

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

На правах рукописи

Очкасова Анастасия Сергеевна
**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РИБОСОМНОГО БЕЛКА α 33 ЧЕЛОВЕКА С АПУРИН-
АПИРИМИДИНОВЫМИ САЙТАМИ В ДНК И мРНК**

1.4.9 – биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель
д.х.н., доцент Грайфер Д. М.

Новосибирск – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1 УЧАСТИЕ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ ЭУКАРИОТ В ПРОЦЕССАХ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КЛЕТКЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	12
1.1. Типы повреждений нуклеиновых кислот.....	13
1.1.1. Повреждения в ДНК.....	16
1.1.2. Повреждения в РНК.....	19
1.1.3. Клеточный ответ на повреждения в ДНК.....	22
1.1.4. Клеточный ответ на повреждения в РНК.....	29
1.2. Участие рибосомных белков в репарации повреждений ДНК.....	31
1.2.1. Рибосомные белки, проявляющие свойства ферментов репарации ДНК.....	31
1.2.2. Рибосомные белки как регуляторы системы репарации.....	34
1.2.3. Рибосомные белки, участвующие в регуляции систем активации апоптоза, как ответа на повреждение ДНК.....	36
1.3. Участие рибосомных белков в контроле качества РНК.....	38
1.4. Биомедицинские аспекты участия рибосомных белков в репарации ДНК и контроле качества РНК.....	41
1.5. Заключение.....	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	47
2.1. Материалы.....	47
2.2. Методики эксперимента.....	50
2.2.1. Выделение рибосомных субчастиц 40S, 60S и пре-40S.....	50
2.2.2. Выделение рекомбинантного белка uS3.....	51
2.2.3. Получение олигонуклеотидов, содержащих АП сайт и другие модифицированные звенья.....	52
2.2.4. Сшивка 40S субчастиц, пре-40S частиц или гес-uS3 с модельными ДНК.....	53
2.2.5. Определение уровня связывания модельных ДНК с гес-uS3.....	54
2.2.6. Сшивка гес-uS3 с модельной ДНК и специфическое расщепление сшитого белка.....	55
2.2.7. Получение комплексов 80S рибосом с тРНК и их сшивка с диальдегидным производным нонарибонуклеотида.....	55
2.2.8. Сшивка белка uS3 в составе 80S рибосом с аналогами мРНК, несущими АП сайты и/или диальдегидным производным нонарибонуклеотида AAUAAAUAU...56	56
2.2.9. Определение степени связывания меченых аналогов мРНК с 80S рибосомами.....	57
2.2.10. Анализ расщепления аналогов ДНК по АП сайтам рекомбинантным белком uS3 и белком uS3 в составе рибосомы.....	57
2.2.11. Определение участков связывания геномной ДНК человека с белком uS3 в составе хроматина.....	57
2.2.12. Претрансляционная обработка лизата ретикулоцитов кролика и сшивка рибосом с мРНК, содержащей АП сайт.....	58

2.2.13. Постмечение РНК.....	59
2.2.14. Трансляция мРНК в ЛРК с использованием [³⁵ S]-метионина ([³⁵ S]-Met).....	59
ГЛАВА 3. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РИБОСОМНОГО БЕЛКА uS3 ЧЕЛОВЕКА	
С АПУРИН-АПИРИМИДИНОВЫМИ САЙТАМИ В ДНК И В мРНК	
(РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ).....	61
3.1. Способность белка uS3 в составе 40S субчастиц рибосом сшиваться с АП сайтом в оц-ДНК.....	62
3.2. Различия во взаимодействиях белка uS3 в составе 40S субчастиц рибосом и изолированного uS3 с АП сайтами ДНК.....	64
3.3. Участок сшивки белка uS3 в составе 40S субчастиц рибосом с АП сайтом оц-ДНК.....	65
3.4. Анализ АП-лиазной активности изолированного рибосомного белка uS3.....	67
3.5. Участки связывания uS3 на геномной ДНК в составе хроматина.....	69
3.6. Валидация способности белка uS3 в составе пре-40S частиц взаимодействовать с АП сайтами в оц-ДНК.....	70
3.7. Анализ зависимости средства рибосомного белка uS3 к оц-ДНК от наличия в ней повторов TGGAA.....	72
3.8. Влияние положения АП сайта в ДНК и ее последовательности на эффективность расщепления белком uS3 по этому сайту.....	74
3.9. Аминокислотные остатки рибосомного белка uS3, взаимодействующие с АП сайтом в составе модельной ДНК.....	76
3.10. Способность мРНК, связанной в мРНК-связывающем канале рибосомы, сшиваться посредством АП сайта с пептидом 55-64 белка uS3.....	84
3.11. Сшивки мРНК, содержащей АП сайт, с рибосомным белком uS3 в процессе трансляции.....	89
3.12. Сшивка аналогов мРНК с рибосомами в процессе трансляции.....	92
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	100
ВЫВОДЫ.....	102
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	103

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

[³⁵S]Met – метионин, содержащий изотоп ³⁵S

2'-ОН-группа – гидроксильная группа при атоме углерода в положении 2' в пентозном кольце нуклеозида

40S и 60S – малая и большая субчастицы эукариотической рибосомы

80S – эукариотическая рибосома

8-охо-G, 8охоG – 8-оксогуанин

АТФ – аденозин-5'-трифосфат

BER – Base Excision Repair, эксцизионная репарация ДНК

CNBr – бромциан

dRP – остаток дезоксирибозы-фосфата

EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота

EGTA – этиленгликоль-бис(β-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота

E-участок рибосомы – участок связывания деацелированной тРНК пред ее выходом из рибосомы

GMPPNP – гуанозин 5'-(β, γ)-метилен-трифосфата, негидролизуемый аналог GTP

GTP – гуанозин-5'-трифосфат

HEK293T – трансфецируемая клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека (от англ. Human Embryonic Kidney 293)

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

HR – Homologous Recombination, гомологичная рекомбинация

IPTG – изопропил-β-D-тиогалактопиранозида

K_d – константа диссоциации

MMR – Mismatch Repair, репарация неканонических пар оснований

NAD – участки хроматина, ассоциированные с ядрышком (от англ. nucleolus-associated chromatin regions)

NER – Nucleotide Excision Repair, эксцизионная репарация нуклеотидов

NGD – No-Go Decay, No-go деградация

NHEJ – Non Homologous Ends Joining, негомологичное соединение концов

NRD – Non-functional rRNA decay, деградация нефункциональной рРНК

NTCB – 2-нитро-5-тиоцианобензойная кислота

Phe-тРНК^{Phe} – тРНК^{Phe} с фенилаланином

PMSF – фенилметилсульфонил фторид

P-участок рибосомы – пептидил-тРНК связывающий участок рибосомы

rec-uS3 – рекомбинантный рибосомный белок uS3 человека

RQC – Ribosome-based Quality Control, контроль качества, опосредованный рибосомами

SDS – додецилсульфат натрия

SDS-ПААГ – полиакриламидный гель, содержащий 0.1%-ный SDS

THF – тетрагидрофуран

TP40 – суммарный белок 40S рибосомных субчастиц

uS3D – рибосомный белок uS3 дрозофилы

uS3-p – фосфорилированный белок uS3

aa – аминокислотные остатки

АП-сайт – апурин-апиримидиновый сайт

АП-ДНК – ДНК, содержащая АП-сайт

A-участок рибосомы – аминоацил-тРНК связывающий участок рибосомы

АФК – активные формы кислорода

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ДНКаза – дезоксирибонуклеаза

ДТТ – дитиотреитол

дц-АП-ДНК – двуцепочечная АП-ДНК

дц-ДНК – двуцепочечная ДНК

кДНК – комплементарная ДНК

КН-домен – К гомологичный домен (от англ. K homology domain)

ЛРК – лизат ретикулоцитов кролика

миРНК – микроРНК

МНаза – микрококковая эндонуклеаза

мРНК – матричная РНК

мтДНК – митохондриальная ДНК

мякРНК – малая ядрышковая РНК

мяРНК – малая ядерная РНК

НК – нуклеиновая кислота

нкРНК – некодирующая молекула РНК

об/мин – оборотов в минуту

ОЕ₂₆₀ – оптические единицы при длине волны 260 нм)

оц-АП-ДНК – одноцепочечная АП-ДНК

оц-ДНК – одноцепочечная ДНК

ПААГ – полиакриламидный гель

рибо-ГТР – ГТР, у которого углерод в положении 2' в пентозном кольце не содержит гидроксильных групп

рРНК – рибосомная РНК

Трис – трис(гидроксиметил)аминометана

тРНК – транспортная РНК

тРНК_i^{Met} – инициаторная метиониновая тРНК

тРНК^{Phe} – фенилаланиновая тРНК

тРНК^{Val} – валиновая тРНК

УФ-облучение – ультрафиолетовое облучение

УФ-свет – ультрафиолетовый свет

ssAP – оц-АП-ДНК

dsAP – дц-АП-ДНК

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время известно, что многие рибосомные белки не только участвуют в трансляции в качестве компонентов рибосомы, но также вовлечены в различные клеточные процессы, не связанные с формированием функционально компетентной структуры рибосомы (см., например, [1-3]). Экстрарибосомные или нетрансляционные функции рибосомных белков в этих процессах обычно связаны с их взаимодействиями с нуклеиновыми кислотами и/или другими белками. Такого рода функции называют также внерибосомными, поскольку подавляющее большинство рибосомных белков (за исключением эукариотических рибосомных белков RACK1 и L13a) выполняет их, будучи в изолированном состоянии, т.е. находясь вне рибосомы.

Эволюционно консервативный рибосомный белок uS3 эукариот является одним из ключевых участников процесса трансляции, поскольку он принимает непосредственное участие в формировании мРНК-связывающего центра рибосомы и во взаимодействиях с факторами инициации трансляции. Одновременно белки семейства uS3 являются наиболее яркими представителями рибосомных белков с разнообразными внерибосомными функциями, большинство из которых связано с их взаимодействием с ДНК (для обзора см. [2-5]). Несмотря на то, что внерибосомные функции рибосомных белков являются предметом изучения уже более 20 лет, до сих пор появляются работы, открывающие новые, ранее неизвестные функции белков данного семейства [6, 7]. К наиболее давно известным и достаточно хорошо изученным неканоническим функциям эукариотических рибосомных белков семейства uS3 относится их участие в регуляции транскрипции генов, находящихся под контролем транскрипционного фактора NF-κB [8, 9], а также способность участвовать в эксцизионной репарации повреждений в ДНК [10-17]. Последнее проявляется, в частности, в наличии у них так называемой АП-лиазной активности – способности расщеплять ДНК по апурин-апиримидиновым (АП) сайтам, которые образуются в ДНК в результате действия активных форм кислорода при окислительном стрессе, а также спонтанно в отсутствие стресса. В этом плане оказался наиболее изученным рибосомный белок uS3 человека (см., например, [12, 17-19]); однако на момент начала настоящей работы многие аспекты участия этого белка в репарации ДНК оставались неясными. Например, было неизвестно, обладает ли uS3 активностью ферментов репарации, будучи в составе 40S рибосомной субчастицы, и какие последовательности или структурные мотивы ДНК предпочтительно взаимодействуют с изолированным uS3. Кроме того, было не ясно, где и когда этот белок реально участвует в репарации в клетке и какой участок в нем отвечает за АП-лиазную активность. Наконец, было не выяснено, может ли uS3 в составе 40S-субчастиц

взаимодействовать с АП-сайтами в мРНК и таким образом принимать участие в контроле качества мРНК в процессе трансляции. Понимание молекулярных механизмов функционирования систем, обеспечивающих стабильность генома, – репарации ДНК и контроля качества мРНК имеет фундаментальное значение, поскольку известно, что нарушения в этих системах являются причинами развития многих серьезных патологий. Так, нарушения в системах репарации ДНК приводят к таким патологиям, как рак и нейродегенеративные заболевания. Накопление поврежденных мРНК в клетках также связывают с развитием различных нейродегенеративных заболеваний, в первую очередь, болезнью Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона.

Цель данной работы – исследование функций рибосомного белка uS3 человека в составе зрелых цитоплазматических 40S субчастиц рибосом или ядерных пре-40S частиц и в свободном состоянии, связанных с его взаимодействиями с АП-сайтами в ДНК и мРНК, ассоциированными соответственно с процессами репарации ДНК и контроля качества мРНК.

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

1. Выяснить, способен ли белок uS3 в составе зрелых цитоплазматических 40S субчастиц или ядерных пре-40S субчастиц рибосом человека проявлять активность ферментов репарации ДНК, в частности взаимодействовать с АП-сайтами.
2. Идентифицировать участки связывания рибосомного белка uS3 на геномной ДНК человека в составе хроматина с использованием метода ChIP-Seq на клетках HEK293.
3. Определить аминокислотные остатки свободного рибосомного белка uS3, непосредственно участвующие в формировании АП-лиазного каталитического центра.
4. Установить, способен ли белок uS3 в составе 40S субчастицы взаимодействовать с АП-сайтом в мРНК, связанной в рибосомном канале.
5. Выяснить, может ли взаимодействие рибосомного белка uS3 с АП-сайтом в мРНК происходить непосредственно в процессе трансляции.

Научная новизна и практическая ценность

В настоящей работе впервые проведен анализ АП-лиазной активности белка uS3 человека в свободном состоянии и в составе 40S рибосомных субчастиц по отношению к двуцепочечной (дц) и одноцепочечной (оц) ДНК, определены участки связывания uS3 на хроматине и установлены пептиды, участвующие во взаимодействии с АП-сайтами в ДНК или мРНК. Получены данные, указывающие на новую функцию uS3 в составе рибосомы – участие в контроле качества мРНК.

С использованием модельных ДНК, содержащих АП-сайты, показано, что изолированный рекомбинантный рибосомный белок uS3 (rec-uS3) расщепляет оц-ДНК по АП-сайту намного эффективнее, чем дц-ДНК, и что uS3 в составе зрелых цитоплазматических 40S субчастиц рибосом полностью лишен АП-лиазной активности. Обнаружено, что рибосомный белок uS3 в обеих формах способен сшиваться с АП-сайтами в оц-ДНК, тогда как в сшивке с АП-сайтами в дц-ДНК может участвовать только rec-uS3. Установлен пептид белка uS3 в составе зрелых цитоплазматических 40S рибосомных субчастиц, сшивающийся с АП-сайтами в оц-ДНК, и выявлено, что uS3 не сшивается с АП-сайтами, будучи в составе ядерных пре-40S частиц. С использованием метода, основанного на иммунопреципитации хроматина (ChIP) и высокопроизводительном секвенировании ДНК (Seq), примененного к клеткам HEK293, определены участки геномной ДНК, взаимодействующие с рибосомным белком uS3. Обнаружено, что эти участки находятся преимущественно в прицентромерных районах хроматина и в доменах, ассоциированных с ядрышком, где хроматин менее конденсирован и более доступен для ДНК-связывающих белков. Из результатов по связыванию rec-uS3 с различными модельными оц-ДНК, последовательности которых были выбраны на основе анализа данных ChIP-Seq, сделано заключение, что выбор белком uS3 участков для связывания в геномной ДНК определяется в основном не повышенным сродством к каким-либо последовательностям, а их физической доступностью. С использованием разработанного ранее в лаборатории подхода к установлению аминокислотных остатков белков, сшивающихся с аналогами мРНК, определен район rec-uS3, содержащий остаток, образующий ковалентную связь с АП-сайтом в оц-ДНК на стадии ее расщепления по этому сайту. Тем самым впервые получены данные об аминокислотных остатках изолированного рибосомного белка uS3, непосредственно участвующих в формировании его АП-лиазного центра.

Обнаружено, что мРНК, содержащая АП-сайт, может посредством него сшиваться с пептидом 55-64 белка uS3, находящимся на внешней поверхности 40S субчастицы недалеко от участка входа мРНК в рибосомный канал. Показано, что такая сшивка может происходить непосредственно в процессе трансляции поврежденной мРНК в бесклеточной белоксинтезирующей системе, приводя к образованию трансляционного комплекса с ковалентно фиксированной на рибосоме мРНК. Известно, что трансляционные комплексы с мРНК, «застрявшей» на рибосоме, являются мишенями для пути No-Go Decay, предназначенного для их разборки и деградации поврежденных мРНК и «недосинтезированных» пептидов. Следовательно, полученные результаты указывают на существование неизвестного ранее молекулярного механизма, посредством которого

рибосомы участвуют в контроле качества мРНК, основанном на ковалентной фиксации мРНК на 40S субчастице за счет взаимодействия АП-сайта с белком uS3.

Таким образом, результаты настоящего исследования значительно расширили знания о неканонических функциях рибосомного белка uS3 человека как в составе рибосомы, так и вне ее. Полученные в ходе исследования результаты могут иметь принципиальное значение для понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе развития многих опасных патологий, связанных с нарушениями в процессах репарации повреждений ДНК и с накоплением поврежденных мРНК.

Положения, выносимые на защиту

1. Белок uS3 в составе зрелых цитоплазматических 40S субчастиц рибосом человека не обладает АП-лиазной активностью, но может сшиваться посредством своего пептида 55-64 с АП-сайтом в оц-ДНК; такой сшивки не происходит, когда uS3 находится в составе ядерных пре-40S частиц.
2. АП-лиазная активность изолированного белка uS3 по отношению к оц-ДНК существенно выше, чем к дц-ДНК. При расщеплении АП-сайта uS3 образует ковалентные аддукты как с продуктом расщепления ДНК, так и, в меньшей степени, с нерасщепленной ДНК; это расщепление происходит с участием района 155-192 белка uS3.
3. В клеточном ядре изолированный белок uS3 взаимодействует преимущественно с прицентромерными районами хромосом и доменами хроматина, ассоциированными с ядрышком.
4. Синтетические аналоги мРНК, фиксированные в канале рибосомы кодон-антикодоновым взаимодействием с тРНК в Р-участке, способны сшиваться с пептидом 55-64 белка uS3 с помощью АП-сайта, находящегося вне рибосомы вблизи участка входа мРНК в канал.
5. Синтетические аналоги мРНК, содержащие АП-сайт, могут сшиваться через этот сайт с пептидом 55-64 белка uS3 в процессе трансляции. Сшивка происходит, когда в ходе движения мРНК относительно рибосомы АП-сайт оказывается в наиболее благоприятном положении относительно этого пептида.

Степень достоверности и апробация результатов

По результатам работы опубликовано 5 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Основные результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: VII Российский

симпозиум «Белки и пептиды» (12-17 июля 2015 г., Новосибирск, Россия); международная конференция «Химическая биология-2016», посвященная 90-летию академика Д.Г.Кнорре (24-29 июля 2016 г., Новосибирск, Россия); II Всероссийская конференция с международным участием «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (18-23 июня 2017 г., Новосибирск, Россия); международная научная конференция «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» и VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (18-22 сентября 2017 г., Москва, Россия); XVIII Всероссийский симпозиум «Структура и функции клеточного ядра» (16-18 октября 2018 г., Санкт-Петербург, Россия), 44th FEBS Congress (6-11 July, 2019, Krakow, Poland); X Российский симпозиум «Белки и пептиды» (3-7 октября 2022 г., Сочи, Россия).

Личный вклад автора

Представленные в диссертационной работе результаты в основном получены лично автором. Выделение пре-40S субчастиц рибосом из ядер клеток HEK293T проведено в ЛСФР ИХБФМ СО РАН А.В. Ивановым. Пробоподготовка ChIP-Seq образцов для получения библиотек ДНК выполнена в ЛСФР А.В. Гопаненко. Приготовление библиотек ДНК с их последующим высокопроизводительным секвенированием и первичной обработкой данных проведено в ЦПК «Геномика» ИХБФМ СО РАН А.Е. Тупикиным и М.Р. Кабиловым; биоинформатический анализ данных выполнен М.Р. Кабиловым.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 123 страницах, содержит 36 рисунков, 3 таблицы. Библиография включает 281 литературный источник.

ГЛАВА 1. УЧАСТИЕ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ ЭУКАРИОТ В ПРОЦЕССАХ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КЛЕТКЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Центральная догма жизни на молекулярном уровне заключается в передаче генетической информации от ДНК к РНК и ее последующей реализации в виде полипептидных цепей белков, а также в самовоспроизведении ДНК. В течение всей жизни клетка претерпевает воздействие экзогенных и эндогенных факторов разного рода на процессы реализации и воспроизведения генетической информации. Различные виды ионизирующего излучения, УФ-свет, мутагенные химические вещества (например, активные электрофилы, такие как алкилирующие агенты) атакуют клетку извне; кроме того, активные формы кислорода, спонтанно образующиеся в клетке в результате внутриклеточных процессов и/или окислительного стресса, повреждают нуклеиновые кислоты [20]. В результате действия данных факторов под ударом оказывается правильность передачи генетической информации, что сказывается на нормальном функционировании клетки; накопление повреждений в нуклеиновых кислотах, в конечном счете, может приводить к гибели клетки [21, 22]. Здоровая клетка человека получает порядка 10 тысяч повреждений в день [20, 21], и это только в ДНК. Подобно ДНК, РНК уязвима к химическим воздействиям из эндогенных и экзогенных источников. Учитывая центральную роль РНК во многих фундаментальных биологических процессах, включая трансляцию и сплайсинг, можно полагать, что повреждение ее звеньев оказывает пагубное влияние на протекание этих процессов. Есть данные, свидетельствующие о связи между повреждениями в РНК и нейродегенеративными расстройствами. Известно, что у пациентов с болезнью Альцгеймера в пораженной области мозга повреждено до 50% всей мРНК [23], в то время как в клетках лобных долей мозга здорового человека окислению подвергается только 2% мРНК [23, 24]. Чтобы избежать негативного воздействия повреждений в нуклеиновых кислотах на жизнь клетки, у эукариот существуют определенные системы ответа. В случае повреждения ДНК в клетках эукариот активируются системы репарации ДНК, нацеленные на ее восстановление в неповрежденном виде. Изучению этих систем было посвящено огромное количество исследований, которые позволили к настоящему времени установить в деталях все стадии и особенности процессов репарации ДНК. Данные этих исследований освещены во множестве обзоров (см., например, [25, 26]), поэтому в настоящей главе процессы репарации ДНК рассмотрены кратко и только в общих чертах. Известно, что в репарации ДНК могут участвовать не только специализированные ферменты систем репарации, но и некоторые рибосомные белки, которые, будучи вне рибосомы, могут выполнять разные функции, не имеющие прямого отношения к трансляции (так называемые «внерибосомные функции») (см.

ссылки [1, 2, 4]). В данной главе освещены в основном те аспекты репарации ДНК, которые связаны с рибосомными белками.

Что касается повреждений в РНК, то достаточно долго считали, что они не оказывают существенного влияния на жизнедеятельность организмов вследствие недолговечности жизни РНК в клетке. Однако несколько лет назад были получены данные о том, что в определенных тканях РНК могут сохраняться от нескольких часов до дней, что позволило предположить, что поврежденные РНК вредны для клетки, если их не удалить [27-29]. В клетках эукариот есть несколько путей контроля качества РНК, которые принципиально отличаются от систем контроля качества ДНК и осуществляются не в ядре (как в случае ДНК), а в цитоплазме, где преимущественно и функционирует РНК. Принципиальное отличие этих путей от систем репарации ДНК заключается в том, что они нацелены не на восстановление поврежденных РНК, а на их выявление и уничтожение. Центральным участником процессов контроля качества РНК является рибосома, и общим моментом всех этих процессов является разборка трансляционных комплексов, образованных на поврежденных мРНК, с последующей деградацией этих мРНК. К настоящему времени получен ряд данных о роли некоторых рибосомных белков в составе этих комплексов на определенных стадиях процессов контроля качества РНК, которые рассмотрены в главе 1.

1.1. Типы повреждений нуклеиновых кислот

Наиболее реакционноспособными центрами нуклеиновых кислот являются атомы кислорода и азота азотистых оснований, которые особенно чувствительны к определенным типам химического повреждения от таких источников, как активные формы кислорода (АФК), УФ-свет и алкилирующие агенты [25, 30-33]. В то же время, некоторые авторы не разделяют экзогенные и эндогенные АФК, учитывая, что они являются побочными продуктами аэробного дыхания и генерируются в клетках экзогенными источниками (химические вещества, ультрафиолетовое и ионизирующее излучение) [34-36]. Скорее всего, факторы эндогенного и экзогенного происхождения, повреждающие ДНК, могут оказывать свое генотоксическое действие на ДНК с использованием одного и того же механизма. Например, как ионизирующее излучение (внешний фактор), так и нормальное окислительное фосфорилирование генерируют АФК, которые могут повредить ДНК клетки [37]. Таким образом, большинство повреждений в НК происходит под действием АФК или, иными словами, под действием окислительного стресса [38,39]. Основным эндогенным источником АФК в клетке являются митохондрии. К настоящему времени установлено, что пероксисомы, микросомы и эндоплазматический ретикулум также способны продуцировать высокие уровни АФК [40-42]. Ключевым

компонентом АФК является супероксид-анион ($O_2^{\cdot-}$), который образуется у эукариот в нормальных условиях в результате работы ферментов, связанных с клеточной мембраной и находящихся в цитоплазме [43]. Вследствие своей высокой реакционной способности он генерирует ряд других АФК, таких как гидроксильный радикал ($OH\cdot$), пергидроксильный радикал ($HO_2\cdot$) и пероксид водорода H_2O_2 [44]. Считается, что основными источниками окислительного повреждения нуклеиновых кислот являются реакции с $OH\cdot$ [45]. Помимо этого, повреждения как ДНК, так и РНК вызывают H_2O_2 [46] и формы синглетного кислорода (1O_2), которые образуются в результате травм или фотоокислительного стресса [47]. Гидроксильный радикал $\cdot OH$ реагирует с ДНК путем присоединения по двойным связям в основаниях ДНК (с образованием соответствующих аддуктов, см. рис. 1), либо путем отрыва атома водорода от метильной группы остатка тимина и каждой из связей СН остатка 2'-дезоксирибозы [48].

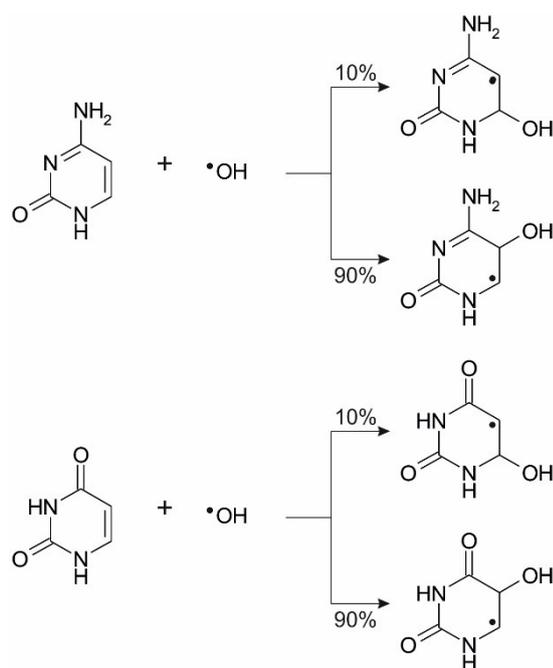


Рисунок 1. Схема присоединения гидроксильного радикала к двойной связи C5-C6 пиримидинов с процентным выходом соответствующих продуктов [49].

Дальнейшие превращения этих интермедиатов определяются их свойствами. Так, аддукт, образующийся при присоединении радикала $\cdot C5-OH$, является восстанавливающим, а $\cdot C6-OH$ – окисляющим [49], и соответственно превращения этих аддуктов зависят от наличия окислителей или восстановителей. В случае пуриновых остатков гидроксильный радикал атакует положения C2 [50], C4, C5 и C8 [51]. В конечном счете, окисление пиримидиновых и пуриновых остатков в ДНК приводят к образованию множества продуктов (рис. 2а), которые будут рассмотрены в следующем разделе.

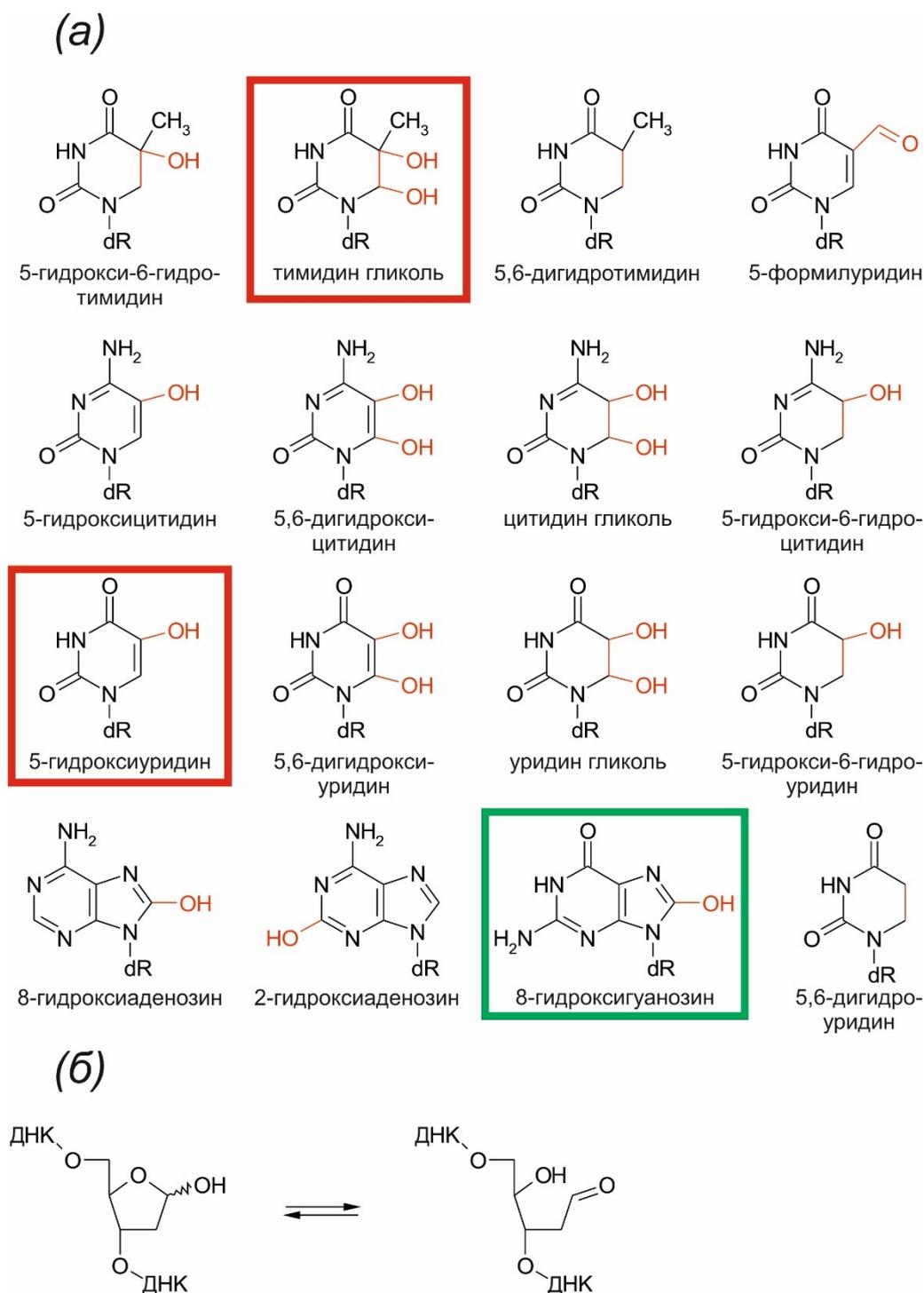


Рисунок 2. Окислительные повреждения звеньев ДНК. (а) Примеры некоторых азотистых оснований ДНК, модифицированных в результате воздействия АФК и свободных радикалов. Зеленой рамкой выделены структуры, чаще всего встречающиеся/детектируемые в окисленной ДНК; красной – структуры, наименее распространенные в окисленной ДНК [25]. (б) Таутомерные формы апурин-апиримидинового (АП) сайта: фуранозная (слева) и альдегидная (справа).

Одной из значимых модификаций азотистых оснований ДНК является алкилирование. В нормальных клеточных процессах метилирование ДНК с помощью метилтрансфераз может служить эпигенетической меткой, которая может передаваться по наследству в ходе клеточных

делений [52,53]. Метилтрансферазы используют в качестве донора метильной группы чаще всего S-аденозилметионин, однако в определенных случаях в этом качестве могут выступать эндогенные нитрозированные соли желчных кислот, бетаин, холин, а также токсичные продукты внешней среды, в частности, из табачного дыма [25]. Примеры остатков метилированных оснований, образующихся в результате действия данных агентов, приведены на рисунке 3б. Самыми распространенными продуктами алкилирования в ДНК, генерируемыми экзогенными алкилирующими агентами, являются остатки O6-алкилгуанина и O4-алкилтимина, а также N7-алкилгуанина, N3-алкиладенина, N1-алкиладенина и N3-алкилцитозина [54]. Более того, частота встречаемости каждого типа аддуктов зависит от того, являются ли субстраты ДНК и РНК одноцепочечными или двуцепочечными [54]. Это связано с тем, что фрагменты оснований, участвующие в Уотсон-Криковском взаимодействии, менее подвержены модификации, нежели те же самые фрагменты, находящиеся в составе одноцепочечных участков ДНК или РНК [55].

Атомы кислорода гидроксильной группы остатков рибозы (в случае РНК) и фосфодиэфирного остова также уязвимы для химического повреждения [33], которое может привести к разрывам цепей НК [56]. АФК могут отщеплять водород от атомов углерода остатков дезоксирибозы, что приводит к одно- и двуцепочечным разрывам ДНК [57]. Разрывы цепи ДНК также могут возникать во время эксцизионной репарации окисленных оснований, коллапса репликационной вилки и в результате действия топоизомеразы [58]. Наличие в клетке ДНК с нерепарированными разрывами цепей может иметь пагубные последствия в виде полномасштабных перестроек в хромосомах и нестабильности генома, что, в конечном счете, может приводить к гибели клеток.

1.1.1. Повреждения в ДНК

К настоящему времени идентифицировано более 20 видов повреждений азотистых оснований под действием окислительного стресса (рис. 2а), но только часть из них хорошо изучена [59]. На данный момент самым изученным окислительным повреждением в ДНК считают остатки 8-оксо-7,8-дигидро-2-дезоксигуанозина (8-охо-dG) [31, 59, 60] (на рис. 2а выделен зеленой рамкой); их же иногда относят и к самым часто встречающимся/детектируемым повреждениям в клетке [31, 60]. Другим распространенным повреждением ДНК, которое в некоторых исследованиях относят к наиболее частым, являются апурин-апириимидиновые (АП) сайты (рис. 2б) [39, 61]. Такие сайты могут возникать в результате спонтанного удаления остатков азотистых оснований [39]. Например, ДНК в клетке человека в обычных условиях может терять до 5000 остатков пуринов ежедневно [62, 63], а по некоторым данным даже больше [64]. Кроме того, АП-сайт является промежуточным

продуктом в процессе эксцизионной репарации ДНК (Base Excision Repair, BER, подробнее – см. раздел 1.1.3) [65], поэтому, с этой точки зрения, АП-сайты в ДНК должны возникать достаточно часто. Остатки 8-охо-dG удаляются специфической ДНК-гликозилазой OGG1. Эти остатки, как и АП-сайты, являются короткоживущими интермедиатами (время их полужизни в клетке порядка нескольких минут) [66-68], поскольку удаление поврежденного основания гликозилазой и последующее расщепление ДНК АП-эндонуклеазой APE1 являются быстротекущими последовательными стадиями BER [66-68]. Менее распространенными продуктами окислительных повреждений оснований ДНК являются остатки тимингликоля [25] и 5-гидроксиурацила [31] (на рис. 2а выделены красной рамкой). Кроме повреждения оснований, в результате окислительного стресса могут возникать одно- или двуцепочечные разрывы цепи ДНК и замены остатков оснований [69, 70].

К повреждению ДНК приводит не только окислительный стресс, но и УФ-свет, под действием которого в ДНК могут образовываться сшивки между основаниями одной цепи (рис. 3а) или разных цепей ДНК, и, как уже упоминалось в предыдущем разделе, алкилирующие агенты, вызывающие модификацию остатков гетероциклических оснований (рис.3б). Самым распространенным спонтанным мутагенозом считается дезаминирование оснований, когда остатки цитозина, аденина, гуанина и 5-метилцитозина в ДНК теряют свою экзоциклическую аминогруппу, превращаясь в остатки урацила (U), гипоксантина, ксантина и тимина соответственно (рис. 3в) [25]. Наконец, в качестве повреждений ДНК можно рассматривать спонтанные ошибки во время репликации, связанные с неточным копированием матричной ДНК репликативными ДНК-полимеразами (вставки или делеции оснований, которые происходят с частотой от 10^{-6} до 10^{-8} на клетку в поколение) [71, 72].

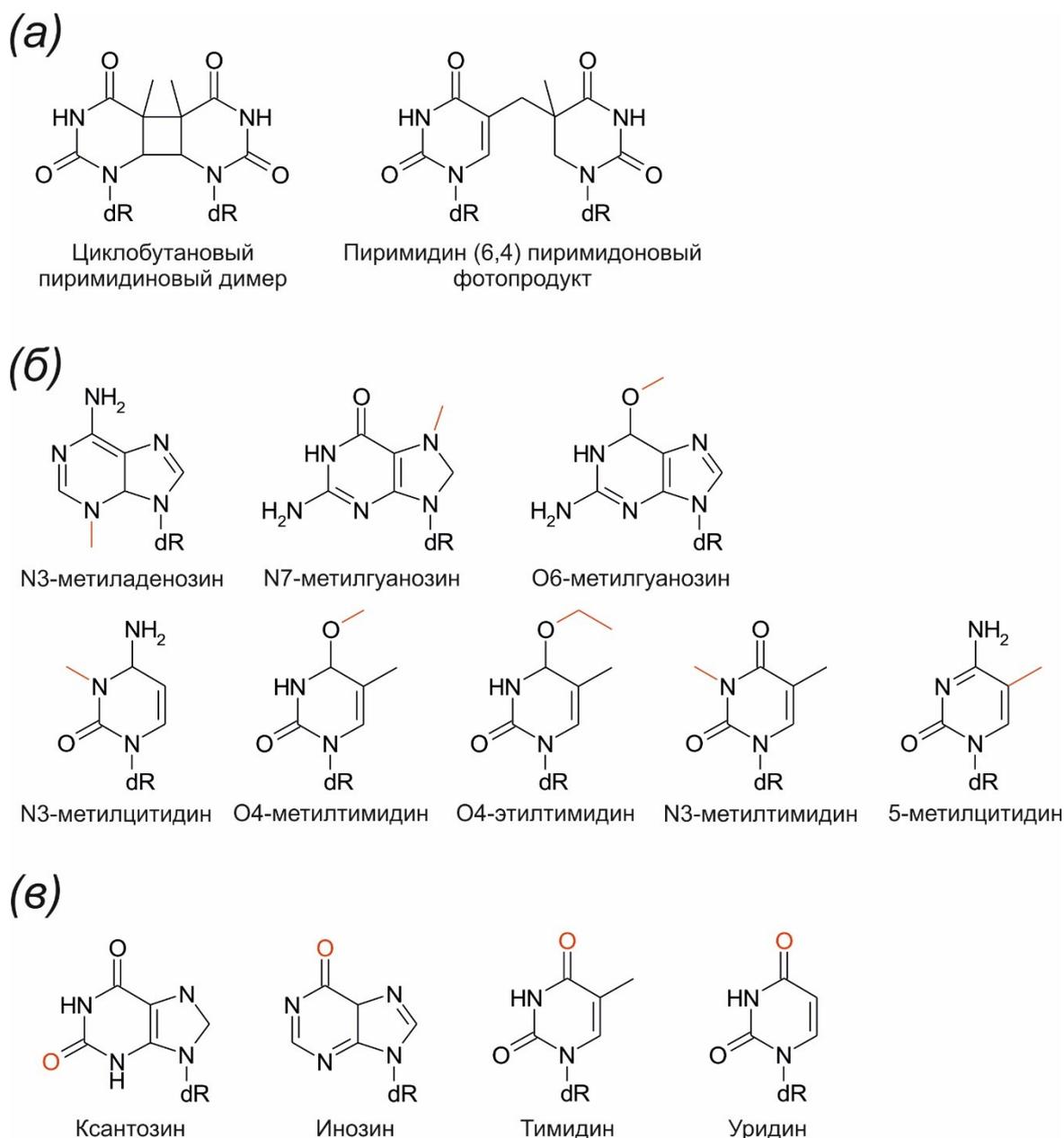


Рисунок 3. Типы повреждений остатков нуклеотидных оснований ДНК. (а) Самые распространенные продукты воздействия УФ-лучей на ДНК; (б) остатки метилированных оснований; (в) остатки дезаминированных оснований [25, 73].

Опасность модификации остатков нуклеотидных оснований в нуклеиновых кислотах в результате действия АФК и других агентов для функционирования клетки заключается в первую очередь в том, что она может существенно влиять на природу комплементарных взаимодействий, происходящих с их участием. Так, остаток 8-охо-dG сохраняет свою способность образовывать комплементарную пару с остатком цитозина, но окисление остатка гуанина по С8 превращает акцептор водородной связи (N7) в донор водородной связи, и в результате остаток 8-охо-dG, принимая син-конформацию, оказывается способным образовывать Хугстиновскую пару с остатком аденина (рис.4).

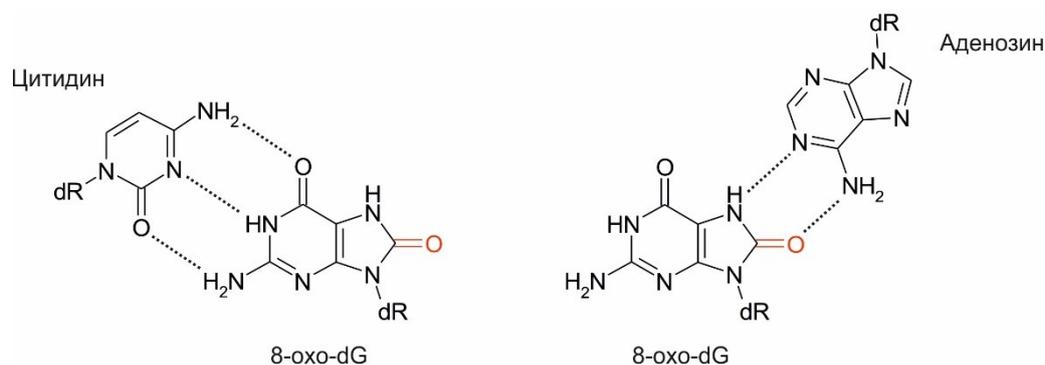


Рисунок 4. Уотсон-криковская пара остатков 8-охо-dG с остатком цитидина (слева) и хугстиновская пара остатков 8-охо-dG с остатком аденозина (справа) [74].

1.1.2. Повреждения в РНК

Мир РНК включает широкий класс молекул с различными клеточными функциями, которые можно классифицировать как кодирующие и не кодирующие РНК. К кодирующим молекулам относятся матричные РНК (мРНК), в то время как не кодирующие молекулы (нкРНК) включают рибосомные РНК (рРНК), транспортные РНК (тРНК), микроРНК (миРНК), малые ядерные и ядрышковые РНК (мяРНК и мякРНК) и длинные не кодирующие РНК (днкРНК). Очевидно, что наибольшее значение для жизни клетки и организма в целом могут иметь повреждения в мРНК, поскольку, в отличие от других видов РНК, ее функция определяется не пространственной структурой (которая зачастую может мало меняться при повреждениях РНК), а нуклеотидной последовательностью, правильность трансляции которой является основой жизни. Однако долгое время повреждения мРНК не вызывали большого интереса в связи с представлениями о ее недолговечности. Например, согласно данным [75] период полужизни мРНК, кодирующих гистоны, у млекопитающих варьирует от 10 до 40 минут в зависимости от клеточного цикла. Однако, как уже упоминалось выше, в настоящее время установлено, что мРНК человека может сохраняться от нескольких часов до дней в определенных тканях [27-29]. От массы общей РНК в клетках мРНК составляет всего несколько процентов. Большая часть клеточной РНК включает стабильные тРНК (~15% в растущей клетке *E.coli*) и рРНК (~80% в растущей клетке *E.coli*), у которых период полужизни обычно больше, чем время удвоения клеток в культуре [76]. У млекопитающих период полужизни лежит в диапазоне от нескольких часов до дней для тРНК и нескольких дней для рРНК [77, 78]. Высокая стабильность рРНК и тРНК по сравнению с мРНК понятна: эти РНК защищены от деградации вследствие их прочных вторичных и третичных структур и связей с белками в составе рибосом и их трансляционных комплексов соответственно [76].

РНК уязвима к тем же химическим воздействиям, что и ДНК, при этом к настоящему времени получены данные, что РНК в гораздо большей степени подвержена окислительному стрессу и действию алкилирующих агентов, чем ДНК [29, 79-81]. Это неудивительно,

поскольку, во-первых, значительная часть последовательностей РНК, в отличие от ДНК, находится в одноцепочечном состоянии, в котором остатки азотистых оснований более доступны для химической модификации, чем в двуцепочечном [80, 82, 83]. Во-вторых, ядерная мембрана в эукариотических клетках также обеспечивает защиту от АФК, которые должны пройти через нее, прежде чем получить доступ к ДНК [29, 83]. В-третьих, считается, что расположение многих РНК в непосредственной близости к митохондриям в цитоплазме способствует окислительному повреждению пула РНК в клетке [84]. Наконец, размер пула рибонуклеотидов в сотни раз больше, чем дезоксирибонуклеотидов [85], поэтому рибонуклеотиды с большей вероятностью будут подвергаться модификациям, чем дезоксирибонуклеотиды. Подтверждением сказанного выше является целый ряд данных; так, было показано, что эпителиальные клетки легких человека накапливают 8-охо-G до уровней, которые в 14-25 раз превышают уровни 8-охо-dG при воздействии пероксида водорода [80]. Аналогично, УФ-свет индуцирует примерно в 7 раз более высокую степень окисления РНК по сравнению с ДНК в клетках фибробластов кожи человека, а действие гепатоканцерогена 2-нитропропана приводит к значительно большему уровню окисления РНК, чем ДНК [86, 87].

Так же, как и в ДНК, самым распространенным повреждением в РНК считается окисление остатков гуанина по атому С8 с образованием 8-охо-G [88, 89]. Накопление остатков окисленного гуанина в РНК, как и в ДНК, обусловлено низким потенциалом восстановления остатков гуанина по сравнению с остальными основаниями [29, 41]. В нормальных физиологических условиях частота встречаемости 8-охо-G в РНК составляет 1 на 10^5 немодифицированных остатков гуанина [90]. Это соотношение резко возрастает (в 10 раз), при умеренном окислительном стрессе, например, в условиях воспаления [90, 91]. Наличие в РНК остатков 8-охо-G серьезно нарушает декодирование в процессе трансляции (подробнее об этом – в разделах 1.1.4 и 1.4) [28, 92]. Вероятно, с этим также связано то, что значительно повышенный уровень окисленной мРНК наблюдается при многих нейродегенеративных заболеваниях. Например, в клетках коры лобных долей головного мозга, подверженного болезни Альцгеймера, окислению может подвергаться до 30–70% мРНК [23], в то время как в тех же клетках здорового человека соответствующего возраста окислению подвергается только 2% мРНК [23, 24]. Интересно, что степень повреждения зависит от природы конкретной мРНК, и даже различные области в транскрипте могут различаться по своей уязвимости к действию повреждающих агентов [24, 93, 94]. Было высказано предположение, что эти различия обусловлены специфическими факторами – природой последовательности и вторичной структуры РНК, защитой определенных участков РНК за счет связывания белков и пр. [29, 95].

Поскольку интерес к изучению повреждений в РНК появился намного позже, чем в ДНК, информации о разнообразии повреждений в РНК к настоящему времени накоплено

немного. Кроме остатков 8-охо-G, в РНК встречаются АП-сайты, как и в ДНК. Они могут возникать не только при действии АФК, но и в результате различных процессов, не связанных с окислительным стрессом. Так, АП-сайты могут возникать после гидролиза лабильной N-гликозидной связи в некоторых минорных основаниях (например, в остатке вайбутозина в тРНК^{Phe}) [96], а также при восстановлении остатка 7-метилгуанозина (7mG) боргидридом, сопровождающемся высвобождением 7mG [97]. Давно известен сайт специфической апуринизации остатка аденина в так называемой сарцин-рициновой петле 28S рРНК в эукариотических рибосомах под действием алкалоидов сарцина или ридина [98]. При этом частота встречаемости АП-сайтов в РНК в разных тканях человека (первичные фибробласты кожи, В-клетки, клетки проксимального канала, клетки НЕК293) была определена только недавно. Было показано, что у различных типов клеток эукариот АП-сайты в РНК (мРНК, рРНК и пр.) встречаются с частотой около 3 таких сайтов на 10⁶ рибонуклеотидов [99]. Эта величина на порядок меньше содержания АП-сайтов в ДНК клеток мозга крысы [100] и во вновь реплицированной ДНК из клеток некоторых позвоночных [101], но сравнима с таковой для ДНК в В-клетках цыплят и клетках печени крысы и человека [100, 101]. Можно полагать, что АП-сайты встречаются в РНК реже, чем в определенных ДНК, поскольку N-гликозидные связи в РНК прочнее, чем в ДНК [102-104], поэтому спонтанная апуринизация в РНК должна происходить реже по сравнению с таковой в ДНК. С другой стороны, есть основания считать, что АП-сайты в РНК образуются не только спонтанно, но и под действием специфических гликозилаз, способных в определенных условиях гидролизовать N-гликозидные связи в РНК [105]. Примером ферментов такого рода является метилпурин-ДНК-гликозилаза человека, которая, как обнаружено недавно, способна гидролизовать N-гликозидные связи в РНК [99].

АП-сайт в РНК гораздо более стабилен, чем в ДНК; так, расщепление цепи РНК по АП-сайту в щелочной среде по механизму «β»- или «δ»-элиминирования (подробнее см. раздел 1.2.1) происходит на 2 порядка медленнее, чем ДНК [106]. Этот сайт в РНК, как и в ДНК, существует в равновесии между циклической (фуранозной) и ациклической (альдегидной) формами (рис. 2б). Первая является преобладающей формой (~99%) [107], в то время как вторая способна реагировать с аминами, в результате чего образуются ковалентные аддукты – основания Шиффа (рис. 5).

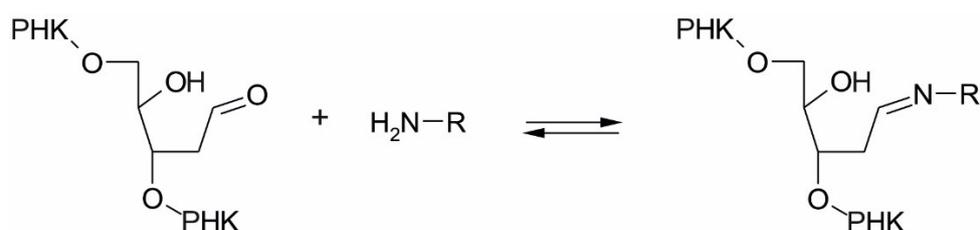


Рисунок 5. Схема образования иминов (оснований Шиффа) с участием АП-сайтов.

1.1.3. Клеточный ответ на повреждение ДНК

Как уже говорилось выше, клеточные ответы на повреждения ДНК и РНК принципиально разные, несмотря на то, что природа повреждений в этих нуклеиновых кислотах схожа. Поврежденная ДНК в клетке подвергается репарации, однако в случае, когда количество повреждений в ДНК достигает критического уровня и клеточные механизмы не могут с ними справиться, включаются механизмы, ведущие к апоптозу, запрограммированной гибели клетки [108]. Иными словами, клеточный ответ на повреждение ДНК зависит от степени повреждения ДНК и типа повреждения, а также от фазы клеточного цикла, которая определяет, по какому пути пойдет репарация [109, 110].

Клеточный ответ на повреждение ДНК, в частности, репарацию повреждений, т.е. восстановление структуры ДНК, изучают еще с 60-х годов прошлого века. За это время накоплен огромный объем информации и установлены основные пути репарации, которые реализуются в соответствии с типом репарируемого повреждения. В эукариотической клетке их пять: эксцизионная репарация оснований (Base Excision Repair, BER), эксцизионная репарация нуклеотидов (Nucleotide Excision Repair, NER), репарация неканонических пар оснований (Mismatch Repair, MMR), гомологичная рекомбинация (Homologous Recombination, HR) и негомологичное соединение концов (Non Homologous Ends Joining, NHEJ) [25].

У эукариот BER ответственен за исправление повреждений, вызванных окислением, дезаминированием и алкилированием (в основном, метилированием и этилированием) остатков гетероциклических оснований, которые значительно не искажают спирали ДНК [111]. В хроматине такие повреждения являются самыми многочисленными, поэтому BER очень востребован в клетках. BER включает следующие основные этапы: распознавание повреждений специфической ДНК-гликозилазой, удаление остатка поврежденного основания с образованием АП-сайта, расщепление фосфодиэфирной связи с 5'-стороны от АП-сайта эндонуклеазой APE1 с образованием остатка дезоксирибозы-5'-фосфата (5'dRp). На следующем этапе полимеразы Pol β вставляет правильный нуклеотид за счет полимеразной активности, а группа 5'dRp удаляется благодаря ее активности dRp-лиазы (dRp-lyase), в результате чего образуется 5'-фосфатный конец, необходимый для лигирования (сшивания) концов разрыва ДНК-лигазой I или III (см. рис. 6). Другой путь, называемый «длиннозаплаточным», происходит с участием ДНК-полимераз Pol δ или Pol ϵ , которые вместе с ядерным антигеном пролиферирующих клеток (PCNA) и фактором репликации C (RFC) осуществляют синтез с вытеснением цепи (от 2 до 13 нт). Эта цепь удаляется эндонуклеазой FEN1, а образовавшийся ник (или одноцепочечный разрыв) зашивает ДНК-лигаза I (рис. 6).

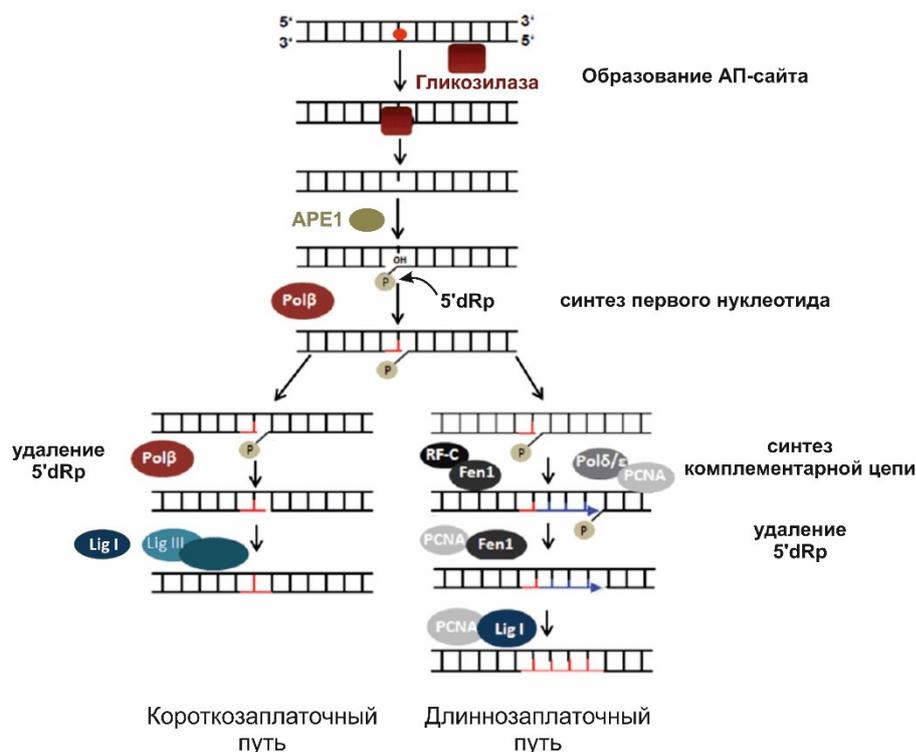


Рисунок 6. Схематическое изображение двух путей BER [112].

Известны 11 различных ДНК-гликозилаз, способных распознавать и вырезать поврежденные основания, которые вывернуты из большой бороздки, а также те, что не выходят за пределы ДНК-дуплекса [113, 114]. С точки зрения функции ДНК-гликозилазы могут быть либо монофункциональными, обладающими только гликозилазной активностью, такими как урацилгликозилазы, N-метилпурин-ДНК-гликозилаза (MPG) и MutY Homolog (MUTYH), либо бифункциональными, то есть с гликозилазной и «β-лиазной» активностями (последняя катализирует расщепление по механизму β-элиминирования). К бифункциональным гликозилазам относятся Nth-подобная ДНК-гликозилаза 1 (NTHL1), Nei-подобная ДНК-гликозилаза 1 (NEIL1) и Nei-подобная ДНК-гликозилаза 2 (NEIL2) [115]. Существуют также гликозилазы, которые могут работать как моно- и бифункциональные гликозилазы, например, 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза (OGG1) и NEIL3 [116]. От функциональности ДНК-гликозилазы, участвующей в BER, зависит путь, по которому будет идти репарация [114].

NER удаляет повреждения, в результате которых образуются так называемые объемные аддукты в ДНК. В качестве примеров объемных повреждений можно привести циклобутанпиримидиновые димеры, пиримидин-пиримидон-(6-4)-фотопродукты [117], ароматические амины, такие как ацетиламинофлуорен, афлатоксин, нитрозамины, такие как MNNG, и оксид 4-нитрохинолина [118]. Классическим примером сшивающего агента, в результате действия которого в ДНК образуются объемные аддукты, является цисдихлордиаминоплатина (цисплатин), который может образовывать аддукты с остатками

гуанина [118]. Первый этап NER у млекопитающих включает обнаружение искаженной структуры двойной спирали, содержащей химическую модификацию. Это происходит с участием ДНК-связывающего комплекса ХРС-RAD23В, который ассоциирует с участком цепи ДНК напротив повреждения [119, 120]. Когда двойная спираль искажена незначительно, например, в случае циклобутан-пиримидинового димера, повреждение узнает ДНК-связывающий комплекс ХРС-DDB [120]. В комплекс DDB также входит убиквитинлигаза E3, которая полиубиквитинирует ХРС, увеличивая таким образом сродство ХРС к ДНК, после чего комплекс DDB диссоциирует [118]. Следующим этапом NER является привлечение транскрипционного комплекса ТFIИИ, а также белков ХРА и RPA и эндонуклеаз XPG и ERCC1-XPF. В составе комплекса с ТFIИИ происходит раскручивание двуцепочечной ДНК вокруг поврежденного нуклеотидного остатка, в результате чего образуется пузыреподобная структура, охватывающая около 30 нт. Эндонуклеаза XPG надрезает поврежденную цепь с 3'-стороны от повреждения, а гетеродимер ERCC1-XPF, в котором XPF обладает эндонуклеазной активностью, – с 5'-стороны, причем разрез с помощью XPG не обязательно должен идти первым [118]. Вырезанный олигонуклеотидный фрагмент, содержащий повреждение, таким образом, удаляется. Образовавшийся пробел заполняется ДНК-полимеразой Pol δ или Pol ε, а разрыв цепи в ДНК зашивается ДНК-лигазой III [118] (см. рис. 7).

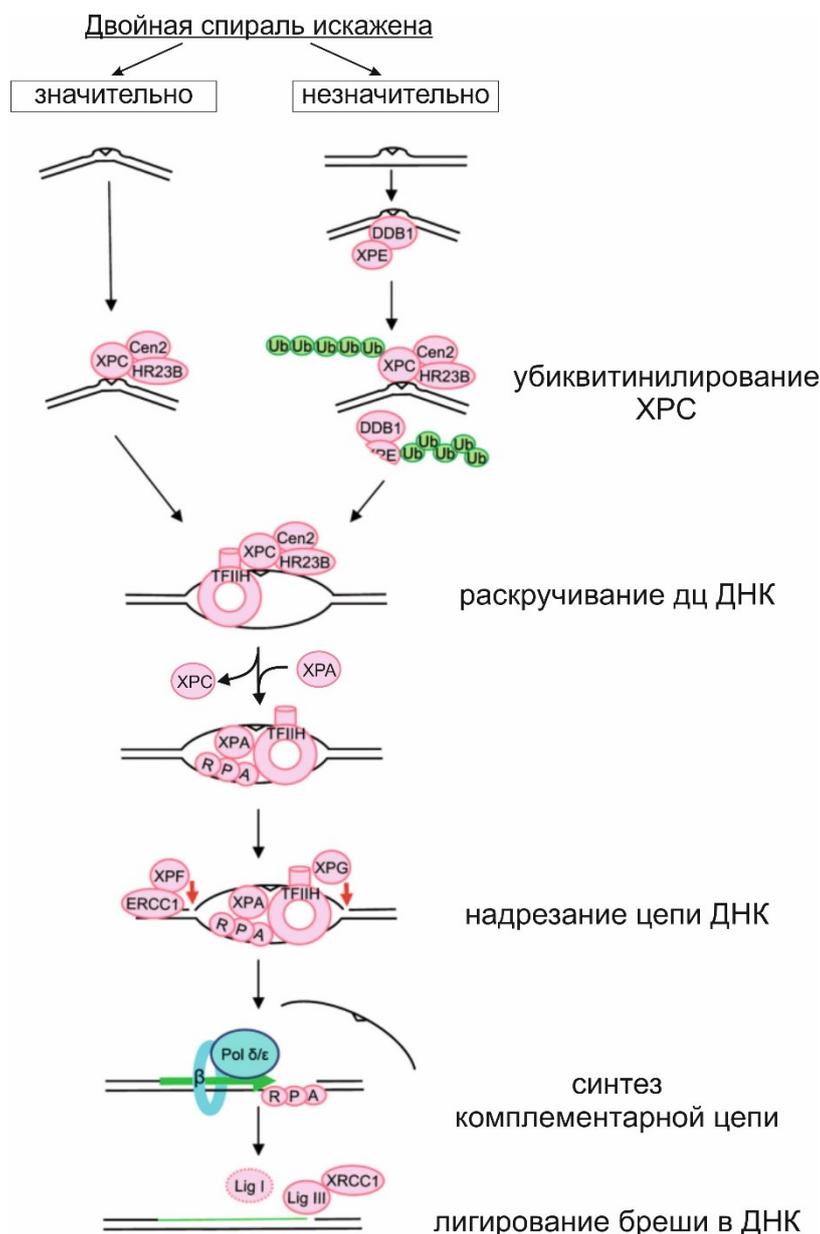


Рисунок 7. Схематическое изображение пути NER [118].

MMR в основном репарирует некомплементарные пары оснований, возникающие из-за ошибок при репликации, а также петли, образующиеся в результате вставок или делеций при репликации повторяющихся последовательностей ДНК [121]. Подобные ошибки могут возникать с частотой 10^{-4} - 10^{-5} [71]. MMR увеличивает точность репликации до 10^{-9} - 10^{-10} на нуклеотид [122-124]. В клетках млекопитающих некомплементарные пары оснований распознаются одним из двух гетеродимеров: MutS α (состоит из MSH2 и MSH6) или MutS β (состоит из MSH2 и MSH3) [125]. MutS α в первую очередь связывается с некомплементарной парой оснований или участком с выпетливанием размером до 3 нт, тогда как MutS β связывается с более длинными участками размером до 13 нт. Важным событием в этапе разрезания ДНК является привлечение гетеродимера MutL α (состоит из MLH1 и PMS2). Считается, что PCNA активирует эндонуклеазную активность MutL α именно в отношении поврежденной цепи [125].

После этапа разрезания ДНК-экзонуклеаза I (ExoI), активируясь с помощью MSH2 и/или MLH1, вырезает участок цепи ДНК, содержащий остаток ошибочно включенного нуклеотида. Образовавшаяся брешь заполняется с помощью ДНК-полимеразы Pol δ . После завершения этого процесса ДНК-лигаза I зашивает разрыв цепи ДНК (см. рис. 8). Следует отметить, что гетеродимеры MutS α/β и MutL α являются АТФазами: в эукариотических клетках они функционируют зависимым от гидролиза АТФ образом. Энергия, высвобождающаяся при гидролизе АТР, необходима для скольжения этих гетеродимеров вдоль ДНК при распознавании повреждения (MutS α) и для раскручивания дуплекса (MutL α) при разрезании цепи ДНК [125].

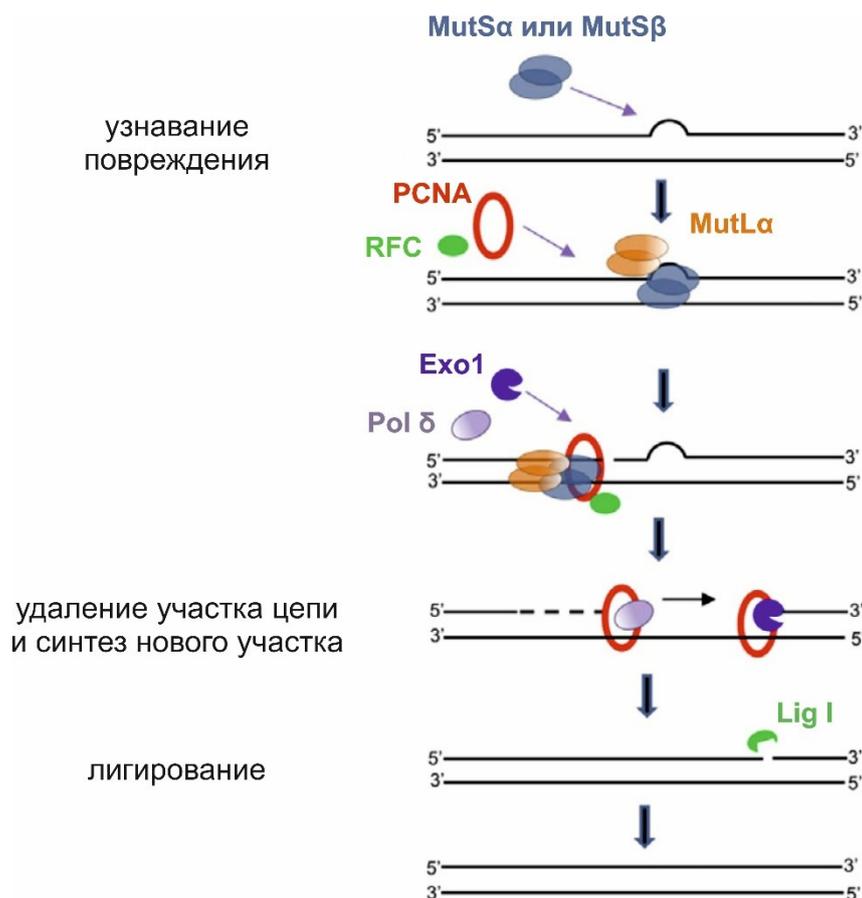


Рисунок 8. Схематическое изображение пути MMR [125].

Двухцепочечные разрывы в ДНК считаются наиболее токсичными для клетки из всех повреждений. Их репарация осуществляется двумя путями: гомологичной рекомбинацией HR или негомологичным соединением концов NHEJ [25, 126]. Путь NHEJ отличается от пути HR тем, что воссоединение концов происходит напрямую с использованием участков с ограниченной гомологией и осуществляется быстрее, однако с меньшей точностью. В то же время путь HR, напротив, точный, более медленный процесс, в котором гомологичный фрагмент служит в качестве матричной ДНК (сестринские хроматиды или гомологичные хромосомы) [127]. В NHEJ за секунды происходит фиксирование разорванных концов ДНК-дуплекса гетеродимером Ku, который тем самым защищает их от действия экзонуклеаз и

привлекает другие белки для облегчения процессинга (см. ниже) и лигирования [128, 129]. Таким образом, в репарацию двуцепочечного разрыва в пути NHEJ оказываются втянутыми следующие ферменты: ДНК-зависимая протеинкиназа (DNA-PK), обладающая киназной и фосфатазной активностями, белок XRCC4, ДНК-лигаза IV, XRCC4-подобный фактор (XLF), полинуклеотид киназа/фосфатаза (PNKP), апратаксин, белок Artemis и апратаксин-и-полинуклеотидкиназа-подобный фактор (APLF) [129]. Поскольку концы двуцепочечного разрыва ДНК могут содержать 5'-гидроксильную и 3'-фосфатную группы, которые не могут быть лигированы, привлечение набора соответствующих ферментов необходимо для процессинга. За образование ковалентной связи между 3'-фосфатной и 5'-гидроксильной группами ответственен киназный домен DNA-PK, а за удаление 3'-фосфатных групп – фосфатазный домен [129]. Белок XRCC4 в комплексе с ДНК-лигазой IV образует каркас совместно с комплексом Ku-антигена и DNA-PKcs; собственно этот каркас и обеспечивает привлечение вышеупомянутых ферментов репарации [129], тогда как комплексы белков XRCC4 с XLF отвечают за удерживание разорванных цепей ДНК. Факторы PNKP и апратаксин участвуют в удалении блокирующих концевых групп, чтобы сделать концы двуцепочечного разрыва лигируемыми. Первый, обладающий киназной и фосфатазной активностями, отвечает за фосфорилирование 5'-конца и удаление фосфатной группы с 3'-конца, а последний, представляющий собой нуклеотидгидролазу и трансферазу, катализирует удаление 5'-аденилатов. Два других белка вовлекаются в подготовку концов к выравниванию и дальнейшему лигированию и, соответственно, к удалению некоторых нуклеозидов с нужных концов. Из них Artemis проявляет 5'-эндонуклеазную активность, удаляя 5'-неспаренный участок и оставляя тупой конец ДНК-дуплекса, и 5'-3'-экзонуклеазную активность по отношению к оцДНК и, кроме того, способен удалять 3'-фосфогликолятные группы с концов ДНК. APLF, обладающий как эндо-, так и 3'-5'-экзонуклеазной активностью [129], вырезает выступающие 3'-концы, чтобы сделать возможным лигирование ДНК-субстратов с помощью комплекса XRCC4-ДНК-лигазы IV [129]. Образовавшиеся в результате действия ферментов бреши заполняются с помощью активности ДНК-полимераз Pol μ и Pol λ , относящихся к семейству X. Процесс завершается лигированием с помощью ДНК-лигазы IV [25, 129 130] (см. рис. 9).

При HR (рис. 9) происходит узнавание двуцепочечного разрыва комплексом MRN, состоящим из трех белков. Из них Mre11 облегчает физический контакт двух пар концов цепей ДНК в месте двуцепочечного разрыва на коротком расстоянии и обладает эндо- и 3'-5'-экзонуклеазной активностями, а Rad50 обеспечивает сближение двух молекул ДНК на большом расстоянии (таких как «сломанная» хромосома и ее сестринская хроматида). Что касается Nbs1, то он не имеет ферментативной активности, но способствует образованию белок-белковых

взаимодействий в местах разрывов ДНК [131]. Интересно отметить, что этот белок вместе с киназой ATM участвует в формировании клеточного ответа на повреждение ДНК, вызывая активацию контрольных точек клеточного цикла и апоптоз [132]. Комплекс MRN обладает эндонуклеазной активностью и вместе с регуляторным белком CtIP и экзонуклеазами Exo1 и DNA2 отвечает за образование выступающих одноцепочечных 3'-концевых участков [130, 133]. Со свободным 3'-концом ДНК, который образуется во время резекции концов, связывается репликационный белок A (RPA), необходимый для привлечения ДНК-зависимой АТФазы RAD51 и белка BRCA2. Вместе они формируют комплекс для поиска гомологичных участков и восстановления нативной структуры ДНК, в ходе которого происходит внедрение 3'-конца одной цепи с гидроксильной группой на конце в гомологичный дуплекс ДНК и реализация комплементарных взаимодействий с интактной цепью ДНК с формированием так называемой D-петли. После этого RAD51 диссоциирует, оставляя свободный 3'-ОН-конец, что позволяет ДНК-полимеразе δ вести синтез ДНК в 3'-5'-направлении с помощью резольваз (сайт-специфических рекомбиназ), таких как эндонуклеазы MUS81, EME1 и GEN1 [133]. Как только синтез новой цепи ДНК завершается, разрыв зашивается с помощью ДНК-лигазы I [133] (см. рис. 9).

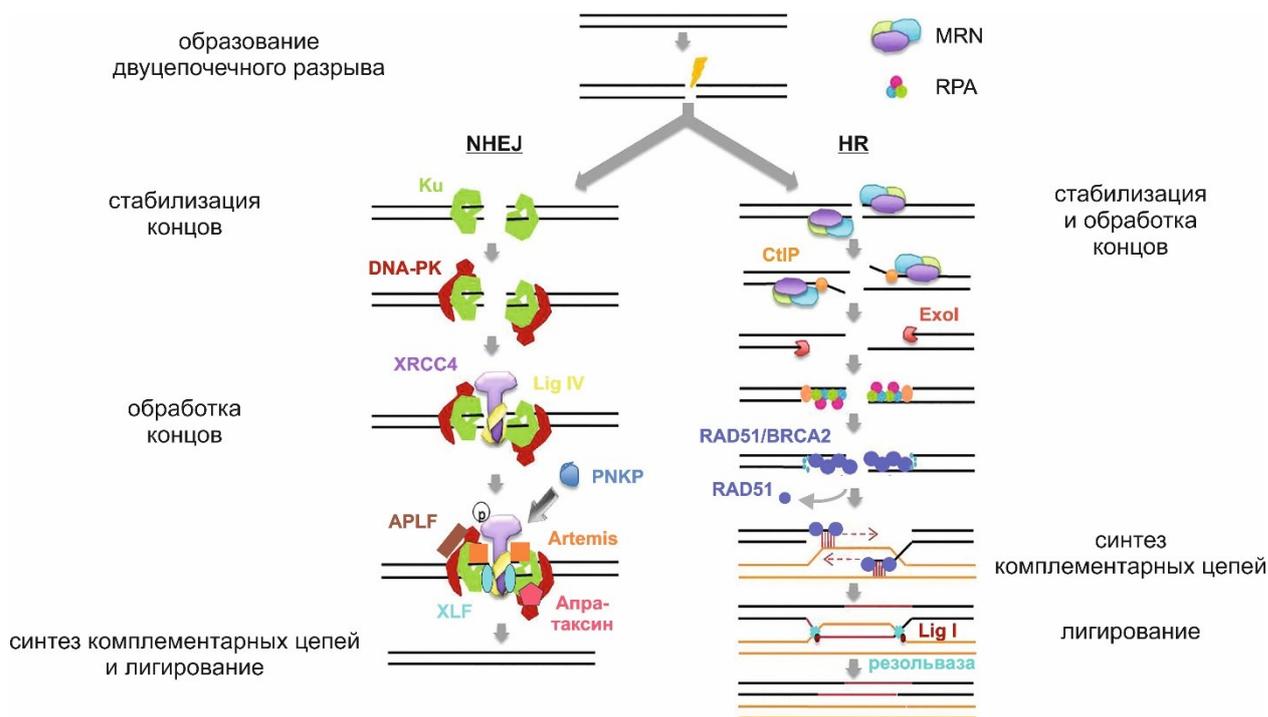


Рисунок 9. Схематическое изображение путей NHEJ и HR [130, 133].

В последнее время появляются данные, что некоторые повреждения ДНК могут быть удалены с помощью альтернативных механизмов; так, ферменты BER в определенных ситуациях могут удалять некоторые объемные аддукты в ДНК, и наоборот [117, 134, 135].

1.1.4. Клеточный ответ на повреждения в РНК.

Как уже упоминалось выше, поврежденная РНК в клетке не репарируется, а распознается и подвергается деградации, причем относительно высокая скорость кругооборота РНК в клетке сама по себе не является достаточным условием для предотвращения последствий повреждения РНК [28]. К настоящему времени установлено, что в этом процессе ключевую роль играет рибосома, которая необходима для узнавания поврежденной РНК (в первую очередь, мРНК). Процесс выявления повреждений в РНК, приводящий, в конечном счете, к ее устранению как у высших, так и у низших эукариот, носит название No-Go Decay (NGD). Он сопряжен с процессом, называемым Ribosome-based Quality Control (RQC), нацеленным на удаление укороченных полипептидов, образовавшихся в результате преждевременной остановки трансляции [28, 92]. Известно, что у эукариот одну и ту же мРНК могут одновременно транслировать несколько рибосом [136]. В момент, когда рибосома в процессе трансляции «натывается» на повреждение в РНК, она останавливается, и следующая за ней транслирующая рибосома сталкивается с ней, образуя дисому, в которой соседние рибосомы контактируют друг с другом своими 40S субчастицами [28, 137-139]. С этого момента начинается работа NGD, который включает в себя 3 стадии. На первой стадии происходит распознавание уникальной пространственной структуры, образующейся в результате столкновения 40S субчастиц двух соседних рибосом и селективного убиквитинилирования нескольких белков в составе «застопорившихся» рибосом с помощью убиквитинлигазы (ZNF598 у млекопитающих и Hel2 у дрожжей) [140-143] (рис. 10, схема слева). Затем происходит разборка трансляционного комплекса с участием специфических факторов Pelota (у дрожжей Dom34) и Hbs1, действие которых сходно с действием факторов терминации трансляции eRF1 и eRF3, соответственно, и белка ABCE1 (у дрожжей Rli1), стимулирующего диссоциацию рибосом на субчастицы [144-147]. Далее мРНК, связанная с 40S субчастицей, расщепляется в районе участка, на котором «застопорилась» рибосома, эндонуклеазой (повидимому, белком Cue2 [148]), и образовавшиеся фрагменты подвергаются деградации экзонуклеазой Xrn1 (в случае 5'-концевой половины мРНК) и в экзосомах (в случае 3'-концевой половины) [149-151]. Параллельно происходит процесс RQC, ведущий к деградации укороченного полипептида (рис. 10, схема слева). Этот процесс начинается с узнавания образующейся в результате диссоциации рибосом 60S субчастицы, несущей тРНК с укороченным полипептидом, специальным белковым комплексом RQT (RQC-trigger complex), состоящим из РНК-геликазы Slh1/Rqt2, убиквитин-связывающего белка Cue3/Rqt3 и белка Rqt4 [143, 152]. Далее E3 убиквитин-лигаза Listerin модифицирует укороченную пептидную цепь и тем самым направляет ее на деградацию [153].

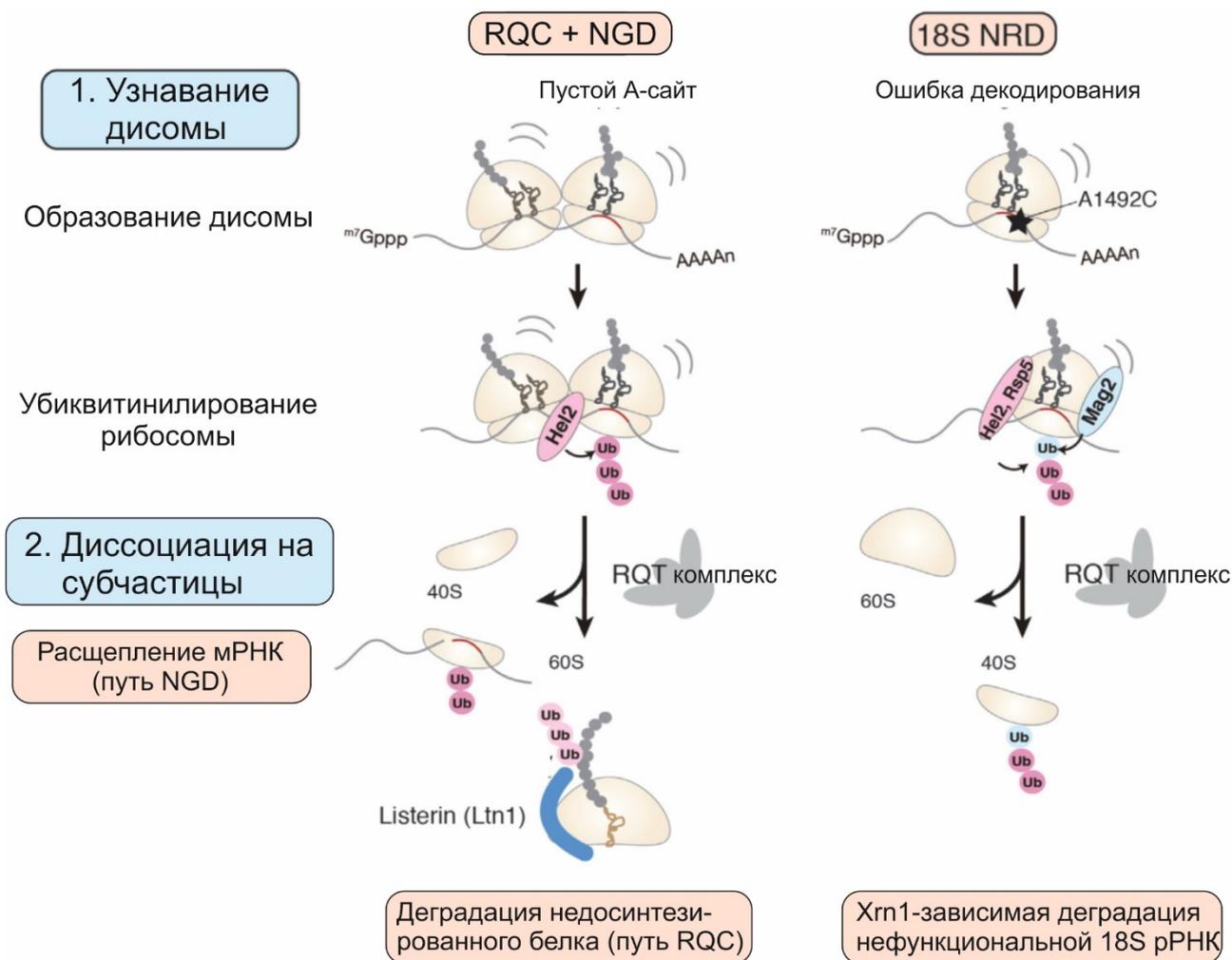


Рисунок 10. Пошаговая схема RQC и NGD (слева) и NRD (справа). RQC+NGD: (1) столкнувшиеся в результате остановки трансляции рибосомы распознаются и убиквитинилируются убиквитинлигазой ZNF598 по одному или нескольким остаткам рибосомных белков; (2) рибосомы диссоциируют на субчастицы, и мРНК расщепляется эндонуклеазой Cue2; (3) E3 убиквитин-лигаза Listerin вместе с другими ферментами связывается с высвободившимся комплексом 60S субчастицы с пептидил-тРНК и убиквитинилирует «недосинтезированный» полипептид; ANKZF1 гидролизует связь между ним и тРНК, после чего Listerin направляет полипептид на деградацию. NRD: (1) остановившаяся рибосома убиквитинилируется поэтапно различными убиквитин-лигазами семейства E3; (2) рибосома диссоциирует на субчастицы; (3) нефункциональная 18S рРНК подвергается деградации под действием экзорибонуклеазы Xrn1.

Следует заметить, что путь NGD активируется в клетке во всех случаях, когда происходит преждевременная остановка трансляции, которая может быть вызвана не только наличием в молекулах мРНК поврежденных звеньев, но и препятствиями другого рода. Среди них стабильные вторичные структуры мРНК, редкие кодоны в них и кластеры положительно заряженных аминокислотных остатков в растущем пептиде, затрудняющих его продвижение по каналу 60S субчастицы [28, 45, 137, 138, 154, 155].

В заключение следует сказать, что недавно было обнаружено, что контроль качества РНК, начальные стадии которого связаны с рибосомами, касается не только мРНК, но и зрелых

рРНК, содержащих точечные мутации, которые отрицательно влияют на функции рибосом, даже если они содержатся в полностью собранных 80S рибосомах [156, 157]. Обнаружение и деградация таких рРНК происходит по пути, называемом Non-functional rRNA decay (NRD). Этот путь осуществляется для рРНК с повреждениями нуклеотидов, играющих ключевую роль в формировании основных функциональных центров рибосомы – декодирующего и пептидилтрансферазного центров, т.е. 18S рРНК и 25S/28S рРНК соответственно. В настоящее время NRD пока изучен в большей степени для дрожжей; оказалось, что пути деградации нефункциональных 18S рРНК и 25S рРНК существенно различаются, но их механизмы остаются во многом неизвестными. В случае 18S рРНК NRD начинается с остановки трансляции в результате дефекта в декодирующем центре рибосомы. Затем «застрявшие» рибосомы подвергаются убиквитинилированию в несколько последовательных стадий (с участием убиквитинлигаз Hel2, Mag2 и Rsp5) и диссоциируют на субчастицы с участием РНК-геликазы Slh1 (компонента комплекса RQT, см. выше) с последующей деградацией 18S рРНК экзорибонуклеазой Xrn1 в 40S субчастице [158]. Деградация 25S рРНК происходит посредством других убиквитин-лигаз класса E3 (комплексов Rtt101-Mms1 [159] и cullin-RING [160]). Рибосомы, содержащие убиквитинилированные 60S субчастицы, диссоциируют на субчастицы под действием комплекса Cdc48-Npl4-Ufd1 и затем поступают в протеасомы для деградации [160].

1.2. Участие рибосомных белков в репарации повреждений ДНК

1.2.1. Рибосомные белки, проявляющие свойства ферментов репарации ДНК

Уже достаточно давно известно, что два семейства эукариотических рибосомных белков проявляют активность ферментов репарации, в первую очередь, семейство uS3. Еще в 1995 году группа Линна обнаружила, что белок uS3 мыши имеет активность УФ-эндонуклеазы III, которая расщепляет ДНК по поврежденным звеньям, образованным в результате действия УФ-облучения (циклобутановые пиримидиновые димеры и др.), и АП-лиазную активность (способность расщеплять ДНК по АП-сайтам) [161]. В дальнейшем было установлено, что эукариотические белки семейства uS3, в зависимости от организма, имеют различные наборы активностей, соответствующих ферментам пути BER. Кроме АП-лиазной активности, присущей всем изученным на сегодняшний день белкам семейства, они могут проявлять множество других свойств. Так, uS3 дрозофилы (uS3D) имеет активность 8-охоG-N-гликозилазы, Mg²⁺-независимой dRP-лиазы и Mg²⁺-зависимой 3'-концевой транс-4-гидрокси-2-пентенал-5'-фосфат-гидролазы [10-14]. В то же время uS3 дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) расщепляет ДНК по циклобутановым пиримидин-пиримидиновым димерам, остаткам 8-охо-G и АП-сайтам по механизму β-элиминирования [15, 16]. Белок uS3 человека не обладает N-

гликозилазной активностью, но способен расщеплять ДНК, поврежденную УФ-светом, по остаткам тимингликоля и циклобутановым пиримидин-пиримидиновым димерам без предварительного удаления основания [17].

Интересно, что общая для всех белков семейства uS3 АП-лиазная активность может реализовываться с использованием разных механизмов расщепления ДНК у разных представителей семейства. Расщепление проходит через стадию образования ковалентного интермедиата, но с uS3 млекопитающих реакция проходит через «β»-элиминирование [16-18], а с uS3D – через «β»- и «δ»-элиминирование (рис. 11) [11, 162]; при этом расщепление ДНК в суперспиральной форме протекает эффективнее, чем в релаксированной [17].

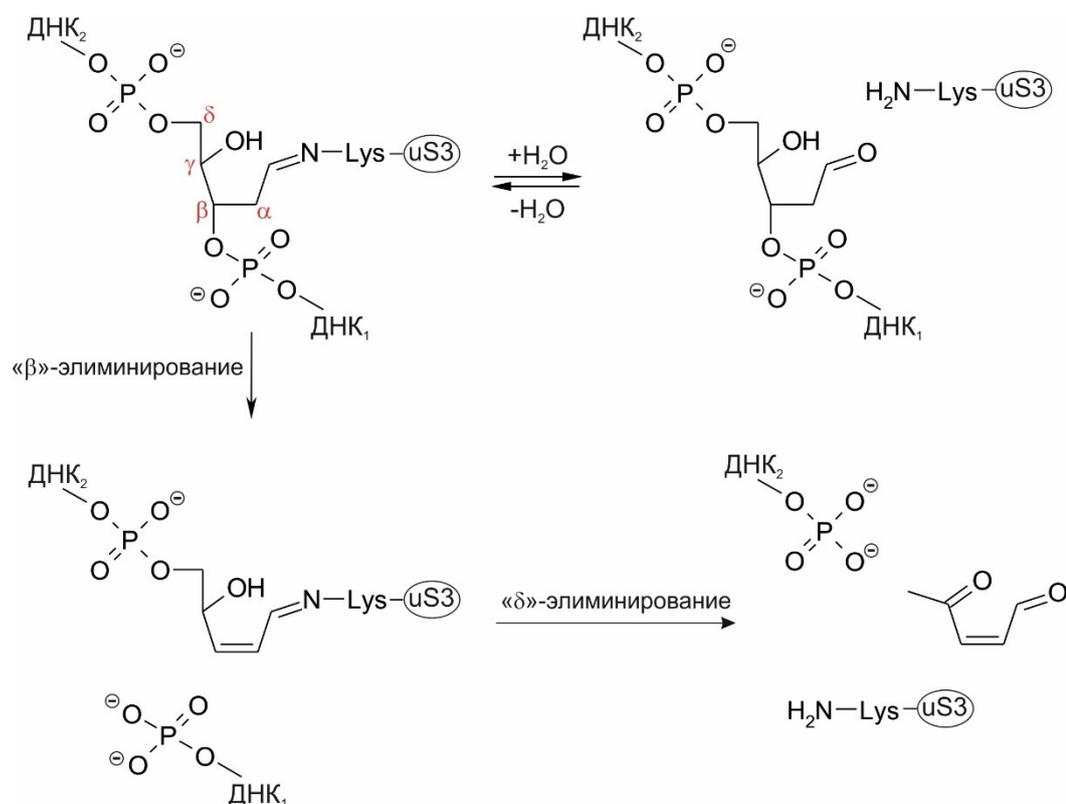


Рисунок 11. Схема расщепления АП-сайта в ДНК белком uS3 по механизмам «β»- и «δ»-элиминирования. Приведенные выше обозначения механизмов указаны в кавычках, поскольку с химической точки зрения и тот и другой тип реакции протекает по одному и тому же механизму β-элиминирования, однако относительно атома углерода пентозного кольца, участвующего в образовании N-гликозидной связи, в соответствующей реакции задействован атом углерода либо в β-положении («β»-элиминирование), либо в δ-положении («δ»-элиминирование, см. верхнюю структуру слева).

О природе каталитического центра uS3 известно довольно мало. Так, в 2001 году группа Deutsch на основании сравнительного анализа структур нескольких белков репарации ДНК (эндонуклеазы III и др.) и uS3D выявила в последнем остаток глутамина (Q59), который, согласно предположению авторов, может находиться в каталитическом домене и отвечать за гликозилазную и АП-лиазную активности белка [162]. Действительно, замена остатка Q59 на

аланин или аспарагин влияла на каталитическую активность белка, в частности, она приводила к потере способности uS3D расщеплять ДНК по механизму «δ»-элиминирования, но не влияла на способность расщеплять ДНК по механизму β-элиминирования. Удивительно, что данные замены приводили к потере не только АП-лиазной активности, осуществляемой по механизму «δ»-элиминирования, но также и N-гликозилазной активности. В uS3 у дрожжей с помощью метода сайт-направленного мутагенеза были выявлены два остатка, D154 и K200, замены которых приводили к снижению АП-лиазной активности белка [16]. Однако использованный метод дает лишь косвенную информацию об участии аминокислотных остатков в катализе, поскольку замены могут приводить к изменению структуры белка и тем самым влиять на строение каталитического центра даже, если соответствующие остатки не входят в его состав.

Очевидно, что свою активность в процессах, связанных с клеточными ответами на повреждение ДНК, белок uS3 способен проявлять только в ядре. Считается общепринятым, что для транспортировки в ядро и выполнения в нем соответствующих функций белок должен подвергнуться специфическому фосфорилированию с помощью различных протеинкиназ. В частности, в клетках НЕК293Т для переноса в ядро из цитоплазмы он фосфорилируется протеинкиназой С δ (PKCδ) по остаткам S6 и T221 и протеинкиназой ERK1/2 по остатку треонина (T42) [163, 164]. Белок uS3 способен фосфорилироваться и перемещаться в ядро для выполнения как функций фермента репарации, так и регуляторного белка, участвующего в различных сигнальных путях. Например, через фосфорилирование по остатку T70 киназой Akt [165] он вовлекается в активацию экспрессии генов, способствующих выживанию клетки [8]. В то же время фосфорилирование по остатку S209 киназой IκB обеспечивает его участие в передаче сигналов в пути NF-κB, где он может выступать в качестве компонента комплекса NF-κB [8, 9].

Помимо uS3, АП-лиазная активность была обнаружена у рибосомного белка дрозофилы uL10 (P0 по старой номенклатуре); эта активность проявляется как по отношению к одноцепочечной ДНК, так и двуцепочечной [10]. Ни у одного из других представителей семейства uL10 (P0) АП-лиазная активность на сегодняшний день не была обнаружена, зато относительно недавно было показано, что белки этого семейства могут проявлять другой вид нуклеазной активности, 3'-5'-экзонуклеазную (характерную для фермента репарации APEX2) [166].

Среди бактериальных рибосомных белков активность, сходную с таковой у ферментов репарации ДНК, проявляет, насколько можно судить по имеющимся к настоящему времени данным, только белок bS16, не имеющий гомологов у эукариот. Было показано, что bS16 в *Escherichia coli* является ДНК-связывающим белком, несущим Mg²⁺-Mn²⁺-зависимую эндонуклеазную активность [167]. Этот белок предпочитает связываться с ДНК в составе

крестообразных структур и вносит одноцепочечные разрывы после остатков аденина (в большинстве случаев неспаренных), за которыми чаще всего следует последовательность 5'-GTT - 3' [168]. Однако функциональную значимость обнаруженных уже давно *in vitro* свойств белка bS16 в дальнейшем не изучали, и она так и осталась неизвестной. Это в такой же мере касается и описанных выше свойств белка uL10; немного больше можно сказать об участии uS3 в реальных процессах репарации ДНК в клетке. В работе [18] было показано, что uS3 имеет примерно одинаковое сродство к поврежденной и неповрежденной ДНК (содержание которой в клетке намного больше, чем поврежденной). На основании этого наблюдения было высказано предположение, что белок uS3 не играет большой роли в общей репарации ДНК, но он может участвовать в этом процессе в определенных участках генома, в частности, в ядрышке. В определенной степени эта гипотеза подтвердилась в дальнейшем, когда было показано, что при окислительном стрессе в культуре клеток НЕК293 этот белок перемещается в митохондрии и его наличие в этих органеллах существенно повышает эффективность репарации ДНК [169].

1.2.2. Рибосомные белки как регуляторы системы репарации

Данные об участии рибосомных белков в регуляции систем репарации ДНК, не связанные с активностью, характерной для ферментов репарации, начали появляться более 15 лет назад и продолжают накапливаться поныне. Так, установлено, что рибосомный белок eL6 напрямую взаимодействует с гистоном H2A и участвует в ответе на повреждение ДНК, а именно на двуцепочечный разрыв ДНК, способствуя накоплению ферментов репарации и многочисленных факторов, регулирующих этот процесс (MDC1, BRCA1, p53 и др.), в местах повреждения ДНК в клетках НЕК293 [170]. Оказалось, что накопление eL6 в сайтах повреждения ДНК не требует его фосфорилирования специфичными протеинкиназами, обычно играющими важную роль в ответе на повреждение ДНК, и происходит с участием белков – представителей семейства поли-(ADP)-рибозо-полимеразы (PARP), PARP1 и PARP2. Эти белки представляют собой сенсоры, которые обнаруживают разрыв в ДНК и катализируют образование цепей PAR на белках, участвующих в репарации ДНК (например, 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазе 1 (OGG1), ДНК-полимеразе β , ДНК-лигазе III и др. [171]), способствуя их привлечению к месту повреждения. Помимо белка eL6, в поврежденных участках накапливаются также зависимым от PARP1/2 образом белки uL2 (L8 по старой номенклатуре) и uS11 (S14 по старой номенклатуре) [170]. Существенно, что все обнаруженные в обсуждаемой работе эффекты имеют четко доказанную роль в жизни клетки; в частности, в ней показано, что белок eL6 действительно требуется для выживания клетки при повреждении ДНК (деплеция eL6 значительно снижало долю выживших клеток).

Данные об участии в процессах репарации ДНК получены также для белка uL3. При изучении механизма действия широко применяющихся противоопухолевых препаратов 5-фторурацила (5-FU) и оксалиплатина (L-ОHP) на клетки рака легких и толстой кишки было обнаружено, что белок uL3 участвует в клеточном ответе на действие этих препаратов, выступая в качестве ключевого регулятора клеточного цикла, апоптоза и репарации ДНК [172]. При деплеции белка uL3 цитотоксический эффект данных препаратов, проявляющийся в повреждении ДНК и нарушениях в клеточном цикле и апоптозе, резко снижался. Этот белок оказался сильным ингибитором процессов репарации по путям HR и NHEJ. Воздействие uL3 на репарацию могло происходить как посредством влияния на уровень белка p21, который является регулятором клеточного цикла, ингибирующим его через путь, зависимый от циклин-зависимых киназ в ответ на повреждение ДНК, так и независимым от p21 образом.

Интересно, что рибосомный белок uS3 наряду со своими активностями, характерными для ферментов BER, может также участвовать в регуляции репарации ДНК. Так, он способен негативно регулировать репарацию двуцепочечных разрывов по пути NHEJ, взаимодействуя с биомаркером двуцепочечных разрывов γ H2AX и гетеродимерами Ku в составе ДНК-зависимого протеинкиназного комплекса DNA-ПК [173]. Предполагают, что фосфорилирование uS3 в составе данного комплекса играет роль в сигнальной трансдукции, активированной повреждением ДНК и приводящей, в конечном счете, к гибели клеток в результате этого повреждения по пути, запускаемому фактором p53 [173]. Другим примером вовлечения uS3 в регуляцию репарации является непосредственное взаимодействие его C-концевого домена (94–244aa) с N-доменом (1–320aa) RecQ-подобной геликазы 4 человека (RECQL4). Данная геликаза играет существенную роль в инициации репликации, и, кроме того, является важным участником в репарации ДНК. Белок uS3 ингибирует АТФазную, ДНК-связывающую и геликазную активности RECQL4 посредством прямого взаимодействия с ней [174]. С другой стороны, существуют данные, свидетельствующие о том, что uS3 может вызывать усиление геликазной активности фактора транскрипции РНК-полимеразы II (TFIIH) и белка XPD (белок группы комплементации D пигментной ксеродермы), который выполняет вспомогательную функцию в процессе NER благодаря этой активности [175].

Приведенные выше данные показывают, что роль uS3 в репарации ДНК многообразна; он может выступать и как фермент, участвующий в этом процессе, и как участник процессов, приводящих к гибели клеток вследствие повреждений в ДНК. По-видимому, процессы, происходящие с участием свободного uS3, запускаются стрессами, вызывающими остановку биогенеза рибосом вследствие ареста клеточного цикла и последующего повышения уровня свободных рибосомных белков в ядре [176, 177].

В заключение следует заметить, что рассмотренные выше рибосомные белки участвуют в таких путях репарации ДНК, как HR и NHEJ, которые осуществляются в ответ на двуцепочечное повреждение ДНК, которое считается, хоть и редким, по сравнению с точечными повреждениями, но самым опасным для жизни клетки и труднорепазируемым.

1.2.3. Рибосомные белки, участвующие в регуляции систем активации апоптоза, как ответа на повреждение ДНК

Запуск репарации не является единственным вариантом клеточного ответа на повреждение ДНК, и в определенных условиях стресс, приводящий к таким повреждениям, активирует запрограммированную гибель клетки (апоптоз). Центральным участником этого процесса является так называемый опухолевый супрессор p53 – фактор транскрипции, который регулирует экспрессию множества генов и может, в зависимости от условий, инициировать апоптоз, активировать репарацию ДНК, вызывать остановку клеточного цикла и др. [178, 179]. Ген белка p53 (*TP53*) играет центральную роль в канцерогенезе, его мутации найдены примерно в 50% всех опухолей человека [180, 181]. В отсутствие стресса в клетке поддерживается очень низкий уровень p53 за счет постоянной деградации этого белка под действием убиквитин-лигазы MDM2, которая убиквитинилирует p53 и транспортирует из ядра в цитоплазму, где он и подвергается деградации в протеосомах [182, 183].

В последнее время получено достаточно много данных об участии целого ряда рибосомных белков в зависимых от стресса и повреждения ДНК сигнальных путях p53-MDM2. Это связано со способностью соответствующих белков непосредственно взаимодействовать с MDM2 и тем самым инактивировать ее и стабилизировать p53, а также с их участием в активации биосинтеза и транслокации p53 в клетке. Данные такого рода получены для белков uL18 (L5), uL5 (L11), uL14 (L23) [184-186], uL24 (L26) [186, 187], eS7 (S7) [186, 188, 189], eS26 (S26) [190], uS19 (S15), uS10 (S20) и eL37 (L37) [191]. В качестве примера рибосомных белков, регуляторные функции которых изучены лучше других, можно рассмотреть eS31 (RPS27a) и eS26. В первом случае в ответ на действие таких стрессоров, как этопозид, метилметансульфонат и УФ-свет, вызывающих повреждение ДНК, происходит сверхэкспрессия гена *RPS27a*. В результате этого накапливается белок eS31 – продукт гена *RPS27a*, и он индуцирует (с участием p53) сверхэкспрессию гена *p21^{Waf1}*, кодирующего ингибитор циклин-зависимой киназы p21, которая выполняет функции, связанные с положительной регуляцией пролиферации, подавлением апоптоза и др. [186, 192]. Эти данные свидетельствуют о том, что eS31 является сенсором стресса в клетке, который усиливает ответ p53 на остановку клеточного цикла, вызванную повреждением ДНК [186].

В случае белка eS26 было показано, что он обладает способностью взаимодействовать с MDM2 и ингибирует MDM2-опосредованное убиквитинилирование p53, что приводит к стабилизации p53 в клетке [190]. Так же, как и в случае с eS31, нокдаун eS26 нарушал способность p53 транскрипционно активировать свои гены-мишени в ответ на повреждение ДНК, не влияя на его стабильность, что приводило к нарушению в контрольной точке G2/M клеточного цикла, и продолжению роста клеток. Интересно, что истощение клеток по белку eS26 приводило к рибосомному стрессу, в результате которого в стабилизацию и активацию p53 вовлекался рибосомный белок uL5.

Следует заметить, что рассмотренные в предыдущем разделе свойства рибосомного белка uS3 также имеют непосредственную связь с сигнальными путями, завязанными на p53. В частности, это касается упоминавшегося в том разделе (подраздел 1.2.2.) взаимодействия белка с гетеродимерами Ku в составе ДНК-зависимого протеинкиназного комплекса DNA-PK, которое замедляет реакции лигирования в пути репарации ДНК NHEJ и вызывает, в конечном счете, p53-зависимую гибель клеток после облучения высокой дозой ионизирующего излучения [173]. В этой же работе показано, что DNA-PK при повреждении ДНК также фосфорилирует uS3 по остатку треонина T220, что приводит к диссоциации белка из комплекса с DNA-PK; авторы полагают, что фосфорилированный таким образом белок участвует в сигнальной трансдукции, взаимодействуя с p53 и киназой Chk2, которая активируется после формирования двуцепочечных разрывов в ДНК и инициирует арест клеточного цикла и апоптоз при серьезном повреждении [193, 194]. В этом же русле находятся данные о корреляции между уровнями белка uS3 (но не его мРНК) и апоптоза нейронов в мозге мышей при стрессе (тяжелом голодании), которую наблюдали в работе [195]. В этом случае влияние uS3 на апоптоз было опосредовано его партнерами – белками теплового шока HSP70 и CHIP (carboxy terminus of heat shock protein 70-interacting protein). Приведенные данные иллюстрируют взаимосвязь между повышением уровня свободных рибосомных белков как регуляторов клеточного цикла, репарации и апоптоза и остановкой биогенеза рибосом – самого энергозатратного клеточного процесса, вызванной стрессом, которая уже упоминалась в предыдущем разделе.

Интересно отметить, что, когда в клетке увеличивается уровень АФК, под ударом также оказывается и митохондриальная ДНК (мтДНК). В работе [169] авторы наблюдали прямую зависимость между уменьшением повреждений в мтДНК и накоплением белка uS3 в митохондриях. Для того чтобы проникнуть в митохондрии, белок uS3 должен связаться со специальным переносчиком – комплексом шаперонов Hsp70/Hsp90. Шаперон Hsp90 защищает uS3 от деградации в цитоплазме и связывается в комплекс с Hsp70, которому «передает» транспортируемый белок, при этом уровень связывания между Hsp70 и uS3 в присутствии АФК увеличивается, что приводит к накоплению uS3 в митохондриях. Таким образом, при

повышении содержания АФК в клетке, приводящем к повреждению мтДНК, белок uS3 перемещается в митохондрии и участвует в репарации мтДНК, при этом уровень uS3 в митохондриях негативно коррелирует со степенью ассоциации белка с шапероном Hsp90 [169].

Таким образом, рибосомные белки могут выполнять различные функции, связанные с ответом на повреждения ДНК, – как играть роль непосредственно фермента репарации, так и регулировать клеточные пути p53-MDM2, обуславливающие остановку клеточного цикла и апоптоз в ответ на повреждение ДНК при стрессах. Однако свойства ферментов репарации обнаружены всего у двух рибосомных белков и относительно хорошо изучены только для uS3, тогда как регуляторные функции (особенно способность взаимодействовать с MDM2) оказались присущими многим рибосомным белкам; вполне вероятно, что список рибосомных белков, имеющих подобные функции, будет далее расширяться.

1.3. Участие рибосомных белков в контроле качества РНК

В то время как в клеточном ответе на повреждение ДНК участвуют свободные рибосомные белки, в контроль качества РНК они вовлекаются только как составные части рибосомы.

Принципиально важную роль в участии рибосомных белков в процессах, связанных с контролем качества мРНК, играет их специфическое убиквитинилирование. Этот тип модификации регулирует множество процессов, а не только деградацию, как считалось до недавнего времени (см., например, [196]). В NGD убиквитинилирование инициирует разборку трансляционных комплексов, образованных «застопорившимися» рибосомами, а в сопряженном с NGD пути RQC – деградацию «неправильного» укороченного пептида (см. раздел 1.1.4). В обоих случаях остаток убиквитина, прикрепленный к полипептиду, действует как сигнал, привлекающий факторы, которые запускают диссоциацию рибосом, и факторы, которые направляют «ошибочную» пептидную цепь в протеасому для деградации. В первом случае убиквитинилирование белков 40S субчастицы в «застопорившейся» рибосоме осуществляется, как уже упоминалось в разделе 1.1, с помощью ZNF598 (Hel2 у дрожжей) – убиквитин-лигазы класса E3.

Уникальная конформация димеров 40S-40S в составе «столкнувшихся» рибосом (рис. 12) оказывается предпочтительной для проявления активности фермента ZNF598 [138, 197]. При этом убиквитинилированию (через остаток K63 убиквитина) подвергаются рибосомные белки uS10 по остаткам K6/8 [138, 143] и K4/8 [197], eS10 по остаткам K138/139 [197] и uS3 по остатку K212 [143] (нумерация остатка дана для дрожжевого uS3). Показано, что убиквитинилирование eS10 [197] и uS10 [143] действительно являются триггерами RQC и NGD, поскольку является необходимым условием для запуска этих процессов. С другой стороны,

убиквитинилирование uS3, происходящее при «столкновении» рибосом, как оказалось, не является необходимым для RQC и NGD, поскольку замена консервативного остатка K212 в uS3 на неспособный убиквитинилироваться остаток аргинина не влияла на эффективность RQC у дрожжей [143], что вызывало вопросы о функциональном назначении этой модификации. Дальнейшие исследования [158] показали, что последовательное убиквитинилирование uS3 по K212 играет принципиально важную роль в другом процессе контроля качества РНК – NRD. На рибосомах, где трансляция остановилась вследствие ошибок при декодировании из-за повреждений в 18S рРНК, uS3 вначале моноубиквитинилируется (через остаток K63 убиквитина) по K212 убиквитинлигазой Mag2, относящейся к классу E3, а затем полиубиквитинилируется по этому же остатку другими E3-убиквитинлигазами – Hel2 и Rsp5. Предполагают, что именно эти модификации запускают диссоциацию рибосом на субчастицы, промотируемую при NRD РНК-хеликазой Slh1 (Rqt2) [158], входящей в состав RQC (см. выше).

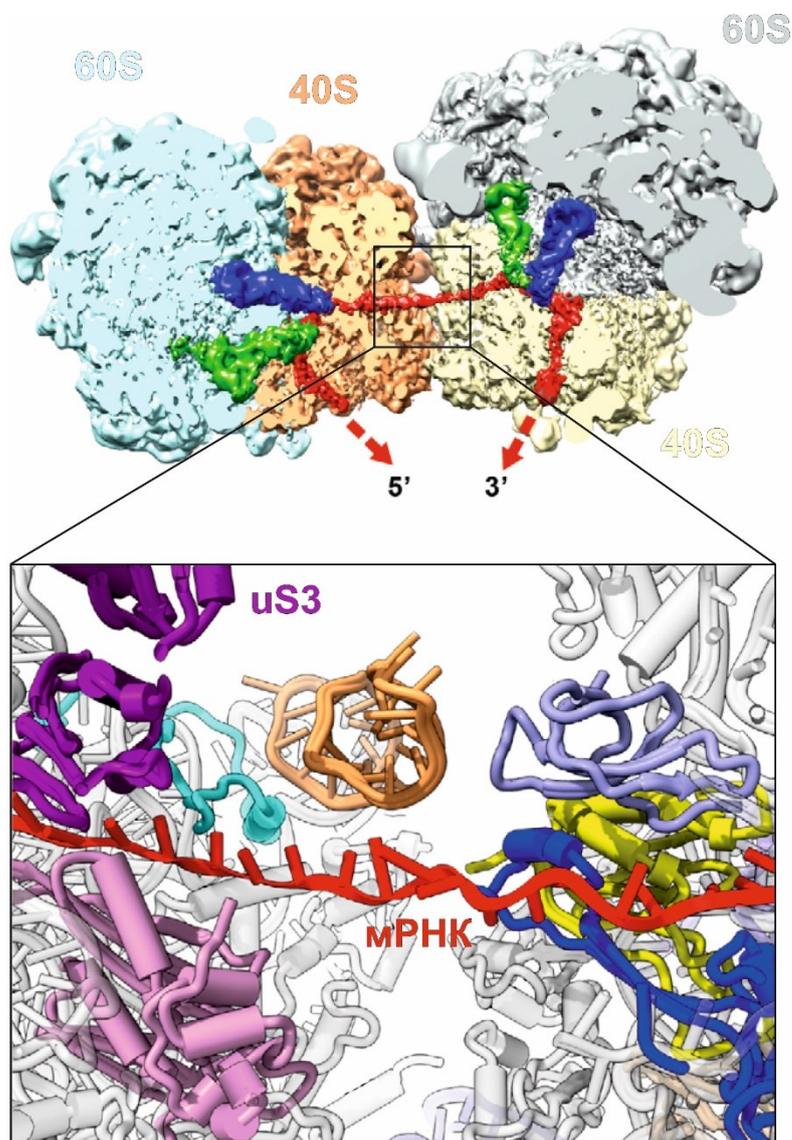


Рисунок 12. Модель «застопорившихся» рибосом (PDB 6I7O). 40S субчастицы изображены оранжевым и желтым цветами, 60S – голубым и серым. мРНК выделена красным цветом.

Синим выделены тРНК в А-участке рибосомы, зеленым цветом – тРНК в Р-участке рибосомы. Отмечен район «столкновения» соседних рибосом, представленный в увеличенном виде внизу. Белок uS3 выделен темно-фиолетовым цветом [138].

Рибосомные белки являются не только ключевыми участниками процессов запуска NGD, RQC и NRD, но и играют важную роль в эндонуклеазном расщеплении «застрявшей» мРНК при NGD. Так, моноубиквитинилирование белка eS7 E3-убиквитинлигазой Not4 (через остаток K63 убиквитина) с последующим полиубиквитинилированием убиквитинлигазой Hel2 оказалось необходимой предпосылкой для расщепления мРНК с 5'-стороны от ее участка, «застрявшего» в рибосоме [138]. Кроме того, обнаружено, что консервативные остатки R116/117 в белке uS3, играющие ключевую роль в его взаимодействии с мРНК в рибосомном канале [198, 199], оказывают значительное влияние на реакцию эндонуклеазного расщепления «застрявшей» мРНК посредством пока еще неизученного механизма, хотя сам uS3 в эту реакцию не вовлекается [199]. Следует отметить, что имеется много данных о том, что в процессах RQC и NRD принимает участие рибосомный белок RACK1 (Asc1 в дрожжах), [142, 197, 200], который осуществляет связь рибосомы с клеточными сигнальными путями [201]. Известно, что в 40S субчастице этот белок взаимодействует с С-концевым хвостом uS3, где находится его сайт убиквитинилирования K212 (в uS3 человека это K214), и что взаимодействие с uS3 имеет принципиально важное значение для выполнения белком RACK1 своих функций [158, 202]. Поэтому неудивительно, что это взаимодействие вносит вклад в регуляцию процессов контроля качества РНК, ассоциированных с рибосомой. В частности, предполагают, что RACK1 физически сближает сайты убиквитинилирования рибосомных белков uS3 и uS10 для убиквитинлигазы ZNF598 при столкновении 40S субчастиц, делая их доступными для фермента [138, 142]. В пользу этого свидетельствуют данные о том, что при нокдауне RACK1 ожидаемая остановка трансляции не происходит и процесс продолжается вплоть до считывания поли(А) хвоста [138, 142, 155]. Считают также, что взаимодействие RACK1 с С-концевой областью uS3 играет важную роль в убиквитинилировании uS3 при распознавании дефектных 40S субъединиц на ранних стадиях NRD 18S рРНК [158].

Как уже упоминалось в разделе 1.1.4, пути удаления из клетки нефункциональной 25S/28S рРНК (25S/28S NRD) существенно отличаются от путей удаления 18S рРНК, несмотря на наличие общих черт – убиквитинилирования рибосомных белков на начальных стадиях с помощью специфических убиквитинлигаз класса E3 и последующей диссоциации рибосом на субчастицы. Однако в пути 25S/28S NRD задействован другой набор убиквитинлигаз в комплексе Rtt101-Mms1 [159], который узнает свои субстраты с участием белка Crt10 [203], а диссоциация рибосом на субчастицы, предшествующая направлению 60S субчастиц в протеасомы, происходит под действием комплекса Cdc48-Npl4-Ufd1 [160].

Убиквитинилированию на начальной стадии этого пути подвергаются белки 60S субчастицы, причем в этом оказался задействованным остаток K48 убиквитина [160].

После убиквитинилирования белков 60S субчастицы, комплекс Cdc48-Npl4-Ufd1 связывается с цепью убиквитина, способствует диссоциации рибосом. Предполагается, что полиубиквитинилирование позволяет направить 60S рибосомные белки неактивной 60S рибосомной субчастицы на деградацию в убиквитин-протеасомную систему, облегчая РНКазам доступ к 25S рРНК [160]. Интересно, что такая убиквитин-протеасомная система задействована только в 25S NRD, но не в 18S NRD [160]. По-видимому, эволюция выбрала различные механизмы для специфического устранения дефектных больших или малых субчастиц, потому что вероятность того, что обе субчастицы будут содержать дефектную рРНК, слишком мала. К сожалению, 25/28S NRD остается малоизученным – данные получены только в дрожжевых системах, и рибосомные белки 60S субчастицы, убиквитинилирование которых запускает процесс, остаются не идентифицированными.

1.4. Биомедицинские аспекты участия рибосомных белков в репарации ДНК и контроле качества РНК

В предыдущих главах были представлены данные об участии рибосомных белков в процессах, имеющих первостепенное значение в жизни клетки, – в регуляции процессов репарации ДНК и утилизации поврежденной ДНК в процессе апоптоза, а также в контроле качества матричной и рибосомной РНК. Поэтому неудивительно, что их «деятельность» ассоциирована с различными заболеваниями, развитие которых связано с нарушениями упомянутых процессов. Так, дефекты в системах репарации ДНК могут приводить к нарушению клеточного метаболизма, что, в свою очередь, приводит к таким заболеваниям, как нейродегенеративные расстройства и рак (см., например, [117]). Получены многочисленные данные о том, что гены многих рибосомных белков сверхэкспрессируются в раковых клетках [204, 205], однако пока нет ясного понимания молекулярных механизмов и путей, связывающих сверхэкспрессию этих генов и канцерогенез.

Как уже было сказано выше, рибосомные белки могут участвовать в регуляции апоптоза и клеточного цикла; подобные функции были выявлены у целого ряда рибосомных белков. Среди них uS3 (S3) [6, 7, 174, 206, 207], uS19 (S15) [191], eL37 (L37) [191, 208], uS10 (S20) [191], uL18 (L5), uL5 (L11), uL14 (L23) [209], eS7 (S7) [189], uS11 (S14) [210], eS25 (S25) [211], eS26 (S26) [190], eS27 (S27) [212], uL24 (L26) [213] и uL4 (L4) [214]. Вовлечение рибосомных белков (например, uS19 (S15), uS10 (S20) и eL37 (L37) [191]) в регуляцию вышеуказанных событий может быть прямо связано с их участием в пути MDM2-p53, который включает важнейший

супрессор опухолей p53, являясь основным в клеточном ответе на повреждение ДНК (см. предыдущий раздел 1.2.3). Поэтому представляется вполне вероятным, что данные функции рибосомных белков имеют непосредственное отношение к канцерогенезу. В работе [191] показано, что, связываясь с E3 убиквитинлигазой MDM2, рибосомные белки блокируют ее и тем самым препятствуют деградации p53, в результате чего происходит чрезмерное накопление p53, ведущее к остановке клеточного цикла. В этой же работе факт физического взаимодействия между MDM2 и белками uS10 и uS19 был подтвержден данными о способности последних ко-иммунопреципитировать с MDM2; помимо этого, были получены свидетельства того, что пути, по которым происходит блокирование деградации p53, для каждого из этих белков имеют свои характерные особенности. Позже прямое взаимодействие uS19 с MDM2 было экспериментально подтверждено в исследованиях *in vivo*, направленных на изучение взаимосвязи между мутациями в гене *RPS15*, кодирующем uS19, и хроническим лимфолейкозом [215]. Установлено, что мутации в его гене приводят к нарушениям в регуляции экспрессии *TP53* и связаны с агрессивными формами лимфолейкоза [215]; на этом основании uS19 рассматривается как один из вновь обнаруженных драйверов канцерогенеза [216]. Однако остается неясным, что является причиной связи мутаций в uS19 и лимфолейкозом – нарушения внерибосомных функций белка или дефекты в работе рибосом, собранных с участием мутантного белка.

Несмотря на давно известную взаимосвязь между рядом рибосомных белков и канцерогенезом, до сих пор они не нашли практического применения в качестве онкомаркеров при диагностике злокачественных опухолей или мишеней для действия противораковых препаратов, и исследования в этом направлении только разворачиваются. Для белка uS3 к настоящему времени получены результаты, позволяющие рассчитывать на практическое применение в биомедицине в обозримом будущем; краткий обзор результатов соответствующих исследований приведен ниже.

Было показано, что рибосомный белок uS3 в миелоидной лейкемогенной клеточной линии FDC-P1 связывает белок латексин, который при гамма-облучении увеличивает уровень повреждения ДНК, вызывая дефекты в формировании митотического веретена и дестабилизируя хромосомы, что приводит лейкозные клетки к вырождению (дегенерации); тем самым латексин усиливает действие облучения на раковые клетки [217]. Белок uS3, как было сказано выше, способствует репарации ДНК в самых различных видах клеток. Связывание латексина с uS3 ингибирует транспорт последнего в ядро, тем самым блокируя развитие клеточного цикла и индуцируя гибель раковых клеток. Еще одно интересное исследование связано с радиорезистентностью клеток глиобластомы [218]. Было обнаружено, что при облучении раковых клеток uS3 перемещается в ядро, где подвергается убиквитинилированию

Е3 убиквитин-лигазой RNF138 (содержащий домен «цинкового пальца») с последующей деградацией, причем этот процесс связан с резистентностью клеток глиобластомы к облучению. В отсутствие RNF138 в клетках ядерный uS3 взаимодействует с DDIT3 (DNA damage-inducible transcript 3) – критически важным регулятором апоптоза, вызываемого стрессом, приводя к гибели облученных клеток [218]. На основании этих данных было сделано предположение, что RNF138 может быть потенциальной мишенью для противораковых агентов.

Сообщалось, что uS3 способствует развитию остеосаркомы. В опухолевых клетках происходит активация группы факторов транскрипции GLI для последующей индукции генов-мишеней. В клетках остеосаркомы геном-мишенью для фактора транскрипции GLI2 является *RPS3*. Таким образом, повышенная наработка фактора транскрипции GLI2 связана с повышенной экспрессией гена белка uS3 [219]. Показано, что uS3 способствует онкогенезу и повышает устойчивость злокачественных клеток к противораковому лечению за счет специфических внерибосомных взаимодействий, а также способствует их инвазии [219]. Все это позволяет рассматривать данный белок в качестве мишени для действия противораковых агентов. С другой стороны, белок uS3 способствует выживаемости «здоровых клеток» при пигментной ксеродерме [175], а также замедлению старения клеток кожи [220], что указывает на потенциальную возможность использования средств, повышающих уровень экспрессии гена *RPS3*, в терапевтических целях для предотвращения старения клеток кожи и последствий их УФ-облучения.

В качестве потенциальной мишени для действия противораковых агентов также можно рассматривать и рибосомный белок uL16 (L10). Эта точка зрения основана на данных, показывающих, что uL16 накапливается в клетках пациентов, больных эпителиальным раком яичников, тем самым увеличивая жизнеспособность этих клеток и способствуя их пролиферации [221]. Кроме того, было обнаружено, что в клетках другого типа рака (поджелудочной железы) не происходит накопления uL16, однако нокаун соответствующего гена приводит к остановке клеточного цикла в S фазе [223, 222]. В последнем случае оказалось, что в раковых клетках белок локализуется не только в ядре и цитоплазме, но также в митохондриях. Нокаун uL16 снижал активность митохондриального комплекса I, что, в свою очередь, приводило к снижению концентрации АТФ в раковой клетке [222], которая испытывает повышенную по сравнению с нормальными клетками потребность в АТФ и его предшественниках [224, 225]. Участвуя таким образом в производстве АТФ, uL16 может влиять на белки OSGIN1 и HMOX1, которые вовлекаются в окислительно-восстановительный гомеостаз, что в свою очередь, влияет на баланс АФК [222], содержание которых в клетке прямо коррелирует с уровнем повреждения нуклеиновых кислот.

Взаимосвязь между накоплением повреждений в мРНК и старением, а также развитием некоторых хронических нейродегенеративных заболеваний, известна довольно давно. Так, высокий уровень 8-охо-G наблюдали в нейронах гиппокампа, субикулума, энторинальной коры, а также лобного, височного и затылочного неокортекса в аутоптических тканях мозга пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера [84]. Аналогичные результаты были получены у старых крыс с потерей памяти [90]. Существенно повышенный уровень окислительных повреждений был выявлен в нейрональной РНК в коре головного мозга людей на переходных стадиях от нормального пожилого возраста до начала болезни Альцгеймера [226]. То же самое наблюдали в РНК из образцов мозга пациентов с деменцией с тельцами Леви [227], болезнью Крейтцфельда-Якоба [228] и подострым склерозирующим панэнцефалитом [229].

В основе взаимосвязи между развитием нейродегенеративных заболеваний и старением с накоплением повреждений в РНК, по-видимому, лежат нарушения в регуляции трансляции с участием поврежденных мРНК и рРНК, связанные с дефектами в системе контроля качества РНК (см. раздел 1.3). Дефекты контроля качества мРНК и синтезируемых пептидов (соответственно, NGD и RQC, см. раздел 1.3) приводят к накоплению поврежденных мРНК [92, 230], при трансляции которых образуются aberrантные укороченные белки с «неправильной» пространственной структурой, легко агрегирующие друг с другом [231]. Агрегация белков – это аномальная ассоциация неправильно свернутых белков в нерастворимые белковые структуры [232]. Именно образование подобного рода агрегатов, которые клетки неспособны расщеплять, связывают с такими патологиями, как болезни Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона [231, 233, 234]. В частности, при болезни Альцгеймера наблюдают накопление белковых структур, состоящих в основном из трансмембранного белка бета-амилоида и называемых по-другому амилоидными бляшками [235]. Как уже говорилось в предыдущем разделе 1.3, белки uS3, uS10 и eS10 в составе транслирующей рибосомы являются ключевыми участниками начальных стадий NGD и RQC. Поэтому можно ожидать, что мутации в генах этих белков, затрагивающие их способность участвовать в процессах контроля качества мРНК и синтезированных пептидов, будут также вносить вклад в развитие нейродегенеративных заболеваний, хотя, насколько можно судить по доступным на сегодняшний день данным, соответствующего подтверждения пока не получено. Интересно также упомянуть сделанное достаточно давно предположение о том, что белок uS3 может сканировать мРНК на предмет поиска АП-сайта и последующей инактивации мРНК или ее расщепления по этому сайту по аналогии с его взаимодействием с поврежденной ДНК [236]. Однако последующих исследований, позволяющих подтвердить либо опровергнуть данное предположение, проведено не было. Наконец, имеются данные о вероятной взаимосвязи между повреждениями в РНК с одной стороны и канцерогенезом и

атеросклерозом с другой (см., например, [237]), однако роль рибосомных белков в этой взаимосвязи пока остается неизученной.

1.5. Заключение

Таким образом, на сегодняшний день получен целый ряд данных об участии рибосомных белков в процессах, связанных с клеточными ответами на повреждение нуклеиновых кислот. При повреждении ДНК многие белки, будучи вне рибосом, участвуют в регуляции клеточного цикла, апоптоза и репарации ДНК в путях, ключевыми участниками которых являются фактор транскрипции p53 – важнейший супрессор опухолей и E3 убиквитинлигаза MDM2, отвечающая за деградацию p53 в нормальных клетках в отсутствие стресса и поддержание его концентрации на минимальном уровне. Способ вовлечения некоторых белков (например, uS10 и uS19) в эти пути установлен; показано, что, связываясь с MDM2, они ингибируют ее действие и тем самым вызывают повышение уровня p53 в клетках. Способность непосредственно участвовать в процессе репарации ДНК в качестве фермента, взаимодействующего с ее поврежденными звеньями, хорошо подтверждена и достаточно изучена только для одного семейства рибосомных белков – консервативного во всех царствах семейства uS3. Однако молекулярные аспекты функционирования uS3 в эксцизионной репарации ДНК остаются по большей части неизученными. Неясно, есть ли у белка предпочтения во взаимодействии с теми или иными последовательностями и/или структурными мотивами ДНК; неизвестно, в каких участках геномной ДНК uS3 связывается в живых клетках; практически отсутствует информация о строении активного центра uS3 как АП-лиазы и т.д.

Рибосомные белки участвуют также в клеточном ответе на повреждения РНК (мРНК и рРНК), но только в качестве компонентов рибосомы. Они играют важную роль на начальных стадиях процессов NGD, RQC и NRD, которые инициируются остановкой трансляции, вызванной повреждением мРНК или рРНК, и ведут, в конечном счете, к утилизации поврежденных РНК и укороченных «недосинтезированных» полипептидов. Запуск этих процессов начинается со специфического убиквитинилирования рибосомных белков в результате распознавания соответствующими убиквитинлигазами необычной конформации димеров дисом 40S-40S, образующихся при «столкновении» соседних рибосом. Определены пока только белки 40S субчастицы, запускающие NGD и RQC, тогда как белки 60S субчастицы, участвующие в начальной стадии NRD 25S/28S рРНК, остаются не идентифицированными. Интересно, что роль uS3 в начальных стадиях NGD сводится не только к его убиквитинилированию при остановке трансляции. Этот белок оказывает значительное влияние на эндонуклеолитическое расщепление «застрявшей» на рибосоме мРНК и, возможно,

взаимодействует с АП-сайтами в мРНК аналогично тому, как это происходит в случае ДНК; последняя гипотеза пока остается непроверенной.

Из всех рибосомных белков uS3 резко выделяется самым богатым набором функций, имеющих прямое отношение к клеточным ответам на повреждения и в ДНК, и в РНК, хотя молекулярные аспекты процессов, посредством которых uS3 участвует в этих ответах, остаются в значительной степени неясными. Этим обусловлены основные цели настоящей диссертационной работы, связанные с определением участков связывания изолированного uS3 в геномной ДНК в составе хроматина и критериев выбора белком участков для взаимодействия с ДНК, а также с выяснением способности uS3 в составе рибосомы участвовать в контроле качества мРНК посредством взаимодействия с АП-сайтами.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

В данной работе использованы следующие материалы.

Реактивы: гепарина натриевая соль (AppliChem), циклогексимид (Fluka BioChemika), дезоксихолат натрия (Panreac), сахароза (Panreac), пуромицин дигидрохлорид из *Streptomyces alboniger* (Sigma-Aldrich), лизоцим из белка куриного яйца (ICN Biomedicals), глицерин (AppliChem), перйодат натрия (Fluka BioChemika), цианоборгидрид натрия (MilliporeSigma), гемин (Sigma-Aldrich), бромциан (CNBr, Fluka) или 2-нитро-5-тиоцианобензойная кислота (NTCB, Sigma-Aldrich), гликоген (ThermoFisher), анизомицин из *Streptomyces griseolus* (Sigma-Aldrich), негидролизующий аналог ГТФ – гуанозин 5'-(β, γ)-метилен-трифосфата (GMPPNP) фирмы Sigma-Aldrich.

Материалы и наборы: нитроцеллюлозная мембрана Protran Premium 0.45 мкм (Amersham), хроматографическая бумага Whatman Grade 3мм (Sigma-Aldrich), Ni-NTA агароза (Sigma-Aldrich), мембрана с номинальным отсечением по молекулярной массе в диапазоне 8000-15000 Да (Serva), колонка хроматографическая N 5154 с сорбентом ProntoSIL 120-5 C18 (Эконова), магнитные частицы Dynabeads с белком G (Invitrogen).

Ферменты: рекомбинантная полинуклеотидкиназа фага Т4 получена в лаборатории биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН (20 ед. акт./мкл), урацил-ДНК-гликозилаза *Escherichia coli* (*E. coli*) любезно предоставлена к.х.н Антоном Ендункиным (Лаборатория геномной и белковой инженерии ИХБФМ СО РАН), микрококковая эндонуклеаза (Sigma), Т4 РНК-лигаза (SibEnzyme), ингибитор рибонуклеаз Ribolock (ThermoFisher).

Антитела и антисыворотки: антитела против белка uS3 кролика (ab140676, Abcam), вторичные антитела к IgG кролика (Sigma-Aldrich).

Меченые рибонуклеозидтрифосфаты и тРНК: [³²P]АТФ и [³²P]рСр синтезированы в Лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН; [¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} (1300 пмоль/ОЕ₂₆₀) и деацилированные тРНК^{Phe} и тРНК^{Val} любезно предоставлены доктором В.И. Катуниним (НИЦ «Курчатовский институт» Санкт-Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова); 8-оксогуанин (8-охо-G), уридин (U) и тетрагидрофуран (THF) (Glen Research, Стерлинг, Вирджиния, США), [³⁵S]-метионин (American Radiolabeled Chemicals Inc.).

Составы стандартных растворов и буферов: буфер электродный Лэммли (25 мМ Трис-НСl, рН 8.3, 0.1% SDS и 0.2 М глицин), буфер электродный ТВЕ (89 мМ Трис, 89 мМ Н₃ВО₃ и 2 мМ EDTA, рН 8.0).

Таблица 1. Составы стандартных растворов и буферов, использованных в работе.

Буфер I	20 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 125 мМ КСl, 10 мМ MgCl ₂ , 0.5 мМ EDTA и 10 мМ β-меркаптоэтанол
Буфер II	20 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 100 мМ NH ₄ Cl, 3 мМ MgCl ₂ , 0.15 мМ EDTA и 5 мМ β-меркаптоэтанол
Буфер III	20 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 100 мМ КСl, 3 мМ MgCl ₂ , 0.15 мМ EDTA и 10 мМ β-меркаптоэтанол
Буфер IV	20 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 500 мМ КСl, 3 мМ MgCl ₂ , 0.15 мМ EDTA и 10 мМ β-меркаптоэтанол
Буфер А	20 мМ HEPES-КОH, рН 7.5, 120 мМ КСl, 13 мМ MgCl ₂ и 0.6 мМ EDTA
Буфер Х	10 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 10 мМ КСl и 2 мМ MgCl ₂
Буфер Y	10 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 10 мМ КСl, 2 мМ MgCl ₂ , 0.05% Тритон X-100, 1 мМ EGTA, 1 мМ дитиотреитол (ДТТ), 40 мкг/мл PMSF и 10 мкл/мл коктейль ингибиторов протеаз
Буфер Z	25 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 1 мМ ДТТ, 2 мМ EDTA, 0.05% NP40, 1 мМ NaF, 40 мкг/мл PMSF, 5 мкл/мл коктейль ингибиторов протеаз и 0.1 ед. RNasin
Буфер W	25 мМ Tris-НСl, рН 7.5, 100 мМ КСl, 1 мМ ДТТ и 2 мМ EDTA
Буфер O	20 мМ HEPES-КОH, рН 7.5, 20 мМ имидазол, 150 мМ NaCl, 0.5% Тритон X-100, 10 мМ MgCl ₂ , 10 мМ β-меркаптоэтанол, 2 ед/мл ДНКазы I и 2 мМ PMSF
Equilibration buffer	20 мМ HEPES-КОH, рН 7.5, 20 мМ имидазол, 50 мМ NaCl и 2 мМ PMSF
Elution buffer	20 мМ HEPES-КОH, рН 7.5, 400 мМ имидазол, 50 мМ NaCl и 2 мМ PMSF
Буфер Dialysis	60 мМ HEPES-КОH, рН 7.5, 100 мМ КСl, 2 мМ ДТТ и 2 мМ PMSF
Буфер Б	30 мМ HEPES-КОH, рН 7.5, 50 мМ КСl, 0.5 мМ EDTA, 1 мМ ДТТ и 5% глицерин
Буфер В	10 мМ HEPES-КОH, рН 7.5 и 1 мМ EDTA
Буфер Г	25 мМ HEPES-КОH, рН 7.5, 72 мМ КСl, 4.5 мМ MgCl ₂ , 0.6 мМ ДТТ, 0.6 мМ PMSF и 30% глицерин
Буфер Д	20 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 300 мМ КСl, 3 мМ MgCl ₂ , 0.15 мМ EDTA и 6 мМ β-меркаптоэтанол
Буфер Е	20 мМ HEPES-КОH, рН 7.5, 100 мМ КСl, 10 мМ MgCl ₂ и 0.05% Tween-20
Буфер К	0.2 г/л креатинфосфокиназа, 20 мМ HEPES-КОH, рН 7.5, смесь 20 аминокислот (0.25 мМ каждая), 0.5 мМ спермин, 2 мМ ДТТ, 10 мМ креатинфосфат натрия, 2 мМ рибо-АТР, 0.5 мМ рибо-GTP, 0.25 мМ рибо-СТР, 125 мМ КСl и 3 мМ MgCl ₂

Буфер Л	20 мМ HEPES- KOH, pH 7.5, 100 мМ KCl, 3 мМ MgCl ₂ , 0.15 мМ EDTA и 10 мМ β-меркаптоэтанол
Буфер М	150 мМ NaOAc, pH 5.0 и 10 мМ CuSO ₄
буфер для образцов Лэммли	60 мМ Трис-НСl, pH 7.5, 20% глицерин, 2% SDS, 1% β-меркаптоэтанол и 0.05% бромфеноловый синий
Буфер Л	4.9 М формаид и 0.2 М триэтиламмонийацетат, pH 8.0

Культивирование клеток *E. coli*: среда LB (пептон 10 г/л, 5 г/л дрожжевой экстракт и 10 г/л NaCl), ампициллина натриевая соль (AppliChem) и изопропил-β-D-тиогалактопиранозида (IPTG) (Sigma-Aldrich).

В работе использованы компьютерные программы: GraphPad Prism, Quantity One и CLC GW 9.5 (Qiagen).

Используемые в работе олигодезоксирибонуклеотиды синтезированы в группе олигонуклеотидного синтеза Лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН (таблица 2), олигорибонуклеотиды синтезированы в Лаборатории химии РНК ИХБФМ СО РАН (таблица 3).

Таблица 2. Список олигодезоксирибонуклеотидов, использованных в работе. «Furan» представляет тетрагидрофурановое кольцо вместо нуклеотидного звена.

<i>Название</i>	<i>Последовательность</i>
ssAP	5' – CTCTCCCTTC- dU -CTCCTTTCCTCT – 3'
G	5' – CTCTCCCTTC- G -CTCCTTTCCTCT – 3'
THF	5' – CTCTCCCTTC- Furan -CTCCTTTCCTCT – 3'
8oxoG	5' – CTCTCCCTTC-8oxoG-GCTCCTTTCCTCT – 3'
dsAP	5' – CTCTCCCTTC- dU -CTCCTTTCCTCT – 3' 3' – GAGAGGGAAG- C -GAGGAAAGGAGA – 5'
Cons	5' – TGGAATGGAATGGAATGGAATGGAA – 3'
K	5' – AAGGTAAGGTAAGGTAAGGTAAGGT – 3'
AP-Cons1	5' – TGGAATGGAAT- dU -GAATGGAATGGAA – 3'
AP-Cons2	5' – TGGAATGGAATG- dU -AATGGAATGGAA – 3'
AP-K1	5' – AAGGTAAGGTA- dU -GGTAAGGTAAGGT – 3'
AP-K2	5' – AAGGTAAGGTAA- dU -GTAAGGTAAGGT – 3'

Таблица 3. Список олигорибонуклеотидов, использованных в работе. «AP» обозначает AP-сайт с защитной 2-нитробензильной группой.

<i>Название</i>	<i>Последовательность</i>
-----------------	---------------------------

каплям при постоянном перемешивании 3 М КСl до конечной концентрации 0.5 М. После инкубации раствора 45 мин при 37°C его наносили на линейный градиент плотности сахарозы (10-30%) в буфере IV с последующим центрифугированием 19 ч при 4°C (ультрацентрифуги «Beckman Optima XE-90» или «Beckman Optima L-90K», роторы SW-28, 20000 об/мин). Фракции, соответствующие 40S и 60S субчастицам, собирали, и субчастицы осаждали из фракций центрифугированием (центрифуга «Beckman Optima XE-90», ротор SW-28, 24000 об/мин, 20 ч, 4°C), предварительно повысив концентрацию Mg^{2+} в них до 15 мМ и снизив концентрацию КСl до 120 мМ. Осадки субчастиц растворяли в воде обычно до концентрации 80-120 ОЕ₂₆₀/мл и полученные растворы хранили в жидком азоте порциями по 20 мкл.

Перед использованием 40S и 60S субчастицы реактивировали инкубацией в буфере А в течение 10 мин при 37°C, затем осветляли при комнатной температуре в течение 1 мин при 14000 об/мин. Для получения 80S рибосом реактивированные и осветленные субчастицы смешивали в мольном соотношении 40S:60S = 1:1,5 и инкубировали 10 мин при комнатной температуре; активность 80S рибосом в поли(U)-зависимом связывании [¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} составляла около 80% (что соответствует уровню связывания около 1,6 моль Phe-тРНК^{Phe} на 1 моль рибосом). В отсутствие поли(U) уровень связывания составлял менее 0.05 моль [¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} на 1 моль 80S рибосом.

Пре-40S субчастицы были выделены Ивановым А.В. (ЛСФР ИХБФМ СО РАН) из ядер, полученных из 40×10^6 клеток НЕК293Т по методике, описанной в работе [238]. Вкратце, собранные клетки промывали 1 мл буфера X, а затем помещали в буфер Y и инкубировали в течение 20 мин при 0°C. После этого клетки пропускали через стерильную инъекционную иглу 27G×1/2" и центрифугировали в течение 5 мин при 4°C (центрифуга «Eppendorf 5430R», ротор FA-45-30-11, 700×g). Осадок ресуспендировали в 0,5 мл буфера Z, обрабатывали ультразвуком 2 раза по 10 сек при 22 МГц и центрифугировали в течение 10 мин при 4°C (центрифуга «Eppendorf 5430R», ротор FA-45-30-11, 13000×g). Полученный супернатант наносили на линейный градиент плотности сахарозы (10-30%) в буфере W и центрифугировали в течение 3 ч при 4°C (ультрацентрифуга «Beckman Optima L-90K», ротор SW-40, 36000 об/мин). Градиентные фракции, содержащие пре-40S субчастицы, собирали, и субчастицы осаждали центрифугированием в течение 17 ч при 4°C (ультрацентрифуга «Beckman Optima L-90K», ротор SW-60, 48000 об/мин).

2.2.2. Выделение рекомбинантного рибосомного белка uS3

Рекомбинантный uS3 (rec-uS3), содержащий на N-конце хвост, включающий 6 остатков гистидина, получали из штамма клеток *E. coli* BL21 (DE3), трансформированного вектором pET-15b со вставленной кДНК uS3 человека (любезно предоставленным д.х.н. А.А.

Малыгиным, ЛСФР ИХБФМ СО РАН) [239]. Штамм выращивали в 0,4 л среды LB, содержащей 100 мг/л ампициллина, в течение 12 ч при 37°. Затем синтез белка индуцировали добавлением IPTG до конечной концентрации 1 мМ и продолжали выращивание штамма при 18°C в течение 6 ч. Клетки собирали центрифугированием и ресуспендировали в 10 мл ледяного буфера O с последующей инкубацией с 1 мг/мл лизоцима в течение 30 мин на льду. Наконец, клетки обрабатывали ультразвуком на льду с частотой 44 МГц, а клеточный дебрис отделяли центрифугированием при 7000×g в течение 20 мин.

Для очистки гес-uS3 клеточный лизат наносили на колонку, заполненную 1 мл Ni-NTA агарозы (Sigma-Aldrich), предварительно уравновешенную раствором Equilibration buffer. Колонку промывали 10 мл того же буфера, но с 500 мМ NaCl, и белки элюировали 10 мл раствора Elution buffer. Полученный белковый раствор подвергали диализу при 4°C в течение 12 ч против буфера Dialysis с использованием мембраны с номинальным отсечением по молекулярной массе в диапазоне 8000-15000 Да (Serva), разбавленной равным объемом глицерина и хранили при -20°C. Концентрация белка в растворе составляла около 0,06 мг/мл (~2 мкМ). Для проверки его чистоты наработанный белок разбавляли в буфере для образцов Лэммли, грели 10 мин при 80°C и разделяли в 12%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии 0.1%-ного SDS.

2.2.3. Получение олигонуклеотидов, содержащих АП-сайт и другие модифицированные звенья

Модельные ДНК – 23-звенные олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие остатки 8-оксогуанина (8-охо-G), уридина (U) или тетрагидрофурана (THF), были синтезированы из коммерчески доступных фосфорамидитов (Glen Research, Стерлинг, Вирджиния, США), очищены и охарактеризованы в лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН. Очистку олигомеров проводили с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ и последующего электрофореза в 20%-ном ПААГ в присутствии 8М мочевины. В очищенные модельные ДНК вводили метку ³²P по 5'-концу с помощью T4-полинуклеотидкиназы (Biosan, Новосибирск, Россия) и [γ -³²P]АТР в соответствии с инструкциями производителя, и обессоливали с помощью микроколоночной ВЭЖХ на колонке с сорбентом NenSorb C18 (DuPont, Уилмингтон, Делавэр, США).

Для получения модельных одноцепочечных (оц) ДНК, содержащих АП-сайт (АП-ДНК), соответствующий меченый олигомер, содержащий остаток дезоксиуридина, обрабатывали 2.5 ед. урацил-ДНК-гликозилазы *E. coli* (любезно предоставлена к.х.н А. Ендункиным, Лаборатория геномной и белковой инженерии ИХБФМ СО РАН), на 100 пмоль олигонуклеотида непосредственно перед использованием в течение 30 мин при 37°C в буфере

Б. Для получения модельной двуцепочечной (дц) АП-ДНК меченый олигомер, содержащий остаток дезоксиуридина (45 мкМ), отжигали с комплементарным ему олигомером (90 мкМ) в 6 мкл буфера В в течение 2 мин при 95°C. Затем смесь инкубировали 5 мин при 37°C и 30 мин при 25°C. Наконец, полученный дуплекс ДНК обрабатывали урацил-ДНК-гликозилазой *E. coli*, как описано выше, и полученную двуцепочечную АП-ДНК сразу же использовали. Олигорибонуклеотиды AAUAAAUAU и AAUAAAUUC, окисленные периодатом натрия до диальдегида по 3'-концевой рибозе, получали, как описано ранее [240].

Синтетические 23-, 30- и 44- звенные мРНК, содержащие фотолabileную 2-нитробензильную группу в положении С1' в пентозном кольце, лишенном гетероциклического основания, были получены в лаборатории химии РНК Мещаниновой М.И. Их мечение ³²Р по 5'-концу проводили, как описано выше. Защитную группу с АП-сайта на 3'-конце аналога мРНК удаляли облучением мягким УФ светом ($\lambda > 290\text{nm}$) на приборе UVP SpotCure в течение 2 мин в условиях, описанных в [241].

2.2.4. Сшивка 40S субчастиц, пре-40S частиц или гес-uS3 с модельными ДНК

Сшивку меченых ³²Р оц-ДНК или дц-АП-ДНК (1 мкМ) с 40S субчастицами рибосом (3 мкМ) проводили инкубацией соответствующей смеси в буфере А при 25°C в течение 1 ч с последующим добавлением 50 мМ цианоборгидрида натрия NaBH₃CN до конечной концентрации 5 мМ и инкубацией в течение 1 ч при 37°C. В некоторых экспериментах 40S субчастицы предварительно сшивали с диальдегидным производным нанорибонуклеотида AAUAAAUUC (см. раздел 2.2.7), затем данные комплексы (с концентрацией 40S субчастиц 1.75 мкМ) инкубировали с меченой ³²Р оц-АП-ДНК в концентрации 0.6 мкМ в условиях, описанных выше, с последующей обработкой реакционной смеси цианоборгидридом натрия для стабилизации сшивок. В экспериментах с пре-40S частицами их инкубировали в буфере А в концентрации 0.33 мкМ с мечеными ³²Р оц-АП-ДНК в концентрации 0.33 мкМ в течение 1 ч при 25°C, затем реакционную смесь обрабатывали NaBH₃CN и инкубировали при 37°C, как описано выше. Рибосомный материал осаждали добавлением 0,8 объема охлажденного этанола, выдерживали 10 мин при -20°C.

Сшивку гес-uS3 с мечеными ³²Р оц- и дц-АП-ДНК проводили инкубацией белка (0.6 мкМ) с 0.1 мкМ оц- или дц-ДНК в буфере Г в течение 1 ч при 25°C с дальнейшим добавлением NaBH₃CN и инкубацией, как описано в разделе 2.2.4. В экспериментах с гес-uS3 белок осаждали шестью объемами ацетона. Осадок отделяли центрифугированием (центрифуга «Eppendorf 5403», 12500 об/мин, 4°C, 18 мин), высушивали и подготавливали образцы к стандартной процедуре гель-электрофореза. Для этого полученные осадки ресуспендировали в буфере для образцов Лэммли, содержащем додецилсульфат натрия (SDS), инкубировали в течение 10 мин

при 80 °C и анализировали с помощью разделения в 12%-ном ПААГ в присутствии 0.1%-ного SDS в стандартных условиях (SDS-ПААГ). Для проявления белков гели окрашивали Coomassie R250, а для детекции полос белков, сшитых с меченой ДНК, высушенные гели радиоавтографировали. Количественную оценку автордиограмм проводили с помощью Molecular Imager FX Pro (Bio-Rad); средние значения и стандартные отклонения относительных интенсивностей полос рассчитывали из трех независимых экспериментов.

В отдельных экспериментах 40S субчастицы рибосом сшивали с модельными оц- или дц-ДНК в буфере А в конечных концентрациях 1.3 мкМ и 7.4 мкМ соответственно. Реакционные смеси инкубировали при комнатной температуре в условиях, как описано выше, и обрабатывали NaBH_3CN с последующей инкубацией при 37°C в течение 1 ч. После процедуры сшивания 40S субчастицы очищали центрифугированием в градиенте 10-30% сахарозы в буфере Д (ультрацентрифуга «Beckman Optima L-90K», ротор SW-41, 24000 об/мин, 4°C, 17 ч) с последующим их осаждением из соответствующей градиентной фракции этанолом и анализировали с помощью иммуноблотинга. Для этого белки 40S субчастиц после их разделения с помощью SDS-ПААГ, как описано выше, переносили с геля на нитроцеллюлозную мембрану с использованием стандартной процедуры электропереноса, и полосы, содержащие белок uS3, проявляли с помощью коммерческих специфических антител против белка uS3 кролика. Степень сшивки uS3 с модельными ДНК рассчитывали путем сканирования соответствующих сигналов иммуноблотинга с использованием системы визуализации ChemiDoc XRS (Bio-Rad), принимая, что сумма интенсивностей полос сшитого uS3 и немодифицированного uS3 составляет 100%. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы GraphPad Prism на основе двух-трех независимых экспериментов.

2.2.5. Определение уровня связывания модельных ДНК с rec-uS3

Связывание меченых олигомеров ДНК с rec-uS3 проводили при постоянной концентрации олигомера (0,01 мкМ) и переменной концентрации белка (0,01-1 мкМ). Инкубацию компонентов проводили в буфере Е при комнатной температуре в течение 25 мин.

Уровень связывания ДНК-олигомеров с rec-uS3 тестировали независимо двумя методами: с помощью фильтрации на нитроцеллюлозных фильтрах и с помощью метода задержки в геле, проводя электрофорез в нативных условиях при 4°C. В последнем случае в образцы добавляли глицерин до конечной концентрации 5% и наносили на 10%-ный ПААГ, содержащий 25 мМ Трис, 0.2 М глицин и 5%-ный глицерин. Для количественной обработки проводили денситометрирование автордиограмм с использованием Molecular Imager FX Pro (Bio-Rad). Константу диссоциации (K_d) рассчитывали из данных изотерм связывания

олигомеров с белком, полученных методом задержки в геле. Среднее значение K_d для каждой модельной ДНК рассчитывали на основании данных не менее трех независимых серий экспериментов.

2.2.6. Сшивка гес-uS3 с модельной ДНК и специфическое расщепление сшитого белка

Сшивание 5'-³²P-меченого модельного одноцепочечного 23-мера ssAP с uS3 (как с рекомбинантным белком, так и с uS3 в составе 40S субчастиц рибосом человека) и выделение сшитого белка с помощью электрофореза в 15% ПААГ в присутствии SDS проводили, как описано в разделе 2.2.4. Из высушенного геля вырезали кусочки, соответствующие радиоактивным полосам сшитого с модельной ДНК uS3, и использовали их для последующего расщепления белка бромцианом (CNBr, Fluka) или 2-нитро-5-тиоцианобензойной кислотой (NTCB, Sigma-Aldrich). Расщепление в геле модифицированного uS3 под действием CNBr с последующим анализом полученных меченых фрагментов с помощью SDS-ПААГ проводили по методике [242] с несколькими модификациями: фрагменты разделяли в том же геле, что использовали для выделения модифицированного uS3; время инкубации составляло 16 ч, а конечный объем реакционной смеси составлял 0,2 мл.

Расщепление uS3, сшитого с модельной ДНК, с помощью NTCB выполняли следующим образом. Кусочек геля, содержащий модифицированный uS3, инкубировали в 50 мкл буфера Л, содержащем 5 мМ дитиотреитол, при 37°C в течение 4 ч. Затем добавляли такой же объем 0,09 М NTCB в буфере Л и инкубировали смесь при 37°C в течение 1 ч. После инкубации добавляли 25 мкл 1 М NaOH и смесь инкубировали при 37°C в течение 16 ч. Реакцию останавливали добавлением 1/5 объема 85%-ной муравьиной кислоты и высушивали под вакуумом для удаления следов кислоты. Осадок ресуспендировали в буфере для образцов Лэммли, и фрагменты сшитого меченого белка разделяли и проявляли, как описано в разделе 2.2.4.

2.2.7. Получение комплексов 80S рибосом с тРНК и их сшивка с диальдегидным производным нонарибонуклеотида

Для получения 80S рибосом 40S и 60S субчастицы реактивировали инкубацией в буфере А в течение 10 мин при 37°C, так же как в разделе 2.2.1, затем осветляли при комнатной температуре в течение 1 мин при 14000 об/мин, смешивали в мольном соотношении 40S:60S = 1:1,5 в концентрациях 1.88 мкМ и 2.81 мкМ соответственно и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Для получения бинарных комплексов 80S рибосом с тРНК тРНК^{Phe} или тРНК^{Val} реактивировали в буфере А в течение 5 мин при 37°C, смешивали с 80S рибосомами в мольном соотношении 80S:тРНК = 1:3 (конечные концентрации 80S рибосом и тРНК

составляли 1.75 мкМ и 5.3 мкМ соответственно) и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре.

Для блокирования пептида 55-64 белка uS3 полученные комплексы сшивали с диальдегидным производным олигорибонуклеотида AAUAAAUAU. Для этого комплексы инкубировали с данным производным в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего добавляли NaBH₃CN и инкубировали при 37°C 1 ч, как описано в разделе 2.2.4. Конечные концентрации 80S рибосом и диальдегидного производного AAUAAAUAU в реакционных смеси были 1.2 мкМ и 33 мкМ соответственно. Полученные бинарные комплексы с пришитым к пептиду 55-64 белка uS3 в составе 40S субчастиц производным нонарибонуклеотида использовали для получения тройных комплексов с аналогами мРНК, содержащими АП-сайты, и последующих экспериментов по тестированию сшивания этих аналогов с uS3 в составе этих комплексов (см. раздел 2.2.8).

В отдельных экспериментах диальдегидное производное олигорибонуклеотида AAUAAAUUC использовали для сшивания с uS3 в составе 40S субчастиц или гес-uS3; в этом случае инкубацию проводили в тех же условиях, как описано выше, но конечные концентрации субчастиц (или гес-uS3) и производного нонамера составляли 1.6 мкМ и 16 мкМ, соответственно. Затем сшивку стабилизировали добавлением NaBH₃CN и инкубировали при 37°C 1 ч, как описано в разделе 2.2.4. Смеси, содержащие 40S субчастицы, осаждали добавлением 0.8 объема от реакционной смеси холодного этанола с последующим центрифугированием при 4°C в течение 18 мин при 12500 об/мин. Смеси, содержащие гес-uS3, осаждали добавлением 6 объемов от реакционной смеси ацетона с последующим центрифугированием в условиях, описанных выше. Полученные осадки использовали в экспериментах по сшивке 40S субчастиц и гес-uS3 с модельными ДНК (подробнее см. раздел 2.2.4).

2.2.8. Сшивка белка uS3 в составе 80S рибосом с аналогами мРНК, несущими АП-сайты и/или диальдегидным производным нонарибонуклеотида AAUAAAUAU

Бинарные комплексы 80S рибосом с тРНК^{Phe}, полученные, как описано в разделе 2.2.7, инкубировали с аналогами мРНК, содержащими АП-сайт, в буфере А в течение 1 ч при комнатной температуре. Конечные концентрации 80S рибосом и аналогов мРНК в реакционных смесях были 1.2 мкМ. По окончании инкубации комплексы облучали мягким УФ-светом с длиной волны >290 нм в течение 2 мин, в условиях, описанных в разделе 2.2.3, и инкубировали в течение 40 мин при комнатной температуре в темноте. В некоторых экспериментах облучению подвергали бинарные комплексы 80S рибосом с тРНК^{Phe}, в которых рибосомы были сшиты с нанорибонуклеотидом AAUAAAUAU (см. раздел 2.2.7). Затем в смеси, содержащие

облученные комплексы, добавляли 50 мМ NaBH₃CN до конечной концентрации 5 мМ и инкубировали их в течение 1 ч при 37°C. Осаждение рибосомного материала и разделение рибосомных белков с помощью SDS-ПААГ с последующим иммуноблотингом с использованием антител против белка uS3 кролика проводили, как описано в разделе 2.2.4. Расчет степени сшивки uS3 с аналогами мРНК и статистическую обработку результатов проводили, как описано в разделе 2.2.4.

2.2.9. Определение степени связывания меченых аналогов мРНК с 80S рибосомами

Степень связывания окисленных меченых аналогов мРНК с 80S рибосомами определяли с помощью фильтрования на нитроцеллюлозных фильтрах. Предварительно фильтры обрабатывали 0.6 М КОН при 25°C в течение 20 мин для уменьшения неспецифической сорбции меченых аналогов, затем промывали 5 раз бидистиллированной водой и хранили в буфере А. На один эксперимент по фильтрованию из каждой реакционной смеси отбирали аликвоты, соответствующие примерно 1 пмоль 80S рибосом. Сначала комплексы разбавляли буфером А до 0.6-0.8 мл и фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры площадью 2.3 см², затем фильтры промывали два раза буфером А по 0.8 мл. Радиоактивность фильтров измеряли по Черенкову и, учитывая удельную радиоактивность меченого аналога мРНК, рассчитывали степень их связывания с 80S рибосомами (моль аналога мРНК на моль рибосом).

2.2.10. Анализ расщепления аналогов ДНК по АП-сайтам рекомбинантным белком uS3 и белком uS3 в составе рибосомы

Для анализа эффективности расщепления модельных 5'-меченых оц-АП-ДНК белком гес-uS3 или 40S субчастицами ДНК инкубировали с белком или субчастицами 1 ч при 37°C при постоянной начальной концентрации АП-ДНК (0.5 мкМ) и переменной концентрации белка или 40S субчастиц. Продукты расщепления модельных АП-ДНК разделяли электрофорезом в ПААГ в присутствии 8М мочевины с последующей радиоавтографией и денситометрической обработкой радиоавтографов с помощью программы Quantity One для определения степени расщепления АП-ДНК. Из полученных кривых зависимости степени расщепления АП-ДНК от концентрации гес-uS3 (или 40S субчастиц) в качестве характеристики эффективности расщепления определяли концентрацию, при которой расщеплению подвергалось 50% АП-ДНК (С-50). В расчет брали средние значения С-50, определенные для каждой модельной ДНК из трех независимых серий экспериментов.

2.2.11. Определение участков связывания геномной ДНК человека с белком uS3 в составе хроматина

Чтобы определить участки связывания рибосомного белка uS3 на геномной ДНК в хроматине, использовали метод ChIP-seq (Chromatin Immunoprecipitation Sequencing), примененный к клеткам НЕК293 в соответствии с описанной методикой [243]. Суть метода состоит в обработке клеток формальдегидом для образования сшивок ДНК с белками, последующей фрагментации ДНК ультразвуком и выделении сшитых с белком фрагментов ДНК с помощью иммунопреципитации с использованием специфических антител против uS3 кролика, конъюгированных с Protein G Dynabeads (Thermo Fischer Scientific). Далее ковалентные связи между белком и ДНК разрушали нагреванием в течение 6-18 ч при 65°C и полученные фрагменты передавали в Центр коллективного пользования «Геномика» СО РАН для получения библиотек кДНК и их последующего глубокого секвенирования. В результате получили риды длиной 50 пар оснований, и анализировали данные с помощью программного обеспечения CLC GW 9.5 (Qiagen). После удаления адаптеров и контроля качества риды картировали на версию генома hg38. В дальнейшем анализе использовали пики экспериментальных образцов, не перекрывающиеся с пиками, полученными в контрольном эксперименте без антител. Идеограммы хромосом получали с использованием Genome Decoration Page (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp). Данные о ридх ChIP-seq, полученные в настоящей работе, депонированы в GenBank (study accession PRJNA310826, experiment accessions SRX2312326 - SRX2312330). Анализ и результаты в данном разделе были получены к.б.н. Гопаненко А.В. совместно с Центром коллективного пользования «Геномика» СО РАН под руководством Кабилова М.Р.

2.2.12. Претрансляционная обработка лизата ретикулоцитов кролика и сшивка рибосом с мРНК, содержащей АП-сайт

Для того, чтобы удалить эндогенную мРНК, из лизата ретикулоцитов кролика (ЛРК) (Promega), содержащего 30 мкМ гемин, ЛРК размораживали во льду и выдерживали в течение 15 мин при 37°C в буфере К. Затем его обрабатывали микрококковой эндонуклеазой (МНаза, 0.2 ед.акт./мкл) в присутствии 2 мМ CaCl₂ в течение 40 мин при 37°C. Действие МНазы останавливали добавлением EGTA до конечной концентрации 4 мМ. К обработанному лизату добавляли ³²P-меченую модельную мРНК, содержащую АП-сайт, до конечной концентрации 2 мкМ, и смесь инкубировали при 37°C в течение 40 мин с последующей обработкой NaBH₃CN, как описано в разделе 2.2.4. После этого из смеси выделяли рибосомы центрифугированием в линейном градиенте плотности сахарозы (15%-30%) в буфере Л (ультрацентрифуга «Beckman Optima L-90K», ротор SW-41, 25000 об/мин, 4°C, 17 ч) с последующим фракционированием градиента. Фракции, соответствующие 80S рибосомам, объединяли, и рибосомный материал осаждали двумя объемами холодного этанола, предварительно добавив гликоген до

концентрации 4 мг/л в качестве носителя и Mg^{2+} до концентрации 20 мМ. Полученные осадки 80S рибосом растворяли в буфере, содержащем 1%-ный SDS и 10 мМ EDTA, и инкубировали в течение 20 мин при 37°C для диссоциации рибосом на белки и рРНК. Белки осаждали шестью объемами ацетона; полученные осадки растворяли в буфере для образцов Лэммли и анализировали с помощью SDS-ПААГ, как описано в разделе 2.2.4.

2.2.13. Постмечение РНК

Комплексы эндогенных 80S рибосом ретикулоцитного лизата с 44-х звенными аналогами мРНК, содержащими АП-сайт, получали, как описано в разделе 2.2.12. Все последующие процедуры, включая обработку комплексов $NaBH_3CN$, центрифугирование в градиенте плотности сахарозы и осаждение рибосомного материала проводили, как описано в том же разделе. В некоторых экспериментах буфер К содержал 5 мМ анизомицин. В других опытах, где указано, буфер К вместо рибо-GTP содержал 2 мМ негидролизующий аналог GTP (GMPPNP). Суммарную РНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции и осаждали ее 2.5 объемами этанола, предварительно добавив гликоген до концентрации 4 мг/л и 1/10 объема 3 М NaOAc (рН 5.0). Осадок растворяли в буфере М, инкубировали в течение 25 мин при 30°C, затем вновь осаждали, как описано выше. Выделенную РНК метили по 3'-концу с помощью $[^{32}P]pCp$ и T4 РНК-лигазы в RNA ligase buffer в течение 18 ч при 4°C. Полученную меченую РНК осаждали этанолом, как описано выше, растворяли в 15 мкл формамида, содержащего красители ксиленцианол и бромфеноловый синий, и анализировали электрофорезом в 10%-ном ПААГ в присутствии 8 М мочевины. Электрофорез вели до выхода обоих красителей из геля. По окончании электрофореза гель высушивали и радиоавтографировали.

2.2.14. Трансляция мРНК в ЛРК с использованием $[^{35}S]$ -метионина ($[^{35}S]$ -Met)

Трансляцию мРНК рибосомами человека в ЛРК, освобожденном от эндогенных рибосом и мРНК, проводили по методике [244] с использованием $[^{35}S]$ -Met (American Radiolabeled Chemicals Inc.) в конечной концентрации 0.25 мМ. С этой целью размороженный во льду ЛРК центрифугировали в течение 19 ч при 12300 об/мин при 4 °C (ультрацентрифуга «Optima XE-90 Beckman», ротор Ti-42.2), супернатант обрабатывали МНазой, как описано в разделе 2.2.12, и затем добавляли ингибитор рибонуклеаз Ribolock до конечной концентрации 0.5 ед.акт./мкл. В некоторых экспериментах к обработанному ЛРК добавляли 40S и 60S-субчастицы рибосом из плаценты человека (см. раздел 2.2.1) до конечной концентрации 0.1 мкМ и 0.15 мкМ соответственно. Буфер К содержал вместо 0.25 мМ раствора смеси 20 аминокислот смесь из 19 аминокислот с исключением метионина, и $[^{35}S]$ -Met. Сшивку эндогенных рибосом с 44-х

звенными синтетическими мРНК с последующей обработкой NaBH_3CN проводили, как описано в разделе 2.2.12. Комплексы, содержащие 80S рибосомы, выделяли из трансляционных смесей центрифугированием в градиенте плотности сахарозы (15%-30%) в условиях, описанных в разделе 2.2.12. Суммарный белок выделяли из фракций 80S рибосом, осаждали этанолом, ресуспендировали в 1%-ном SDS, содержащем 10 мМ EDTA, и инкубировали в течение 20 мин при 37°C с последующим осаждением шестью объемами холодного ацетона (как в разделе 2.2.12). Осадки вновь ресуспендировали в 50 мкл раствора, содержащего 1%-ный SDS и 10 мМ EDTA, выравнивали объемы, добавлением данного раствора, и наносили на хроматографические бумажки площадью $1.5 \times 1.5 \text{ см}^2$ с последующей автордиографией.

ГЛАВА 3. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РИБОСОМНОГО БЕЛКА uS3 ЧЕЛОВЕКА С АПУРИН-АПИРИМИДИНОВЫМИ САЙТАМИ В ДНК И В мРНК (РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ)

Как уже упоминалось в обзоре литературы, рибосомный белок uS3, с одной стороны, является одним из ключевых компонентов важнейшего функционального центра рибосомы – мРНК-связывающего, а с другой стороны, он обладает наибольшим среди рибосомных белков набором неканонических функций, которые связаны, в основном, с взаимодействием с ДНК. При этом даже в отношении наиболее давно известного внерибосомного свойства белков семейства uS3, связанного с их способностью взаимодействовать с АП-сайтами, оставалось множество неизученных аспектов, касающихся, в частности, критериев выбора белком участков ДНК для взаимодействия с АП-сайтами, возможности проявления неканонических функций белком, находящимся в составе рибосомных или пре-рибосомных частиц и пр. Для изучения этих аспектов функционирования белка uS3 человека длиной 243aa, который имеет молекулярную массу 26,7 kDa, и содержит два домена: КН-домен и С-концевой домен, в настоящей работе применен арсенал методов и подходов, наработанных в лаборатории структуры и функции рибосом ИХБФМ СО РАН за многие годы исследований взаимодействия рибосом и рекомбинантных рибосомных белков человека с различными производными РНК. В первую очередь, это касается подходов к получению, разделению и идентификации ковалентных аддуктов рибосомных белков с производными РНК, которые были плодотворно использованы в многочисленных работах лаборатории, направленных на установление контактов мРНК с рибосомными белками в процессе трансляции, выполненных с использованием аффинной модификации рибосом реакционноспособными аналогами мРНК. Для изучения взаимодействия рибосомного белка uS3 человека с нуклеиновыми кислотами в настоящей работе были использованы короткие модельные ДНК и мРНК, несущие АП-сайт в заданном положении. Для получения таких ДНК при их химическом синтезе в соответствующее положение цепи внедряли дезоксиуридин, который превращали перед использованием в АП-сайт в результате удаления основания урацил-ДНК-гликозилазой; в модельные мРНК АП-сайт, защищенный легко снимаемой 2-нитробензильной группой, был введен также непосредственно в процессе их синтеза. В дополнение к этим подходам, для установления участков связывания белка uS3 на геномной ДНК в составе хроматина в работе был использован метод Chip-Seq, основанный на образовании индуцированных формальдегидом сшивок белок-ДНК в клетках с последующей иммунопреципитацией белка и определением сшитых с ним последовательностей ДНК с помощью высокопроизводительного секвенирования.

3.1. Способность белка uS3 в составе 40S субчастиц рибосом сшиваться с АП-сайтом в оц-ДНК

На первом этапе работы было исследовано, способен ли uS3 человека в составе рибосомы сшиваться с АП-сайтом в ДНК и расщеплять ДНК по этому сайту подобно тому, как это делает изолированный uS3 [18]. Для этой цели была использована модельная 23-звенная одноцепочечная (оц) ДНК, несущая звенья, имитирующие различные окислительные повреждения (рис. 13) и 40S субчастицы рибосом из плаценты человека.

оц-ДНК: 5'-СТСТСССТТСХСТССТТТСССТСТ-3'

кДНК: 5'-AGAGGAAAGGAGCGAAGGGAGAG-3'

Х=G, 8-охо-G, dU или THF

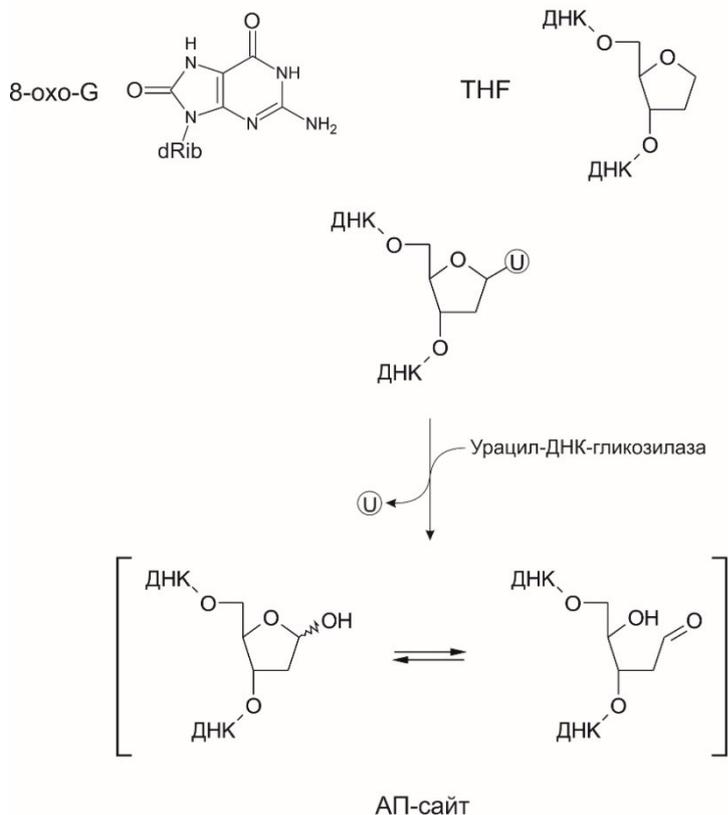


Рисунок 13. Нуклеиновые кислоты и их производные, использованные в данной части работы. Оц-ДНК, одноцепочечная 23-звенная модельная ДНК; кДНК, комплементарный ей 23-мер; THF, тетрагидрофуран; 8-охо-G, 8-оксогуанин. Остаток dU в соответствующем 23-мере превращали в АП-сайт перед использованием с помощью урацил-ДНК-гликозилазы. Он представлен в равновесии между гидроксильной и альдегидной формами (в природе равновесие преимущественно сдвинуто в сторону гидроксильной формы [107]).

Радиоавтограф геля, представленный на рис. 14А, показывает результаты сшивки 40S субчастиц с мечеными 23-звенными оц-ДНК, несущими различные повреждения. Видно, что сшивка 40S субчастиц происходит только с оц-ДНК, содержащей АП-сайт (рис. 14А, дорожка 1). Иммуноблоттинг с использованием антител против белка uS3 (рис. 14Б) выявил интенсивный дублет, соответствующий немодифицированному uS3, а также более слабую двойную полосу

на дорожке 3, чье положение соответствует положению дублета на радиоавтографе (рис. 14А). Следовательно, сшивка оц-ДНК происходит именно с белком uS3 через АП-сайт. Этот белок проявляется в виде двойной полосы потому, что в составе 40S субчастицы он существует в двух формах – фосфорилированной (верхняя полоса) и дефосфорилированной (нижняя полоса), которые имеют разную электрофоретическую подвижность [240]. Обе полосы в дублете имеют одинаковую интенсивность, что отражает примерно равное содержание форм uS3 в рибосоме. Однако в дублете, соответствующем сшитому uS3, верхняя полоса намного слабее нижней, что указывает на то, что в сшивке предпочтительно участвует белок в дефосфорилированной форме (рис. 14Б, дорожка 3). Модельные ДНК с другими вставками, имитирующими окислительные повреждения, – остатками 8-оксогуанина (наиболее распространенного окисленного пурина) или тетрагидрофурана (неальдегидного аналога АП-сайта, устойчивого к β-элиминированию), сшивок с белком uS3 не образуют. Об этом свидетельствует отсутствие на радиоавтографе и иммуноблоте каких-либо сигналов, которые можно было бы отнести к сшитому uS3 (рис. 14). Поскольку на радиоавтографе нет также сигналов, которые можно было бы отнести к сшивкам модельной ДНК с другими рибосомными белками, помимо uS3, сделан вывод, что uS3 является единственным белком 40S субчастицы, способным образовывать ковалентный аддукт с АП-сайтами в оц-ДНК.

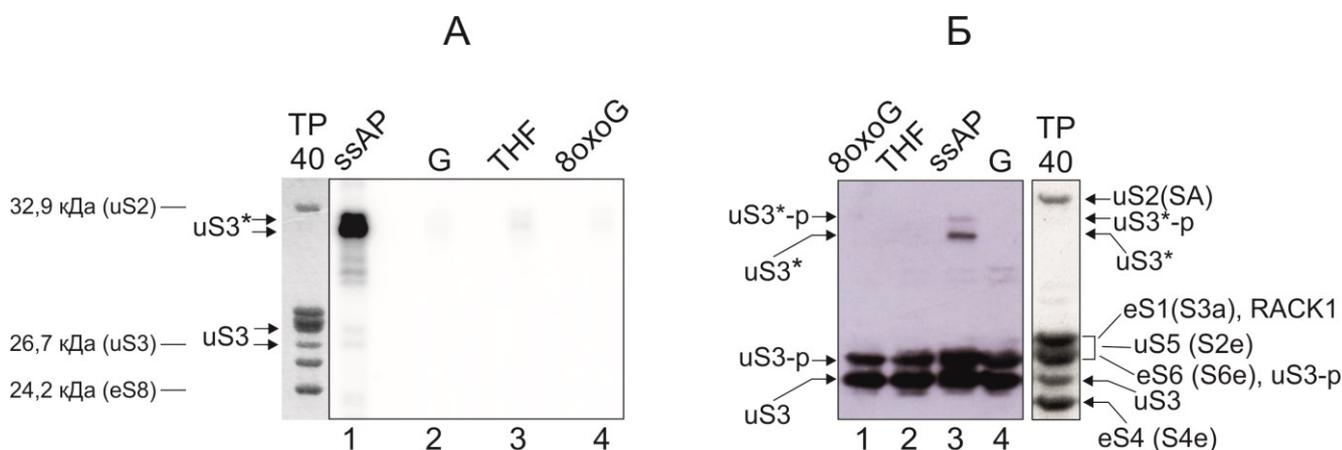


Рисунок 14. Идентификация сшивок модельных оц-ДНК с рибосомным белком uS3 в составе 40S субчастицы. (А) Анализ рибосомных белков 40S субчастиц, инкубированных с 5'-³²P-мечеными производными ДНК, с помощью SDS-ПААГ. Радиоавтограф геля. (Б) Анализ рибосомных белков 40S субчастиц, инкубированных с производными ДНК, с помощью иммуноблотинга с использованием специфических антител против uS3 кролика. Дорожки «ТР40» соответствуют суммарному белку 40S субчастицы после разделения в SDS-ПААГ и окрашивания геля Coomassie R250. Полосы, соответствующие рибосомным белкам, подписаны на рисунке; полосы, соответствующие фосфорилированному белку uS3, обозначены uS3-p; полосы, соответствующие сшитому белку uS3, обозначены звездочками. Обозначения 8oxoG, THF, ssAP и G соответствуют опытам с 40S субчастицами, инкубированными с оц-ДНК, содержащими соответственно остатки 8-оксогуанина, тетрагидрофурана, АП-сайт или немодифицированный G.

3.2. Различия во взаимодействиях с АП-сайтами ДНК белка uS3 в составе 40S субчастиц рибосом и изолированного uS3

Сравнительный анализ способностей рекомбинантного рибосомного белка uS3 человека (гес-uS3) и белка uS3 в составе 40S субчастиц рибосом человека сшиваться с АП-сайтом в оц-ДНК и дц-ДНК был проведен с использованием описанных выше 23-звенных 5'-³²P-меченых модельных ДНК и последующего разделения сшитых белков с помощью SDS-ПААГ. Оказалось, что в отличие от белка uS3 в составе 40S субчастицы, образующего сшивки только с оц-АП-ДНК (рис. 15А), гес-uS3 способен сшиваться как с оц-АП-ДНК, так и с дц-АП-ДНК, хотя с последней намного менее эффективно (рис. 15Б). Кроме того, в результате сшивки гес-uS3 с АП-ДНК образовывались два продукта, значительно отличающихся друг от друга по своей электрофоретической подвижности, идентификацию которых проводили, основываясь на ранее полученных в нашей лаборатории данных об электрофоретической подвижности белка uS3, сшитого с различными ³²P-мечеными олигонуклеотидами [240]. Согласно этим данным продукт, соответствующий верхней полосе, отнесен к сшивке гес-uS3 с полноразмерной АП-ДНК, а продукт, соответствующий нижней полосе, которая была основной, – к его сшивке с 5'-концевым 10-звенным фрагментом АП-ДНК, образующимся после ее расщепления по АП-сайту (рис. 15Б). Количественная обработка результатов, приведенных на рис. 15Б, показала, что на долю продукта, соответствующего нижней полосе, приходится более 75% сшивок белка с АП-ДНК. Можно заметить, что электрофоретическая подвижность у гес-uS3, сшитого с полноразмерной оц-ДНК (рис. 15Б), несколько меньше, чем у uS3, сшитого с той же оц-ДНК, в составе 40S рибосомы (рис. 15А). Это ожидаемо, поскольку гес-uS3 имеет дополнительно 20 аминокислотных остатков за счет N-концевого «хвоста», содержащего 6 остатков гистидина. Таким образом, гес-uS3 и uS3 в составе 40S субчастиц сшиваются с АП-ДНК по-разному; более того, uS3 в составе рибосомы, в отличие от гес-uS3, не расщепляет ДНК по АП-сайту.

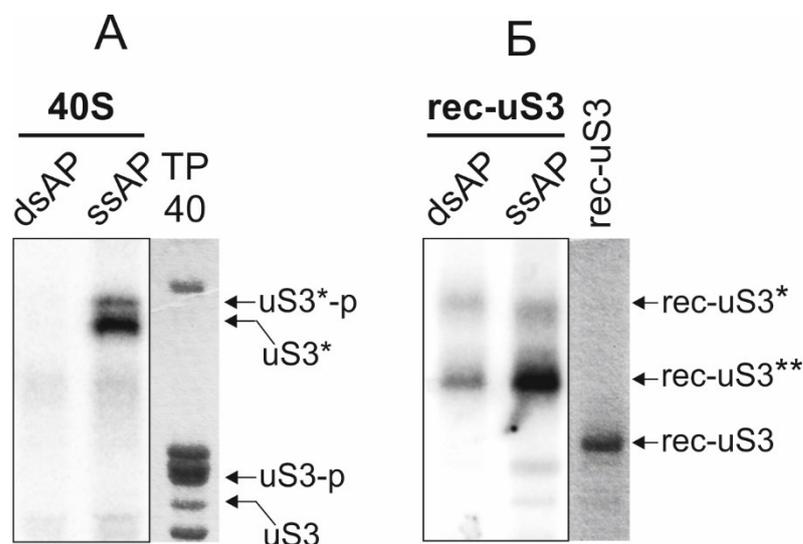


Рисунок 15. Анализ сшивки 5'-³²P-меченых дц-АП-ДНК и оц-АП-ДНК (dsAP и ssAP соответственно), с белком uS3 в составе 40S субчастицы рибосом человека (А) и с rec-uS3 (Б) с помощью SDS-ПААГ. Радиоавтограф геля. Rec-uS3** – рекомбинантный рибосомный белок uS3, сшитый с фрагментом ДНК, оставшимся после ее расщепления по АП-сайту, rec-uS3* – рекомбинантный рибосомный белок uS3, сшитый с полноразмерной 23-звенной ДНК. Полосы, соответствующие фосфорилированному белку uS3, обозначены uS3-p; полосы, соответствующие сшитому белку uS3, обозначены звездочками. Слабые полосы, наблюдаемые ниже полос сшитого белка uS3, не воспроизводимы и не обсуждаются.

3.3. Участок сшивки белка uS3 в составе 40S субчастиц рибосом с АП-сайтом оц-ДНК

Для того чтобы выяснить, какой участок белка uS3 в составе 40S субчастицы рибосомы сшивается с АП-сайтом оц-ДНК, использовали подход, основанный на конкуренции за сшивание с этим белком между модельной оц-ДНК и производным олигорибонуклеотида с 3'-концевой рибозой, окисленной до диальдегида. Выбор этого подхода обусловлен тем, что, как ранее было показано в нашей лаборатории, производные такого типа сшиваются независимо от их длины и последовательности с пептидом 55-64 в КН-домене (от англ. K homology domain) белка uS3, экспонированным на поверхности 40S субчастицы [240]. Эффективность этого сшивания настолько высока, что белок uS3 оказывается модифицированным в большей части (до 70-80%) рибосом. Очевидно, в сшивке принимает участие остаток Lys62 или Arg64, поскольку в данном пептиде нет других остатков, способных образовывать основания Шиффа с альдегидами. КН-домен – это структурный мотив, присутствующий во многих нерибосомных белках, который, как полагают, отвечает за взаимодействия белков с одноцепочечными нуклеиновыми кислотами. Результаты, представленные на рис. 16А (дорожка 2) показывают, что блокирование пептида 55-64 uS3 с помощью сшивки с окисленным производным нонарибонуклеотида лишает 40S субчастицу способности сшиваться с оц-АП-ДНК. Такого

эффекта не наблюдали с 40S рибосомами, предварительно инкубированными с немодифицированным нонамером вместо его диальдегидного производного (рис. 16А, дорожка К). На основании этих результатов сделан вывод о том, что участок сшивки оц-АП-ДНК находится во фрагменте 55-64 или прилегает к нему.

Наконец, с помощью иммуноблотинга с использованием антител против белка uS3 установлено, что rec-uS3, в отличие от uS3 в составе 40S субчастицы, не взаимодействует своим КН-доменом с производным олигорибонуклеотида с окисленной 3'-концевой рибозой. Как видно из рис. 16Б (дорожка 2), после инкубации rec-uS3 с этим производным на мембране не наблюдали никаких сигналов, которые можно было бы отнести к модифицированному белку. Это указывает на вероятные различия между структурами uS3 в составе 40S субчастицы и изолированного uS3 и на связанные с этим различия во взаимодействии с одноцепочечными нуклеиновыми кислотами.

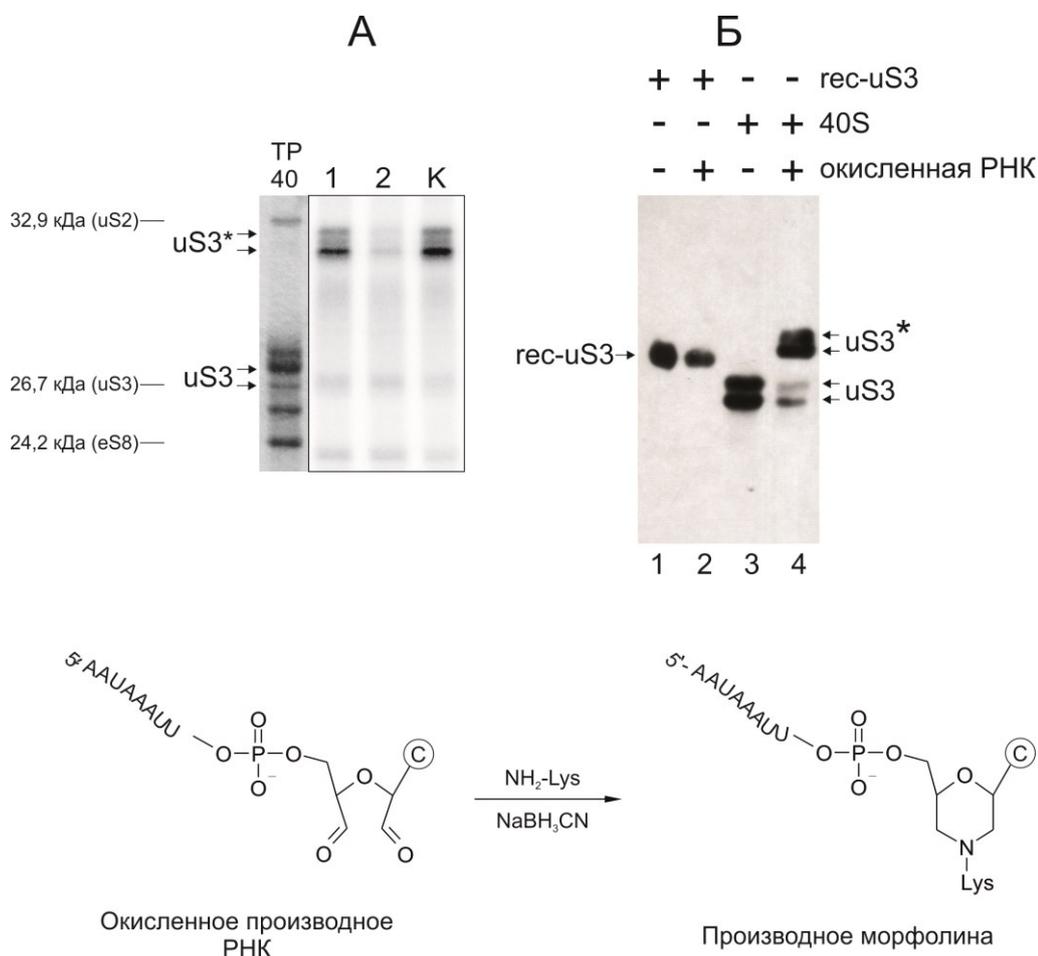


Рисунок 16. Сшивка 3'-диальдегидного производного нонарибонуклеотида AAUAAAUUC («окисленная РНК») с белком uS3 в составе 40S субчастицы (А) и с rec-uS3 (Б), и влияние производного, сшитого с белком uS3 в составе 40S субчастицы, на способность uS3 сшиваться с оц-АП-ДНК. Панель А, радиоавтограф геля после разделения в SDS-ПААГ белков, выделенных из 40S субчастиц, инкубированных с 5'-³²P-меченой оц-АП-ДНК в отсутствие производного нонарибонуклеотида (1), из 40S субчастиц, предварительно инкубированных с этим

производным (2), и из 40S субчастиц, предварительно инкубированным с немодифицированным нонарибонуклеотидом (3). Панель Б, иммуноблот после инкубации гес-uS3 (дорожка 2) и 40S субчастиц (дорожка 4) с производным AAUAAAUUC. Дорожки 1 и 3 соответствуют контрольным гес-uS3 (1) и 40S субчастицам (3), инкубированным в отсутствие производного нонарибонуклеотида. Звездочкой обозначены полосы, соответствующие сшитому uS3. Внизу представлена схема реакции производного нонаолигорибогуклеотида, 3'-конец которого окислен до диальдегида с помощью NaIO₄, с отаском лизина с образованием производного морфолина [245].

3.4. Анализ АП-лиазной активности изолированного рибосомного белка uS3

Для анализа способности гес-uS3 расщеплять ДНК, содержащие АП-сайт, использованы описанная выше модельная 23-звенная оц-АП-ДНК и ее дуплекс с комплементарным 23-мером в качестве дц-АП-ДНК. Обнаружено, что гес-uS3 расщепляет оц-АП-ДНК намного эффективнее, чем дц-АП-ДНК (рис. 17). Количественная оценка результатов показала, что при 0.12 мкМ гес-uS3 доля нерасщепленной дц-АП-ДНК была в (2,8 ± 0,8) раза больше, чем в случае с оц-АП-ДНК, а при 0.75 мкМ гес-uS3 оц-АП-ДНК расщеплялась количественно, тогда как более 30% дц-АП-ДНК оставалось нерасщепленной. Значительные различия в свойствах изолированного рибосомного белка uS3 человека, проявляемых им по отношению к оц-АП-ДНК и дц-АП-ДНК, обнаружены впервые, поскольку, насколько нам известно, в более ранних исследованиях [12, 18, 19, 162] использовали только дц-ДНК, содержащие АП-сайт. Как и ожидалось, гес-uS3 не оказывал воздействия на модельные 23-звенные ДНК с остатками гуанина, 8-оксогуанина или тетрагидрофурана вместо АП-сайта (соответствующий радиоавтограф геля не приведен).

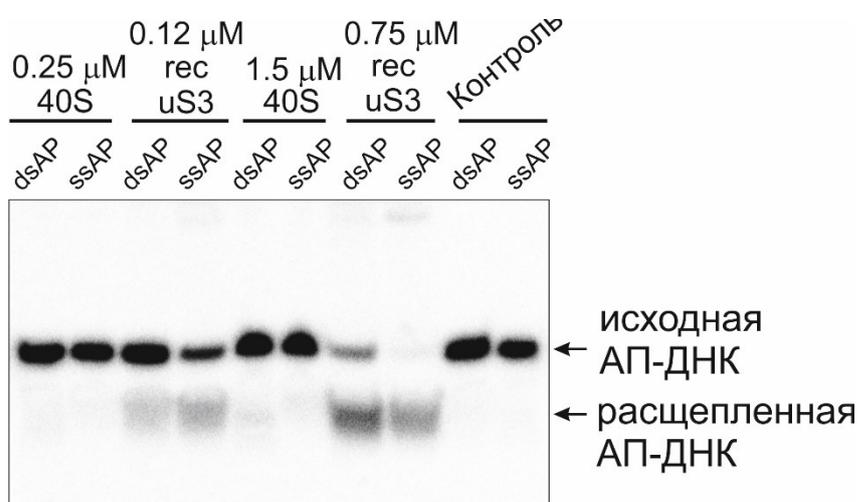


Рисунок 17. Анализ расщепления 5'-³²P-меченых оц-АП-ДНК (ssAP) и дц-АП-ДНК (dsAP), инкубированных с гес-uS3 или 40S субчастицами, взятыми в разных концентрациях

(обозначены сверху). Радиоавтограф геля после разделения в ПААГ в присутствии 8 М мочевины. Дорожки «Контроль» соответствуют экспериментам с модельными ДНК, инкубированными в отсутствие гес-uS3 и 40S субчастиц.

Результаты по расщеплению АП-ДНК белком гес-uS3 хорошо коррелируют с приведенными выше данными по сшивкам этого белка с АП-ДНК (раздел 3.2), показывающими преимущественное сшивание гес-uS3 с продуктом расщепления модельной ДНК, то есть с 10-мером (рис. 15Б). Что касается белка uS3 в составе 40S субчастицы рибосомы, он неспособен расщеплять ни оц-АП-ДНК, о чем уже упоминалось в разделе 3.2, ни дц-АП-ДНК (рис. 17), причем расщепления не удавалось наблюдать даже при максимально достижимых концентрациях (5 мкМ) 40S субчастиц (соответствующий радиоавтограф не приведен).

Анализ пространственной структуры 40S субчастицы показал, что аминокислотные остатки uS3, замены которых влияют на ферментативную активность изолированного белка [16, 19], экранированы в 40S субчастице и участвуют во внутри-рибосомных взаимодействиях (рис. 18). Это, вероятно, и является причиной того, что белок uS3 в составе 40S субчастицы полностью теряет АП-лиазную активность, присущую изолированному белку. Кроме того, этот анализ показал, что участок сшивки АП-сайта в КН-домеине белка uS3 в составе 40S субчастицы – пептид 55-64 находится на значительном удалении от аминокислотных остатков предположительно вовлеченных в формирование каталитического центра данного белка (рис. 18).

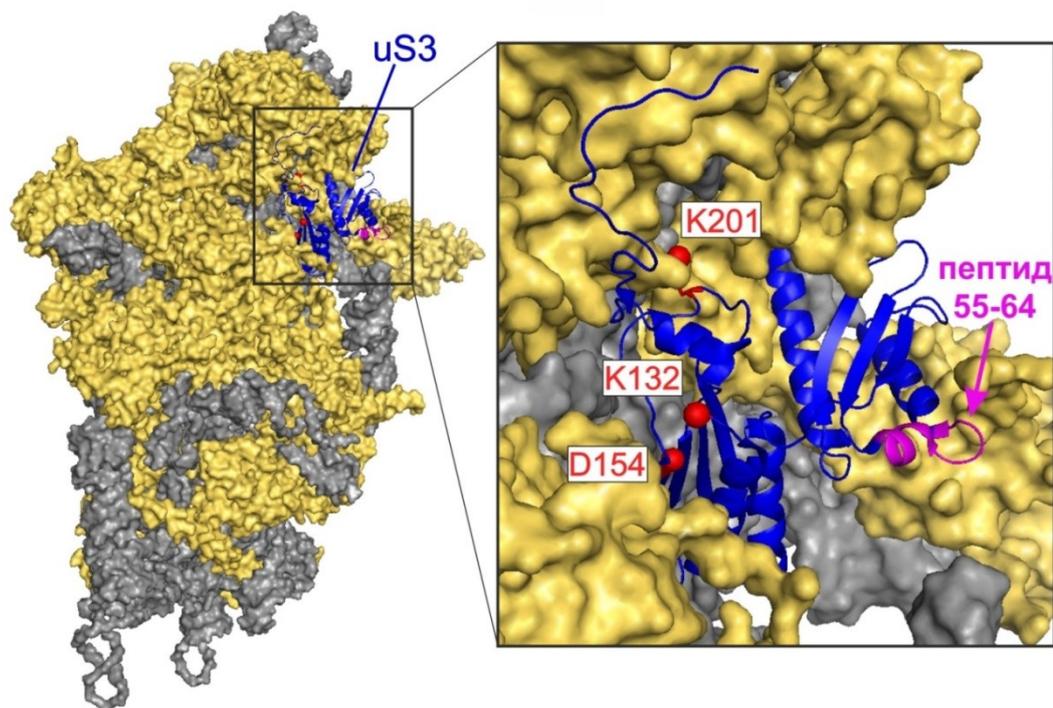


Рисунок 18. Расположение белка uS3 на 40S субчастице рибосомы млекопитающих ([246]; PDB 4KZX). Слева – общий вид с внешней стороны субчастицы, справа – увеличенная структура

области 40S субчастицы, содержащей белок uS3, выделенный синим цветом. Фрагмент 55-64 белка uS3, сшивающийся с оц-АП-ДНК, выделен сиреневым цветом; аминокислотные остатки, принадлежащие к предполагаемому каталитическому центру [16, 19] представлены красными сферами.

Таким образом, полученные результаты показали, что, скорее всего, структура КН-домена в изолированном белке uS3 и белке uS3 в составе 40S субчастицы, различна. В 40S субчастице пространственная структура или ориентация КН-домена uS3, по-видимому, намного более предпочтительна для взаимодействия с фрагментами РНК, которое может приводить к сшивке терминальных диальдегидных групп с белком uS3, чем в изолированном uS3. Это, очевидно, отражается в разных способах взаимодействия этих форм белка с нуклеиновыми кислотами. Свободный uS3, по-видимому, взаимодействует с АП-сайтами своим каталитическим центром, отвечающим за АП-лиазную активность, тогда как uS3 в составе 40S субчастицы – посредством пептида 55-64 в КН-домене, который расположен вдали от каталитического центра. Следовательно, можно говорить о разных функциях в клетке белка uS3 в составе рибосомы и свободного uS3, связанных с взаимодействием с АП-сайтами.

3.5. Участки связывания рибосомного белка uS3 на геномной ДНК в составе хроматина

Для получения информации о функциональной роли белка uS3 в клетке была проведена идентификация участков связывания этого белка на геномной ДНК человека с использованием метода ChIP-Seq на клетках HEK293. Белок uS3, сшитый с фрагментами клеточной ДНК, был выделен из ядерного лизата клеток, обработанных формальдегидом, с помощью иммунопреципитации с использованием специфических антител против uS3, иммобилизованных на сорбенте – магнитных частицах Dynabeads с ковалентно-присоединенным белком G, после фрагментации сшитой ДНК ультразвуком. Одновременно был проведен контрольный эксперимент, где аналогичные операции были проведены без антител против uS3, а также эксперимент без использования сорбента для получения образца, содержащего полный набор последовательностей ДНК (ридов). Глубокое секвенирование и обработка результатов ChIP-Seq с помощью коммерческого программного обеспечения CLC GW позволило получить около 15 миллионов уникальных ридов. В результате картирования этих ридов на геномной ДНК (версия генома человека hg38) получили 229 пиков, локализованных преимущественно в прицентромерных районах хромосом (в частности, хромосом 1, 2, 4, 7, 10, 16, 17 и 20, см. рис. 19). В хромосомах 7, 10, 16 и 20 пики совпадали с регионами хроматина, так называемыми NAD (от англ. nucleolus-associated chromatin regions), или примыкали к ним (рис. 19).

Дальнейший анализ участков связывания рибосомного белка uS3 показал, что большинство пиков находится в районах, гиперчувствительных к ДНКазе I, где хроматин находится в менее конденсированном состоянии и доступен как для расщепления ДНКазой, так и для связывания ДНК-связывающих белков, таких, как факторы транскрипции [247-250]. Эти районы рассматривают как потенциальные регуляторные участки [249, 250], которые могут служить маркерами многих типов цис-регуляторных элементов – промоторов, энхансеров, сайленсеров и пр. Кроме того, центромерные и прицентромерные районы хромосом содержат много альфа-сателлитных повторов, склонных в значительной степени к формированию петель с одноцепочечными участками ДНК, где содержание АП-сайтов резко повышено [251-253]. Картирование воспроизводимых ридов на геноме человека показало, что частота их попадания в районы альфа-сателлитной ДНК на 30% выше, чем в контрольном эксперименте без антител против белка uS3. Однако метод ChIP-Seq не позволяет узнать, в каком состоянии (изолированном или в составе пре-40S частиц, которые собираются в ядре) рибосомный белок uS3 взаимодействует с тем или иным участком ДНК.

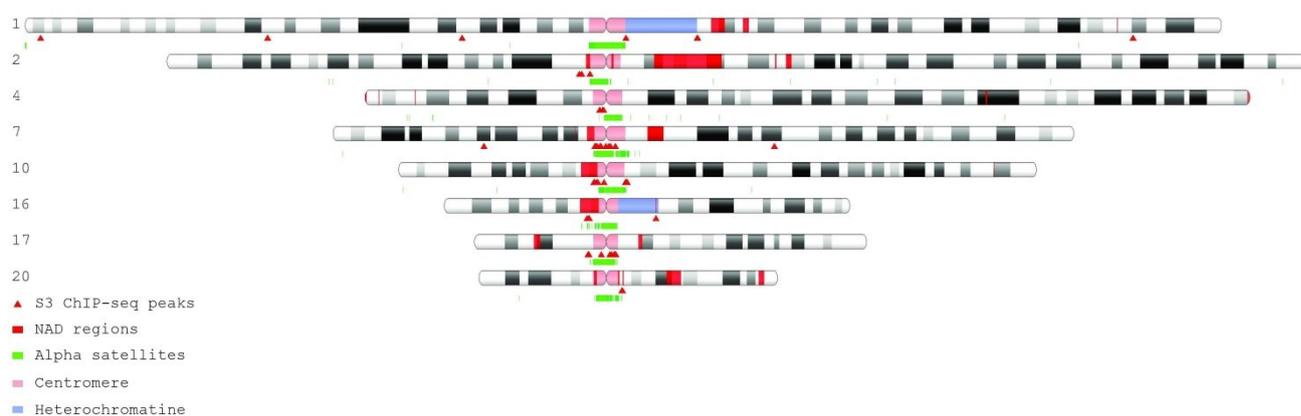


Рисунок 19. Распределение пиков ChIP-Seq для рибосомного белка uS3 на идеограммах хромосом версии генома hg38. Приведены только те хромосомы, в которых найдено более 5 пиков. Положения пиков показаны красными стрелками. Районы хромосом отмечены разными цветами в соответствии с обозначениями, приведенными внизу слева.

3.6. Проверка способности белка uS3 в составе ядерных пре-40S частиц взаимодействовать с АП-сайтами в оц-ДНК

В клетке ДНК может встретиться с рибосомным белком uS3 только в ядре, где он присутствует либо в изолированном виде, либо в составе пре-40S частиц, но не в составе зрелых 40S субчастиц, которые могут находиться только в цитоплазме. Для выяснения вопроса о том, может ли uS3 в составе пре-40S частиц сшиваться с АП-сайтами в оц-ДНК, использовали

ту же модельную 23-х звенную оц-АП-ДНК (рис. 13), что и для изучения сшивок с uS3 в составе зрелых 40S, и пре-40S частицы из ядер клеток НЕК293 человека. Результаты, представленные на рис. 20, показывают, что полосы uS3, сшитого с оц-АП-ДНК, как и ожидалось, отчетливо видны на дорожках 2, соответствующих зрелым 40S субчастицам, как на радиоавтографе (рис. 20В), так и на иммуноблоте (рис. 20А). При этом сигналов, которые можно было бы отнести к модифицированному uS3, не наблюдали в аналогичных опытах с пре-40S частицами (рис. 20А и 20В, дорожки 1) и в контрольных опытах с 40S субчастицами, обработанными 23-мером без АП-сайта (дорожки 3). Отсутствие сшивок с uS3 в случае пре-40S частиц не связано с отсутствием этого белка в них, поскольку соответствующий сигнал четко виден при иммуноблотинге (рис. 20А). Следовательно, белок uS3 в составе пре-40S частицы не способен сшиваться с АП-сайтами в оц-ДНК. Это, по-видимому, связано с тем, что в незрелой 40S субчастице N-концевой домен uS3, который содержит пептид 55-64, связан с фактором сборки Ltv1, а также с тем, что расположение uS3 в пре-40S частице отличается от такового в зрелой субчастице [254-256].

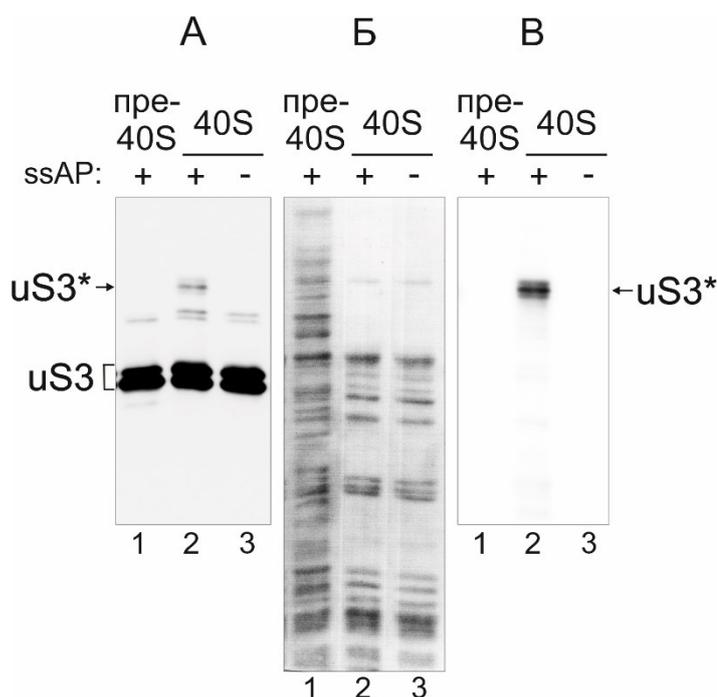


Рисунок 20. Анализ сшивок $5'$ - ^{32}P -меченой оц-АП-ДНК (ssAP) с белком uS3 в составе 40S субчастиц рибосом из плаценты человека (40S) или пре-40S частиц из ядерного экстракта клеток НЕК293 (пре-40S). Иммуноблотинг рибосомных белков, разделенных в SDS-ПААГ, с использованием антител против рибосомного белка uS3 (А); нитроцеллюлозная мембрана, окрашенная Ponceau С, перед ее использованием в иммуноблотинге (Б); радиоавтограф мембраны (В). Стрелками показаны полосы, соответствующие белку uS3, сшитому (uS3*) и не сшитому (uS3) с модельной ДНК.

Поскольку, как уже отмечалось, ДНК и зрелые 40S субчастицы рибосомы никогда не встречаются друг с другом в клетке, то очевидно, что взаимодействие между экспонированным

фрагментом 55-64 uS3 в составе 40S субчастицы и ДНК, наблюдаемое *in vitro*, не имеет биологического значения. Следовательно, способность uS3 в составе 40S субчастиц сшиваться с АП-сайтами в оц-ДНК, обнаруженная в настоящей работе, отражает, скорее всего, способность этого белка участвовать во взаимодействиях зрелых 40S субчастиц с одноцепочечными РНК, в частности с АП-сайт-содержащими мРНК, в цитоплазме. Такое предположение имеет основания, поскольку давно известно, что рибосомы *in vitro* могут связывать оц-ДНК в качестве аналогов мРНК [257-259]. В частности, рибосомы не различают синтетические аналоги мРНК и оц-ДНК со сходными последовательностями при формировании комплекса без кодон-антикодонного взаимодействия в А-участке рибосомы, в котором критическую роль играют 2'-ОН-группы мРНК [260].

3.7. Анализ зависимости сродства рибосомного белка uS3 к оц-ДНК от наличия в ней повторов TGGAA

Анализ последовательностей ДНК хроматина в участках связывания рибосомного белка uS3 человека, идентифицированных методом ChIP-Seq, выявил консенсусные последовательности, выравнивание которых показало наличие в их структуре повторов TGGAA (рис. 21).

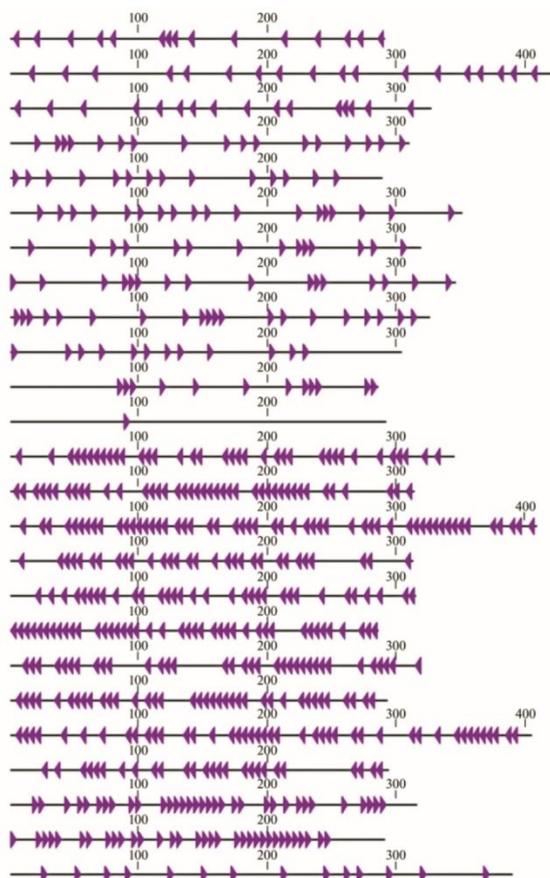


Рисунок 21. Распределение повторов TGGAA (показаны стрелками) в последовательностях, идентифицированных как сайты связывания белка uS3 (см. раздел 3.5), согласно данным ChIP-Seq, депонированным в GenBank (коды доступа PRJNA310826 и SRX2312326–SRX2312330).

Найденный пентануклеотид относится к III типу сателлитной ДНК человека, который встречается в большинстве хромосом и, в частности в прицентромерных районах, в которых преимущественно оказались участки связывания рибосомного белка uS3. Следовательно, можно было предположить, что белок uS3 имеет повышенное сродство к пентамерам TGGAA. Для проверки этого предположения было проведено исследование зависимости сродства uS3 к оц-ДНК от ее последовательности, в частности, от наличия в ней повторов пентамера TGGAA. В качестве модельных ДНК использовали 25-мер (TGGAA) \times 5 («Cons») и 25-мер (AAGGT) \times 5 такого же нуклеотидного состава, что и «Cons», но не содержащий пентамеров TGGAA («K»). Поскольку геномная ДНК двуцепочечна, найденные с помощью метода ChIP-Seq участки связывания рибосомного белка uS3 на геномной ДНК в составе хроматина могли отражать взаимодействия uS3 и с цепью, комплементарной той, которая содержит пентамеры TGGAA. Поэтому в качестве третьей модельной ДНК был использован упомянутый в разделе 3.1 пиримидин-богатый 23-мер CTCTCCCTTCGCTCCTTTCCTCT (далее «G»), содержащий мотивы TTC и TCC, комплементарные триплетам пентамера TGGAA (рис. 13). На рис. 22 приведены данные по связыванию меченых модельных ДНК с uS3, полученные методом задержки в геле, который позволяет детектировать как связанный, так и свободный олигомер, и, соответственно, даёт более точные результаты по сравнению с методом фильтрации на нитроцеллюлозных фильтрах, часто используемым для снятия изотерм адсорбции. Расчет констант диссоциации из данных по связыванию, представленных на рис. 22, показал, что, против ожидания, олигомер «Cons» имеет наименьшее из трех модельных ДНК сродство к рибосомному белку uS3 ($K_d = (5.7 \pm 0.2) \times 10^{-7}$ М). Сродство к этому белку у ДНК «K» заметно выше ($K_d = (3.22 \pm 0.15) \times 10^{-7}$ М), а у пиримидин-богатого олигомера «G» немного больше, чем у контрольной ДНК «K» ($K_d = (2.10 \pm 0.07) \times 10^{-7}$ М).

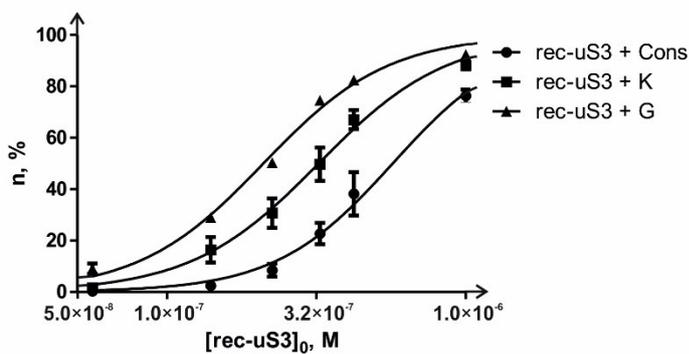
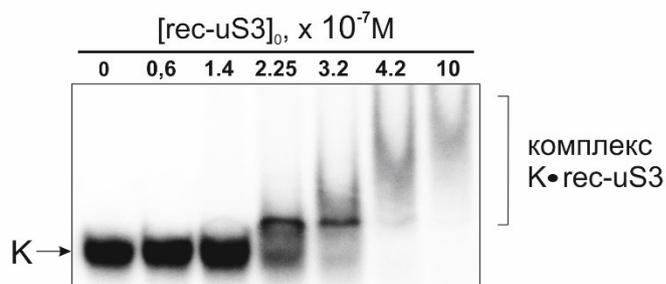


Рисунок 22. Изотермы связывания 5'-³²P-меченых модельных ДНК «G», «K» и «Cons» с рекомбинантным рибосомным белком uS3 человека, рассчитанные из радиоавтографов электрофореграмм, полученных при анализе связывания ДНК с rec-uS3 методом задержки в геле. Внизу приведен типичный радиоавтограф электрофореграммы с модельной ДНК «K» в качестве примера (n – доля связанного с белком олигомера в %).



Данные по связыванию вышеуказанных модельных ДНК с rec-uS3 свидетельствуют о том, что повторы TGGAA, преобладающие в участках хроматина, взаимодействующих с белком, не придают одноцепочечной ДНК повышенного сродства к белку uS3 по сравнению со сродством, проявляемым последовательностями, не содержащими таких повторов. Мотивы TTC и TCC, комплементарные триплетам пентамера TGGAA заметно усиливают это сродство, однако не в такой степени, чтобы обеспечить селективное связывание uS3 с ними в присутствии других последовательностей. Поэтому можно полагать, что высокое содержание данных пентамеров в участках связывания рибосомного белка uS3 на хроматине связано не с повышенным сродством белка к последовательностям (TGGAA)_n, а с большим количеством повторов данного пентамера в открытых районах хроматина, доступных для связывания с данным белком. Вероятно, эти районы оказываются наиболее доступными для связывания (не экранированы гистонами) и/или содержат большое количество петлевых одноцепочечных участков, к которым uS3 имеет более высокое сродство, чем к двуцепочечным.

3.8. Влияние положения АП-сайта в ДНК и ее последовательности на эффективность расщепления белком uS3 по этому сайту

Как уже было сказано в предыдущем разделе, участки сателлитной ДНК, в которых, в частности, расположены повторы (TGGAA)_n, склонны к образованию одноцепочечных петель, в которых содержание АП-сайтов повышено по сравнению с другими участками ДНК. В связи с этим можно было предположить, что uS3 предпочтительно расщепляет ДНК по АП-сайтам в

одноцепочечных районах, которые содержат повторы TGGAA или комплементарные им мотивы. Для изучения влияния последовательности ДНК и положения АП-сайта в ней на эффективность расщепления белком гес-uS3 был использован набор модельных ДНК, похожих на те, что описаны в предыдущих разделах, но содержащих АП-сайт в центральной части. Этот набор включал ДНК «Cons» (раздел 3.7) с АП-сайтом в положениях 12 или 13 (AP1-Cons и AP2-Cons соответственно) и ДНК «К» с АП-сайтом в этих же положениях (AP1-K и AP2-K соответственно), а также оц-ДНК «G» (раздел 3.1) с АП-сайтом в положении 11 (ssAP). Для сравнительного анализа эффективностей расщепления проводили эксперименты, где начальные концентрации АП-ДНК (5×10^{-7} М) в реакционных смесях и время инкубации (1 ч) были постоянны при варьировании концентрации гес-uS3. Продукты расщепления разделяли электрофорезом в ПААГ, содержащем 8 М мочевины, с последующей радиоавтографией (рис. 23) и денситометрической обработкой радиоавтографов для определения степени расщепления АП-ДНК. Из полученных кривых зависимости степени расщепления АП-ДНК от концентрации гес-uS3 (рис. 23) определяли концентрации, при которых расщеплению подвергалось 50% АП-ДНК (C-50), и использовали их в качестве характеристик эффективностей расщепления.

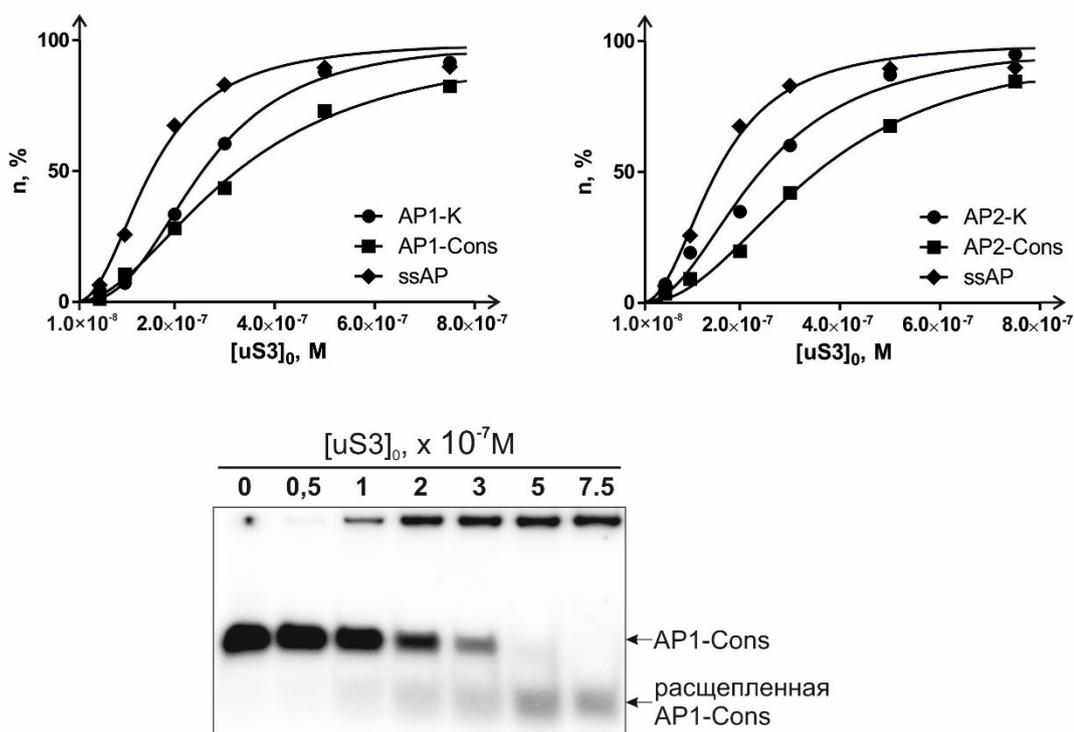


Рисунок 23. Кривые зависимости степени расщепления меченых модельных ДНК с АП-сайтом (взяты в концентрации 5×10^{-7} М) белком гес-uS3 от его концентрации, рассчитанные из соответствующих радиоавтографов электрофореграмм после разделения продуктов расщепления электрофорезом в ПААГ в денатурирующих условиях. Обозначения модельных ДНК даны в тексте. Внизу в качестве примера приведен радиоавтограф с модельной ДНК AP1-Cons. Радиоактивные полосы в самой верхней части геля в районе карманов детектируются

вследствие того, что часть модельной ДНК участвует в сшивках с белком после расщепления, а также из-за образования нерастворимых ДНК-белковых агрегатов

Результаты экспериментов, приведенных на рис. 23, показывают, что положение АП-сайта в ДНК практически не влияет на эффективность ее расщепления, а влияние последовательности ДНК на эту эффективность хорошо коррелирует с зависимостью сродства *hes-uS3* к ДНК от ее последовательности (см. рис. 22). С несколько повышенной эффективностью происходило расщепление *ssAP* ($C_{-50} = (1.62 \pm 0.08) \times 10^{-7}$ М), с наименьшей – *AP-Cons* ($C_{-50} = (3.20 \pm 0.30) \times 10^{-7}$ М), а для *AP-K* было получено промежуточное значение ($C_{-50} = (2.50 \pm 0.30) \times 10^{-7}$ М). Это указывает на то, что сама по себе АП-лиазная активность рибосомного белка *uS3* не зависит от последовательности ДНК, содержащей АП-сайт, и положения АП-сайта в ней, а те различия в эффективностях расщепления АП-ДНК, которые наблюдаются в опытах с модельными ДНК, связаны только с зависимостью сродства белка к ДНК от ее последовательности. Полученные результаты находятся в согласии с нашим предположением, что преимущественное связывание рибосомного белка *uS3* в участках хроматина, содержащих повторы пентамера TGGAA или комплементарные ему мотивы, обусловлено тем, что соответствующие последовательности расположены в наиболее доступных для связывания белка участках геномной ДНК (см. раздел 3.7). Вероятно, благодаря повышенному содержанию АП-сайтов в таких участках, изолированный рибосомный белок *uS3* может предпочтительно принимать участие в репарации ДНК именно в этих участках. Еще в 2008 г. на основе анализа данных по взаимодействию *uS3* с ДНК было высказана гипотеза, что белок *uS3* вряд ли играет существенную роль в глобальной репарации ДНК, но может быть участником этого процесса на определенных участках генома, например, в ядрышке [18]. С этими соображениями вполне согласуются данные ChIP-seq, которые показали, что значительная часть участков связывания *uS3* на хроматине находится в доменах, ассоциированных с ядрышком (см. раздел 3.5). Скорее всего, если *uS3* человека участвует в процессе репарации геномной ДНК, то это происходит преимущественно в доступных участках сателлитной ДНК в этих доменах. По-видимому, эти участки имеют повышенное содержание повторов TGGAA и/или комплементарных им мотивов в одноцепочечных «петлевых» областях. Таким образом, выбор рибосомным белком *uS3* таких сайтов в хроматине может быть обусловлен только их физической доступностью для связывания.

3.9. Аминокислотные остатки рибосомного белка *uS3*, взаимодействующие с АП-сайтом в составе модельной ДНК

Чтобы идентифицировать пептид *hes-uS3*, взаимодействующий с АП-сайтом в 23-звенной ДНК, обозначенной в разделе 3.1 как *ssAP*, очищенный белок сшивали с радиоактивно

меченой модельной ДНК с последующей стабилизацией сшивки цианборгидридом натрия, и разделением продуктов сшивки электрофорезом в SDS-ПААГ так же, как описано в упомянутом разделе. Контрольная смесь содержала вместо гес-uS3 реактивированные 40S субчастицы. Полученные результаты представлены на рис. 24. Дорожка 3 на автордиограмме геля отображает радиоактивную полосу, соответствующую сшивке uS3 в составе 40S субчастицы с ^{32}P -ssAP, как и на рис. 15 (левая панель), где представлены данные по сшивкам 5'- ^{32}P -меченых dsAP и ssAP с белком uS3 в составе 40S субчастиц рибосом человека. Дорожка 2 содержит мажорную и минорную полосы, которые отображают продукты, образующиеся в результате сшивки гес-uS3 с ^{32}P -ssAP. Мажорная полоса соответствует сшивке гес-uS3 с 5'-концевым фрагментом этой модельной 23-звенной АП-ДНК, появляющимся в результате её расщепления по АП-сайту, а минорная полоса – сшивке с полноразмерной нерасщепленной АП-ДНК. Интересно отметить, что интенсивную радиоактивную полосу, соответствующую белку uS3, сшитому с расщепленной модельной ДНК (10-мер), также наблюдали и в случае, когда реакционную смесь не обрабатывали цианборгидридом натрия (рис. 24, дорожка 1), что указывает на необычную для оснований Шиффа подобного рода стабильность без восстановления. Такой стабильности не наблюдали для референсной сшивки uS3 в составе 40S субчастицы в тех же условиях (рис. 24, дорожка 4). Продукт, соответствующий основной полосе сшитого гес-uS3, был использован для определения участка гес-uS3, участвующего в сшивке, с применением протеолитических агентов, расщепляющих пептиды по определенным аминокислотным остаткам, с последующим разделением меченых сшитых пептидов в SDS-ПААГ. Поскольку сшитые фрагменты ДНК значительно затрудняют идентификацию пептидов по их электрофоретической подвижности, в качестве контроля использовали продукт сшивки ^{32}P -ssAP с uS3 в составе 40S субчастицы, учитывая, что в этом случае пептид, участвующий в сшивке, был установлен ранее, и им является пептид 55-64 в КН-домене uS3 (подробнее см. раздел 3.3).

Для установления места сшивки в гес-uS3 были выбраны бромциан (CNBr), муравьиная кислота и 2-йодозобензойная кислота (Ibz), поскольку при расщеплении белка uS3 данными агентами в каждом случае образуется единственный крупный фрагмент (1-127 при обработке CNBr, 33-154 при обработке муравьиной кислотой и 1-192 при обработке Ibz), который легко опознать, поскольку он во много раз больше всех остальных фрагментов, образующихся при расщеплении этими агентами (см. схему внизу рис. 25). Следует отметить, что ни с одним из трех использованных здесь протеолитических агентов не удавалось достичь исчерпывающего расщепления белка uS3, и мы наблюдали полосы, соответствующие как продуктам его как полного, так и неполного расщепления.

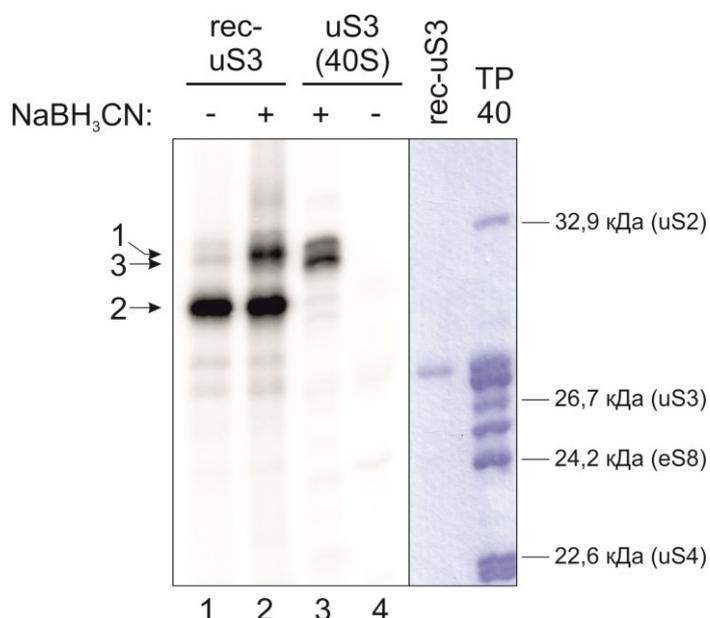


Рисунок 24. Выделение uS3 (рекомбинантного или в составе 40S субчастиц), сшитого с 5'-³²P-меченой 23-звенной модельной ДНК, электрофорезом в 12%-ном SDS-ПААГ. Слева автордиограмма геля. Дорожки 2 и 3 соответствуют экспериментам с rec-uS3 и uS3, сшитому в составе 40S рибосомных субчастиц человека, соответственно, как на рис. 15. На дорожке 2 второстепенная верхняя полоса 1 соответствует rec-uS3, сшитому с полноразмерным 23-мером, а основная нижняя полоса 2 соответствует rec-uS3, сшитому с 5'-концевой половиной 23-звенной ДНК, образующейся в результате ее расщепления по АП-сайту. Полоса 3 на третьей дорожке представляет собой uS3, сшитый с полноразмерным 23-мером на 40S субчастицах. Дорожка «TP40» содержит окрашенные Coomassie R250 полосы, полученные при разделении суммарного белка 40S субчастиц, а дорожка «rec-uS3» - полосу rec-uS3.

Результаты, представленные на рис. 25, показывают, что при референсной сшивке 23-звенной модельной ДНК с пептидом 55-64 белка uS3 в составе 40S субчастицы рибосомы расщепление как CNBr, так и HCOOH и Ibz приводило к образованию меченых продуктов ожидаемого размера, которым соответствуют полосы в верхней части электрофореграммы. Сравнивая положение радиоактивных полос с полосами всех белков из 40S субчастицы на окрашенных Coomassie R250 дорожках и учитывая, что масса 10-членной ДНК, сшитой с uS3 (см. подпись к рис. 24), соответствует массе 20-30 аминокислотных остатков, мы однозначно отнесли полосы X, Y и Z на центральной панели на рис. 25 к сшитым фрагментам 1-192, 33-154 и 1-127. Полосы, расположенные чуть выше полос Y и Z в эксперименте с uS3, сшитом в составе 40S субчастиц, соответствуют продуктам неполного расщепления uS3 CNBr и муравьиной кислотой, соответственно. При воздействии CNBr и муравьиной кислоты на сшитый rec-uS3 продуктам полного расщепления uS3 соответствуют полосы M и N, соответствующие наиболее быстро мигрирующим продуктам в соответствующих дорожках (видно также несколько более слабых полос, расположенных выше и соответствующих продуктам неполного расщепления белка). Очевидно, что эти полосы соответствуют продуктам, мигрирующим намного быстрее референсных сшитых пептидов 1-127 (полоса Y) и

33-154 (полоса Z), следовательно, участок сшивки в гес-uS3 не совпадает с участком сшивки с белком в составе субчастиц (55-64), а продукты M и N соответствуют одному из коротких фрагментов uS3 в районе 128–243 в случае расщепления CNBr и в районе 1–32 или 155–243 в случае расщепления HCOOH (см. схему в нижней части рис. 25).

В случае Ibz в белке uS3 имеется единственный сайт расщепления (рис. 25, нижняя часть), и это может привести только к образованию либо длинного фрагмента 1-192, либо короткого фрагмента 193-243. В соответствующих дорожках на центральной панели, помимо основной полосы X с электрофоретической подвижностью, соответствующей с ожидаемой для фрагмента 1-192, сшитого с модельной ДНК, имеется также минорная полоса ниже основной. Однако ее нельзя отнести к сшитому фрагменту 193-243, поскольку он соответствует намного более длинному сшитому пептиду – его электрофоретическая подвижность ниже подвижности продуктов Y (1-127) и Z (33-154), поэтому данную полосу можно отнести только к продукту неспецифической деградации белка, которой не удалось избежать при обработке Ibz. Следовательно, расщепление с помощью Ibz показывает, что участок сшивки в гес-uS3 расположен в районе 1-192. Комбинация результатов расщепления гес-uS3, сшитого с модельной ДНК, всеми тремя используемыми здесь протеолитическими агентами, позволяет заключить, что участок сшивки расположен в области 155-192.

Как уже упоминалось выше, обычно основания Шиффа, образующиеся в результате взаимодействия остатка лизина с альдегидсодержащей нуклеиновой кислотой (например, ДНК, содержащей АП-сайт), без восстановления цианоборгидридом натрия нестабильны и не выдерживает условий пробоподготовки и анализа в SDS-ПААГ. Обнаруженная нами аномальная стабильность продукта сшивки гес-uS3 с расщепленной 10-звенной модельной ДНК без предварительного восстановления (рис. 24, дорожка 1) аналогична тому эффекту, который наблюдался, например, при изучении сшивки ДНК, содержащей АП-сайт, с глицеральдегидфосфатдегидрогеназой [261] и с поли(АДФ-рибоза)-полимеразой PARP1, обладающей АП-лиазной активностью [262]. В последнем случае было высказано предположение, что после образования устойчивой ковалентной связи между PARP1 и АП-сайтом в ДНК, расщепленной по фосфодиэфирной связи с 3'-стороны от этого АП-сайта, фермент PARP1 теряет свою активность в качестве АП-лиазы. Низкий уровень АП-лиазной активности, а также низкий оборот, связанный с тем, что фермент остается связанным с репарируемой ДНК после ее расщепления, наблюдали ранее у OGG1 мышей и человека [263,264]. У uS3 как АП-лиазы ферментативная активность очень низкая – эффективное расщепление модельной ДНК этим белком в условиях, близких к физиологическим, достигается только при концентрациях uS3, сравнимых с концентрациями АП-сайт-содержащей

модельной ДНК (см. рис. 23). Мы полагаем, что причина этого такая же, как и в случае OGG1 (см. выше).

В районе 155-192 белка uS3 обнаружено четыре возможных аминокислотных остатка, которые могут образовать основание Шиффа с АП-сайтом модельной ДНК (рис. 26), а именно два лизина (Lys185 и Lys187) и два аргинина (Arg173 и Arg178). Принимая во внимание аномальную для типичных оснований Шиффа стабильность сшивки гес-uS3 с АП-сайтом в ДНК, нельзя исключить участия остатка цистеина в образовании устойчивого аддукта с α,β -ненасыщенным 5'-концевым альдегидным производным, возникающим при расщеплении ДНК по АП-сайту, который не требует восстановления, как это наблюдали в работе [265], однако область 155-192 не содержит остатков цистеина, что исключает такую возможность. С другой стороны, высокая стабильность нашего продукта, вероятно, может достигаться за счет участия в сшивке остатков аргинина в положениях 173 и/или 178. Такое предположение основано, в частности, на данных, показавших, что аддукты остатков аргинина с фенилглиоксалем, имеющим сходство с α,β -ненасыщенным альдегидом, достаточно стабильны, особенно в слабокислых условиях (ниже pH 4) [266]. Таким образом, у нас есть основания предполагать, что гес-uS3 взаимодействует с АП-сайтом в одноцепочечной ДНК через остатки Arg173/Arg178. Районы 55-64 и 155-192 консервативны среди высших эукариот, менее консервативны среди низших эукариот, но остатки Arg64, Arg173, Arg178 и Lys185 практически инварианты. Интересно, что у архей остаток Arg178 заменен на остаток лизина, который в этом домене живых организмов является консервативным.

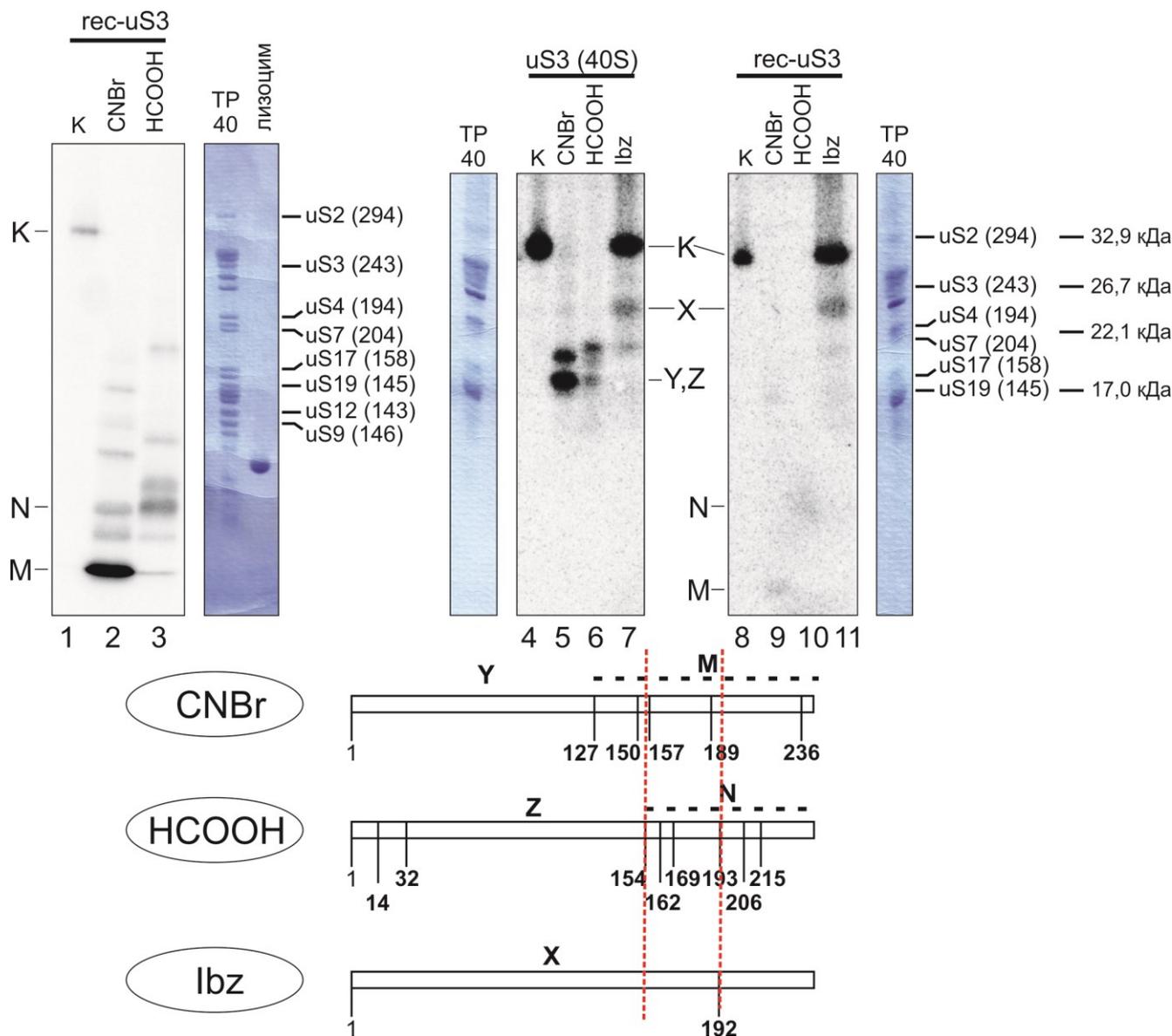


Рисунок 25. Идентификация участка шивки модельной 23-звенной ДНК в белке *rec-uS3*. Анализ с помощью SDS-ПААГ меченых пептидов, полученных в результате расщепления с помощью CNBr, муравьиной кислоты (HCOOH) или lbz сшитого с модельной ДНК *rec-uS3* и с uS3 в составе 40S субчастиц (референсная шивка). Контрольные дорожки К соответствуют сшитому uS3 (рекомбинантному или из 40S субчастиц), необработанному протеолитическими агентами. К каждой автордиограмме приложена дорожка с разделением суммарного белка 40S субчастиц (TP40) в геле, окрашенном Coomassie R250; расположение некоторых из них (в качестве маркеров) указано вместе с длинами их пептидных цепей, обозначенными в количестве аминокислотных остатков (в скобках). Кроме того, на левой панели представлена окрашенная Coomassie R250 дорожка с лизоцимом (длиной 129 аминокислотных остатков) в качестве дополнительного маркера. Радиоактивные полосы, соответствующие продуктам полного расщепления белка uS3, сшитого с модельной ДНК, обозначены как X, Y, Z, M и N. Ниже электрофореграмм приведены схематические изображения (карты) расщепления белка uS3 человека CNBr, HCOOH и lbz, на которых отмечены сшитые пептиды uS3, образующиеся при исчерпывающем расщеплении uS3 каждым из агентов. Пунктирные линии черного цвета над схемами указывают на то, что пептиды M и N, сшитые с модельной ДНК, принадлежат одному из коротких фрагментов uS3 в соответствующей области. Вертикальными пунктирными линиями красного цвета показаны границы области 155-192, в пределах которой расположен сайт шивки белка uS3 с модельной ДНК. Следует обратить внимание, что выход меченых

пептидов, сшитых с модельной ДНК, был различен, и нанесение равных количеств меченого uS3 на каждую дорожку не приводило к одинаковой интенсивности полос, соответствующих меченым продуктам на всех дорожках. Поэтому мы дублируем результаты расщепления гес-uS3 CNBr и HCOOH – они есть и на правой панели, где соответствующие полосы M и N слабые, и на левой панели, где эти полосы видны лучше.

В разделе 3.3 мы показали, что район 55-64 белка uS3 в составе 40S субчастицы рибосомы способен взаимодействовать с АП-сайтом в ДНК. Как оказалось, это взаимодействие не имеет функционального значения и, по всей видимости, отражает способность uS3 в 40S субчастице сшиваться с АП-сайтами, возникающими в цитоплазматических мРНК (см. раздел 3.6). Таким образом, данные, полученные в опытах по сшивкам гес-uS3 и uS3 в составе 40S субчастиц с модельными оц-АП-ДНК, свидетельствуют о том, что uS3 имеет два различных центра взаимодействия с АП-сайтами, которые расположены далеко друг от друга как в его первичной структуре, так и в пространственной структуре. В последнем случае имеется в виду структура uS3 в составе рибосомы [4], поскольку пространственная структура изолированного белка до сих пор не известна. Может возникнуть вопрос, имеет ли структура активного центра uS3 как АП-лиазы какие-либо черты, сходные со структурой активных центров других ферментов эксцизионной репарации ДНК, проявляющих активность сходного типа. Наиболее изученными ферментами человека, расщепляющими ДНК по АП-сайту, являются эндонуклеаза APE1 и 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза (hOGG1). Последняя вначале создает АП-сайт путем гидролиза N-гликозидной связи в окисленном остатке гуанозина, а затем расщепляет цепь ДНК по этому сайту. Из этих двух ферментов только активность hOGG1 осуществляется через промежуточное образование основания Шиффа с участием остатка лизина (K249) белка и АП-сайта [267]. Поэтому мы попытались найти сходные мотивы в структуре активного центра hOGG1 [268] и каких-либо районов в структуре uS3 человека. Структура изолированного uS3 вне рибосомы пока неизвестна, и она может существенно отличаться от его структуры в составе рибосомы, поэтому мы для сравнения использовали также структуру дрожжевого uS3, связанного со шапероном Yar1 через свой N-концевой домен. [269] (рис. 26).

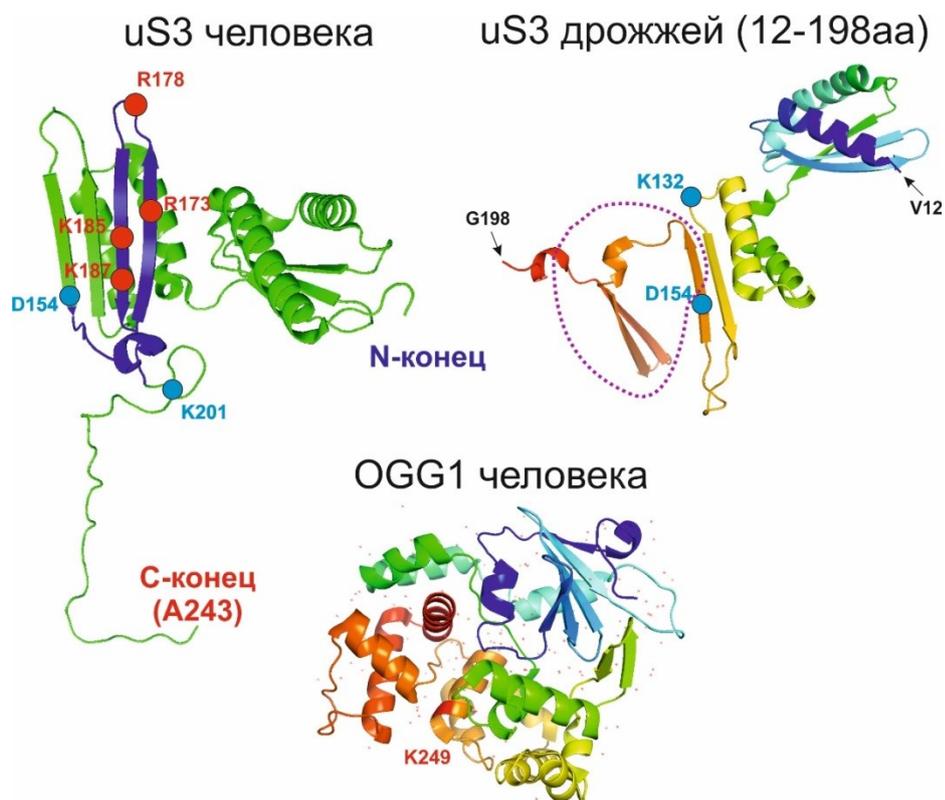


Рисунок 26. Кристаллические структуры uS3 в составе 80S субчастицы рибосомы человека (PDB 6Z6M), uS3 дрожжей в комплексе с шапероном Yar1 (Yar1 на рисунке не показан, PDB 4BSZ) [269] и 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека (hOGG1) [268] (PDB 1KO9). Следует отметить, что Yar1 связывается преимущественно с N-доменом uS3; C-домен uS3 содержит внутрицепочечные связи и частично находится в изолированном виде. Аминокислотные остатки, относящиеся к каталитическим центрам hOGG1 и дрожжевого uS3 согласно [267] и [16] соответственно, представлены красными сферами. Область 155-192, в которой определен сайт шивки гес-uS3 с модельной ДНК, содержащей АП-сайт (см. выше), отмечена темно-синим цветом на структуре uS3 человека; гомологичная область дрожжевого uS3 показана пунктирной линией на его структуре (верхняя правая структура). Аминокислотные остатки, потенциально способные к образованию основания Шиффа с АП-сайтом в районе 155-192 uS3 человека, представлены в виде красных сфер; остатки D154 и K201, гомологичные остаткам дрожжевого uS3, вносящим вклад в его АП-лиазную активность по данным [16], представлены синими сферами.

Ранее также предпринимались попытки найти в uS3 мотивы, по структуре напоминающие активные центры ферментов эксцизионной репарации ДНК. Так, было высказано предположение, что у дрожжей белок uS3 имеет мотив спираль-шпилька-спираль вокруг K132, который несколько напоминает мотив связывания ДНК OGG1 [19], что может подразумевать возможное сходство в способах ферментативного действия этих двух белков. Однако оказалось, что K132 не вносит существенного вклада в АП-лиазную активность дрожжевого uS3 [19], и тщательный сравнительный анализ структуры активного центра OGG1 и области вокруг K132 uS3 человека и дрожжей (с точки зрения вовлеченных аминокислотных остатков и структурной организации) не выявили достаточного сходства, чтобы делать такие выводы. Таким образом, можно предположить, что АП-лиазная активность uS3 человека имеет

эволюционное происхождение, отличное от происхождения канонических ферментов эксцизионной репарации оснований ДНК. Это может быть связано со специфическим способом участия uS3 в эксцизионной репарации оснований ДНК в избранных участках хроматина, который принципиально отличается от способов участия канонических ферментов репарации ДНК, действующих в глобальной репарации ДНК.

Таким образом, рибосомный белок uS3 способен сшиваться с АП-сайт-содержащими ДНК и расщеплять их по этому сайту только, когда находится в изолированном состоянии в ядре клетки посредством своего участка 155-192, расположенном в С-концевом домене (скорее всего, посредством остатков R173/178). При этом его низкая эффективность, как АП-лиазы, свидетельствует о том, что белок uS3, скорее всего, не вносит существенного вклада в глобальную репарацию ДНК в клетке, но может вовлекаться в этот процесс на определенных участках ДНК, таких как NAD, или при определенных условиях, таких как окислительный стресс (см. раздел 1.2.1) [169].

3.10. Способность мРНК, фиксированной в мРНК-связывающем канале рибосомы, сшиваться посредством АП-сайта с пептидом 55-64 белка uS3

Как уже неоднократно упоминалось, биологически незначимая способность зрелых 40S субчастиц сшиваться с АП-сайтами в оц-ДНК могла бы отражать функцию uS3 в составе рибосомы, связанную с его взаимодействием с такими сайтами в цитоплазматических мРНК. Известно, что 40S субчастица рибосомы человека способна эффективно сшиваться с диальдегидными производными неструктурированных РНК посредством пептида 55-64 белка uS3, расположенного на ее поверхности вблизи входа в мРНК-связывающий канал [240, 270]. Поэтому можно было полагать, что этот пептид способен взаимодействовать с АП-сайтами в мРНК, поскольку они могут существовать в открытой альдегидной форме [107]. Принимая во внимание вышесказанное, мы проверили, может ли АП-сайт в мРНК, связанной с 40S субчастицами, взаимодействовать с пептидом 55-64 белка uS3. Для этой цели были использованы два аналога мРНК (длиной 23 и 30 нуклеотидов), содержащие на 5'-конце триплет UUC, позволяющий фиксировать мРНК в рибосомном канале с помощью взаимодействия с тРНК^{Phe} в Р-участке, и АП-сайт на 3'-конце, защищенный фотолabileйной 2-нитробензильной группой (рис. 27, верхняя и средняя части). Защита необходима для предотвращения сшивки АП-сайта с рибосомами до тех пор, пока не сформируется модельный комплекс. Известно, что во время трансляции в канале рибосомы размещается фрагмент мРНК длиной около 30 нуклеотидов, в середине которого находится кодон, расположенный в Р-

участке. Анализ имеющихся в настоящее время субатомных моделей 40S субчастиц и 80S рибосомных комплексов, содержащих достаточно длинную мРНК, показывает, что нуклеотиды, расположенные после положения +19 (+1 соответствует первому нуклеотиду кодона в Р-участке), находятся вне рибосомы (например, см. [271, 272]). Таким образом, АП-сайты в положениях +23 и +30 в последовательностях аналогов мРНК (далее АП-мРНК₂₃ и АП-мРНК₃₀) также должны быть расположены вне рибосомы при условии, что эти АП-мРНК фиксируются в канале кодон-антикодонным взаимодействием между триплетом UUC и тРНК в Р-участке рибосомы (рис. 27, нижняя часть).

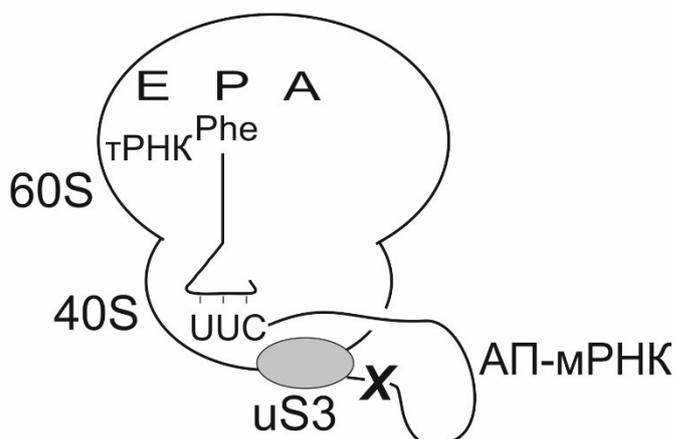
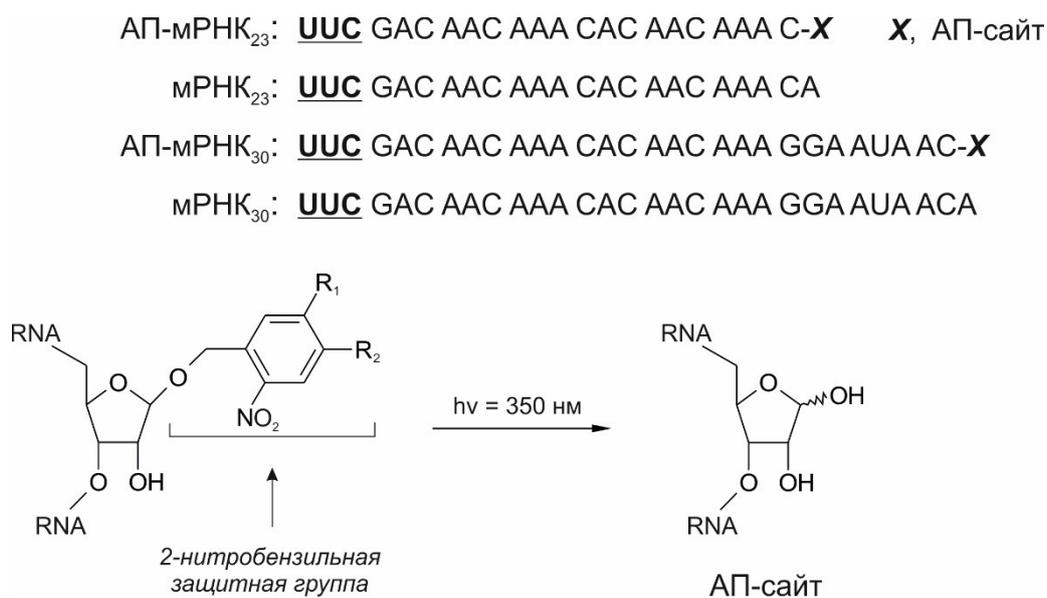


Рисунок 27. Аналоги мРНК, содержащие защищенный АП-сайт, соответствующие немодифицированным аналогам, схема снятия защитной группы с АП-сайта и схематическое изображение рибосомного комплекса, где 5'-концевой триплет UUC аналога мРНК связан с тРНК^{Phe} в Р-участке рибосомы, а 3'-конец шит с экспонированным фрагментом белка uS3 через АП-сайт, который обозначен как «X». А, Р и Е – участки связывания тРНК на рибосоме (соответственно, аминокатильный, пептидильный и участок выхода).

Связывание 5'-³²P-меченых аналогов мРНК с 80S рибосомами в присутствии и отсутствии тРНК^{Phe} проверяли, используя стандартный метод фильтрации через

нитроцеллюлозные фильтры. Данные аналоги, взятые в стехиометрическом соотношении с рибосомами, практически количественно связывались с ними в присутствии тРНК^{Phe}, тогда как в отсутствие тРНК существенного связывания не детектировали (рис. 28). Таким образом, в данных условиях свободный (находящийся вне канала рибосомы) аналог, который потенциально мог бы сшиваться с пептидом 55-64 uS3, экспонированным на поверхности рибосомы, присутствовал в реакционной смеси лишь в незначительном количестве.

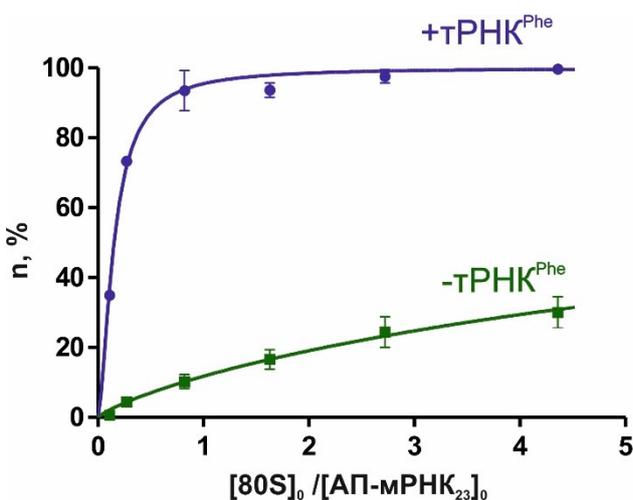


Рисунок 28. Изотерма связывания АП-мРНК₂₃ с 80S рибосомами человека. Верхняя кривая соответствует тройной смеси 80S рибосом с тРНК^{Phe} и меченым аналогом мРНК, а нижняя кривая — бинарной смеси рибосом с аналогом мРНК в отсутствие тРНК; n — доля связанного с 80S рибосомами меченого лиганда в %.

На следующем этапе работы было исследовано, может ли аналог мРНК, закрепленный в мРНК-связывающем канале посредством кодон-антикодонного взаимодействия с тРНК в Р-участке, сшиваться с экспонированным пептидом белка uS3 через АП-сайт на 3'-конце мРНК, расположенный вне рибосомы (рис. 27). Результаты, полученные с помощью 5'-³²P-меченой АП-мРНК₂₃, приведены на рис. 29А. Видно, что сильные радиоактивные полосы, которые могут быть отнесены к сшитому белку, наблюдаются только в дорожке 1, соответствующей комплексу 80S рибосомы с АП-мРНК₂₃ и тРНК^{Phe}, облученному после своего формирования для снятия защитной группы с АП-сайта. Положение данных полос соответствует белку uS3, сшитому с АП-мРНК₂₃, поскольку их сдвиг относительно полосы немодифицированного uS3 в окрашенном геле аналогичен сдвигу полосы белка uS3 в составе 40S субчастиц, сшитого с 23-х звеной оц-АП-ДНК (рис. 14А). Этих полос не наблюдали без облучения и в отсутствие тРНК или АП-сайта в мРНК (рис. 29А дорожки 2-4), что свидетельствовало о том, что сшивка происходила именно с деблокированным АП-сайтом и только тогда, когда мРНК была фиксирована в мРНК-связывающем канале кодон-антикодонным взаимодействием между тРНК^{Phe} и триплетом UUC в Р-участке. Результаты иммуноблотинга, представленные на рис. 29Б, показывают те же самые закономерности, что наблюдали на радиоавтографе, для обоих аналогов АП-мРНК₂₃ и АП-мРНК₃₀. Видно, что полосы сшитого uS3 располагаются выше полос

немодифицированного белка, а положение сигналов uS3, сшитого с АП-мРНК₂₃, точно соответствует расположению радиоактивных полос на радиоавтографе (рис. 29А). Следовательно, АП-сайт на 3'-конце мРНК, закрепленной в мРНК-связывающем канале рибосомы, действительно может сшиваться с белком uS3, причем эффективность этой сшивки достаточно высока.

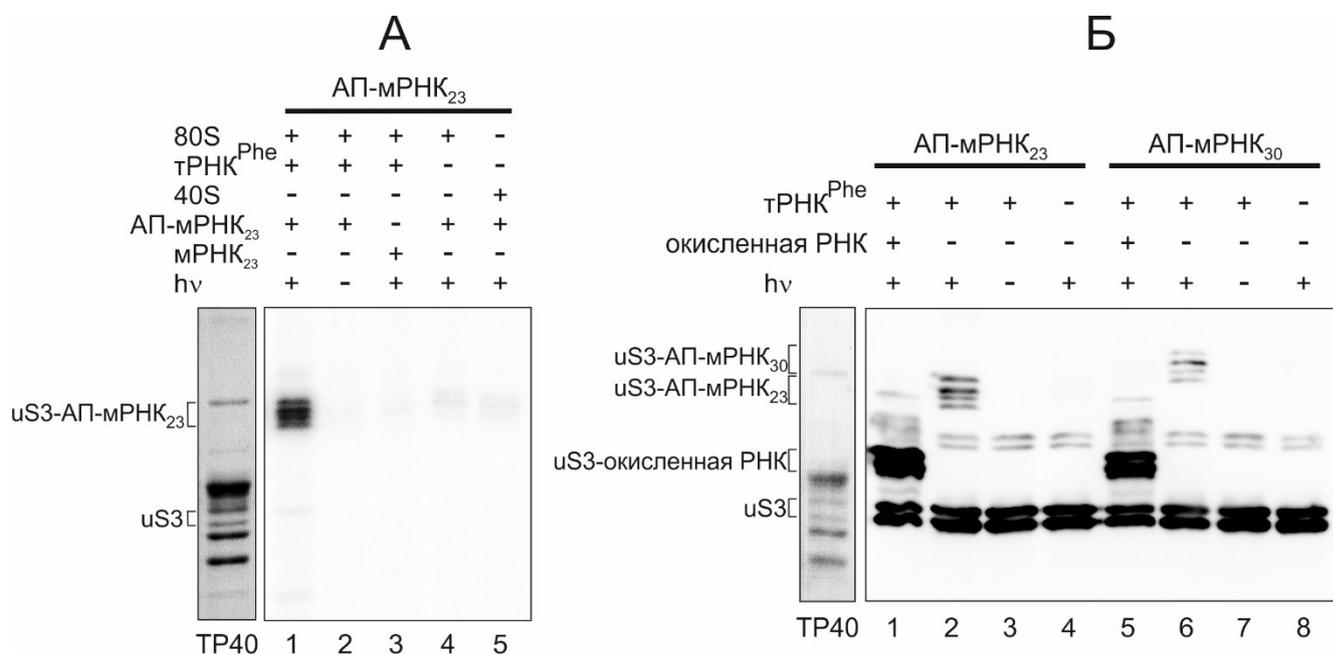


Рисунок 29. Сшивка аналогов мРНК, содержащих АП-сайт, с белком uS3 в рибосомных комплексах, в которых эти аналоги были фиксированы в мРНК-связывающем канале с помощью тРНК^{Phe}. Радиоавтограф геля после разделения в SDS-ПААГ белков, выделенных из соответствующих комплексов, инкубированных с 5'-³²P-меченым аналогом АП-мРНК₂₃ (А). Иммуноблотинг рибосомных белков, выделенных из комплексов, инкубированных с немечеными аналогами АП-мРНК₂₃ или АП-мРНК₃₀, где АП-сайт оставался заблокированным («hν») или был деблокирован («hν+») с помощью УФ-облучения (Б). Иммуноблотинг проведен с использованием антител против рибосомного белка uS3. В отдельных экспериментах 40S субчастицы перед добавлением мРНК и тРНК сшивали с 3'-диальдегидным производным нонамера AAUAAAUAU (обозначенным как «окисленная РНК»), взятым в 25-кратном молярном избытке относительно рибосом. ТР40 – суммарный белок рибосомных 40S субчастиц, разделенных в SDS-ПААГ и окрашенных Coomassie R250 (А) или Ponceau С (Б).

Полосы, соответствующие белку uS3, сшитому с АП-мРНК₃₀, на дорожке 6 (рис. 29Б) находятся несколько выше полос uS3, сшитого с АП-мРНК₂₃ (дорожка 2 рис. 29Б), из-за меньшей электрофоретической подвижности белка, сшитого с более длинной РНК. Можно заметить, что модифицированный uS3 проявляется в виде группы полос как на радиоавтографе (рис. 29А, дорожка 1), так и при иммуноблотинге (рис. 29Б, дорожки 2 и 6), а немодифицированный uS3 в последнем случае представлен двумя полосами. Как уже было отмечено в разделе 3.1 (см. описание к рис. 14), uS3 в рибосомах человека присутствует в двух формах, фосфорилированной и нефосфорилированной, электрофоретическая подвижность

которых различна. Учитывая, что uS3 имеет несколько сайтов фосфорилирования (см. [240]), можно предположить, что множественные полосы uS3, сшитого с аналогами мРНК, соответствуют различным ковалентным аддуктам, образованным с нефосфорилированным uS3 и различными альтернативными формами фосфорилированного белка, электрофоретическая подвижность некоторых одинакова, когда белок не модифицирован.

Количественная обработка результатов, представленных на рис. 29Б (дорожки 2 и 6), показала, что доли uS3, сшитого с аналогами мРНК АП-мРНК₂₃ и АП-мРНК₃₀, фиксированными в мРНК-связывающем канале рибосомы, составляла (26.1 ± 2.2) % и (15.0 ± 1.3) % соответственно. Эти результаты показывают, что АП-мРНК могут достаточно эффективно сшиваться с uS3, когда неповрежденная 5'-концевая часть мРНК прочно связана в канале рибосомы, а АП-сайт на 3'-конце мРНК находится на расстоянии нескольких нуклеотидных остатков от последнего остатка, находящегося внутри рибосомы (в положении +19, см выше). О специфичности взаимодействия белка uS3 с АП-мРНК, связанными в рибосомном канале, свидетельствует то, что в бинарных смесях 40S субчастиц с аналогами мРНК сшивки практически не наблюдали (рис. 29Б, дорожки 4 и 8).

Для доказательства того, что сшивка АП-сайтов аналогов мРНК происходила именно с пептидом 55-64 белка uS3, проводили эксперименты, в которых этот пептид был предварительно заблокирован сшивкой с 3'-диальдегидным производным олигорибонуклеотида, генерированной в соответствии с [240] (рис. 29Б, дорожки 1 и 5). В параллельных опытах использовали вместо образцов 80S рибосом, содержащих модифицированные 40S субчастицы, образцы, содержащие немодифицированные 40S субчастицы. Ожидалось, что олигорибонуклеотид, сшитый с пептидом 55-64 uS3, не мешает фиксации аналога мРНК в рибосомном канале с помощью кодон-антикодонного взаимодействия триплета UUC с тРНК, поскольку 3'-диальдегидное производное олигорибонуклеотида с одинаковой эффективностью сшивается как с «пустыми» 80S рибосомами, так и с их комплексами с тРНК и аналогами мРНК [240]. Таким образом, сшитый с рибосомами нонарибонуклеотид AAUAAAUAU не должен был препятствовать их тРНК-зависимому связыванию с АП-мРНК. Результаты иммуноблотинга, приведенные на рис. 29Б, показывают, что в 80S рибосомах, где пептид 55-64 uS3 был предварительно заблокирован ковалентно присоединенным производным нонамера, сшивка обоих аналогов мРНК, содержащих АП-сайт, с uS3 была едва заметна (рис. 29Б дорожки 1 и 5). Следовательно, можно сделать вывод, что АП-мРНК действительно были сшиты с 40S субчастицами через тот же фрагмент 55-64 uS3, что и диальдегидное производное нонамера. Таким образом, сшивка рибосомного белка uS3 с АП-сайтом происходит именно посредством фрагмента 55-64 в тех комплексах, где аналог мРНК, содержащий данный АП-сайт, фиксирован за счет кодон-антикодонного взаимодействия в мРНК-связывающем канале рибосомного

ожидать, что трансляция последних будет «тонуть» в остаточной трансляции эндогенной мРНК. Чтобы исключить такую возможность, мы использовали обработанный МНазой ЛРК, полностью лишенный не только эндогенной мРНК, но и эндогенных рибосом, которые удаляли из него путем высокоскоростного центрифугирования. Вместо них в лизат вносили 40S и 60S рибосомные субчастицы человека. Результаты, приведенные на рис. 31, показывают накопление [³⁵S]-Met в 80S рибосомных фракциях в опытах как с контрольной, так и с АП-сайт-содержащей мРНК30, которое практически полностью зависело от присутствия мРНК и рибосом человека (рис. 31, колонки 1 и 2). Следовательно, эти модельные мРНК могут транслироваться в ЛРК, по крайней мере, до стадии сборки 80S пост-инициаторных комплексов с инициаторной тРНК_i^{Met} в Р-участке рибосомы.

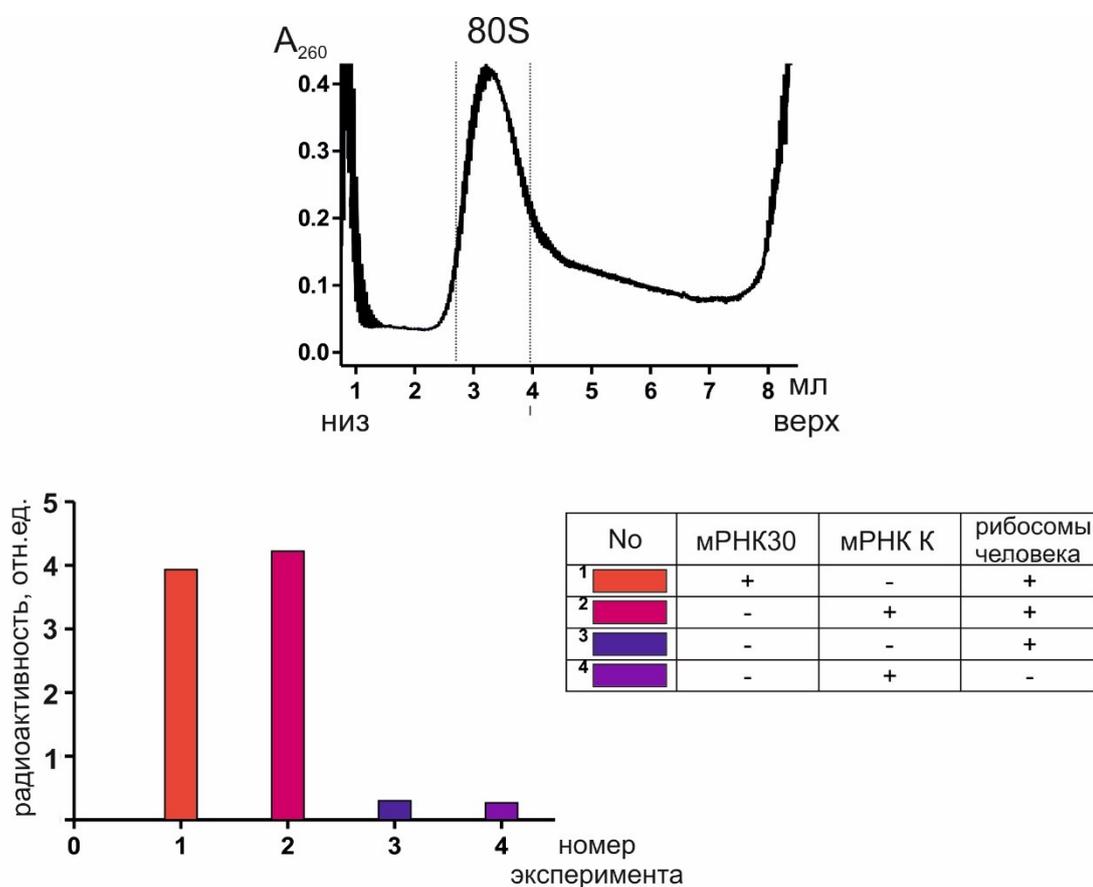


Рисунок 31. Накопление [³⁵S]-Met в 80S рибосомных комплексах в ЛРК (лишенном эндогенной мРНК и рибосом и снабженном рибосомами человека) при его инкубации с модельными мРНК в условиях трансляции. Типичный профиль седиментации, полученный из смеси, содержащей 100 мкл ЛРК, представлен сверху; 80S рибосомная фракция, собранная для измерения радиоактивности, показана вертикальными линиями.

Далее, с использованием подхода, примененного в предыдущих работах нашей лаборатории [270, 276, 277], была проанализирована природа молекул тРНК, связанных с 80S рибосомами после остановки трансляции модельных мРНК в ЛРК антибиотиком анизомицином, блокирующим образование пептидной связи [278]. Этот подход основан на

выделении суммарной РНК из соответствующего 80S рибосомного комплекса, очищенного центрифугированием в градиенте плотности сахарозы, и ее мечении по 3'-концу с помощью [³²P]pCp и T4 РНК-лигазы с последующей идентификацией полос меченых тРНК_i^{Met} и тРНК^{Phe} после анализа меченой РНК гель-электрофорезом в денатурирующих условиях, что является возможным благодаря разнице в их электрофоретических подвижностях [270, 276]. Этот метод дает возможность выявить связанные с рибосомой деацилированные тРНК и аминоксил-тРНК, поскольку перед мечением РНК обрабатывают ионами Cu²⁺, которые катализируют деацилирование тРНК и тем самым позволяют метить ее по 3'-концу. Пептидил-тРНК не могут быть определены данным методом, поскольку Cu²⁺ является плохим катализатором для их гидролиза.

Как видно из результатов, представленных на рис. 32, трансляционные комплексы 80S рибосом, полученные со всеми модельными мРНК, содержат тРНК^{Phe} в сопоставимых количествах. Это указывает на то, что и мРНК, содержащие АП-сайт, и контрольная мРНК участвуют в процессе элонгации, по крайней мере, на стадии связывания Phe-тРНК^{Phe} с фенилаланиновым кодоном мРНК, который следует за кодоном AUG в рибосомном Р-участке.

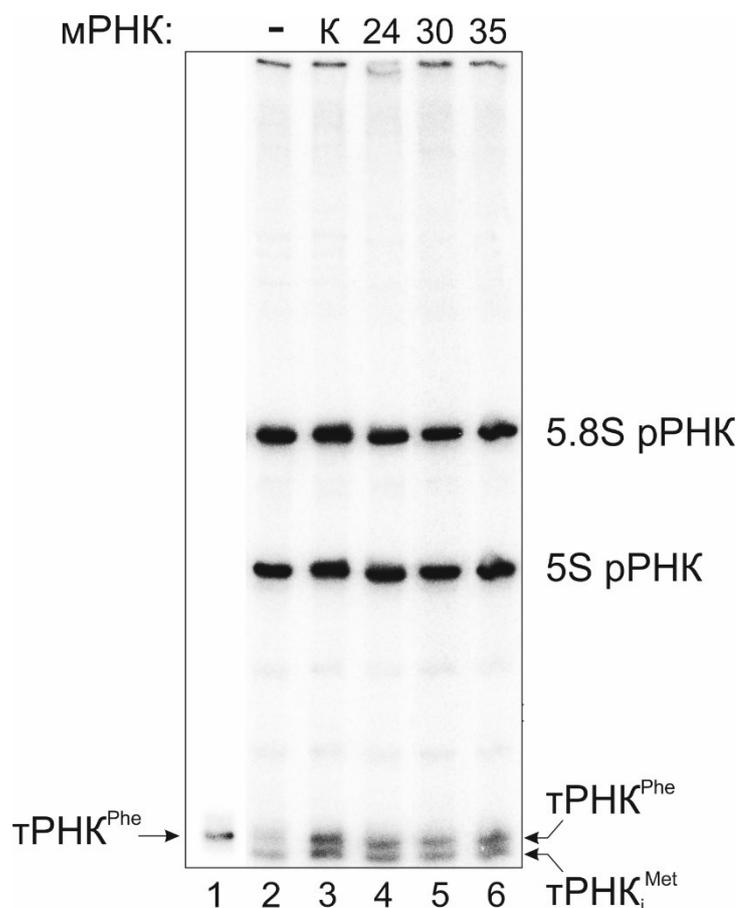


Рисунок 32. Анализ тРНК, содержащихся во фракциях 80S рибосом после центрифугирования в градиенте плотности сахарозы смесей, полученных в результате инкубации модельных мРНК в ЛРК, лишенном эндогенной мРНК, в присутствии 5 мМ анизомицина (дорожки 3-6). Дорожка

2 соответствует ЛРК, инкубированному в отсутствие модельной мРНК. Суммарную РНК, выделенную из вышеуказанных фракций, обрабатывали Cu^{2+} , метили по 3'-концу и разделяли с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии 8 М мочевины с последующей автордиографией геля. Полосы тРНК^{Phe}, тРНК_i^{Met}, 5S и 5,8S рРНК были идентифицированы согласно предыдущим исследованиям нашей лаборатории [270, 277]. Дорожка 1 является эталонной дорожкой, соответствующей тРНК^{Phe}, меченной тем же способом, как суммарная РНК из 80S рибосомных фракций.

3.12. Сшивка аналогов мРНК с рибосомами в процессе трансляции

Чтобы узнать, может ли мРНК посредством АП-сайта сшиваться с uS3 в 40S субчастице в процессе трансляции, мы проанализировали с помощью SDS-ПААГ суммарный белок из фракций 80S рибосом, выделенных из смесей, полученных в результате инкубации ЛРК, лишённого эндогенной мРНК, с 5'-³²P-мечеными аналогами мРНК мРНК24 или мРНК30. Для идентификации радиоактивных полос, соответствующих модифицированному uS3, мы использовали образец, полученный в результате инкубации 40S субчастиц рибосом человека с мРНК35, взятой в высокой концентрации, в условиях генерирования неспецифической сшивки альдегидных производных олигорибонуклеотидов с пептидом 55-64 белка uS3. Этот тип сшивки происходит гораздо менее эффективно, чем при фиксации немодифицированной части альдегид-содержащей РНК в рибосомном канале путем взаимодействия с тРНК (см. раздел 3.10), поэтому его можно выявить только при использовании высоких концентраций рибосом и производного РНК [240, 270].

Результаты, представленные на рис. 33, показывают, что инкубация указанных аналогов мРНК в условиях трансляции приводит к появлению радиоактивных полос, являющихся основными (дорожки 2, 3 и 5), которые могут быть определены как полосы белка uS3, сшитого пептидом 55-64 с мРНК посредством ее АП-сайта. Данный вывод сделан на следующих основаниях. Во-первых, электрофоретическая подвижность продуктов, отнесенных к этой полосе, соответствует подвижности, ожидаемой из наших предыдущих данных о белке uS3, сшитом с аналогом мРНК сходной длины (см. разделы 3.1, 3.3, 3.10). Во-вторых, из всех рибосомных белков только uS3 может эффективно сшиваться с нуклеиновыми кислотами, содержащими АП-сайт (см. раздел 3.1) или другой тип альдегидных групп, вне мРНК-связывающего канала рибосомы [240]. Наконец, в-третьих, такого рода сшивки как с ДНК, так и с РНК, содержащими АП-сайт, происходят через один и тот же пептид 55-64 uS3 (см. разделы 3.3, 3.9, 3.10). Можно заметить, что электрофоретическая подвижность uS3, сшитого с мРНК24 или мРНК30 (рис. 33, дорожки 3 и 5), несколько выше, чем у белка, сшитого с мРНК35 (рис. 33, дорожки 1 и 2), что, по-видимому, обусловлено разной геометрией соответствующих сшитых продуктов, в которых АП-сайт находится в различном положении в последовательности мРНК.

Доказательством того, что аналоги мРНК сшивались с белком uS3 через АП-сайт, являясь наличие едва заметной радиоактивной полосы, соответствующей сшитому uS3, в контрольном эксперименте, где АП-сайт перед трансляцией не был деблокирован УФ-облучением (рис. 33, дорожки 4 и 6), и в эксперименте с мРНК К, в которой АП-сайт отсутствовал (рис. 33, дорожка 7).

Следует заметить, что инкубация модельных мРНК с 80S рибосомами (в отсутствие тРНК) в концентрациях, близких к таковым в ЛРК, не выявила интенсивных радиоактивных полос, соответствующих их сшивкам с uS3 (рис. 33, дорожка 8). Это может быть рассмотрено как подтверждение того, что радиоактивные полосы, наблюдаемые с АП-сайт-содержащими аналогами мРНК (рис. 33), относятся к их сшивкам с uS3, образованным в трансляционных комплексах с эндогенными 80S рибосомами ЛРК. В этих комплексах немодифицированная 5'-концевая часть мРНК находилась в рибосомном канале, а 3'-концевая часть с АП-сайтом – вне его, что, очевидно, и позволяло АП-сайту сшиваться с пептидом 55-64 uS3.

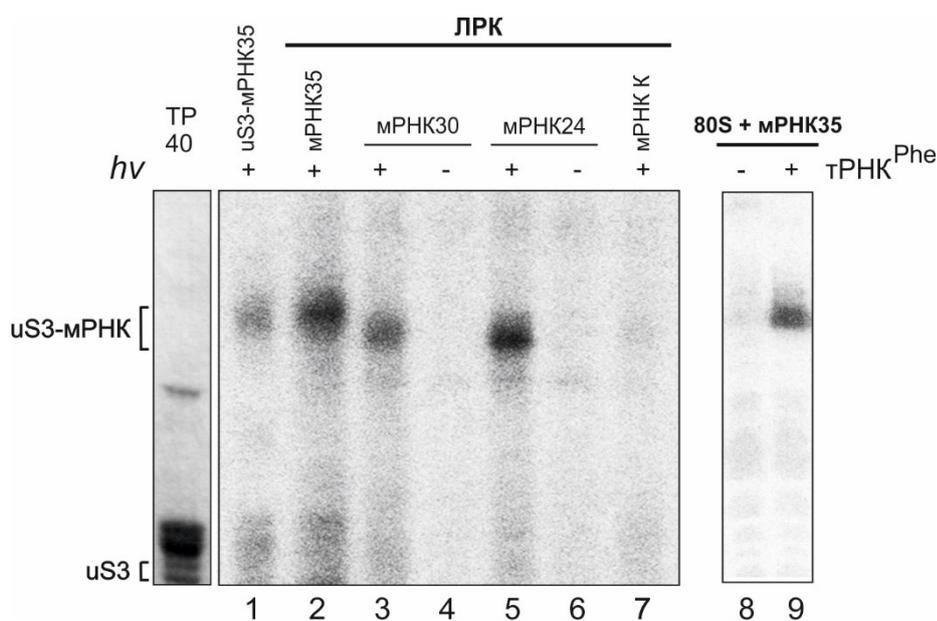


Рисунок 33. Анализ рибосомных белков, сшитых с 5'-³²P-мечеными модельными мРНК (примерно с одинаковой удельной радиоактивностью) при их трансляции в ЛРК, обработанном МНазой, с помощью электрофореза в SDS-ПААГ (дорожки 2-7). Концентрация эндогенных рибосом в трансляционных смесях составляла $\approx 0,05$ мкМ. Слева представлена дорожка, показывающая разделение суммарного белка 40S субчастицы с последующим окрашиванием геля Coomassie R250 (TP40). Полосы, соответствующие uS3, сшитому с модельными мРНК, обозначены как uS3-мРНК. Обозначение *hv* соответствует облучению мягким УФ-светом для снятия защиты с АП-сайтов мРНК перед их загрузкой в трансляционную систему. Дорожка 1 (uS3-мРНК35) соответствует эталонной сшивке белка через пептид 55-64 с мРНК35, полученной инкубацией меченой мРНК с 40S субчастицами человека, взятыми в концентрации 2.5 мкМ. Дорожки 8 и 9 относятся к uS3, сшитому с мРНК35 в 80S рибосомных комплексах, полученных без ЛРК при концентрациях 80S рибосом и мРНК, таких же, как и в экспериментах с ЛРК.

Как видно из результатов, представленных на рис. 33, при трансляции в ЛРК выход сшивки примерно одинаков для всех модельных мРНК (дорожки 2, 3 и 5). Это указывает на то, что они происходили, когда АП-сайт в мРНК в ходе трансляции попадал в общее для всех аналогов благоприятное для сшивания положение относительно пептида 55-64 белка uS3. Если бы это было не так, то выходы сшивок uS3 с этими мРНК различались бы, так как расстояния от АП-сайта, расположенного в 3'-концевой части мРНК вне рибосомного канала, до участка входа мРНК в рибосому и, соответственно, до пептида 55-64 uS3, были бы различны для мРНК24, мРНК30 и мРНК35. Для доказательства данного утверждения были проведены модельные эксперименты по сшиванию тех же аналогов мРНК с uS3 в 80S рибосомных комплексах человека, в которых мРНК были фиксированы в канале рибосомы путем взаимодействия триплета GUU с тРНК^{Val} в Р-участке рибосомы аналогично тому, как это было сделано выше (см. раздел 3.10). В этих комплексах рамка считывания была смещена на два нуклеотида относительно той, в которой AUG является стартовым кодоном (рис. 34А), поэтому АП-сайт мРНК находился в положениях +22, +28 или +33. Результаты анализа сшивок аналогов мРНК с uS3 в составе этих комплексов (рис. 34Б) показали, что выход сшивок мРНК с uS3 резко снижается при удалении АП-сайта от положения +22, которое, по-видимому, является наиболее благоприятным из трех выбранных положений для сшивания АП-сайта с пептидом 55-64 uS3. Таким образом, эти результаты подтверждают вышеупомянутое утверждение об общем для всех аналогов мРНК положении АП-сайта относительно указанного выше пептида белка uS3, благоприятном для сшивки, при трансляции этих аналогов.

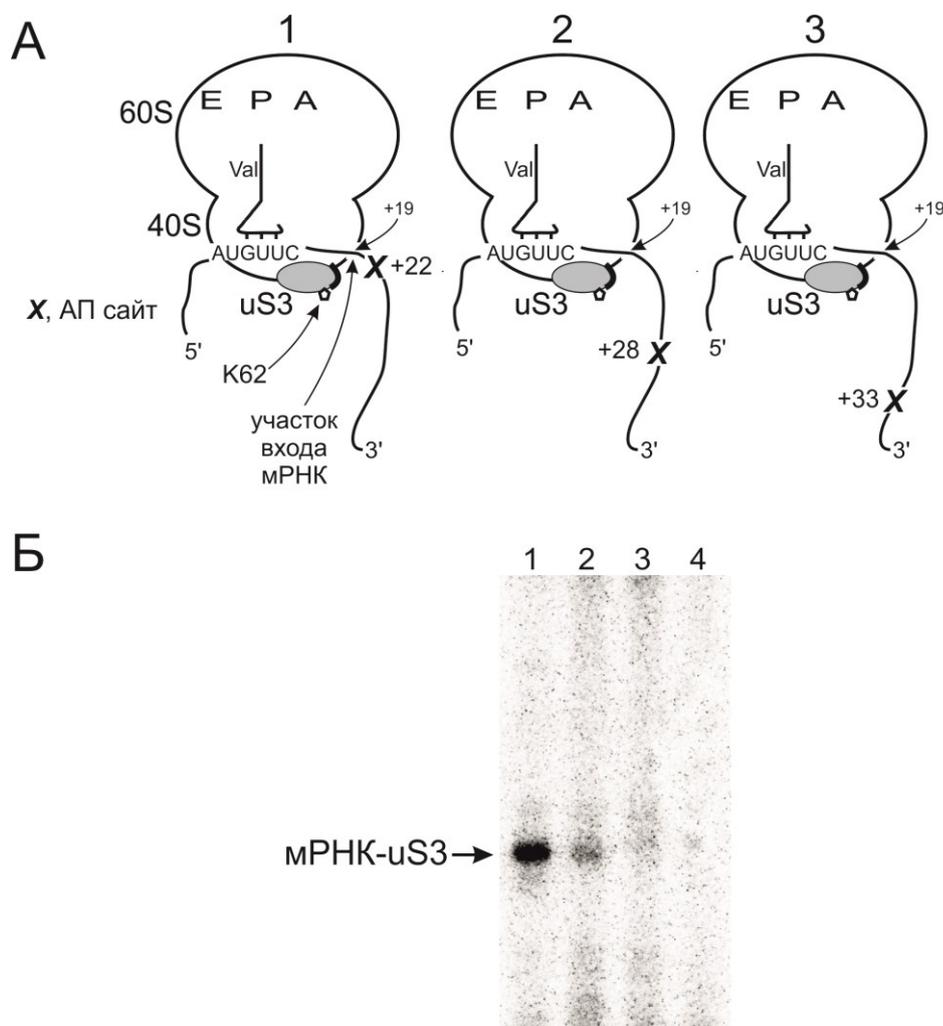


Рисунок 34. Сшивка мРНК, содержащих АП-сайт, с районом 55-64 uS3 в 80S рибосомных комплексах, в которых мРНК фиксирована в канале с помощью кодон-антикодонного взаимодействия с тРНК^{Val} в Р-участке. (А) Схематическое изображение комплексов, где молекулы тРНК изображены как L-подобные объекты, а их антикодоны обозначены тремя вертикальными чертами. (Б) Анализ рибосомных белков, сшитых с 5'-³²P-мечеными модельными мРНК в вышеуказанных комплексах, с помощью электрофореза в SDS-ПААГ. Показан радиоавтограф геля, на котором дорожки 1, 2, 3 и 4 соответствуют комплексам с мРНК24, мРНК30, мРНК35 и мРНК К, соответственно. Отмечена основная радиоактивная полоса, соответствующая uS3, сшитому с аналогами мРНК (мРНК-uS3).

Наконец, с применением того же метода постмечения суммарной РНК из 80S рибосомных фракций, что описан выше (см. раздел 3.11), была сделана попытка оценить, сколько циклов элонгации происходит при трансляции мРНК, содержащей АП-сайт, на примере мРНК24. Результаты постмечения, приведенные на рис. 35, выявили интенсивную полосу меченой тРНК^{Phe} и менее интенсивную полосу меченой тРНК_i^{Met} при разделении полученного препарата меченой РНК гель-электрофорезом. Появление полосы инициаторной тРНК, по-видимому, не связано с трансляцией мРНК24, так как эта полоса с той же интенсивностью присутствовала и в контрольной дорожке без добавления мРНК (дорожка «-мРНК»); наличие таких полос инициаторной тРНК в 80S рибосомных фракциях из ЛРК, обработанных МНазой, также наблюдали ранее [270]). С учетом того, что метод постмечения

РНК не позволяет обнаруживать пептидил-тРНК (см. раздел 3.11), полученные результаты подразумевают, что тРНК^{Phe} в 80S рибосомных комплексах присутствует в деацилированной форме или в виде Phe-тРНК^{Phe}. Однако последнее очень маловероятно, поскольку состояние, в котором аминоксил-тРНК остается связанной в А-участке рибосомы без образования пептидной связи, имеет очень короткое время жизни и, насколько нам известно, его трудно обнаружить без добавления ингибиторов транспептидации [279]. Поэтому сделано предположение, что полоса тРНК^{Phe} на рис. 35 соответствует деацилированной тРНК, которая могла оказаться в Е-участке не ранее, чем во втором цикле элонгации в результате транслокации MetPhePhe-тРНК^{Phe} в Р-участок. Это означает, что АП-сайт, сшитый с пептидом 55-64 белка uS3, должен был сместиться из положения +24 (где он находился в начальный момент трансляции) в положение +18 относительно первого нуклеотида кодона Р-участка, что, вероятно, оказывается возможным благодаря гибкости мРНК и рибосомы в области сшивания.

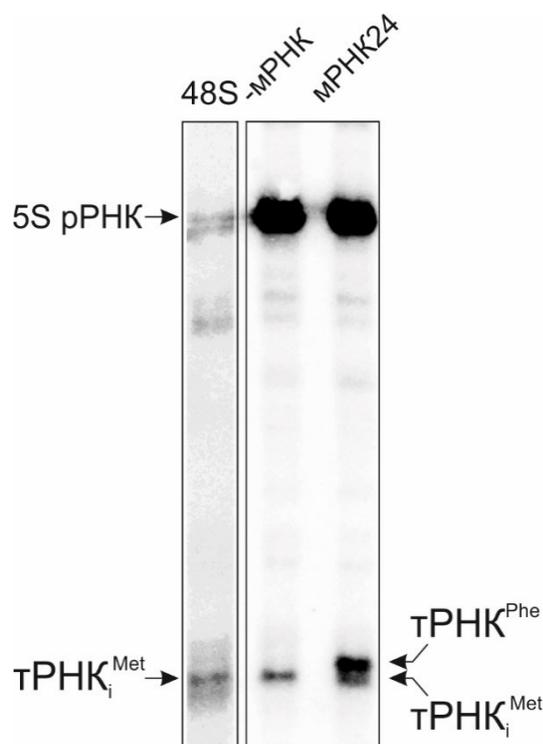


Рисунок 35. Анализ тРНК, содержащихся в 80S рибосомных фракциях, полученных в результате инкубации мРНК24 в ЛРК, лишенном эндогенных мРНК. Дорожка «48S» соответствует меченым РНК из фракции 40S рибосомных субчастиц, содержащей 48S предынициаторный комплекс с тРНК_i^{Met}. Эта дорожка получена при более длительном времени экспозиции из-за более низкого выхода 48S комплексов по сравнению с комплексами 80S, и содержит минорную полосу 5S рРНК из-за загрязнения фракции 40S субчастиц 60S субчастицами.

Таким образом, показано, что АП-сайты в различных положениях кодирующих последовательностей модельных мРНК во время их трансляции в бесклеточной белоксинтезирующей системе млекопитающих сшиваются с пептидом 55-64 рибосомного белка

uS3. Образование такой сшивки могло быть одной из причин остановки трансляции, которую наблюдали ранее при использовании мРНК, содержащей АП-сайт [92]. Вышеизложенное вместе с приведенными в обзоре литературы данными о том, что мРНК, содержащие окислительные повреждения, накапливаются в клетках с подавленным механизмом No-Go Decay [28], дает все основания полагать, что сшивание транслируемых мРНК через АП-сайт с пептидом 55-64 uS3 является одним из способов участия рибосом в контроле качества мРНК.

Анализ структуры 40S субчастиц, проведенный в [280], выявил кластер положительно заряженных аминокислотных остатков между пептидом 55-64 uS3 и участком входа мРНК в рибосомный канал, который, как предполагают авторы, отвечает за лабильное связывание с мРНК в процессе трансляции. Этот кластер мог бы притягивать к себе район мРНК, находящийся между пептидом 55-64 и участком входа мРНК в канал во время трансляции, и тем самым заставлять мРНК (и, соответственно, АП-сайт при его наличии в ней) проходить мимо данного пептида перед тем, как войти в рибосому (рис. 36).

Можно предположить, что пептид 55-64 uS3 в процессе трансляции сканирует мРНК на наличие АП-сайта, и когда находит его, то сшивается с ним, что должно неизбежно привести к остановке трансляции. Такой рибосомный комплекс с «застывшей» мРНК является мишенью для привлечения участников клеточного пути, предназначенного для удаления поврежденных мРНК и неполных продуктов трансляции (сопряженные пути No-Go Decay и Ribosome-based Quality Control, см. главу 1.1.4). Поскольку и мРНК, и рибосома обладают значительной степенью гибкости, не исключено, что после сшивания мРНК еще будет способна участвовать в одном или даже двух циклах элонгации до того, как трансляция остановится.

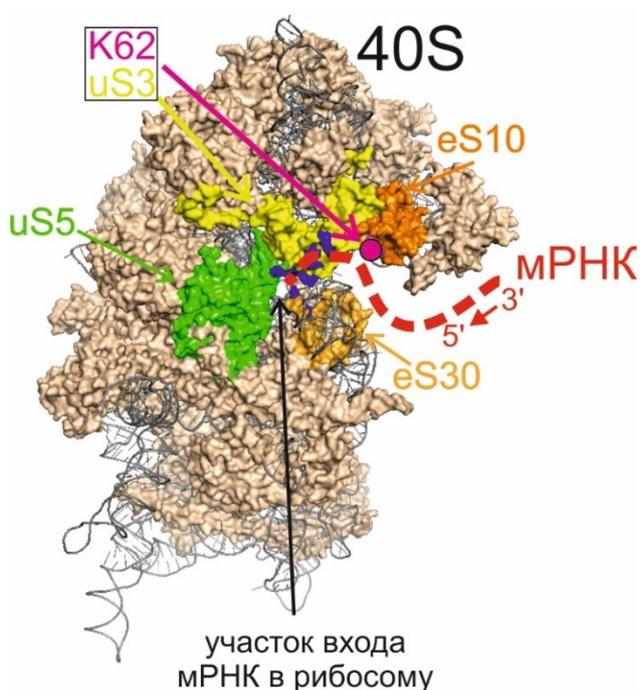


Рисунок 36. Карман для лабильного связывания неструктурированных РНК между порой входа мРНК в рибосому и пептидом 55-64 uS3, предложенный в работе [280]. Темно-синим цветом обозначены положительно заряженные аминокислотные остатки uS3 и соседних рибосомных белков вблизи участка входа мРНК в рибосому; красной пунктирной линией обозначена входящая в рибосому мРНК.

Следует отметить, что молекулярный механизм преждевременной остановки трансляции мРНК, содержащих АП-сайт, наблюдали ранее в работе [92], где авторы полагают, что остановка происходит, когда поврежденный кодон достигает А-участка рибосомы, где он не может быть декодирован. Результаты, полученные в настоящей работе, позволяют предложить альтернативный механизм остановки трансляции – ковалентную фиксацию мРНК на рибосоме посредством сшивки АП-сайта с пептидом 55-64 uS3. Поскольку эффективность сшивки, очевидно, не может быть 100%, то вполне вероятно, что в некоторых случаях повреждение может «проскользнуть» мимо этого пептида и проникнуть в рибосому. Если это произойдет, то трансляция, по-видимому, будет нарушена и остановится на этапе декодирования кодона, содержащего АП-сайт, в соответствии с предположением, сделанным в статье [92].

Таким образом, на основании вышеизложенных данных можно заключить, что АП-сайты, возникающие в мРНК при окислительном стрессе и старении [281], способны непосредственно взаимодействовать в процессе трансляции с пептидом белка uS3, экспонированным на поверхности 40S субчастицы вблизи участка входа мРНК, тем самым делая этот пептид в составе рибосомы участником контроля качества мРНК. Рибосома могла бы участвовать в путях удаления поврежденных мРНК и недосинтезированных пептидов посредством образования трансляционных комплексов с «застывшей» мРНК двумя альтернативными путями. Согласно первому пути входящая в рибосому мРНК, привлекаемая РНК-связывающим карманом вблизи участка входа (рис. 36), проходит мимо пептида 55-64 uS3, который сшивается с ней по мере того, как АП-сайт достигает благоприятного для сшивки положения относительно этого пептида по ходу движения мРНК относительно рибосомы. Второй путь мог бы реализоваться, если поврежденное звено мРНК проследовало мимо пептида 55-64, не образовав ковалентной связи, и попало в декодирующий центр рибосомы. В этом случае трансляция должна остановиться из-за невозможности декодирования поврежденного кодона. Рибосомные комплексы, возникающие в результате этих двух путей, будучи мишенями для клеточных путей контроля качества мРНК и синтезируемых пептидов, должны подвергаться разборке, а мРНК и пептиды – последующей деградации в протеасомах.

Наконец, стоит отметить, что потенциальная роль uS3 в путях, обеспечивающих контроль качества мРНК и синтезируемых пептидов, не ограничивается его способностью сшиваться с АП-сайтами в мРНК в процессе трансляции. Во-первых, консервативные остатки аргинина uS3 в положениях 116/117, которые взаимодействуют с мРНК в участке входа в рибосому влияют на эффективность расщепления мРНК эндонуклеазой на начальных стадиях пути No-Go Decay, хотя сам белок в этом случае не обладает эндонуклеазной активностью [199]. Кроме того, убиквитинирование лизина uS3 по остатку Lys212 у дрожжей (соответствующему Lys214 у человека) является ключевым этапом пути деградации

нефункциональной 18S рРНК (см. раздел 1.1.4), включающим разборку соответствующих рибосомных комплексов и деградацию поврежденной рРНК [158]. Таким образом, очевидно, что uS3 в составе рибосомы выполняет множество функций, связанных с клеточными путями, обеспечивающими контроль качества РНК и синтезируемых пептидов. В этих путях участвуют аминокислотные остатки всех доменов белка, и пептид 55-64 с его уникальным свойством сшиваться с АП-сайтами, по-видимому, входит в их число.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящей работы позволили получить неизвестную ранее информацию о взаимодействии рибосомного белка uS3 человека с ДНК. Анализ полученных в работе данных об участках связывания uS3 на геномной ДНК в составе хроматина и по взаимодействию рекомбинантного белка с модельными ДНК, содержащими АП-сайт, позволило выяснить, что критерием, по которому белок выбирает участки ДНК для связывания, является практически только их физическая доступность, и установить, что изолированный белок предпочитает взаимодействовать с оц-ДНК, а не дц-ДНК в качестве субстрата. Результаты работы указывают на то, что находящийся вне рибосом uS3 может быть вовлечен в репарацию ДНК в ядрышке и связанном с ядрышком хроматине. Применение подходов, использованных ранее для установления пептидов рибосомных белков, контактирующих с мРНК на рибосоме, позволило впервые получить прямые экспериментальные данные о пептидном фрагменте uS3, непосредственно участвующем в АП-лиазной активности белка на стадии образования его ковалентного интермедиата с АП-сайтом. Анализ способности белка, находящегося в составе зрелых цитоплазматических 40S субчастиц, расщеплять ДНК по АП-сайту показал, что он, отличие от свободного uS3, не обладает АП-лиазной активностью, однако способен сшиваться с АП-сайтами в одноцепочечных ДНК. Примечательно, что в работе удалось установить, что изолированный uS3 и белок в составе зрелых 40S субчастиц взаимодействуют с АП-сайтами посредством разных участков, находящихся в разных доменах белка – у изолированного белка - в структурированной части С-концевого домена, а у uS3 в составе рибосомы - в КН-домене на поверхности 40S субчастицы недалеко от участка входа мРНК. Обнаруженная в настоящей работе способность uS3 в составе рибосомы сшиваться с АП-сайтом в оц-ДНК не может иметь биологического значения, поскольку в клетке зрелые рибосомы и ДНК локализованы в разных местах и встретиться не могут. Поэтому было сделано предположение, что данное свойство отражает способность белка взаимодействовать с АП-сайтами в мРНК. Это предположение удалось полностью подтвердить экспериментально, продемонстрировав сшивку АП-сайта в составе мРНК с пептидом 55-64 uS3 на внешней поверхности 40S субчастицы вблизи участка входа мРНК как в модельных комплексах, собранных без участия факторов трансляции, так и в процессе трансляции мРНК, содержащих АП-сайт, в бесклеточной белоксинтезирующей системе. Полученные результаты указывают на существование неизвестного ранее механизма вовлечения рибосом в контроль качества мРНК, основанного на ковалентной фиксации поврежденной мРНК на рибосоме посредством взаимодействия АП-сайта с пептидом 55-64 uS3 в процессе трансляции, превращающей соответствующий рибосомный комплекс в мишень для пути No-Go Decay, предназначенного для узнавания и разборки комплексов с «застывшей» на

рибосоме мРНК и утилизации поврежденных мРНК. Таким образом, неканонические функции uS3 в клетке, основанные на его способности взаимодействовать с АП-сайтами, включают в себя его участие в контроле качества как ДНК, так и мРНК, причем в репарации ДНК участвует только белок, находящийся вне рибосомы, а в контроле качества мРНК – белок в составе 40S субчастицы. Эти функции осуществляются двумя отдельными активными центрами, один из которых, предназначенный для взаимодействия с АП-сайтами в ДНК, расположен в С-концевом домене, а второй, для взаимодействия с АП-сайтами в мРНК – в КН (N-концевом) домене.

ВЫВОДЫ

1. Белок uS3 в составе зрелых цитоплазматических 40S субчастиц рибосом человека, в отличие от изолированного рекомбинантного uS3, не проявляет АП-лиазной активности, однако способен сшиваться с АП-сайтом в одноцепочечной (но не двуцепочечной) ДНК посредством пептида 55-64, экспонированного на поверхности субчастицы вблизи участка входа мРНК, что отражает способность этого пептида к взаимодействию с АП-сайтами в мРНК.
2. Изолированный рекомбинантный рибосомный белок uS3 расщепляет по АП-сайту более эффективно одноцепочечную ДНК по сравнению с двуцепочечной ДНК, сшиваясь при этом с продуктом расщепления ДНК и, в меньшей степени, с нерасщепленной ДНК. Участок сшивки ДНК в изолированном uS3 находится в районе 155-192, расположенном вдали от пептида 55-64, взаимодействующего с АП-сайтами в одноцепочечных нуклеиновых кислотах в составе 40S субчастиц. Это свидетельствует о существовании в рибосомном белке uS3 двух различных центров взаимодействия с АП-сайтами.
3. В клеточном ядре белок uS3, находящийся вне рибосомных частиц, взаимодействует преимущественно с прицентромерными областями хромосом и доменами хроматина, ассоциированными с ядрышком. Основным критерием выбора белком uS3 участков на хроматине является их физическая доступность для связывания, которая, вероятно, обеспечивается отсутствием их экранирования гистонами и/или высоким содержанием одноцепочечных участков.
4. Синтетические аналоги мРНК, содержащие АП-сайт, способны сшиваться с пептидом 55-64 белка uS3, экспонированным на поверхности 40S субчастицы вблизи участка входа мРНК в рибосомный канал, когда неповрежденная 5'-концевая часть мРНК фиксирована в канале кодон-антикодоновым взаимодействием с тРНК, а АП-сайт находится в мРНК на расстоянии нескольких нуклеотидных остатков с 3'-стороны от последнего остатка, находящегося внутри рибосомы.
5. Пептид 55-64 белка uS3 может сшиваться с синтетическими мРНК через АП-сайт в процессе трансляции. Сшивка происходит, когда в ходе движения мРНК относительно рибосомы АП-сайт оказывается в наиболее благоприятном положении относительно этого пептида. Комплекс с ковалентно фиксированной на рибосоме мРНК имеет все свойства мишени для клеточного пути No-Go Decay, предназначенного для удаления поврежденных мРНК, что указывает на существование неизвестного ранее механизма, вовлекающего рибосомы в процесс контроля качества мРНК посредством сшивки АП-сайта с пептидом 55-64 белка uS3.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Warner J.R., McIntosh K.B. How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? // *Mol. Cell.* – 2009. – V. 34. – P. 3-11.
2. Lu H., Zhu Y.-F., Xiong J., Wang R., Jia Z. Potential extra-ribosomal functions of ribosomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae* // *Microbiol. Res.* – 2015. – V. 177. – P. 28-33.
3. Franklin D.A., Zhang Y. Extra-ribosome functions of ribosomal proteins encyclopedia // *Cell Biol.* – 2016. – V. 3. – P. 281-287.
4. Graifer D., Malygin A., Zharkov D.O., Karpova G. Eukaryotic ribosomal protein S3: A constituent of translational machinery and an extraribosomal player in various cellular processes // *Biochimie.* – 2014. – V. 99. – P. 8-18.
5. Graifer D., Karpova G. Ribosomal protein uS3 in cell biology and human disease: Latest insights and prospects // *Bioessays.* – 2020. – V. 42. – e2000124.
6. Han S.H., Chung J.H., Kim J., Kim K.-S., Han Y.S. New role of human ribosomal protein S3: regulation of cell cycle via phosphorylation by cyclin-dependent kinase 2 // *Oncology Lett.* – 2017. – V. 13. – P. 3681-3687.
7. Kim J., Kim Y.-S. Effect of HIV-1 Tat on the formation of the mitotic spindle by interaction with ribosomal protein S3 // *Sci. Rep.* – 2018. – V. 8. – P. 8680-8694.
8. Yang H.J., Youn H.S., Seong K.M., Jin Y.-W., Kim J., Youn B.H. Phosphorylation of ribosomal protein S3 and antiapoptotic TRAF2 protein mediates radioresistance in non-small cell lung cancer cells // *J. Biol. Chem.* – 2013. – V. 288. – P. 2965-2975.
9. Wan F., Weaver A., Gao X., Bern M., Hardwidge P.R., Lenardo M.J. IKKbeta phosphorylation regulates RPS3e nuclear translocation and NF-kappaB function during infection with *Escherichia coli* strain O157:H7 // *Nat. Immunol.* – 2011. – V. 12. – P. 335-343.
10. Yacoub A., Augeri L., Kelley M.R., Doetsch P.W., Deutsch W.A. A *Drosophila* ribosomal protein contains 8-oxoguanine and abasic site DNA repair activities // *EMBO J.* – 1996. – V. 15. – P. 2306-2312.
11. Deutsch W.A., Yacoub A., Jaruga P., Zastawny T.H., Dizdaroglu M., Characterization and mechanism of action of *Drosophila* ribosomal protein S3 DNA glycosylase activity for the removal of oxidatively damaged DNA bases // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – P. 32857-32860.
12. Hegde V., Wang M., Deutsch W.A. Characterization of human ribosomal protein S3 binding to 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites by surface plasmon resonance // *DNA Repair.* – 2004. – V. 3. – P. 121-126.

13. Wilson 3rd D.M., Deutsch W.A., Kelley M.R. Cloning of the *Drosophila* ribosomal protein S3: another multifunctional ribosomal protein with AP endonuclease DNA repair activity // *Nucleic Acids Res.* – 1993. – V. 21. – P. 2516.
14. Sandigursky M., Yacoub A., Kelley M.R., Deutsch W.A., Franklin W.A. The *Drosophila* ribosomal protein S3 contains a DNA deoxyribosephosphodiesterase (dRpase) activity // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – P. 17480-17484.
15. Jung S.-O., Lee J.Y., Kim J. Yeast ribosomal protein S3 has an endonuclease activity on AP DNA // *Mol. Cells.* – 2001. – V. 12. – P. 84-90.
16. Seong K.M., Jung S.-O., Kim H.D., Kim H.J., Jung Y.-J., Choi S.-Y., Kim J. Yeast ribosomal protein S3 possesses a b-lyase activity on damaged DNA // *FEBS Lett.* – 2012. – V. 586. – P. 356-361.
17. Kim S.H., Lee J.Y., Kim J. Characterization of a wide range base-damage-endonuclease activity of mammalian rpS3 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – V. 328. – P. 962-967.
18. Balyeva K.E., Malygin A.A., Karpova G.G., Nevinskii G.A., Zharkov D.O. Interactions of human ribosomal protein S3 with undamaged and damaged DNA // *Mol. Biol. (Mosk).* – 2008. – V. 42. – P. 314-322.
19. 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.* – 2006. – V. 5. – P. 810-815.
20. Lindahl T., Barnes D.E. Repair of endogenous DNA damage // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Boil.* – 2000. – V. 65. – P. 127-134.
21. DNA repair and mutagenesis / Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W. et al. – Washington, DC, USA: ASM Press, 2006. – P. 1118.
22. Halliwell B. Free radicals in biology and medicine / Halliwell B., Gutteridge J.M.C. – Oxford, UK: Oxford University Press, 4th ed., 2007. – P. 704.
23. Shan X., Lin C.L. Quantification of oxidized RNAs in Alzheimer's disease // *Neurobiol. Aging.* – 2006. – V. 27. – P. 657-662.
24. Shan X., Tashiro H., Lin C.L. The identification and characterization of oxidized RNAs in Alzheimer's disease // *J. Neurosci.* – 2003. – V. 23. – P. 4913-4921.
25. Chatterjee N., Graham C.W. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis // *Environ. Mol. Mutagen.* – 2017. – V. 58. – P. 235-263.
26. Sancar A., Lindsey-Boltz L.A., Ünsal-Kaçmaz K., Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints // *Annu. Rev. Biochem.* – 2004. – V. 73. – P. 39-85.

27. Küpfer P.A. Oxidative damage on RNA nucleobases / Küpfer P.A., Leumann C.J. // *Chemical biology of nucleic acids: fundamentals and clinical applications* / Erdmann V.A., Markiewicz W.T., Barciszewski J., eds. – Berlin: Springer-Verlag, Part of the series RNA Technologies, 2014. – P. 75-94.
28. Simms C.L., Hudson B.H., Mosior J.W., Rangwala A.S., Zaher H.S. An active role for the ribosome in determining the fate of oxidized mRNA // *Cell Rep.* – 2014. – V. 9. – P. 1256-1264.
29. Simms C.L., Zaher H.S. (2016) Quality control of chemically damaged RNA // *Cell Mol. Life Sci.* – 2016. – V. 73. – P. 3639-3653.
30. Carusillo A., Mussolino C. DNA damage: from threat to treatment // *Cells.* – 2020. – V. 9. – P. 1665-1686
31. Karakaidos P., Karagiannis D., Rampias T. Resolving DNA damage: epigenetic regulation of DNA repair // *Molecules.* – 2020. – V. 25. – P. 2496-2524.
32. Guo J., Yun B.H., Turesky R.J. Biomonitoring of DNA damage in Humans // *Chemical Biology.* – 2021. – V. 1. – P. 1-26.
33. Liewei L.Y., Hani S.Z. How do cells cope with RNA damage and its consequences? // *J. Biol. Chem.* – 2019. – V. 294. – P. 15158-15171.
34. C. von Sonntag. Free-radical-induced DNA damage and its repair: a chemical perspective / C. von Sonntag. – Berlin: Springer, 2006. – P. 543.
35. Halliwell B. Free radicals in biology and medicine / Halliwell B., Gutteridge J.M.C. – Oxford: Oxford University Press, 5th ed., 2015. – P. 896.
36. Ultraviolet light induced generation of reactive oxygen species // *Advances in experimental medicine and biology* / Jager T.L., Cockrell A.E., Du Plessis S.S. – Stellenbosch, 2017. – Ch. 2. – P. 15-23.
37. Chakarov S., Petkova R., Russev G.C., Zhelev N. DNA damage and mutation. Types of DNA damage // *Biodiscovery.* – 2014. – V. 11. – e8957.
38. Bohr, V.A. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002. – V. 32. – P. 804-812.
39. Lindahl, T. Instability and decay of the primary structure of DNA // *Nature.* – 1993. – V. 362. – P. 709-715.
40. Brown G.C., Borutaite V. Mitochondrion there is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells // *Mitochondrion.* – 2012. – V. 12. – P. 1-4.

41. Casas-Grajales S., Muriel P. Antioxidants in liver health // *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* – 2015. – V. 6. – P. 59-72.
42. Phaniendra A., Jestadi D.B., Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases // *Ind. J. Clin. Biochem.* – 2015. – V. 30. – P. 11-26.
43. Sohal R. S., Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging // *Science.* – 1996. – V. 273. – P. 59-63.
44. Lü J.M., Lin P. H., Yao Q., Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems // *J. Cell. Mol. Med.* – 2010. – V. 14. – P. 840-860.
45. Yan L.L., Zaher H.S. How do cells cope with RNA damage and its consequences? // *J. Biol. Chem.* – 2019. – V. 294. – P. 15158-15171.
46. Imlay J.A., Chin S.M., Linn S. (1988) Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro // *Science.* – 1988. – V. 240. – P. 640-642.
47. Neeley W. L., Essigmann, J. M. (2006) Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products // *Chem. Res. Toxicol.* – 2006. – V. 19. – P. 491-505.
48. C. von Sonntag. The chemical basis of radiation biology / C. von Sonntag. – New York: Taylor & Francis, 1987. – P. 515.
49. Steenken S. Addition-elimination paths in electron-transfer reactions between radicals and molecules // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* – 1987. – V. 87. – P. 113-124.
50. Nackerdien Z., Kasprzak K.S., Rao G., Halliwell B., Dizdaroglu M. Nickel(II)- and cobalt(ii)-dependent damage by hydrogen peroxide to the DNA bases in isolated human chromatin // *Cancer Res.* – 1991. – V. 51. – P. 5837-5842.
51. Vieira A.J.S.C., Steenken S. Pattern of OH radical reaction with adenine and its nucleosides and nucleotides. Characterisation of two types of isomeric OH adduct and their unimolecular transformation reactions // *J. Am. Chem. Soc.* – 1990. – V. 112. – P. 6986-6994.
52. Kim M., Costello J. DNA methylation: an epigenetic mark of cellular memory // *Exp. Mol. Med.* – 2017. – V. 49. – e322.
53. Паткин, Е.Л. Эпигенетика – интегрирующая система между генами, метаболизмом и окружающей средой, определяющая фенотип: Актовая речь на заседании Ученого Совета ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины" / Паткин Евгений Львович. – Санкт-Петербург, 2017. – 40 с.
54. Singer B. Molecular biology of mutagens and carcinogens / Singer B., Grunberger D. – New York: Plenum, 1983. – P. 348.
55. Nay S.L. Direct repair in mammalian cells / Nay S.L., O'Connor T.R. // *New research directions in DNA repair.* – London: InTechOpen, 2013. – P. 123-162.

56. Cadet J., Wagner J. R. DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation // Cold Spring Harbor. Perspect. Biol. – 2013. – V. 5. – a012559.
57. Balasubramanian B., Pogozelski W.K., Tullius T.D. DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1998. – V. 95. – P. 9738-9743.
58. Pommier Y., Leo E., Zhang H., Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs // Chem. Biol. – 2010. – V. 17. – P. 421-433.
59. Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease // FASEB J. – 2003. – V. 10. – P. 1195-1214.
60. Giorgio M., Dellino G.I., Gambino V., Roda N., Pelicci P.G. On the epigenetic role of guanosine oxidation // Redox Biol. – 2020. – V. 29. – 101398.
61. Thompson P.S., Cortez D. New Insights into Abasic Site Repair and Tolerance // DNA Repair (Amst). – 2020. – V. 90. – 102866.
62. Molecular biology of the cell: 4th edition / Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. – New York: Garland Science, 2002. – P. 1616.
63. Lindahl T., Nyberg B. Rate of Depurination of native deoxyribonucleic acid // Biochemistry. – 1972. – V. 11. – P. 3610-3618.
64. Wilson 3rd D.M., Barsky D. The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA // Mutat Res. – 2001. – V. 485. – P. 283-307.
65. Liu Z.J., Cuesta S.M., P. van Delft, Balasubramanian S. Sequencing abasic sites in DNA at single-nucleotide resolution // Nat Chem. – 2019. – V. 11. – P. 629-637.
66. Fortini P., Pascucci B., Parlanti E., D'Errico M., Simonelli V., Dogliotti E. 8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways // Mutat Res. – 2003. – V. 531. – P. 127-139.
67. Hamilton M.L., Guo Z., C D Fuller C.D., H. van Remmen, Ward W.F., Austad S.N., Troyer D.A., Thompson I., Richardson A. A reliable assessment of 8-oxo-2-deoxyguanosine levels in nuclear and mitochondrial DNA using the sodium iodide method to isolate DNA // Nucleic Acids Res. – 2001. – V. 29. – P. 2117-2126.
68. Vidal A.E., Hickson I.D., Boiteux S., Radicella J.P. Mechanism of stimulation of the DNA glycosylase activity of hOGG1 by the major human AP endonuclease: bypass of the AP lyase activity step // Nucleic Acids Res. – 2001. – V. 29. – P. 1285-1292.
69. Van Houten B., Santa-Gonzalez G.A., Camargo M. DNA repair after oxidative stress: current challenges // Curr. Opin. Toxicol. – 2017. – V. 7. – P. 9-16.
70. Gonzalez-Hunt C.P., Wadhwa M., Sanders L.H. DNA damage by oxidative stress: Measurement strategies for two genomes // Curr. Opin. Toxicol. – 2018. – V. 7. – P. 87-94.

71. Kunkel T.A. DNA replication fidelity // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – P. 16895-16898.
72. Kunkel T.A. Evolving views of DNA replication (in)fidelity // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* – 2009. – V. 74. – P. 91-101.
73. Kumar S., Chinnusamy V., Mohapatra T. Epigenetics of modified DNA bases: 5-methylcytosine and beyond // *Front Genet.* – 2018. – V. 9. – P. 1-14.
74. Hsu G.W., Ober M., Carell T., Beese L.S. Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a high-fidelity DNA polymerase // *Nature.* – 2004. – V. 431. – P. 217-221.
75. Ross J. mRNA stability in mammalian cells // *Microbiol. Rev.* – 1995. – V. 59. – P. 423-450.
76. Li Z., Deutscher M.P. Analyzing the decay of stable RNAs in *E. coli* // *Methods Enzymol.* – 2008. – V. 447. P. 31-45.
77. Defoiche J., Zhang Y., Lagneaux L., Pettengell R., Hegedus A., Willems L., Macallan D.C. Measurement of ribosomal rna turnover in vivo by use of deuterium-labeled glucose // *Clin. Chem.* – 2009. – V. 55. – P. 1824-1833.
78. Choe B.K., Taylor M.W. Kinetics of synthesis and characterization of transfer RNA precursors in mammalian cells // *BBA.* – 1972. – V. 272. – P. 275-287.
79. Wurtmann E. J., Wolin S. L. RNA under attack: cellular handling of RNA damage // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 2009. – V. 44. – P. 34-49.
80. Hofer T., Badouard C., Bajak E., Ravanat J. L., Mattsson A., Cotgreave I.A. (2005) Hydrogen peroxide causes greater oxidation in cellular RNA than in DNA // *Biol. Chem.* – 2005. – V. 386. – P. 333-337.
81. Nunomura A., Lee H.G., Zhu X., Perry G. Consequences of RNA oxidation on protein synthesis rate and fidelity: implications for the pathophysiology of neuropsychiatric disorders // *Biochem. Soc. Trans.* – 2017. – V. 45. – P. 1053-1066.
82. Aas D. P., Otterlei M., Falnes P. O., Vågbø C. B., Skorpen F., Akbari M., Sundheim O., Bjørås M., Slupphaug G., Seeberg E., Krokan H. E. Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA // *Nature.* – 2003. – V. 421. – P. 859-863.
83. Copley J. N., Fiorello M. L., Bailey D. M. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress // *Redox Biol.* – 2018. – V. 15. – P. 490-503.
84. Nunomura A., Perry G., Pappolla M. A., Wade R., Hirai K., Chiba S., Smith M. A. RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease // *J. Neurosci.* – 1999. – V. 19. – P. 1959-1964.
85. Traut T.W. Physiological concentrations of purines and pyrimidines // *Mol. Cell. Biochem.* – 1994. – V. 140. – P. 1-22.

86. Fiala E. S., Conaway C. C., Mathis J. E. Oxidative DNA and RNA damage in the livers of Sprague-Dawley rats treated with the hepatocarcinogen 2-nitropropane // *Cancer Res.* – 1989. – V. 49. – P. 5518-5522.
87. Wamer W.G., Wei R.R. In vitro photooxidation of nucleic acids by ultraviolet A radiation // *Photochem. Photobiol.* – 1997. – V. 65. – P. 560-563.
88. Sekiguchi M., Tsuzuki T. Oxidative nucleotide damage: consequence and prevention // *Oncogene.* – 2002. – V. 21. – P. 8895-8904.
89. Grollman A.P., Moriya M. Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within // *Trends Genet.* – 1993. – V. 9. – P. 246-249.
90. Shen Z., Wu W., Hazen S. L. Activated leukocytes oxidatively damage DNA, RNA, and the nucleotide pool through halide-dependent formation of hydroxyl radical // *Biochemistry.* – 2000. – V. 39. – P. 5474-5482.
91. Valavanidis A., Vlachogianni T., Fiotakis C. (2009) 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis // *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* – 2009. – V. 27. – P. 120-139.
92. Calabretta A., Küpfer P.A., Leumann C.J. The effect of RNA base lesions on mRNA translation // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – V. 43. – P. 4713-4720.
93. Chang Y., Kong Q., Shan X., Tian G., Ilieva H., Cleveland D.W., Rothstein J.D., Borchelt D.R., Wong P.C., Lin C.L. Messenger RNA oxidation occurs early in disease pathogenesis and promotes motor neuron degeneration in ALS // *PLoS ONE.* – 2008. – V. 3. – e2849.
94. McKinlay A., Gerard W., Fields S. Global analysis of RNA oxidation in *Saccharomyces cerevisiae* // *BioTechniques.* – 2012. – V. 52. P. 109-111.
95. Núñez M.E., Hall D.B., Barton, J.K. (1999) Long-range oxidative damage to DNA: effects of distance and sequence // *Chem. Biol.* – 1999. – V. 6. – P. 85-97.
96. Thiebe R., Zachau H.G. A specific modification next to the anticodon of phenylalanine transfer ribonucleic acid // *Eur. J. Biochem.* – 1968. – V. 5. – P. 546-555.
97. Wintermeyer W., Zachau H.G. A specific chemical chain scission of tRNA at 7-methylguanosine // *FEBS Lett.* – 1970. – V. 11. – P. 160-164.
98. Endo Y., Mitsui K., Motizuki M., Tsurugi K. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins // *J. Biol. Chem.* – 1987. – V. 262. – P. 5908-5912.
99. Liu Y., Rodriguez Y., Ross R.L., Zhao R., Watts J.A., Grunseich C., Bruzel A., Li D., Burdick J.T., Prasad R., Crouch R.J., Limbach P.A., Wilson S.H., Cheung V.G. RNA abasic sites in yeast and human cells // *PNAS.* – 2020. – V. 117. – P. 20689-20695.

100. Nakamura J., Swenberg J.A. Endogenous apurinic/aprimidinic sites in genomic DNA of mammalian tissues // *Cancer Res.* – 1999. – V. 59. – P. 2522-2526.
101. Chastain 2nd P.D., Nakamura J., Rao S., Chu H., Ibrahim J.G., Swenberg J.A., Kaufman D.G. Abasic sites preferentially form at regions undergoing DNA replication // *FASEB J.* – 2010. – V. 24. – P. 3674-3680.
102. Garrett E.R., Seydel J.K., Sharp A.J. The acid-catalyzed solvolysis of pyrimidine nucleosides // *J. Org. Chem.* – 1966. – V. 31. – P. 2219-2227.
103. Saladino R., Crestini C., Ciciriello F., Di Mauro, Costanzo G. Origin of informational polymers: Differential stability of phosphoester bonds in ribomonomers and ribooligomers // *J. Biol. Chem.* – 2006. – V. 281. – P. 5790-5796.
104. York J. Effect of the structure of the glycon on the acid-catalyzed hydrolysis of adenine nucleosides // *J. Org. Chem.* – 1981. – V. 46. – P. 2171-2173.
105. Lenz S.A.P., Wetmore S.D. Evaluating the substrate selectivity of alkyladenine DNA glycosylase: The synergistic interplay of active site flexibility and water reorganization // *Biochemistry.* – 2016. – V. 55. – P. 798-808.
106. Küpfer P.A., Leumann C.J. The chemical stability of abasic RNA compared to abasic DNA // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – V. 35. – P. 58-68.
107. Wilde J.A., Bolton P.H. Characterization of the equilibrating forms of the aldehydic abasic site in duplex DNA by ¹⁷O NMR // *J. Am. Chem. Soc.* – 1989. – V. 111. – P. 1896-1897.
108. Wang J.Y.J. Cell death response to DNA damage // *Yale. J. Biol. Med.* – 2019. – V. 92. – P. 771-779.
109. Laiho M., Latonen L. Cell cycle control, DNA damage checkpoints and cancer // *Ann. Med.* – 2003. – V. 35. – P. 391-397.
110. Jekimovs C., Bolderson E., Suraweera A., Adams M., O'Byrne K.J., Richard D.J. Chemotherapeutic compounds targeting the DNA double-strand break repair pathways: the good, the bad, and the promising // *Front. Oncol.* – 2014. – V. 4. – P. 1-18.
111. Zharkov D.O. *Mechanisms of Genome Protection and Repair* / Zharkov D.O. – Switzerland: Springer Nature, 2020. – P. 220.
112. Спивак И.М. Экология. Повреждение и репарация ДНК: учебное пособие / Спивак И.М. – Санкт-Петербург: Эко-Вектор, 2006. – С. 220.
113. Huffman J.L., Sundheim O., Tainer J.A. DNA base damage recognition and removal: new twists and grooves // *Mutat Res.* – 2005. – V. 577. – P. 55-76.
114. Krokan H.E., Bjørås M. Base excision repair // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2013. – V. 5. – a012583.

115. Jacobs A.L., Schär P. DNA glycosylases: in DNA repair and beyond // *Chromosoma*. – 2012. – V. 121. – P. 1-20.
116. Svilar D., Goellner E.M., Almeida K.H., Sobol R.W. Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2011. – V. 14. – P. 2491-2507.
117. Речкунова Н.И., Красикова Ю.С., Лаврик О.И. Интерактом систем репарации оснований и нуклеотидов // *Мол. биол.* – 2021. – Т. 55 – С. 181-193.
118. Nospikel T. Nucleotide excision repair: variations on versatility // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2009. – V. 66. – P. 994-1009.
119. Maillard O., Solyom S., Naegeli H. (2007) An aromatic sensor with aversion to damaged strands confers versatility to DNA repair // *PLoS Biol.* – 2007. – V. 5. – e79.
120. Apelt K., Lans H., Schärer O.D., Luijsterburg M.S. Nucleotide excision repair leaves a mark on chromatin: DNA damage detection in nucleosomes // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2021. – V. 78. – P. 7925-7942.
121. Jiricny J. Postreplicative Mismatch Repair // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2013. – V. 5. – a012633.
122. Kolodner R.D., Marsischky G.T. Eukaryotic DNA mismatch repair // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 1999. – V. 9. – P. 89-96.
123. Buermeyer A.B., Deschenes S.M., Baker S.M., Liskay R.M. Mammalian DNA mismatch repair // *Annu. Rev. Genet.* – 1999. – V. 33. – P. 533-564.
124. Schofield M.J., Hsieh P. DNA mismatch repair: molecular mechanism and biological function // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2003. – V. 57. – P. 579-608.
125. Liu D., Keijzers G., Rasmussen L.J. DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells // *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* – 2017. – V. 773. – P. 174-187.
126. Wright W.D., Shah S.S., Heyer W.-D. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks // *J. Biol. Chem.* – 2018. – V. 293. – P. 10524-10535.
127. Mao Z., Bozzella M., Seluanov A., Gorbunova V. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells // *Cell Cycle*. – 2008. – V. 7. – P. 2902-2906.
128. Fell V.L., Schild-Poulter C. Ku regulates signaling to DNA damage response pathways through the Ku70 von Willebrand A domain // *Mol. Cell Biol.* – 2012. – V. 32. – P. 76-87.
129. Davis A.J., Chen D.J. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining // *Transl. Cancer Res.* – 2013. – V. 2. – P. 130-143.
130. Литвинов С.В. Основные пути репарации двойных разрывов геномной ДНК и взаимодействия между ними // *Цитология и генетика*. – 2014. – Т. 48. – С. 64-77.

131. Lamarche B.J., Orazio N.I., Weitzman M.D. The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance // *FEBS Lett.* – 2010. – V. 584. – P. 3682-3695.
132. Stracker T.H., Morales M., Couto S.S., Hussein H., Petrini J.H.J. The carboxy terminus of NBS1 is required for induction of apoptosis by the MRE11 complex // *Nature.* – 2007. – V. 447. – P. 218-221.
133. Borrego-Soto G., Ortiz-López R., Rojas-Martínez A. Ionizing radiation-induced DNA injury and damage detection in patients with breast cancer // *Genet. Mol. Biol.* – 2015. – V. 38. – P. 420-432.
134. Ziemba A., Derosier L.C., Methvin R., Song C.Y., Clary E., Kahn W., et al. Repair of triplex-directed DNA alkylation by nucleotide excision repair // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – V. 29. – P. 4257-4263.
135. Kondo N., Takahashi A., Ono K., Ohnishi T. DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways // *J. Nucleic Acids.* – 2010. – V. 2010. – P. 1-7.
136. Raveh A., Margalioth M., Sontag E.D., Tuller T. A model for competition for ribosomes in the cell // *J. R. Soc. Interface.* – 2016. – V. 13. – 20151062.
137. Simms C.L., Yan L.L., Zaher H.S. Ribosome collision is critical for quality control during No-go decay // *Mol. Cell.* – 2017. – V. 68. – P. 361-373.
138. Ikeuchi K., Tesina P., Matsuo Y., Sugiyama T., Cheng J., Saeki Y., Tanaka K., Becker T., Beckmann R., Inada T. Collided ribosomes form a unique structural interface to induce Hel2-driven quality control pathways // *EMBO J.* – 2019. – V. 38. – e100276.
139. Juskiewicz S., Chandrasekaran V., Lin Z., Kraatz S., Ramakrishnan V., Hegde R.S. ZNF598 is a quality control sensor of collided ribosomes // *Mol. Cell.* – 2018. – V. 72. – P. 469-481.
140. Brandman O., Stewart-Ornstein J., Wong D., Larson A., Williams C.C., Li G.-W., Zhou S., King D., Shen P.S., Weibezahn J., Dunn J.G., Rouskin S., Inada T., Frost A., Weissman J.S. A ribosome-bound quality control complex triggers degradation of nascent peptides and signals translation stress // *Cell.* – 2012. – V. 151. – P. 1042-1054.
141. Garzia A., Jafarnejad S.M., Meyer C., Chapat C., Gogakos T., Morozov P., Amiri M., Shapiro M., Molina H., Tuschl T., Sonenberg N. The E3 ubiquitin ligase and RNA-binding protein ZNF598 orchestrates ribosome quality control of premature polyadenylated mRNAs // *Nat. Commun.* – 2017. – V. 8. – 16056.
142. Sundaramoorthy E., Leonard M., Mak R., Liao J., Fulzele A., Bennett E.J. ZNF598 and RACK1 regulate mammalian ribosome-associated quality control function by mediating regulatory 40S ribosomal ubiquitylation // *Mol. Cell.* – 2017. – V. 65. – P. 751-760.

143. Matsuo Y., Ikeuchi K., Saeki Y., Iwasaki S., Schmidt C., Udagawa T., Sato F., Tsuchiya H., Becker T., Tanaka K., Ingolia N.T., Beckmann R., Inada T. Ubiquitination of stalled ribosome triggers ribosome-associated quality control // *Nat. Commun.* – 2017. – V. 8. – P. 150-159.
144. Tsuboi T., Kuroha K., Kudo K., Makino S., Inoue E., Kashima I., Inada T. Dom34:hbs1 plays a general role in quality-control systems by dissociation of a stalled ribosome at the 3' end of aberrant mRNA // *Mol. Cell.* – 2012. – V. 46. – P. 518-529.
145. Shoemaker C.J., Elyer D.E., Green R. Dom34:Hbs1 promotes subunit dissociation and peptidyl-tRNA drop-off to initiate no-go decay // *Science.* – 2010. – V. 330. – P. 369-372.
146. Pisareva V.P., Skabkin M.A., Hellen C.U.T., Pestova T.V., Pisarev A.V. Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes // *EMBO J.* – 2011. – V. 30. – P. 1804-1817.
147. Ikeuchi K., Yazaki E., Kudo K., Inada T. Conserved functions of human Pelota in mRNA quality control of nonstop mRNA // *FEBS Lett.* – 2016. – V. 590. – P. 3254-3263.
148. D'Orazio K.N., Wu C.C.-C., Sinha N., Loll-Krippelber R., Brown G.W., Green R. The endonuclease Cue2 cleaves mRNAs at stalled ribosomes during No Go Decay // *Elife.* – 2019. – V. 8. – e49117.
149. Navickas A., Chamois S., Saint-Fort R., Henri J., Torchet C., Benard L. No-Go Decay mRNA cleavage in the ribosome exit tunnel produces 5'-OH ends phosphorylated by Trl1 // *Nat. Commun.* – 2020. – V. 11. – P. 1-11.
150. Hu W., Sweet T.J., Chamnongpol S., Baker K.E., Collier J. Co-translational mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae* // *Nature.* – 2009. – V. 461. – P. 225-229.
151. Tesina P., Heckel E., Cheng J., Fromont-Racine M., Buschauer R., Kater L., Beatrix B., Berninghausen O., Jacquier A., Becker T., Beckmann R. Structure of the 80S ribosome-Xrn1 nuclease complex // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2019. – V. 26. – P. 275-280.
152. Sitron C.S., Park J.H., Brandman O. Asc1, Hel2, and Slh1 couple translation arrest to nascent chain degradation // *RNA.* – 2017. – V. 23. – P. 798-810.
153. Bengtson M.H., Joazeiro C.A.P. Role of a ribosome-associated E3 ubiquitin ligase in protein quality control // *Nature.* – 2010. – V. 467. – P. 470-473.
154. Guydosh N.R., Green R. Translation of poly(A) tails leads to precise mRNA cleavage // *RNA.* – 2017. – V. 23. – P. 749-761.
155. Kuroha K., Akamatsu M., Dimitrova L., Ito T., Kato Y., Shirahige K., Inada T. Receptor for activated C kinase 1 stimulates nascent polypeptide-dependent translation arrest // *EMBO Rep.* – 2010. – V. 11. – P. 956-961.

156. LaRiviere F.J., Cole S.E., Ferullo D.J., Moore M.J. A late-acting quality control process for mature eukaryotic rRNAs // *Mol. Cell.* – 2006. – V. 24. – P. 619-626.
157. Cole S.E., LaRiviere F.J., Merrikh C.N., Moore M.J. A convergence of rRNA and mRNA quality control pathways revealed by mechanistic analysis of nonfunctional rRNA decay // *Mol. Cell.* – 2009. – V. 34. – P. 440-450.
158. Sugiyama T., Li S., Kato M., Ikeuchi K., Ichimura A., Matsuo Y., Inada T. Sequential ubiquitination of ribosomal protein uS3 triggers the degradation of Non-functional 18S rRNA // *Cell Rep.* – 2019. – V. 26. – P. 3400-3415.
159. Fujii K., Kitabatake M., Sakata T., Miyata A., Ohno M. A role for ubiquitin in the clearance of nonfunctional rRNAs // *Genes. Dev.* – 2009. – V. 23. – P. 963-974.
160. Fujii K., Kitabatake M., Sakata T., Ohno M. 40S subunit dissociation and proteasome-dependent RNA degradation in nonfunctional 25S rRNA decay // *EMBO J.* – 2012. – V. 31. – P. 2579-2589.
161. Kim J., Chubatsu L.S., Admon A., Stahl J., Fellous R., Linn S. Implication of mammalian ribosomal protein S3 in the processing of DNA damage // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270. – P. 13620-13629.
162. Hegde V., Kelley M.R., Xu Y., Mian I.S., Deutsch W.A. Conversion of the bifunctional 8-oxoguanine/ β - δ apurinic/apyrimidinic DNA repair activities of *Drosophila* ribosomal protein S3 into the human S3 monofunctional β -elimination catalyst through a single amino acid change // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – P. 27591-27596.
163. Kim T.-S., Kim H.D., Kim J. PKCdelta-dependent functional switch of rpS3e between translation and DNA repair // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – V. 1793. – P. 395-405.
164. Yadavilli S., Hegde V., Deutsch W.A. Translocation of human ribosomal protein S3 to sites of DNA damage is dependant on ERK-mediated phosphorylation following genotoxic stress // *DNA Repair (Amst).* – 2007. – V. 6. – P. 1453-1462.
165. Lee S.B., Kwon I.-S., Park J., Lee K.-H., Ahn Y., Lee C., Kim J., Choi S.Y., Cho S.-W., Ahn J.-Y. Ribosomal protein S3, a new substrate of Akt, serves as a signal mediator between neuronal apoptosis and DNA repair // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285. – P. 29457-29468.
166. Funakoshi M., Nambara D., Hayashi Y., Zhang-Akiyama Q.-M. CiAPEX2 and CiP0, candidates of AP endonucleases in *Ciona intestinalis*, have 3'-5' exonuclease activity and contribute to protection against oxidative stress // *Genes Environ.* – 2017. – V. 39. – P. 27-35.
167. Oberto J., Bonnefoy E., Mouray E., Pellegrini O., Wikström P.M., Rouvière-Yaniv J. The *Escherichia coli* ribosomal protein S16 is an endonuclease // *Mol. Microbiol.* – 1996. – V. 19. – P. 1319-1330.

168. Bonnefoy E. The ribosomal S16 protein of *Escherichia coli* displaying a DNA-nicking activity binds to cruciform DNA // *Eur. J. Biochem.* – 1997. – V. 247. – P. 852-859.
169. Kim Y.-J., Kim H.D., Kim J. Cytoplasmic ribosomal protein S3 (rpS3) plays a pivotal role in mitochondrial DNA damage surveillance // *Biochim Biophys Acta.* – 2013. – V. 1833. – P. 2943-2952.
170. Yang C., Zang W., Ji Y., Li T., Yang Y., Zheng X. Ribosomal protein L6 (RPL6) is recruited to DNA damage sites in a poly(ADP-ribose) polymerase-dependent manner and regulates the DNA damage response // *J. Biol. Chem.* – 2019. – V. 294. – P. 2827-2838.
171. Wei H., Yu X. Functions of PARylation in DNA Damage Repair Pathways // *Genomics Proteomics Bioinformatics.* – 2016. – V. 14. – P. 131-139.
172. Esposito D., Crescenzi E., Sagar V., Loreni F., Russo A., Russo G. Human rpL3 plays a crucial role in cell response to nucleolar stress induced by 5-FU and L-OHP // *Oncotarget.* – 2014. – V. 5. – P. 11737-11751.
173. Park Y.J., Kim T.-S., Kim E.-H., Kim H.D., Kim J. Ribosomal protein S3 is a novel negative regulator of non-homologous end joining repair of DNA double-strand breaks // *FASEB J.* – 2020. – V. 34. – P. 8102-8113.
174. 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.
175. Park Y.J., Kim S.H., Kim T.S., S M Lee S.M., Cho B.S., Seo C.I., Kim H.D., Kim J. Ribosomal protein S3 associates with the TFIIH complex and positively regulates nucleotide excision repair // *Cell Mol. Life Sci.* – 2021. – V. 78. – P. 3591-3606.
176. Golomb L., Volarevic S., Oren M. p53 and ribosome biogenesis stress: the essentials // *FEBS Lett.* – 2014. – V. 588. – P. 2571-2579.
177. Lindström M.S., Jurada D., Bursac S., Orsolich I., Bartek J., Volarevic S. Nucleolus as an emerging hub in maintenance of genome stability and cancer pathogenesis // *Oncogene.* 2018. – V. 37. – P. 2351-2366.
178. Vousden K.H., Prives C. Blinded by the light: The growing complexity of p53 // *Cell.* – 2009. – V. 137. – P. 413-431.
179. Zilfou J.T., Lowe S.W. (2009) Tumor suppressive functions of p53 // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2009. – V. 1. – a001883.
180. Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., Harris C.C. p53 mutations in human cancers // *Science.* – 1991. – V. 253. – P. 49-53.
181. Robles A.I., Harris C.C. Clinical outcomes and correlates of TP53 mutations and cancer // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2010. – V. 2. – a001016.

182. Haupt Y., Maya R., Kazaz A., Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53 // Nature. – 1997. – V. 387. – P. 296-299.
183. Kubbutat M.H., Jones S.N., Vousden K.H. Regulation of p53 stability by Mdm2 // Nature. – 1997. – V. 387. – P. 299-303.
184. Yuan X., Zhou Y., Casanova E., Chai M., Kiss E., Gröne H.-J., Schütz G., Grummt I. Genetic inactivation of the transcription factor TIF-IA leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest, and p53-mediated apoptosis // Mol. Cell. – 2005. – V. 19. – P. 77-87.
185. Horn H.F., Vousden K.H. Cooperation between the ribosomal proteins L5 and L11 in the p53 pathway // Oncogene. – 2008. – V. 27. – P. 5774-5784.
186. Nosrati N., Kapoor N.R., Kumar V. DNA damage stress induces the expression of ribosomal protein S27a gene in a p53-dependent manner // Gene. – 2015. – V. 559. – P. 44-51.
187. 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.
188. 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.
189. Chen D., Zhang Z., Li M., Wang W., Li Y., Rayburn E.R., Hill D.L., Wang H., Zhang R. 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.
190. 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.
191. 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. – e68667.
192. Romanov V.S., Bardin A.A., Zubova S.G., Bykova T.V., Pospelov V.A., Pospelova T.V. p21^{Waf1} is required for complete oncogenic transformation of mouse embryo fibroblasts by *E1Aad5* and *c-Ha-ras* oncogenes // Biochimie. – 2011. – V. 93. – P. 1408-1414.
193. Roos W.P., Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis // Trends Mol. Med. – 2006. – V. 12. – P. 440-450.
194. Reinhardt H.C., Yaffe M.B. Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2 // Curr. Opin. Cell Biol. – 2009. – V. 21. – P. 245-255.
195. Hwang I., Cho S.-W., Ahn J.-Y. Chaperone-E3 ligase complex HSP70-CHIP mediates ubiquitination of ribosomal protein S3 // Int. J. Mol. Sci. – 2018. – V. 19. – P. 2723-2739.

196. Song L., Luo Z.-Q. Post-translational regulation of ubiquitin signaling // *J. Cell Biol.* – 2019. – V. 218. – P. 1776-1786.
197. Juskiewicz S., Hegde R.S. Initiation of quality control during Poly(A) translation requires site-specific ribosome ubiquitination // *Mol. Cell.* – 2017. – V. 65. – P. 743-750.
198. Dong J., Aitken C.E., Thakur A., Shin B.-S., Lorsch J.R., Hinnebusch A.G. Rps3/uS3 promotes mRNA binding at the 40S ribosome entry channel and stabilizes preinitiation complexes at start codons // *PNAS.* – 2017. – V. 114. – P. 2126-2135.
199. Simms C.L., Kim K.Q., Yan L.L., Qiu J., Zaher H.S. Interactions between the mRNA and Rps3/uS3 at the entry tunnel of the ribosomal small subunit are important for no-go decay // *PLoS Genet.* – 2018. – V. 14. – e1007818.
200. Limoncelli K.A., Merrih C.N., Moore M.J. ASC1 and RPS3: new actors in 18S nonfunctional rRNA decay // *RNA.* – 2017. – V. 23. – P. 1946-1960.
201. Sengupta J., Nilsson J., Gursky R., Spahn C. M., Nissen P., Frank J. Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2004. – V. 11. – P. 957-962.
202. Singh N., Jindal S., Ghosh A., Komar A.A. Communication between RACK1/Asc1 and uS3 (Rps3) is essential for RACK1/Asc1 function in yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Gene.* – 2019. – V. 706. – P. 69-76.
203. Sakata T., Fujii K., Ohno M., Kitabatake M. Crt10 directs the cullin-E3 ligase Rtt101 to nonfunctional 25S rRNA decay // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2015. – V. 457. – P. 90-94.
204. Mao-De L., Jing X. Ribosomal Proteins and Colorectal Cancer // *Curr. Genom.* – 2007. – V. 8. – P. 43-49.
205. Dolezal J.M., Dash A.P., Prochownik E.V. Diagnostic and prognostic implications of ribosomal protein transcript expression patterns in human cancers // *BMC Cancer.* – 2018. – V. 18. – P. 275-289.
206. 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.
207. Wu M., Qaidi S.E., Hardwidge P.R. SseL deubiquitinates RPS3 to inhibit its nuclear translocation // *Pathogens.* – 2018. – V. 7. – P. 86-98.
208. Llanos S., Serrano M. Depletion of ribosomal protein L37 occurs in response to DNA damage and activates p53 through the L11/MDM2 pathway // *Cell Cycle.* – 2010. – V. 9. – P. 4005-4012.

209. Sun X.-X., Dai M.-S., Lu H. 5-fluorouracil activation of p53 involves an MDM2-ribosomal protein interaction // *J. Biol. Chem.* – 2007. – V. 282. – P. 8052-8059.
210. 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.
211. 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.
212. 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.
213. Zhang Y., Wang J., Yuan Y., Zhang W., Guan W., Wu Z., Jin C., Chen H., Zhang L., Yang X., He F. Negative regulation of HDM2 to attenuate p53 degradation by ribosomal protein L26 // *Nucleic Acids Res.* – 2010. – V. 38. – P. 6544-6554.
214. He X., Li Y., Dai M.-S., Sun X.-X. Ribosomal protein L4 is a novel regulator of the MDM2-p53 loop // *Oncotarget.* – 2016. – V. 7. – P. 16217-16226.
215. Ljungström V., Cortese D., Young E., Pandzic T., Mansouri L., Plevova K., et al. Whole-exome sequencing in relapsing chronic lymphocytic leukemia: clinical impact of recurrent RPS15 mutations // *Blood.* – 2016. – V. 127. – P. 1007-1016.
216. Landau D.A., Tausch E., Taylor-Weiner A.N., Stewart C., Reiter J.G., Bahlo J., et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse // *Nature.* – 2015. – V. 526. – P. 525-530.
217. You Y., Wen R., Pathak R., Li A., Li W., Clair D.St., Hauer-Jensen M., Zhou D., Liang Y. Latexin sensitizes leukemogenic cells to gamma-irradiation-induced cell-cycle arrest and cell death through Rps3 pathway // *Cell Death Dis.* – 2014. – V. 5. – e1493.
218. Kim W., Youn H., Lee S., Kim E., Kim D., Lee J.S., Jae-Lee M., Youn B. RNF138-mediated ubiquitination of rpS3 is required for resistance of glioblastoma cells to radiation-induced apoptosis // *Exp. Mol. Med.* – 2018. – V. 50. – e434.
219. Nagao-Kitamoto H., Setoguchi T., Kitamoto S., Nakamura S., Tsuru A., Nagata M., Nagano S., Ishidou Y., Yokouchi M., Kitajima S., Yoshioka T., Maeda S., Yonezawa S., Komiya S. Ribosomal protein S3 regulates GLI2-mediated osteosarcoma invasion // *Cancer Lett.* – 2015. – V. 356. – P. 855-861.
220. Choi S.H., Kim S.Y., An J.J., Lee S.H., Kim D.W., Hea Ryu H.J., Lee N.I., et al. Human PEP-1-ribosomal protein S3 protects against UV-induced skin cell death // *FEBS Lett.* – 2006. – V. 580. – P. 6755-6762.

221. Shi J., Zhang L., Zhou D., Zhang J., Lin Q., Guan W., Zhang J., Ren W., Xu G. Biological Function of Ribosomal Protein L10 on Cell Behavior in Human Epithelial Ovarian Cancer // *J. Cancer.* – 2018. – V. 9. – P. 745-756.
222. Yang J., Chen Z., Liu N., Chen Y. Ribosomal protein L10 in mitochondria serves as a regulator for ROS level in pancreatic cancer cells // *Redox. Biol.* – 2018. – V. 19. – P. 158-165.
223. Hu J., Wang Y. OSGIN1 (oxidative stress induced growth inhibitor 1) // *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* – 2015. – V. 19. – P. 117-120.
224. DeBerardinis R.J., Lum J.J., Hatzivassiliou G., Thompson C.B. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation // *Cell Metab.* – 2008. – V. 7. – P. 11-20.
225. Lu J., Tan M., Cai Q. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism // *Cancer Lett.* – 2015. – V. 356. – P. 156-164.
226. Nunomura A., Tamaoki T., Motohashi N., et al. The earliest stage of cognitive impairment in transition from normal aging to alzheimer disease is marked by prominent RNA oxidation in vulnerable neurons // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 2012. – V. 71. – P. 233-241.
227. Nunomura A., Hofer T., Moreira P.I., Castellani R.J., Smith M.A., Perry G. RNA oxidation in Alzheimer disease and related neurodegenerative disorders // *Acta Neuropathologica.* – 2009. – V. 118. – P. 151-166.
228. Petersen R.B., Siedlak S.L., Lee H.-G., et al. Redox metals and oxidative abnormalities in human prion diseases // *Acta Neuropathol.* – 2005. – V. 110. – P. 232-238.
229. Hayashi M., Arai N., Satoh J., et al. Neurodegenerative mechanisms in subacute sclerosing panencephalitis // *J. Child. Neurol.* – 2002. – V. 17. – P. 725-730.
230. Linding R., Schymkowitz J., Rousseau F., Diella F., Serrano L. A comparative study of the relationship between protein structure and beta-aggregation in globular and intrinsically disordered proteins // *J. Mol. Biol.* – 2004. – V. 342. – P. 345-353.
231. Jamar N.H., Kritsiligkou P., Grant C.M. Loss of mRNA surveillance pathways results in widespread protein aggregation // *Sci. Rep.* – 2018. – V. 8. – P. 3894-3904.
232. Hipp M.S., Park S.H., Hartl F. U. Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases // *Trends Cell Biol.* – 2014. – V. 24. – P. 506-514.
233. Stefani, M. (2004) Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – V. 1739. – P. 5-25.
234. Chondrogianni N., Petropoulos I., Grimm S., Georgila K., Catalgol B., Friguet B., Grune T., Gonos E.S. Protein damage, repair and proteolysis // *Mol. Aspects Med.* – 2014. – V. 35. P. 1-71.

235. Gouras G.K., Olsson T.T., Hansson O. β -Amyloid peptides and amyloid plaques in Alzheimer's disease // *Neurotherapeutics*. – 2015. – V. 12. – P. 3-11.
236. Brégeon D., Sarasin A. Hypothetical role of RNA damage avoidance in preventing human disease // *Mutat. Res.* – 2005. – V. 577. – P. 293-302.
237. Fimognari C. Role of Oxidative RNA Damage in Chronic-Degenerative Diseases // *Oxid. Med. Cell Longev.* – 2015. – V. 2015. – P. 358713-358721.
238. Strezoska Z., Pestov D.G., Lau L.F. Bop1 is a mouse WD40 repeat nucleolar protein involved in 28S and 5.8S RRNA processing and 60S ribosome biogenesis // *Mol. Cell Biol.* – 2000. – V. 20. – P. 5516-5528.
239. Malygin A., Baranovskaya O., Ivanov A., Karpova G. Expression and purification of human ribosomal proteins S3, S5, S10, S19, and S26 // *Protein Expr. Purif.* – 2003. – V. 28. – P. 57-62.
240. Sharifulin D.E., Grosheva A.S., Bartuli Y.S., Malygin A.A., Meschaninova M.I., Ven'yaminova A.G., Stahl J., Graifer D.M., Karpova G.G. Molecular contacts of ribose-phosphate backbone of mRNA with human ribosome // *Biochim. Biophys. Acta* – 2015. – V. 1849. – P. 930-939.
241. Graifer D., Molotkov M., Styazhkina V., Demeshkina N., Bulygin K., Eremina A., Ivanov A., Laletina E., Ven'yaminova A., Karpova G. Variable and conserved elements of human ribosomes surrounding the mRNA at the decoding and upstream sites // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – V. 32. – P. 3282-3293.
242. Bulygin K.N., Khairulina Y.S., Kolosov P.M., Ven'yaminova A.G., Graifer D.M., Vorobjev Y.N., Frolova L.Y., Kisselev L.L., Karpova G.G. Three distinct peptides from the N domain of translation termination factor eRF1 surround stop codon in the ribosome // *RNA*. – 2010. – V. 16. – P. 1902-1914.
243. Schmidt D., Wilson M.D., Spyrou C., Brown G.D., Hadfield J., Odom D.T. ChIP-seq: Using high-throughput sequencing to discover protein–DNA interactions // *Methods*. – 2009. – V. 48. – P. 240–248.
244. Matasova N.B., Myltseva S.V., Zenkova M.A., Graifer D.M., Vladimirov S.N., Karpova G.G. Isolation of ribosomal subunits containing intact rRNA from human placenta. Estimation of functional activity of 80S ribosomes // *Analyt. Biochem.* – 1991. – V. 198. – P.219-223.
245. Proudininikov D., Mirzabekov A. Chemical methods of DNA and RNA fluorescent labeling // *Nucleic Acid Res.* – 1996. – V. 24. – P. 4535-4542.
246. Lomakin I.B., Steitz T.A. The initiation of mammalian protein synthesis and mRNA scanning mechanism // *Nature*. – 2013. – V. 500. – P. 307-311.

247. Boyle A.P., Davis S., Shulha H.P., Meltzer P., Margulies E.H., Weng Z., Furey T.S., Crawford G.E. High-resolution mapping and characterization of open chromatin across the genome // *Cell*. – 2008. – V. 132. – P. 311-322.
248. Cockerill P.N. Structure and function of active chromatin and DNase I hypersensitive sites // *FEBS J.* – 2011. – V. 278. – P. 2182-2210.
249. Wang Y.-M., Zhou P., Wang L.-Y., Li Z.-H., Zhang Y.-N., Zhang Y.-X. Correlation between DNase I hypersensitive site distribution and gene expression in HeLa S3 cells // *PLoS One*. – 2012. – V. 7. – e42414.
250. He Y., Carrillo J.A., Luo J., Ding Y., Tian F., Davidson I., Song J. Genome-wide mapping of DNase I hypersensitive sites and association analysis with gene expression in MSB1 cells // *Front. Genet.* – 2014. – V. 5. – P. 308-317.
251. Fernández J.L., Vázquez-Gundín F., Rivero M.T., Goyanes V., Gosálvez J. Evidence of abundant constitutive alkali-labile sites in human 5 bp classical satellite DNA loci by DBD-FISH // *Mutat. Res.* – 2001. – V. 473. – P. 163-168.
252. Cortés A., Huertas D., Marsellach F.X., Ferrer-Miralles N., Ortiz-Lombardía M., Fanti L., Pimpinelli S., Pina B., Azorín F. Analysing the contribution of nucleic acids to the structure and properties of centric heterochromatin // *Genetica*. – 2003. – V. 117. – P. 117-125.
253. Aze A., Sannino V., Soffientini P., Bachi A., Costanzo V. Centromeric DNA replication reconstitution reveals DNA loops and ATR checkpoint suppression // *Nat. Cell Biol.* – 2016. – V. 18. – P. 684-691.
254. Mitterer V., Murat G., Réty S., Blaud M., Delbos L., Stanborough T., Bergler H., Leulliot N., Kressler D., Pertschy B. Sequential domain assembly of ribosomal protein S3 drives 40S subunit maturation // *Nat. Commun.* – 2016. – V. 7. – P. 10336-10351.
255. Scaiola A., Peña C., Weisser M., Böhringer D., Leibundgut M., Klingauf-Nerurkar P., Gerhardy S., Panse V.G., Ban N. Structure of a eukaryotic cytoplasmic pre-40S ribosomal subunit // *EMBO J.* – 2018. – V. 37. – e98499.
256. Ameismeier M., Cheng J., Berninghausen O., Beckmann R. Visualizing late states of human 40S ribosomal subunit maturation // *Nature*. – 2018. – V. 558. – P. 249-253.
257. Morgan A.R., Wells R.D., Khorana H.G. Studies on polynucleotides. LXXIV. Direct translation in vitro of single-stranded DNA-like polymers with repeating nucleotide sequences in the presence of Neomycin B // *J. Mol. Biol.* – 1967. – V. 26. – P. 477-497.
258. Ricker R.D., Kaji A. Use of single-stranded DNA oligonucleotides in programming ribosomes for translation // *Nucleic Acids Res.* – 1991. – V. 19. – P. 6573-6578.
259. Bretscher M.S. Direct translation of a circular messenger DNA // *Nature*. – 1968. – V. 220. – P. 1088-1091.

260. Potapov A.P., Triana-Alonso F.J., Nierhaus K.H. Ribosomal decoding processes at codons in the A or P sites depend differently on 2'-OH groups // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270. – P. 17680-17684.
261. Kosova A.A., Khodyreva S.N., Lavrik O.I. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) interacts with apurinic/aprimidinic sites in DNA // *Mutation Res.* – 2015. – V. 779. – P. 46-57.
262. Prasad R., Horton J.K., Chastain II P.D., Gassman N.R., Freudenthal B.D., Hou E.W., Wilson S.H. Suicidal cross-linking of PARP-1 to AP site intermediates in cells undergoing base excision repair // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – V. 42. – P. 6337-6351.
263. Hill J.W., Hazra T.K., Izumi T., Mitra S. Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – V. 29. – P. 430-438.
264. Zharkov D.O., Rosenquist T.A., Gerchman S.E., Grollman A.P. Substrate specificity and reaction mechanism of murine 8-oxoguanine-DNA glycosylase // *J Biol Chem.* – 2000. – V. 275. – P. 28607-28617.
265. Müller T.A., Tobar M.A., Perian M.N., Hausinger R.P. Biochemical characterization of AP lyase and m6A demethylase activities of human AlkB homolog 1 (ALKBH1) // *Biochemistry.* – 2017. – V. 56. - P. 1899-1910.
266. Takahashi K. The reaction of phenylglyoxal with arginine residues in proteins // *J. Biol. Chem.* – 1968. – V. 243. – P. 6171-6179.
267. Tyugashev T.E., Vorobjev Y.N., Kuznetsova A.A., Lukina M.V., Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. Roles of active-site amino acid residues in specific recognition of DNA lesions by human 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1) // *J. Phys. Chem. B.* – 2019. – V. 123. – P. 4878-4887.
268. Bjoras M., Seeberg E., Luna L., Pearl L.H., Barrett T.E. Reciprocal "flipping" underlies substrate recognition and catalytic activation by the human 8-oxo-guanine DNA glycosylase // *J. Mol. Biol.* – 2002. – V. 317. – P. 171-177.
269. Holzer S., Ban N., Klinge S. Crystal Structure of the Yeast Ribosomal Protein Rps3 in Complex with its Chaperone Yar1 // *J. Mol. Biol.* – 2013. – V. 425. – P. 4154-4160.
270. 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.
271. Budkevich T.V., Giesebrecht J., Behrmann E., Loerke J., Ramrath D.J., Mielke T., Ismer J., Hildebrand P.W., Tung C.S., Nierhaus K.H., Sanbonmatsu K.Y., Spahn C.M.

- Regulation of the mammalian elongation cycle by subunit rolling: a eukaryotic-specific ribosome rearrangement // *Cell*. – 2014. – V. 158. – P. 121-131.
272. Schmidt C., Kowalinski E., Shanmuganathan V., Defenouillère Q., Braunger K., Heuer A., Pech M., Namane A., Berninghausen O., Fromont-Racine M., Jacquier A., Conti E., Becker T., Beckmann R. The cryo-EM structure of a ribosome-Ski2-Ski3-Ski8 helicase complex // *Science*. – 2016. – V. 354. – P. 1431-1433.
273. Graille M., Séraphin B. Surveillance pathways rescuing eukaryotic ribosomes lost in translation // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2012. – V. 13. – P. 727-735.
274. Kervestin S., Jacobson A. NMD: a multifaceted response to premature translational termination // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2012. – V. 13. – P. 700-712.
275. Shoemaker C.J., Green R. Translation drives mRNA quality control // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2015. – V. 19. – P. 594-601.
276. Kossinova O., Malygin A., Krol A., Karpova G. A novel insight into the mechanism of mammalian selenoprotein synthesis // *RNA*. – 2013. – V. 19. – P. 1147-1158.
277. Bulygin K., Malygin A., Gopanenko A., Graifer D., Karpova G. The functional role of the C-terminal tail of the human ribosomal protein uS19 // *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* – 2020. – V. 1863. – P. 194490-194498.
278. Anthony D.D., Merrick W.C. Analysis of 40S and 80S complexes with mRNA as measured by sucrose density gradients and primer extension inhibition // *J. Biol. Chem.* – 1992. – V. 267. – P. 1554-1562.
279. Agirrezabala X., Frank J. Elongation in translation as a dynamic interaction among the ribosome, tRNA, and elongation factors EF-G and EF-Tu // *Q. Rev. Biophys.* – 2009. – V. 42. – P. 159-200.
280. Malygin A.A., Krumkacheva O.A., Graifer D.M., Timofeev I.O., Ochkasova A.S., Meschaninova M.I., Venyaminova A.G., Fedin M.V., Bowman M., Karpova G.G., Bagryanskaya E.G. Exploring the interactions of short RNAs with the human 40S ribosomal subunit near the mRNA entry site by EPR spectroscopy // *Nucleic Acids Res.* – 2019. – V. 47. – P. 11850-11860.
281. Tanaka M., Chock P.B., Stadtman E.R. (2007) Oxidized messenger RNA induces translation errors // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2007. – V. 104. – P. 66-71.