annu. Rev. Cell.
 Dev. Biol. 1999. V. 15. P. 607–660.
- Sorokin A. V., Kim E. R., Ovchinnikov L. P. Nucleocytoplasmic transport of proteins // Biochemistry (Mosc). – 2007. – V. 72. – P. 1439–1457.
- 93. Jakel S., Gorlich D. Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells // EMBO J. – 1998. – V. 17. – P. 4491–4502.
- 94. 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. – P. 377–386.
- 95. Kubota S., Copeland T. D., Pomerantz R. J. Nuclear and nucleolar targeting of human ribosomal protein S25: common features shared with HIV-1 regulatory proteins // Oncogene. – 1999. – V. 18. – P. 1503–1514.
- 96. Rosorius O., Fries B., Stauber R. H., Hirschmann N., Bevec D., Hauber J. Human ribosomal protein L5 contains defined nuclear localization and export signals // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 12061–12068.
- 97. Da Costa L., Tchernia G., Gascard P., Lo A., Meerpohl J., Niemeyer C., Chasis J. A., et al. Nucleolar localization of RPS19 protein in normal cells and mislocalization due to mutations in the nucleolar localization signals in 2 Diamond–Blackfan anemia patients: potential insights into pathophysiology // Blood. – 2003. – V. 101. – P. 5039–5045.
- 98. Russo G., Ricciardelli G., Pietropaolo C. Different domains cooperate to target the human ribosomal L7a protein to the nucleus and to the nucleoli // J. Biol. Chem. – 1997. – V. 272. – P. 5229–5235.
- Schmidt C., Lipsius E., Kruppa J. Nuclear and nucleolar targeting of human ribosomal protein S6 // Mol. Biol. Cell. – 1995. – V. 6. – P. 1875–1885.
- Lewis J. D., Tollervey D. Like attracts like: getting RNA processing together in the nucleus // Science. - 2000. - V. 288. - P. 1385-1389.

- 101. O'Donohue M. F., Choesmel V., Faubladier M., Fichant G., Gleizes P. E. Functional dichotomy of ribosomal proteins during the synthesis of mammalian 40S ribosomal subunits // J. Cell. Biol. 2010. V. 190. P. 853–866.
- 102. Tafforeau L., Zorbas C., Langhendries J. L., Mullineux S. T., Stamatopoulou V., Mullier R., Wacheul L., et al. The complexity of human ribosome biogenesis revealed by systematic nucleolar screening of Pre–rRNA processing factors // Mol. Cell. – 2013. – V. 51. – P. 539– 551.
- 103. Robledo S., Idol R. A., Crimmins D. L., Ladenson J. H., Mason P. J., Bessler M. The role of human ribosomal proteins in the maturation of rRNA and ribosome production // RNA. – 2008. – V. 14. – P. 1918–1929.
- 104. Lam Y. W., Lamond A. I., Mann M., Andersen J. S. Analysis of nucleolar protein dynamics reveals the nuclear degradation of ribosomal proteins // Curr. Biol. – 2007. – V. 17. – P. 749– 760.
- 105. Todorov I. T., Noll F., Hadjiolov A. A. The sequential addition of ribosomal proteins during the formation of the small ribosomal subunit in Friend erythroleukemia cells // Eur. J. Biochem. – 1983. – V. 131. – P. 271–275.
- 106. Holmes K. L., Culver G. M. Mapping structural differences between 30S ribosomal subunit assembly intermediates // Nat. Struct. Mol. Biol. 2004. V. 11. P. 179–186.
- 107. Steffen K. K., McCormick M. A., Pham K. M., MacKay V. L., Delaney J. R., Murakami C. J., Kaeberlein M., et al. Ribosome deficiency protects against ER stress in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. – 2012. – V. 191. – P. 107–118.
- 108. 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. – P. 324–329.
- 109. O'Leary M. N., Schreiber K. H., Zhang Y., Duc A. C., Rao S., Hale J. S., Academia E. C., et al. The ribosomal protein Rpl22 controls ribosome composition by directly repressing expression of its own paralog, Rpl2211 // PLoS Genet. – 2013. – V. 9. – P. e1003708.
- 110. Ferreira–Cerca S., Poll G., Gleizes P. E., Tschochner H., Milkereit P. Roles of eukaryotic ribosomal proteins in maturation and transport of pre–18S rRNA and ribosome function // Mol. Cell. – 2005. – V. 20. – P. 263–275.
- 111. Raiser D. M., Narla A., Ebert B. L. The emerging importance of ribosomal dysfunction in the pathogenesis of hematologic disorders // Leuk. Lymphoma. – 2014. – V. 55. – P. 491–500.
- 112. Kondrashov N., Pusic A., Stumpf C. R., Shimizu K., Hsieh A. C., Ishijima J., Shiroishi T., et al. Ribosome–mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning // Cell. 2011. V. 145. P. 383–397.

- Lindahl L., Zengel J. M. Ribosomal genes in Escherichia coli // Annu. Rev. Genet. 1986. V.
 20. P. 297–326.
- 114. Tasheva E. S.Roufa D. J. Regulation of human RPS14 transcription by intronic antisense RNAs and ribosomal protein S14 // Genes Dev. – 1995. – V. 9. – P. 304–316.
- 115. 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. – P. 195–202.
- 116. 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. P. 294–303.
- 117. Cuccurese M., Russo G., Russo A.Pietropaolo C. Alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay regulate mammalian ribosomal gene expression // Nucleic Acids Res. 2005. V. 33. P. 5965–5977.
- 118. Zhang Y., Lu H. Signaling to p53: ribosomal proteins find their way // Cancer Cell. 2009. –
 V. 16. P. 369–377.
- Deisenroth C., Zhang Y. Ribosome biogenesis surveillance: probing the ribosomal protein– Mdm2–p53 pathway // Oncogene. – 2010. – V. 29. – P. 4253–4260.
- 120. Marechal V., Elenbaas B., Piette J., Nicolas J. C., Levine A. J. The ribosomal L5 protein is associated with mdm–2 and mdm–2–p53 complexes // Mol. Cell. Biol. – 1994. – V. 14. – P. 7414–7420.
- Elenbaas B., Dobbelstein M., Roth J., Shenk T., Levine A. J. The MDM2 oncoprotein binds specifically to RNA through its RING finger domain // Mol. Med. – 1996. – V. 2. – P. 439– 451.
- 122. 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. – P. 577–587.
- 123. 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. – P. 8902–8912.
- 124. 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. – P. 7654–7668.
- 125. 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. – P. 7669–7680.

- 126. Chen D., Zhang Z., Li M., Wang W., Li Y., Rayburn E. R., Hill D. L., et al. Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53–MDM2 interaction: binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function // Oncogene. – 2007. – V. 26. – P. 5029–5037.
- 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. – P. 316–326.
- Ofir–Rosenfeld Y., Boggs K., Michael D., Kastan M. B., Oren M. Mdm2 regulates p53 mRNA translation through inhibitory interactions with ribosomal protein L26 // Mol. Cell. – 2008. – V. 32. – P. 180–189.
- 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. P. 1215–1224.
- 130. 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. – P. 1798– 1811.
- 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. – P. e68667.
- 132. 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. – P. 2782–2791.
- 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. – P. 388–396.
- 134. 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. – P. 2225– 2235.
- 135. 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. – P. 1799– 1811.
- 136. Donati G., Bertoni S., Brighenti E., Vici M., Trere D., Volarevic S., Montanaro L., et al. The balance between rRNA and ribosomal protein synthesis up– and downregulates the tumour suppressor p53 in mammalian cells // Oncogene. – 2011. – V. 30. – P. 3274–3288.
- 137. Kim T. H., Leslie P., Zhang Y. Ribosomal proteins as unrevealed caretakers for cellular stress and genomic instability // Oncotarget. – 2014. – V. 5. – P. 860–871.
- 138. Bursac S., Brdovcak M. C., Pfannkuchen M., Orsolic I., Golomb L., Zhu Y., Katz C., et al. Mutual protection of ribosomal proteins L5 and L11 from degradation is essential for p53

activation upon ribosomal biogenesis stress // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2012. – V. 109. – P. 20467–20472.

- 139. Draptchinskaia N., Gustavsson P., Andersson B., Pettersson M., Willig T. N., Dianzani I., Ball S., et al. The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond–Blackfan anaemia // Nat. Genet. 1999. V. 21. P. 169–175.
- 140. Choesmel V., Fribourg S., Aguissa–Toure A. H., Pinaud N., Legrand P., Gazda H. T., Gleizes P. E. Mutation of ribosomal protein RPS24 in Diamond–Blackfan anemia results in a ribosome biogenesis disorder // Hum. Mol. Genet. 2008. V. 17. P. 1253–1263.
- 141. Farrar J. E., Nater M., Caywood E., McDevitt M. A., Kowalski J., Takemoto C. M., Talbot C. C., Jr., et al. Abnormalities of the large ribosomal subunit protein, Rpl35a, in Diamond–Blackfan anemia // Blood. 2008. V. 112. P. 1582–1592.
- 142. Doherty L., Sheen M. R., Vlachos A., Choesmel V., O'Donohue M. F., Clinton C., Schneider H. E., et al. Ribosomal protein genes RPS10 and RPS26 are commonly mutated in Diamond–Blackfan anemia // Am J Hum Genet. 2010. V. 86. P. 222–228.
- 143. Choesmel V., Bacqueville D., Rouquette J., Noaillac–Depeyre J., Fribourg S., Cretien A., Leblanc T., et al. Impaired ribosome biogenesis in Diamond–Blackfan anemia // Blood. 2007.
 V. 109. P. 1275–1283.
- Juli G., Gismondi A., Monteleone V., Caldarola S., Iadevaia V., Aspesi A., Dianzani I., et al. Depletion of ribosomal protein S19 causes a reduction of rRNA synthesis // Sci. Rep. – 2016. – V. 6. – P. 35026.
- 145. Danilova N., Gazda H. T. Ribosomopathies: how a common root can cause a tree of pathologies // Dis. Model Mech. – 2015. – V. 8. – P. 1013–1026.
- 146. Goudarzi K. M., Lindstrom M. S. Role of ribosomal protein mutations in tumor development (Review) // Int. J. Oncol. – 2016. – V. 48. – P. 1313–1324.
- Sulima S. O., De Keersmaecker K. Ribosomal proteins: a novel class of oncogenic drivers // Oncotarget. – 2017. – V. 8. – P. 89427–89428.
- 148. Mills E. W., Green R. Ribosomopathies: There's strength in numbers // Science. 2017. V.
 358. P. 608.
- 149. Boultwood J., Fidler C., Strickson A. J., Watkins F., Gama S., Kearney L., Tosi S., et al. Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome // Blood. - 2002. - V. 99. - P. 4638-4641.
- 150. Ebert B. L., Pretz J., Bosco J., Chang C. Y., Tamayo P., Galili N., Raza A., et al. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen // Nature. – 2008. – V. 451. – P. 335–339.

- 151. Starczynowski D. T., Kuchenbauer F., Argiropoulos B., Sung S., Morin R., Muranyi A., Hirst M., et al. Identification of miR–145 and miR–146a as mediators of the 5q– syndrome phenotype // Nat. Med. 2010. V. 16. P. 49–58.
- 152. Brooks S. S., Wall A. L., Golzio C., Reid D. W., Kondyles A., Willer J. R., Botti C., et al. A novel ribosomopathy caused by dysfunction of RPL10 disrupts neurodevelopment and causes X–linked microcephaly in humans // Genetics. – 2014. – V. 198. – P. 723–733.
- 153. Chiocchetti A., Pakalapati G., Duketis E., Wiemann S., Poustka A., Poustka F., Klauck S. M. Mutation and expression analyses of the ribosomal protein gene RPL10 in an extended German sample of patients with autism spectrum disorder // Am. J. Med. Genet. A. 2011. V. 155A. P. 1472–1475.
- 154. Narla A., Ebert B. L. Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction // Blood. –
 2010. V. 115. P. 3196–3205.
- 155. Bolze A., Mahlaoui N., Byun M., Turner B., Trede N., Ellis S. R., Abhyankar A., et al. Ribosomal protein SA haploinsufficiency in humans with isolated congenital asplenia // Science. – 2013. – V. 340. – P. 976–978.
- 156. Zhou C., Zang D., Jin Y., Wu H., Liu Z., Du J., Zhang J. Mutation in ribosomal protein L21 underlies hereditary hypotrichosis simplex // Hum. Mutat. 2011. V. 32. P. 710–714.
- 157. de Las Heras-Rubio A., Perucho L., Paciucci R., Vilardell J., Leonart M. E. Ribosomal proteins as novel players in tumorigenesis // Cancer Metastasis Rev. 2014. V. 33. P. 115–141.
- 158. De Keersmaecker K., Atak Z. K., Li N., Vicente C., Patchett S., Girardi T., Gianfelici V., et al. Exome sequencing identifies mutation in CNOT3 and ribosomal genes RPL5 and RPL10 in T– cell acute lymphoblastic leukemia // Nat. Genet. – 2013. – V. 45. – P. 186–190.
- 159. D'Allard D. L., Liu J. M. Toward RNA repair of Diamond Blackfan anemia hematopoietic stem cells // Hum. Gene Ther. – 2016. – V. 27. – P. 792–801.
- 160. Graifer D., Karpova G. Roles of ribosomal proteins in the functioning of translational machinery of eukaryotes // Biochimie. – 2015. – V. 109. – P. 1–17.
- 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. P. 6898–6905.
- 162. 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. – P. 187–198.
- 163. Mazumder B., Seshadri V., Imataka H., Sonenberg N., Fox P. L. Translational silencing of ceruloplasmin requires the essential elements of mRNA circularization: poly(A) tail, poly(A)–

binding protein, and eukaryotic translation initiation factor 4G // Mol. Cell. Biol. -2001. - V.21. -P. 6440-6449.

- 164. 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 // Mol. Cell. Biol. – 2003. – V. 23. – P. 1509–1519.
- 165. 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. – P. 324–331.
- 166. Kapasi P., Chaudhuri S., Vyas K., Baus D., Komar A. A., Fox P. L., Merrick W. C., et al. L13a blocks 48S assembly: role of a general initiation factor in mRNA–specific translational control // Mol. Cell. – 2007. – V. 25. – P. 113–126.
- 167. Chaudhuri S., Vyas K., Kapasi P., Komar A. A., Dinman J. D., Barik S., Mazumder B. Human ribosomal protein L13a is dispensable for canonical ribosome function but indispensable for efficient rRNA methylation // RNA. – 2007. – V. 13. – P. 2224–2237.
- 168. Cho S., Kim J. H., Back S. H., Jang S. K. Polypyrimidine tract-binding protein enhances the internal ribosomal entry site-dependent translation of p27Kip1 mRNA and modulates transition from G1 to S phase // Mol. Cell. Biol. – 2005. – V. 25. – P. 1283–1297.
- 169. Gaccioli F., Huang C. C., Wang C., Bevilacqua E., Franchi–Gazzola R., Gazzola G. C., Bussolati O., et al. Amino acid starvation induces the SNAT2 neutral amino acid transporter by a mechanism that involves eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation and capindependent translation // J. Biol. Chem. – 2006. – V. 281. – P. 17929–17940.
- 170. Kullmann M., Gopfert U., Siewe B., Hengst L. ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5'UTR // Genes Dev. – 2002. – V. 16. – P. 3087–3099.
- 171. Ray P. S., Grover R., Das S. Two internal ribosome entry sites mediate the translation of p53 isoforms // EMBO Rep. 2006. V. 7. P. 404–410.
- 172. Komar A. A., Mazumder B., Merrick W. C. A new framework for understanding IRESmediated translation // Gene. – 2012. – V. 502. – P. 75–86.
- 173. Terenin I. M., Smirnova V. V., Andreev D. E., Dmitriev S. E., Shatsky I. N. A researcher's guide to the galaxy of IRESs // Cell. Mol. Life Sci. – 2017. – V. 74. – P. 1431–1455.
- 174. Chen F. W., Ioannou Y. A. Ribosomal proteins in cell proliferation and apoptosis // Int. Rev. Immunol. – 1999. – V. 18. – P. 429–448.
- 175. Barna M. Ribosomes take control // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2013. V. 110. P. 9–10.
- Mauro V. P., Edelman G. M. The ribosome filter hypothesis // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. –
 2002. V. 99. P. 12031–12036.
- 177. Kmita M., Duboule D. Organizing axes in time and space; 25 years of colinear tinkering // Science. - 2003. - V. 301. - P. 331-333.

- 178. 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. P. 33–38.
- 179. Odintsova T. I., Muller E. C., Ivanov A. V., Egorov T. A., Bienert R., Vladimirov S. N., Kostka S., et al. 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. – P. 249–258.
- 180. Vladimirov S. N., Ivanov A. V., Karpova G. G., Musolyamov A. K., Egorov T. A., Thiede B., Wittmann–Liebold B., et al. Characterization of the human small–ribosomal–subunit proteins by N–terminal and internal sequencing, and mass spectrometry // Eur. J. Biochem. – 1996. – V. 239. – P. 144–149.
- 181. Schumacher A. M., Velentza A. V., Watterson D. M., Dresios J. Death-associated protein kinase phosphorylates mammalian ribosomal protein S6 and reduces protein synthesis // Biochemistry. – 2006. – V. 45. – P. 13614–13621.
- 182. Ge W., Wolf A., Feng T., Ho C. H., Sekirnik R., Zayer A., Granatino N., et al. Oxygenase– catalyzed ribosome hydroxylation occurs in prokaryotes and humans // Nat. Chem. Biol. – 2012. – V. 8. – P. 960–962.
- 183. Singleton R. S., Liu–Yi P., Formenti F., Ge W., Sekirnik R., Fischer R., Adam J., et al. OGFOD1 catalyzes prolyl hydroxylation of RPS23 and is involved in translation control and stress granule formation // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2014. – V. 111. – P. 4031–4036.
- 184. Katz M. J., Acevedo J. M., Wappner P. Growing with the wind. Ribosomal protein hydroxylation and cell growth // Fly (Austin). – 2014. – V. 8. – P. 153–156.
- 185. Loenarz C., Sekirnik R., Thalhammer A., Ge W., Spivakovsky E., Mackeen M. M., McDonough M. A., et al. Hydroxylation of the eukaryotic ribosomal decoding center affects translational accuracy // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2014. – V. 111. – P. 4019–4024.
- Anthony R. A., Liebman S. W. Alterations in ribosomal protein RPS28 can diversely affect translational accuracy in Saccharomyces cerevisiae // Genetics. – 1995. – V. 140. – P. 1247– 1258.
- 187. Sharma D., Cukras A. R., Rogers E. J., Southworth D. R.Green R. Mutational analysis of S12 protein and implications for the accuracy of decoding by the ribosome // J. Mol. Biol. 2007. V. 374. P. 1065–1076.
- 188. Martin I., Kim J. W., Lee B. D., Kang H. C., Xu J. C., Jia H., Stankowski J., et al. Ribosomal protein S15 phosphorylation mediates LRRK2 neurodegeneration in Parkinson's disease // Cell. - 2014. – V. 157. – P. 472–485.
- 189. Iwakiri D. Epstein–Barr Virus–Encoded RNAs: Key Molecules in Viral Pathogenesis // Cancers (Basel). – 2014. – V. 6. – P. 1615–1630.

- 190. 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 // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1994. – V. 91. – P. 3463–3467.
- 191. 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. – P. 459–466.
- 192. 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. – P. 872–882.
- 193. 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. – P. 1895–1905.
- 194. Wood J., Frederickson R. M., Fields S., Patel A. H. Hepatitis C virus 3'X region interacts with human ribosomal proteins // J. Virol. 2001. V. 75. P. 1348–1358.
- 195. Lu H., Li W., Noble W. S., Payan D., Anderson D. C. Riboproteomics of the hepatitis C virus internal ribosomal entry site // J. Proteome Res. – 2004. – V. 3. – P. 949–957.
- 196. Niepmann M. Internal translation initiation of picornaviruses and hepatitis C virus // Biochim.
 Biophys. Acta. 2009. V. 1789. P. 529–541.
- 197. Sweeney T. R., Dhote V., Yu Y., Hellen C. U. A distinct class of internal ribosomal entry site in members of the Kobuvirus and proposed Salivirus and Paraturdivirus genera of the Picornaviridae // J. Virol. – 2012. – V. 86. – P. 1468–1486.
- 198. Shatsky I. N., Dmitriev S. E., Terenin I. M., Andreev D. E. Cap– and IRES–independent scanning mechanism of translation initiation as an alternative to the concept of cellular IRESs // Mol. Cells. – 2010. – V. 30. – P. 285–293.
- 199. Yamamoto H., Unbehaun A., Spahn C. M. T. Ribosomal Chamber Music: Toward an Understanding of IRES Mechanisms // Trends Biochem. Sci. 2017. V. 42. P. 655–668.
- 200. Hellen C. U. IRES-induced conformational changes in the ribosome and the mechanism of translation initiation by internal ribosomal entry // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1789. P. 558-570.
- 201. Hellen C. U.de Breyne S. A distinct group of hepacivirus/pestivirus-like internal ribosomal entry sites in members of diverse picornavirus genera: evidence for modular exchange of functional noncoding RNA elements by recombination // J. Virol. – 2007. – V. 81. – P. 5850– 5863.
- 202. Perard J., Leyrat C., Baudin F., Drouet E., Jamin M. Structure of the full-length HCV IRES in solution // Nat. Commun. 2013. V. 4. P. 1612.

- 203. Reynolds J. E., Kaminski A., Kettinen H. J., Grace K., Clarke B. E., Carroll A. R., Rowlands D. J., et al. Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation // EMBO J. 1995. V. 14. P. 6010–6020.
- Berry K. E., Waghray S., Mortimer S. A., Bai Y., Doudna J. A. Crystal structure of the HCV IRES central domain reveals strategy for start–codon positioning // Structure. 2011. V. 19. P. 1456–1466.
- 205. Honda M., Beard M. R., Ping L. H., Lemon S. M. A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation // J .Virol. – 1999. – V. 73. – P. 1165–1174.
- 206. Zhao W. D., Wimmer E. Genetic analysis of a poliovirus/hepatitis C virus chimera: new structure for domain II of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus // J. Virol. 2001. V. 75 (8). P. 3719–3730.
- 207. Kieft J. S., Zhou K., Jubin R., Doudna J. A. Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA // RNA. – 2001. – V. 7. – P. 194–206.
- 208. 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. – P. 2153–2162.
- 209. Dontsova O. A., Rosen K. V., Bogdanova S. L., Skripkin E. A., Kopylov A. M., Bogdanov A. A. Identification of the *Escherichia coli* 30S ribosomal subunit protein neighboring mRNA during initiation of translation // Biochimie. 1992. V. 74. P. 363–371.
- 210. Dubreuil Y. L., Kaba L., Hajnsdorf E., Favre A., Le Bret M. Identification of form III conformers in tRNAPhe from *Escherichia coli* by intramolecular photo–cross–linking // Biochemistry. 1986. V. 25. P. 5726–5735.
- 211. Landry D. M., Hertz M. I., Thompson S. R. RPS25 is essential for translation initiation by the *Dicistroviridae* and hepatitis C viral IRESs // Genes Dev. – 2009. – V. 23. – P. 2753–2764.
- 212. Venkstern T. V., Graifer D. M., Karpova G. G., Morozov I. A. Studying interaction of a derivative of tRNAPhe bearing an aryl azide group at the G–24 with *Escherichia coli* ribosomes and with tRNA–(adenine–1)methyltransferase from *Thermus thermophilus //* Biopolymery i kletka 1990. V. 6. P. 59–65.
- 213. Zenkova M., Ehresmann C., Caillet J., Springer M., Karpova G., Ehresmann B., Romby P. A novel approach to introduce site–directed specific cross–links within RNA–protein complexes. Application to the *Escherichia coli* threonyl–tRNA synthetase/translational operator complex // Eur. J. Biochem. – 1995. – V. 231. – P. 726–735.

- Malygin A. A., Dobrikov M. I., Repkova M. N., Shishkin G. V., Ven'yaminova A. G., Karpova G. G. Proteins neighboring 18S rRNA conserved sequences 609–618 and 1047–1061 within the 40S human ribosomal subunit // RNA. 1999. V. 5. P. 1656–1664.
- 215. Hashem Y., des Georges A., Dhote V., Langlois R., Liao H. Y., Grassucci R. A., Pestova T. V., et al. Hepatitis–C–virus–like internal ribosome entry sites displace eIF3 to gain access to the 40S subunit // Nature. 2013. V. 503. P. 539–543.
- 216. Joseph A. P., Bhat P., Das S., Srinivasan N. Re–analysis of cryoEM data on HCV IRES bound to 40S subunit of human ribosome integrated with recent structural information suggests new contact regions between ribosomal proteins and HCV RNA // RNA Biol. – 2014. – V. 11. – P. 891–905.
- 217. Yamamoto H., Unbehaun A., Loerke J., Behrmann E., Collier M., Burger J., Mielke T., et al. Structure of the mammalian 80S initiation complex with initiation factor 5B on HCV–IRES RNA // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2014. – V. 21. – P. 721–727.
- 218. Filbin M. E., Vollmar B. S., Shi D., Gonen T., Kieft J. S. HCV IRES manipulates the ribosome to promote the switch from translation initiation to elongation // Nat. Struct. Mol. Biol. 2013. V. 20. P. 150–158.
- 219. Bhat P., Shwetha S., Sharma D. K., Joseph A. P., Srinivasan N., Das S. The beta hairpin structure within ribosomal protein S5 mediates interplay between domains II and IV and regulates HCV IRES function // Nucleic Acids Res. 2015. V. 43. P. 2888–2901.
- Wool I. G. Extraribosomal functions of ribosomal proteins // Trends Biochem. Sci. 1996. –
 V. 21. P. 164–165.
- 221. 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.
- 222. Hegde V., Kelley M. R., Xu Y., Mian I. S., Deutsch W. A. Conversion of the bifunctional 8– oxoguanine/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. – P. 27591–27596.
- 223. 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. - P. 14211-14217.
- 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. P. 810–815.

- 225. 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. P. 54–64.
- 226. Grosheva A. S., Zharkov D. O., Stahl J., Gopanenko A. V., Tupikin A. E., Kabilov M. R., Graifer D. M., et al. 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. – P. 3833–3843.
- 227. Sharifulin D. E., Bartuli Y. S., Meschaninova M. I., Ven'yaminova A. G., Graifer D. M., Karpova G. G. Exploring accessibility of structural elements of the mammalian 40S ribosomal mRNA entry channel at various steps of translation initiation // Biochim. Biophys. Acta. – 2016. – V. 1864. – P. 1328–1338.
- 228. Sharifulin D. E., Grosheva A. S., Bartuli Y. S., Malygin A. A., Meschaninova M. I., Ven'yaminova A. G., Stahl J., et al. Molecular contacts of ribose–phosphate backbone of mRNA with human ribosome // Biochim. Biophys. Acta. – 2015. – V. 1849. – P. 930–939.
- 229. Jang C. Y., Kim H. D., Kim J. Ribosomal protein S3 interacts with TRADD to induce apoptosis through caspase dependent JNK activation // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2012. – V. 421. – P. 474–478.
- 230. Kim H. D., Lee J. Y., Kim J. Erk phosphorylates threonine 42 residue of ribosomal protein S3
 // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 333. P. 110–115.
- 231. Kim T. S., Kim H. D., Kim J. PKCdelta–dependent functional switch of rpS3 between translation and DNA repair // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1793. P. 395–405.
- 232. Shin H. S., Jang C. Y., Kim H. D., Kim T. S., Kim S., Kim J. Arginine methylation of ribosomal protein S3 affects ribosome assembly // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2009. – V. 385. – P. 273–278.
- 233. Wan F., Anderson D. E., Barnitz R. A., Snow A., Bidere N., Zheng L., Hegde V., et al. Ribosomal protein S3: a KH domain subunit in NF–kappaB complexes that mediates selective gene regulation // Cell. – 2007. – V. 131. – P. 927–939.
- 234. 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. – P. 535–546.
- 235. 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. P. 21793–21801.
- 236. Lesot H., Kuhl U., Mark K. Isolation of a laminin–binding protein from muscle cell membranes // EMBO J. – 1983. – V. 2. – P. 861–865.

- 237. Malinoff H. L., Wicha M. S. Isolation of a cell surface receptor protein for laminin from murine fibrosarcoma cells // J. Cell. Biol. – 1983. – V. 96. – P. 1475–1479.
- 238. Rao N. C., Barsky S. H., Terranova V. P., Liotta L. A. Isolation of a tumor cell laminin receptor // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1983. V. 111. P. 804–808.
- 239. Wewer U. M., Liotta L. A., Jaye M., Ricca G. A., Drohan W. N., Claysmith A. P., Rao C. N., et al. Altered levels of laminin receptor mRNA in various human carcinoma cells that have different abilities to bind laminin // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1986. V. 83. P. 7137–7141.
- 240. Tohgo A., Takasawa S., Munakata H., Yonekura H., Hayashi N., Okamoto H. Structural determination and characterization of a 40 kDa protein isolated from rat 40 S ribosomal subunit // FEBS Lett. 1994. V. 340. P. 133–138.
- 241. Di Giacomo V., Meruelo D. Looking into laminin receptor: critical discussion regarding the non-integrin 37/67-kDa laminin receptor/RPSA protein // Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. – 2016. – V. 91. – P. 288–310.
- 242. Castronovo V., Taraboletti G., Sobel M. E. Functional domains of the 67–kDa laminin receptor precursor // J. Biol. Chem. – 1991. – V. 266. – P. 20440–20446.
- 243. Landowski T. H., Uthayakumar S., Starkey J. R. Control pathways of the 67 kDa laminin binding protein: surface expression and activity of a new ligand binding domain // Clin. Exp. Metastasis. – 1995. – V. 13. – P. 357–372.
- 244. Jaseja M., Mergen L., Gillette K., Forbes K., Sehgal I., Copie V. Structure–function studies of the functional and binding epitope of the human 37 kDa laminin receptor precursor protein // J. Pept. Res. – 2005. – V. 66. – P. 9–18.
- 245. Kazmin D. A., Hoyt T. R., Taubner L., Teintze M., Starkey J. R. Phage display mapping for peptide 11 sensitive sequences binding to laminin-1 // J. Mol. Biol. 2000. V. 298. P. 431-445.
- 246. Keppel E., Schaller H. C. A 33 kDa protein with sequence homology to the 'laminin binding protein' is associated with the cytoskeleton in hydra and in mammalian cells // J. Cell. Sci. 1991. V. 100. P. 789–797.
- 247. Kim K. J., Chung J. W., Kim K. S. 67–kDa laminin receptor promotes internalization of cytotoxic necrotizing factor 1–expressing *Escherichia coli* K1 into human brain microvascular endothelial cells // J. Biol. Chem. – 2005. – V. 280. – P. 1360–1368.
- 248. Venticinque L., Jamieson K. V., Meruelo D. Interactions between laminin receptor and the cytoskeleton during translation and cell motility // PLoS One. 2011. V. 6. P. e15895.
- 249. Vlatkovic N., Boyd M. T., Rubbi C. P. Nucleolar control of p53: a cellular Achilles' heel and a target for cancer therapy // Cell. Mol. Life Sci. 2014. V. 71. P. 771–791.

- 250. Bhavsar R. B., Makley L. N., Tsonis P. A. The other lives of ribosomal proteins // Hum. Genomics. 2010. V. 4. P. 327–344.
- 251. Patil A. V., Hsieh T. S. Ribosomal protein S3 negatively regulates unwinding activity of RecQ–like helicase 4 through their physical interaction // J. Biol. Chem. – 2017. – V. 292. – P. 4313–4325.
- 252. Wang W., Nag S., Zhang X., Wang M. H., Wang H., Zhou J., Zhang R. Ribosomal proteins and human diseases: pathogenesis, molecular mechanisms, and therapeutic implications // Med. Res. Rev. – 2015. – V. 35. – P. 225–285.
- 253. Zhang Y., O'Leary M. N., Peri S., Wang M., Zha J., Melov S., Kappes D. J., et al. Ribosomal Proteins Rpl22 and Rpl22l1 Control Morphogenesis by Regulating Pre–mRNA Splicing // Cell Rep. – 2017. – V. 18. – P. 545–556.
- 254. Maden B. E., Dent C. L., Farrell T. E., Garde J., McCallum F. S., Wakeman J. A. Clones of human ribosomal DNA containing the complete 18 S–rRNA and 28 S–rRNA genes. Characterization, a detailed map of the human ribosomal transcription unit and diversity among clones // Biochem. J. – 1987. – V. 246. – P. 519–527.
- Garnier J., Gibrat J. F.Robson B. GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence // Methods Enzymol. – 1996. – V. 266. – P. 540–553.
- 256. Jones D. T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices
 // J. Mol. Biol. 1999. V. 292. P. 195-202.
- 257. Pollastri G., Przybylski D., Rost B., Baldi P. Improving the prediction of protein secondary structure in three and eight classes using recurrent neural networks and profiles // Proteins. 2002. V. 47. P. 228–235.
- 258. Ovcharenko I., Nobrega M. A., Loots G. G., Stubbs L. ECR Browser: a tool for visualizing and accessing data from comparisons of multiple vertebrate genomes // Nucleic Acids Res. 2004.
 V. 32 (Web Server issue). P. W280–286.
- 259. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering // Nucleic Acids Res. 1988. V. 16. P. 10881–10890.
- Lambert C., Leonard N., De Bolle X., Depiereux E. ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures // Bioinformatics. - 2002. - V. 18. - P. 1250-1256.
- 261. 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. P. 219–223.
- 262. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Anal. Biochem. 1987. V. 162. P. 156-159.

- Birnboim H. C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucleic Acids Res. – 1979. – V. 7. – P. 1513–1523.
- 264. Tsumoto K., Ejima D., Kumagai I., Arakawa T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies // Protein Expr. Purif. – 2003. – V. 28. – P. 1–8.
- 265. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – V. 227. – P. 680–685.
- 266. Madjar J. J., Arpin M., Buisson M., Reboud J. P. Spot position of rat liver ribosomal proteins by four different two-dimensional electrophoreses in polyacrylamide gel // Mol. Gen. Genet. – 1979. – V. 171. – P. 121–134.
- 267. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – V. 72. – P. 248–254.
- 268. Clarke P. A. RNA footprinting and modification interference analysis // Methods Mol. Biol. 1999. – V. 118. – P. 73–91.
- 269. Hochuli E. Large–scale chromatography of recombinant proteins // J. Chromatogr. 1988. V.
 444. P. 293–302.
- 270. Sreerama N., Venyaminov S. Y., Woody R. W. Analysis of protein circular dichroism spectra based on the tertiary structure classification // Anal. Biochem. 2001. V. 299. P. 271–274.
- 271. Traub P., Nomura M. Structure and function of E. coli ribosomes. V. Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and proteins // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1968. – V. 59. – P. 777–784.
- 272. Lerman M. I., Spirin A. S., Gavrilova L. P., Golov V. F. Studies on the structure of ribosomes.
 II. Stepwise dissociation of protein from ribosomes by caesium chloride and the re–assembly of ribosome–like particles // J. Mol. Biol. 1966. V. 15. P. 268–281.
- 273. Homann H. E., Nierhaus K. H. Ribosomal proteins. Protein compositions of biosynthetic precursors and artifical subparticles from ribosomal subunits in *Escherichia coli* K 12 // Eur J Biochem. 1971. V. 20. P. 249–257.
- 274. Mizushima S., Nomura M. Assembly mapping of 30S ribosomal proteins from *E. coli* // Nature. 1970. V. 226. P. 1214.
- 275. El-Baradi T. T., Raue H. A., De Regt C. H., Planta R. J. Stepwise dissociation of yeast 60S ribosomal subunits by LiCl and identification of L25 as a primary 26S rRNA binding protein // Eur. J. Biochem. 1984. V. 144. P. 393–400.
- Reboud A. M., Buisson M., Madjar J. J., Reboud J. P. Study of mammalian ribosomal protein reactivity in situ. II. – Effect of glutaraldehyde and salts // Biochimie. – 1975. – V. 57. – P. 295–302.

- 277. Welfle H., Henkel B., Bielka H. Ionic interactions in eukaryotic ribosomes: splitting of the subunits of rat liver ribosomes by treatment with monovalent cations // Acta Biol. Med. Ger. 1976. V. 35. P. 401–411.
- 278. Spirin A. S. Structural transformations of ribosomes (dissociation, unfolding and disassembly)
 // FEBS Lett. 1974. V. 40. P. suppl:S38–47.
- 279. Armache J. P., Jarasch A., Anger A. M., Villa E., Becker T., Bhushan S., Jossinet F., et al. Cryo–EM structure and rRNA model of a translating eukaryotic 80S ribosome at 5.5–A resolution // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2010. – V. 107. – P. 19748–19753.
- 280. Graifer D., Karpova G. Structural and functional topography of the human ribosome // Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai). – 2012. – V. 44. – P. 281–299.
- 281. Taylor D. J., Devkota B., Huang A. D., Topf M., Narayanan E., Sali A., Harvey S. C., et al. Comprehensive molecular structure of the eukaryotic ribosome // Structure. – 2009. – V. 17. – P. 1591–1604.
- 282. Ulitin A. B., Agalarov S., Serdyuk I. N. Preparation of a 'beheaded' derivative of the 30S ribosomal subunit // Biochimie. 1997. V. 79. P. 523–526.
- 283. 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. P. 1609–1621.
- 284. Ehresmann C., Baudin F., Mougel M., Romby P., Ebel J. P., Ehresmann B. Probing the structure of RNAs in solution // Nucleic Acids Res. 1987. V. 15. P. 9109–9128.
- 285. Latham J. A., Cech T. R. Defining the inside and outside of a catalytic RNA molecule // Science. – 1989. – V. 245. – P. 276–282.
- 286. Lawley P. D., Shah S. A. Methylation of ribonucleic acid by the carcinogens dimethyl sulphate, N-methyl-N-nitrosourea and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Comparisons of chemical analyses at the nucleoside and base levels // Biochem. J. – 1972. – V. 128. – P. 117– 132.
- 287. Ardini E., Pesole G., Tagliabue E., Magnifico A., Castronovo V., Sobel M. E., Colnaghi M. I., et al. The 67–kDa laminin receptor originated from a ribosomal protein that acquired a dual function during evolution // Mol. Biol. Evol. 1998. V. 15. P. 1017–1025.
- 288. Auth D., Brawerman G. A 33-kDa polypeptide with homology to the laminin receptor: component of translation machinery // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1992. – V. 89. – P. 4368–4372.
- 289. Garcia–Hernandez M., Davies E., Baskin T. I., Staswick P. E. Association of plant p40 protein with ribosomes is enhanced when polyribosomes form during periods of active tissue growth // Plant Physiol. – 1996. – V. 111. – P. 559–568.

- 290. Givant–Horwitz V., Davidson B., Reich R. Laminin–induced signaling in tumor cells // Cancer Lett. – 2005. – V. 223. – P. 1–10.
- 291. Malygin A. A., Bondarenko E. I., Ivanisenko V. A., Protopopova E. V., Karpova G. G., Loktev V. B. C-terminal fragment of human laminin-binding protein contains a receptor domain for venezuelan equine encephalitis and tick-borne encephalitis viruses // Biochemistry (Mosc). 2009. V. 74. P. 1328–1336.
- 292. Brodersen D. E., Clemons W. M., Jr., Carter A. P., Wimberly B. T., Ramakrishnan V. Crystal structure of the 30 S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16 S RNA // J. Mol. Biol. 2002. V. 316. P. 725–768.
- 293. Cannone J. J., Subramanian S., Schnare M. N., Collett J. R., D'Souza L. M., Du Y., Feng B., et al. The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs // BMC Bioinformatics. 2002. V. 3. P. 2.
- 294. Miyamoto A., Usui M., Yamasaki N., Yamada N., Kuwano E., Tanaka I., Kimura M. Role of the N-terminal region of ribosomal protein S7 in its interaction with 16S rRNA which binds to the concavity formed by the beta-ribbon arm and the alpha-helix // Eur. J. Biochem. – 1999. – V. 266. – P. 591–598.
- 295. Rassokhin T. I., Golovin A. V., Petrova E. B., Spiridonova V. A., Karginova O. A., Rozhdestvenskii T. S., Brosius J., et al. [Study of the binding of the S7 protein with 16S rRNA fragment 926–986/1219–1393 as a key step in the assembly of the small subunit of prokaryotic ribosomes] // Mol. Biol. (Mosk). – 2001. – V. 35. – P. 617–627.
- 296. 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. – P. 373–386.
- 297. Powers T., Changchien L. M., Craven G. R., Noller H. F. Probing the assembly of the 3' major domain of 16 S ribosomal RNA. Quaternary interactions involving ribosomal proteins S7, S9 and S19 // J. Mol. Biol. – 1988. – V. 200. – P. 309–319.
- 298. Powers T., Noller H. F. Hydroxyl radical footprinting of ribosomal proteins on 16S rRNA // RNA. 1995. V. 1. P. 194–209.
- 299. Urlaub H., Thiede B., Muller E. C., Brimacombe R., Wittmann–Liebold B. Identification and sequence analysis of contact sites between ribosomal proteins and rRNA in Escherichia coli 30 S subunits by a new approach using matrix–assisted laser desorption/ionization–mass spectrometry combined with N–terminal microsequencing // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 14547–14555.

- 300. Moller K., Zwieb C., Brimacombe R. Identification of the oligonucleotide and oligopeptide involved in an RNA—protein crosslink induced by ultraviolet irradiation of *Escherichia coli* 30 S ribosomal subunits // J. Mol. Biol. – 1978. – V. 126. – P. 489–506.
- 301. Khatter H., Myasnikov A. G., Natchiar S. K., Klaholz B. P. Structure of the human 80S ribosome // Nature. 2015. V. 520. P. 640–645.
- 302. Held W. A., Ballou B., Mizushima S., Nomura M. Assembly mapping of 30 S ribosomal proteins from *Escherichia coli*. Further studies // J Biol Chem. 1974. V. 249. P. 3103–3111.
- 303. Carter A. P., Clemons W. M., Brodersen D. E., Morgan–Warren R. J., Wimberly B. T.Ramakrishnan V. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics // Nature. 2000. V. 407. P. 340–348.
- 304. Gutell R. R., Weiser B., Woese C. R., Noller H. F. Comparative anatomy of 16–S–like ribosomal RNA // Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 1985. V. 32. P. 155–216.
- 305. Grondek J. F.Culver G. M. Assembly of the 30S ribosomal subunit: positioning ribosomal protein S13 in the S7 assembly branch // RNA. 2004. V. 10. P. 1861–1866.
- 306. Selmer M., Dunham C. M., Murphy F. V. t., Weixlbaumer A., Petry S., Kelley A. C., Weir J. R., et al. Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA // Science. 2006. V. 313. P. 1935–1942.
- 307. Yusupova G., Jenner L., Rees B., Moras D., Yusupov M. Structural basis for messenger RNA movement on the ribosome // Nature. – 2006. – V. 444. – P. 391–394.
- 308. Talkington M. W., Siuzdak G., Williamson J. R. An assembly landscape for the 30S ribosomal subunit // Nature. – 2005. – V. 438. – P. 628–632.
- 309. Serganov A. A., Masquida B., Westhof E., Cachia C., Portier C., Garber M., Ehresmann B., et al. The 16S rRNA binding site of *Thermus thermophilus* ribosomal protein S15: comparison with Escherichia coli S15, minimum site and structure // RNA. 1996. V. 2. P. 1124–1138.
- 310. Batey R. T., Williamson J. R. Effects of polyvalent cations on the folding of an rRNA three– way junction and binding of ribosomal protein S15 // RNA. – 1998. – V. 4. – P. 984–997.
- 311. Nikulin A., Serganov A., Ennifar E., Tishchenko S., Nevskaya N., Shepard W., Portier C., et al. Crystal structure of the S15–rRNA complex // Nat. Struct. Biol. 2000. V. 7. P. 273–277.
- 312. Orr J. W., Hagerman P. J., Williamson J. R. Protein and Mg(2+)–induced conformational changes in the S15 binding site of 16 S ribosomal RNA // J. Mol. Biol. – 1998. – V. 275. – P. 453–464.
- Batey R. T., Williamson J. R. Interaction of the *Bacillus stearothermophilus* ribosomal protein S15 with 16 S rRNA: I. Defining the minimal RNA site // J. Mol. Biol. – 1996. – V. 261. – P. 536–549.

- 314. Golovin A. V., Khayrullina G. A., Kraal B., Kopylov C. A. Identification of Novel RNA– Protein Contact in Complex of Ribosomal Protein S7 and 3'–Terminal Fragment of 16S rRNA in E. coli // Acta Naturae. – 2012. – V. 4. – P. 65–72.
- 315. Diedrich G., Spahn C. M., Stelzl U., Schafer M. A., Wooten T., Bochkariov D. E., Cooperman B. S., et al. Ribosomal protein L2 is involved in the association of the ribosomal subunits, tRNA binding to A and P sites and peptidyl transfer // EMBO J. 2000. V. 19. P. 5241–5250.
- 316. Uhlein M., Weglohner W., Urlaub H., Wittmann-Liebold B. Functional implications of ribosomal protein L2 in protein biosynthesis as shown by in vivo replacement studies // Biochem. J. - 1998. - V. 331. - P. 423-430.
- 317. Nissen P., Hansen J., Ban N., Moore P. B., Steitz T. A. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis // Science. 2000. V. 289. P. 920–930.
- 318. Cooperman B. S., Wooten T., Romero D. P., Traut R. R. Histidine 229 in protein L2 is apparently essential for 50S peptidyl transferase activity // Biochem. Cell. Biol. – 1995. – V. 73. – P. 1087–1094.
- 319. Dunkle J. A., Wang L., Feldman M. B., Pulk A., Chen V. B., Kapral G. J., Noeske J., et al. Structures of the bacterial ribosome in classical and hybrid states of tRNA binding // Science. – 2011. – V. 332. – P. 981–984.
- 320. Blaha G., Gurel G., Schroeder S. J., Moore P. B., Steitz T. A. Mutations outside the anisomycin-binding site can make ribosomes drug-resistant // J. Mol. Biol. – 2008. – V. 379. – P. 505–519.
- 321. Youngman E. M., Brunelle J. L., Kochaniak A. B., Green R. The active site of the ribosome is composed of two layers of conserved nucleotides with distinct roles in peptide bond formation and peptide release // Cell. – 2004. – V. 117. – P. 589–599.
- 322. Schmeing T. M., Huang K. S., Strobel S. A., Steitz T. A. An induced-fit mechanism to promote peptide bond formation and exclude hydrolysis of peptidyl-tRNA // Nature. – 2005. – V. 438. – P. 520–524.
- 323. Harms J., Schluenzen F., Zarivach R., Bashan A., Bartels H., Agmon I., Yonath A. Protein structure: experimental and theoretical aspects // FEBS Lett. 2002. V. 525. P. 176–178.
- 324. Armache J. P., Anger A. M., Marquez V., Franckenberg S., Frohlich T., Villa E., Berninghausen O., et al. Promiscuous behaviour of archaeal ribosomal proteins: implications for eukaryotic ribosome evolution // Nucleic Acids Res. – 2013. – V. 41. – P. 1284–1293.
- 325. Agalarov S. C., Selivanova O. M., Zheleznyakova E. N., Zheleznaya L. A., Matvienko N. I., Spirin A. S. Independent in vitro assembly of all three major morphological parts of the 30S ribosomal subunit of *Thermus thermophilus* // Eur. J. Biochem. – 1999. – V. 266. – P. 533–537.

- 326. Samaha R. R., O'Brien B., O'Brien T. W., Noller H. F. Independent in vitro assembly of a ribonucleoprotein particle containing the 3' domain of 16S rRNA // Proc. Natl. Acad. Sci U S A. – 1994. – V. 91. – P. 7884–7888.
- 327. Weitzmann C. J., Cunningham P. R., Nurse K., Ofengand J. Chemical evidence for domain assembly of the Escherichia coli 30S ribosome // FASEB J. 1993. V. 7. P. 177–180.
- 328. Krzyzosiak W., Denman R., Nurse K., Hellmann W., Boublik M., Gehrke C. W., Agris P. F., et al. In vitro synthesis of 16S ribosomal RNA containing single base changes and assembly into a functional 30S ribosome // Biochemistry. 1987. V. 26. P. 2353–2364.
- 329. Semrad K., Green R. Osmolytes stimulate the reconstitution of functional 50S ribosomes from in vitro transcripts of *Escherichia coli* 23S rRNA // RNA. 2002. V. 8. P. 401–411.
- 330. Hornbeck P. V., Kornhauser J. M., Tkachev S., Zhang B., Skrzypek E., Murray B., Latham V., et al. PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40 (Database issue). P. D261–270.
- 331. Mitterer V., Murat G., Rety S., Blaud M., Delbos L., Stanborough T., Bergler H., et al. Sequential domain assembly of ribosomal protein S3 drives 40S subunit maturation // Nat Commun. – 2016. – V. 7. – P. 10336.
- 332. Louie D. F., Resing K. A., Lewis T. S., Ahn N. G. Mass spectrometric analysis of 40 S ribosomal proteins from Rat–1 fibroblasts // J. Biol. Chem. – 1996. – V. 271. – P. 28189– 28198.
- 333. Quade N., Boehringer D., Leibundgut M., van den Heuvel J., Ban N. Cryo-EM structure of Hepatitis C virus IRES bound to the human ribosome at 3.9-A resolution // Nat. Commun. – 2015. – V. 6. – P. 7646.
- 334. Kolupaeva V. G., Pestova T. V., Hellen C. U. An enzymatic footprinting analysis of the interaction of 40S ribosomal subunits with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus // J. Virol. 2000. V. 74. P. 6242–6250.
- 335. Demeshkina N. A., Laletina E. S., Meshchaninova M. I., Repkova M. N., Ven'iaminova A. G., Graifer D. M., Karpova G. G. The mRNA codon environment at the P and E sites of human ribosomes deduced from photo crosslinking with pUUUGUU // Mol. Biol. (Mosk). – 2003. – V. 37. – P. 147–155.
- 336. Lancaster L., Noller H.F. Involvement of 16S rRNA nucleotides G1338 and A1339 in discrimination of initiator tRNA // Mol. Cell. – 2005. – V. 20. – P. 623–632.
- 337. Yu Y., Marintchev A., Kolupaeva V. G., Unbehaun A., Veryasova T., Lai S. C., Hong P., Wagner G., Hellen C. U., Pestova T.V. Position of eukaryotic translation initiation factor

eIF1A on the 40S ribosomal subunit mapped by directed hydroxyl radical probing // Nucleic Acids Res. – 2009. – V. 37. – P. 5167–5182.

- 338. Passmore L. A., Schmeing T. M., Maag D., Applefield D. J., Acker M. G., Algire M A., Lorsch J. R. Ramakrishnan V. The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome // Mol. Cell. 2007. V. 26. P. 41–50.
- 339. Matsuda D., Mauro V. P. Base pairing between hepatitis C virus RNA and 18S rRNA is required for IRES-dependent translation initiation in vivo // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2014. – V. 111. – P. 15385–15389.
- 340. Filbin M. E., Kieft J. S. HCV IRES domain IIb affects the configuration of coding RNA in the 40S subunit's decoding groove // RNA. 2011. V. 17. P. 1258–1273.
- 341. Berry K. E., Waghray S., Doudna J. A. The HCV IRES pseudoknot positions the initiation codon on the 40S ribosomal subunit // RNA. – 2010. – V. 16. – P. 1559–1569.
- 342. Fraser C. S., Hershey J. W., Doudna J. A. The pathway of hepatitis C virus mRNA recruitment to the human ribosome // Nat. Struct. Mol. Biol. 2009. V. 16. P. 397–404.
- 343. Yamamoto H., Collier M., Loerke J., Ismer J., Schmidt A., Hilal T., Sprink T., et al. Molecular architecture of the ribosome-bound Hepatitis C Virus internal ribosomal entry site RNA // EMBO J. – 2015. – V. 34. – P. 3042–3058.
- 344. Demeshkina N., Laletina E., Meschaninova M., Ven'yaminova A., Graifer D., Karpova G. Positioning of mRNA codons with respect to 18S rRNA at the P and E sites of human ribosome // Biochim. Biophys. Acta. – 2003. – V. 1627. – P. 39–46.
- 345. 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. – P. 122–129.
- 346. Budkevich T. V., Giesebrecht J., Behrmann E., Loerke J., Ramrath D. J., Mielke T., Ismer J., et al. Regulation of the mammalian elongation cycle by subunit rolling: a eukaryotic–specific ribosome rearrangement // Cell. – 2014. – V. 158. – P. 121–131.
- 347. 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. – P. 1229–1240.
- 348. 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. Acta. – 2017. – V. 1860. – P. 782– 793.

- 349. Balakin A., Skripkin E., Shatsky I., Bogdanov A. Transition of the mRNA sequence downstream from the initiation codon into a single-stranded conformation is strongly promoted by binding of the initiator tRNA // Biochim. Biophys. Acta 1990. V. 1050. P. 119–123.
- 350. Wollerton M. C., Gooding C., Wagner E. J., Garcia–Blanco M. A., Smith C. W. Autoregulation of polypyrimidine tract binding protein by alternative splicing leading to nonsense–mediated decay // Mol. Cell. – 2004. – V. 13. – P. 91–100.
- 351. Jodelka F. M., Ebert A. D., Duelli D. M., Hastings M. L. A feedback loop regulates splicing of the spinal muscular atrophy-modifying gene, SMN2 // Hum. Mol. Genet. – 2010. – V. 19. – P. 4906–4917.
- 352. Rossbach O., Hung L. H., Schreiner S., Grishina I., Heiner M., Hui J., Bindereif A. Auto- and cross-regulation of the hnRNP L proteins by alternative splicing // Mol. Cell. Biol. – 2009. – V. 29. – P. 1442–1451.
- 353. 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. P. 134–140.
- 354. Chen M., Manley J. L. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2009. V. 10. P. 741–754.
- 355. McManus C. J., Graveley B. R. RNA structure and the mechanisms of alternative splicing // Curr. Opin. Genet. Dev. 2011. V. 21. P. 373–379.
- 356. Antoine M., Reimers K., Wirz W., Gressner A. M., Muller R., Kiefer P. Identification of an unconventional nuclear localization signal in human ribosomal protein S2 // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2005. – V. 335. – P. 146–153.
- 357. Milligan J. F., Groebe D. R., Witherell G. W., Uhlenbeck O. C. Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates // Nucleic Acids Res. – 1987. – V. 15. – P. 8783–8798.
- 358. Wahl M. C., Will C. L., Luhrmann R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine // Cell. 2009. V. 136. P. 701–718.
- 359. Ding Y., Chan C. Y., Lawrence C. E. RNA secondary structure prediction by centroids in a Boltzmann weighted ensemble // RNA. – 2005. – V. 11. – P. 1157–1166.
- 360. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction // Nucleic Acids Res. - 2003. - V. 31. - P. 3406-3415.
- 361. Chao J. A.Williamson J. R. Joint X-ray and NMR refinement of the yeast L30e-mRNA complex // Structure. 2004. V. 12. P. 1165–1176.
- 362. Dabeva M. D., Post–Beittenmiller M. A., Warner J. R. Autogenous regulation of splicing of the transcript of a yeast ribosomal protein gene // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1986. – V. 83. – P. 5854–5857.

- 363. Fewell S. W., Woolford J. L., Jr. Ribosomal protein S14 of *Saccharomyces cerevisiae* regulates its expression by binding to RPS14B pre–mRNA and to 18S rRNA // Mol. Cell. Biol. – 1999. – V. 19. – P. 826–834.
- 364. Li Z., Paulovich A. G., Woolford J. L., Jr. Feedback inhibition of the yeast ribosomal protein gene CRY2 is mediated by the nucleotide sequence and secondary structure of CRY2 premRNA // Mol. Cell. Biol. – 1995. – V. 15. – P. 6454–6464.
- 365. Vilardell J., Warner J. R. Regulation of splicing at an intermediate step in the formation of the spliceosome // Genes Dev. 1994. V. 8. P. 211–220.
- 366. Vilardell J., Yu S. J., Warner J. R. Multiple functions of an evolutionarily conserved RNA binding domain // Mol. Cell. 2000. V. 5. P. 761–766.
- 367. Schafer T., Maco B., Petfalski E., Tollervey D., Bottcher B., Aebi U., Hurt E. Hrr25–dependent phosphorylation state regulates organization of the pre–40S subunit // Nature. 2006. V. 441. P. 651–655.
- 368. Mitrovich Q. M., Anderson P. Unproductively spliced ribosomal protein mRNAs are natural targets of mRNA surveillance in *C. elegans* // Genes Dev. 2000. V. 14. P. 2173–2184.
- 369. Gopanenko A. V., Malygin A. A., Tupikin A. E., Laktionov P. P., Kabilov M. R., Karpova G. G. Human ribosomal protein eS1 is engaged in cellular events related to processing and functioning of U11 snRNA // Nucleic Acids Res. 2017. V. 45. P. 9121–9137.

Благодарности

Автор выражает огромную благодарность своему научному консультанту Галине Георгиевне Карповой, зав. Лаборатории структуры и функции рибосом ИХБФМ СО РАН, за всестороннюю поддержку на всех этапах работы, пример настоящего критического подхода к выполнению научных задач и аналитического научного мышления, и за бесценные наставления по подготовке рукописи.

Автор сердечно благодарит бывших и нынешних сотрудников Лаборатории структуры и функции рибосом ИХБФМ СО РАН, с которыми ему довелось работать и которые способствовали проведению высококлассных исследований в лаборатории.

Отдельную благодарность автор выражает Дмитрию Маратовичу Грайферу за полезные советы и консультации, а также Константину Николаевичу Булыгину и Елене Сергеевне Бабайловой за помощь и поддержку.

Автор искренне благодарит всех сотрудников, которые работали под его руководством, в том числе начиная со студенческой скамьи, за терпение, трудолюбие, отзывчивость и восприимчивость к новым идеям: Антона Валерьевича Иванова, Дарью Дмитриевну Яньшину, Наталью Михайловну Парахневич, Оксану Ивановну Барановскую, Ольгу Александровну Косинову, Алексея Александровича Ильина и Александра Витальевича Гопаненко.

Автор благодарит соавторов своих работ проф. Ивана Николаевича Шатского, проф. Валерия Борисовича Локтева и проф. Иена Эперона за ценные советы по проведению исследований, расширение научного кругозора и плодотворные дискусии.

Автор также благодарит членов семьи и близких друзей за поддержку, терпение и понимание.