

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ
БИОЛОГИИ имени А.Н. БЕЛОЗЕРСКОГО

На правах рукописи

МАКЕЕВА ДЕСИСЛАВА СТАНИМИРОВНА

**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ТРАНСЛЯЦИОННЫХ
ФАКТОРОВ eIF2D/TMA64, MCT-1/TMA20 и DENR/TMA22**

03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2019

Работа выполнена в Лаборатории регуляции синтеза белка отдела химии и биохимии нуклеопротеидов НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского ФГБОУ высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ

Дмитриев Сергей Евгеньевич, кандидат биологических наук;

Шатский Иван Николаевич, доктор химических наук.

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ

Гарбер Мария Борисовна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник Лаборатории структурных исследований аппарата трансляции Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт белка Российской академии наук;

Каменский Пётр Андреевич, доктор биологических наук, профессор кафедры молекулярной биологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»;

Алкалаева Елена Зиновьевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий Лабораторией механизмов и контроля трансляции Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Защита диссертации состоится «24» сентября 2019 г. в 16:00 на заседании диссертационного совета МГУ.03.01 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12, Биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: mgu.03.01.dissovet@gmail.com

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/216396631>.

Автореферат разослан «02» августа 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук



Т.В. Комарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Белок eIF2D, а также гетеродимер белков MCT-1 и DENR (гомологичных N- и C-концевым частям eIF2D, соответственно) являются неканоническими эукариотическими трансляционными факторами, способными обеспечивать ГТФ-независимое связывание тРНК в Р-сайте 40S субъединицы рибосомы. Кроме того, в системе сборки трансляционных комплексов из очищенных компонентов была показана способность этих белков осуществлять разборку пост-терминационного комплекса 40S-мРНК-тРНК. Исследование функций данных факторов затрагивает такие фундаментальные и на данный момент малоизученные клеточные процессы, как реинициация трансляции и рециклинг рибосом. Актуальность изучения MCT-1/DENR и eIF2D также связана с онкогенным потенциалом данных белков и с их вовлечённостью в ряд заболеваний человека и животных.

У дрожжей ортологами факторов eIF2D, MCT-1 и DENR являются белки TMA64, TMA20 и TMA22, соответственно. Однако об их функциях ни *in vitro*, ни *in vivo* до проведения данного исследования ничего не было известно.

Степень разработанности темы

TMA64, TMA20 и TMA22 изначально были обнаружены как белки, ассоциированные с трансляционной машинерией клетки. Параллельно были открыты и охарактеризованы гомологичные им белки eIF2D, MCT-1 и DENR в клетках высших эукариот. Результаты биохимических экспериментов позволяли предположить, то eIF2D и димер MCT-1/DENR функционально заменяемы и работают как неканонические факторы доставки тРНК в Р-сайт рибосомы, однако конкретная роль этих факторов в клетке оставалось неясной. Также ничего не было известно о механизмах регуляции их экспрессии.

В 2014 году было показано, что гомологи MCT-1, DENR и eIF2D у дрозофилы задействованы в трансляции некоторых мРНК, содержащих короткие открытые рамки считывания (uORF) в 5' нетранслируемых областях (5'-НТО), что позволило сделать предположение о некой роли этих белков в реинициации трансляции, однако чёткого представления об их функциях получено не было.

Цели и задачи работы

Целью данной работы было изучение функциональных особенностей белков eIF2D, MCT-1 и DENR и их дрожжевых ортологов TMA64, TMA20 и TMA22 в клетках дрожжей *S.cerevisiae* и в бесклеточной дрожжевой системе, а также регуляции трансляции мРНК eIF2D человека. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

- 1) Выявить изменения в экспрессии генов на уровне транскрипции и трансляции, вызванные делецией генов *TMA64* и *TMA20*, а также двойными делециями *TMA64/TMA20* и *TMA64/TMA22*, в клетках дрожжей методами

- высокопроизводительного секвенирования транскриптома («RNA-Seq») и транслятома (рибосомный профайлинг, или «Ribo-Seq»);
- 2) Проанализировать влияние отсутствия данных белков на эффективность трансляции репортерных мРНК с различными 5'-НТО в системе трансляции *in vitro* на основе клеточных экстрактов дрожжей;
 - 3) Определить локализацию белков в клетках млекопитающих в норме и в условиях жёсткого окислительного стресса, приводящего к образованию стресс-гранул;
 - 4) Определить вклад uORF в 5'-НТО мРНК eIF2D человека в эффективность её трансляции в норме и при клеточном стрессе.

Научная новизна и практическая значимость работы

Основные результаты диссертации не имеют аналогов в мировой литературе и указывают на участие факторов eIF2D (TMA64) и TMA20/TMA22 (MCT-1/DENR) в рециклинге рибосом и реинициации трансляции. Так, были получены и проанализированы данные рибосомного профайлинга штаммов дрожжей, в которых отсутствуют гены *TMA64*, *TMA20* или одновременно *TMA64/TMA20*, *TMA64/TMA22*. Анализ данных рибосомного профайлинга выявил изменения трансляции ряда транскриптов в нокаутных штаммах дрожжей, а также увеличенный сигнал на метагеномном профиле, свидетельствующий о проблемах с освобождением 40S субъединицы со стоп-кодона мРНК. Впервые было показано, что факторы TMA20/TMA22 (MCT-1/DENR) и TMA64 (eIF2D) подавляют инициацию трансляции основной рамки в мРНК, содержащих uORF в 5'-НТО. Было продемонстрировано, что опосредованное ими подавление реинициации трансляции после прочтения uORF зависит от длины и расположения uORF и что это подавление сохраняется в случае, когда в роли uORF выступает длинная рамка, кодирующая полноразмерный белок. На основании полученных данных предложен механизм работы трансляционных факторов eIF2D (TMA64) и MCT-1/DENR (TMA20/TMA22).

Во второй части работы было показано, что в условиях арсенитного стресса eIF2D, MCT-1 и DENR локализуются в клеточных стресс-гранулах. Кроме того, показан механизм регуляции экспрессии фактора eIF2D на уровне трансляции в условиях осмотического стресса.

В совокупности полученные данные вносят важный вклад в раскрытие роли трансляционных факторов eIF2D (TMA64) и MCT-1/DENR (TMA20/TMA22) в клетке.

Положения, выносимые на защиту

- 1) Одновременное отсутствие факторов TMA64 и TMA20, TMA64 и TMA22 в клетках дрожжей затрудняет освобождение 40S субъединиц со стоп-кодонов мРНК и приводит к изменению трансляции кодирующих рамок в некоторых клеточных мРНК (включая рамку MATa2-2 в мРНК *MATa2* и четыре uORF в мРНК *GCN4*).

- 2) Одновременное отсутствие факторов TMA64 и TMA20, TMA64 и TMA22 в дрожжевой системе трансляции *in vitro* приводит к повышенной частоте реинициации на основной рамке в репортерных мРНК, содержащих uORF; этот эффект зависит от длины uORF, удаленности от основной рамки считывания и длины перекрывания с основной ORF и может быть устранён добавлением рекомбинантных белков – гетеродимеров TMA20/TMA22 или MCT-1/DENR, а также нативным белком eIF2D.
- 3) Замена гена *TMA64* на стандартную кассету канамициновой устойчивости смещает старт транскрипции соседнего гена *APC4*, результатом чего является драматическое снижение эффективности трансляции его мРНК.
- 4) В условиях окислительного стресса, индуцированного арсенитом натрия, в культивируемых клетках млекопитающих происходит релокализация факторов eIF2D, MCT-1 и DENR в цитоплазматические стресс-гранулы.
- 5) Наличие uORF в мРНК *eIF2D* является причиной драматического снижения трансляции eIF2D в условиях осмотического стресса.

Методология и методы исследования

Работа выполнена с использованием современных методов молекулярной и клеточной биологии. Полногеномный анализ трансляции в клетках дрожжей проводили с помощью метода рибосомного профайлинга. Для создания репортерных мРНК использовали базовые молекулярно-генетические подходы: генно-инженерные методы, ПЦР, *in vitro* транскрипцию и кэпирование мРНК.

Трансляцию репортерных мРНК проводили в бесклеточной системе, полученной из цитоплазматических экстрактов клеток дрожжей, или *in vivo* в культуре клеток млекопитающих с помощью метода краткосрочной мРНК-трансфекции (FLERT).

Анализ локализации белков в клетках млекопитающих проводили с помощью иммуноцитохимического окрашивания клеток.

Личный вклад соискателя

Личный вклад соискателя состоит в анализе литературных данных, планировании и проведении экспериментов, обработке полученных экспериментальных данных, анализе результатов и подготовке публикаций. Биоинформатическая обработка данных рибосомного профайлинга проводилась в сотрудничестве с И. Кулаковским (ИМБ РАН).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов подтверждается их воспроизводимостью в нескольких повторных экспериментах, в том числе с использованием биологических реплик, наличием положительных и отрицательных контролей.

Диссертация апробирована на семинаре отдела химии и биохимии нуклеопротеидов Научно-исследовательского института Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Результаты работы были представлены на симпозиуме "Physiology & Dynamics of Cellular Microcompartments", Оснабрюк, Германия, 14-15 июля 2016 г., конференции "Translation Machinery in Health & Disease. Decoding Translation for Homeostasis", Галвестон, США, 19-24 марта 2017 г., VIII Российском симпозиуме "Белки и пептиды", Москва, Россия, 18-22 сентября 2017 г..

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в международных рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК РФ.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 105 страницах и включает следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и их обсуждение, Заключение, Выводы, Список цитируемой литературы, Приложение. Диссертация включает 23 рисунка и 12 таблиц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1 Рибосомный профайлинг дрожжевых штаммов

Исходя из того, что в экспериментах по реконструкции трансляционных комплексов в системе *in vitro* eIF2D и димер МСТ-1/DENR были способны стабилизировать тРНК в Р-сайте рибосомы и, как минимум в случае некоторых модельных транскриптов, могли играть роль неканонических факторов инициации трансляции, мы предположили, что эти белки участвуют в трансляции каких-то неизвестных на данный момент клеточных мРНК, и их отсутствие в клетке будет приводить к изменению трансляционной активности этих мРНК. Поэтому на первом этапе работы был сделан рибосомный профайлинг дрожжевых штаммов, в которых отсутствовали гены *TMA64* и *TMA20*, кодирующие ортологи белков eIF2D и МСТ-1 у млекопитающих (*Δtma64* и *Δtma20*, соответственно). Поскольку анализ баз данных о генетических взаимодействиях в дрожжах указывал на то, что белки *TMA64* и *TMA20* частично взаимозаменяемы или задействованы в параллельных клеточных процессах, было решено также использовать линию дрожжей, в которой оба гена были заменены на кассеты устойчивости к антибиотикам (*Δtma64Δtma20*), а также линию *Δtma64Δtma22*. Мы надеялись, что одновременный нокаут по двум генам с частично перекрывающимися функциями приведет к полной блокировке гипотетических путей, в которых участвуют их продукты.

Мы сделали рибосомный профайлинг 4 дрожжевых линий: ВУ4741 дикого типа (*wt*); ВУ4741, нокаутных по *TMA64* (*Δtma64*) или по *TMA20* (*Δtma20*); а также линии, нокаутной сразу по двум генам, *TMA64* и *TMA20* (*Δtma64Δtma20*). В таблице 1

приведена информация о данных, полученных в результате секвенирования транслятомов и транскриптомов всех образцов.

Данные были опубликованы в репозитории NCBI Gene Expression Omnibus (GEO accession: GSE122039, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE122039>).

Таблица 1. Наборы данных, полученных в результате высокопроизводительного секвенирования кДНК-библиотек.

кДНК библиотека	Название	Название штамма	Генотип штамма	Среда	Тип библиотеки
1	wt1_ribo			YPD	Ribo-Seq
2	wt1_rna			YPD	RNA-Seq
3	wt2_ribo	<i>wt</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δo met15Δo ura3Δo</i>	YPD	Ribo-Seq
4	wt2_rna			YPD	RNA-Seq
5	wt_sd_ribo			SD	Ribo-Seq
6	wt_sd_rna			SD	RNA-Seq
7	tma20_ribo	<i>Δtma20</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δo met15Δo ura3Δo tma20Δ::KanMX4</i>	YPD	RiboSeq
8	tma20_rna			YPD	RNA-Seq
9	tma20_sd_ribo			SD	Ribo-Seq
10	tma20_sd_rna			SD	RNA-Seq
11	tma64_ribo	<i>Δtma64</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δo met15Δo ura3Δo tma64Δ::KanMX4</i>	YPD	Ribo-Seq
12	tma64_rna			YPD	RNA-Seq
13	tma64_sd_ribo			SD	Ribo-Seq
14	tma64_sd_rna			SD	RNA-Seq
15	tma20tma64_ribo	<i>Δtma64Δtma20</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δo met15Δo ura3Δo tma64Δ::HygMX4 tma20Δ::KanMX4</i>	YPD	Ribo-Seq
16	tma20tma64_rna			YPD	RNA-Seq
17	tma20tma64_sd_ribo			SD	Ribo-Seq
18	tma20tma64_sd_rna			SD	RNA-Seq

2 Анализ рибосомного профайлинга штаммов дрожжей, нокаутных по генам *TMA20* и *TMA64*

Данные секвенирования библиотек кДНК, полученные в результате выделения фрагментов мРНК, защищенных рибосомой (Ribo-Seq) или тотальной мРНК дрожжей (RNA-seq) были обработаны и картированы на геном *Saccharomyces cerevisiae*. Затем картированные на геном данные RNA-Seq и Ribo-Seq были проанализированы на наличие дифференциального покрытия ридами между образцами, полученными из дрожжевых клеток дикого типа и нокаутных линий.

2.1 Нокаут гена *TMA64* приводит к изменению в транскрипции и трансляции гена *APC4*

Как оказалось, в клетках, содержащих нокаут по гену *TMA64* (штаммы *Δtma64* и *Δtma64Δtma20*), наиболее сильное трансляционное подавление наблюдалось для мРНК *APC4*. В этих клетках, трансляция данной мРНК была снижена более чем в три раза по сравнению с клетками дрожжей, в которых ген *TMA64* затронут не был

(штаммы *wt* и $\Delta tma20$), вне зависимости от того, на какой среде росли клетки – богатой (YPD) или минимальной (SD) (Рис. 1).

Распределение ридов по последовательности в области генов *TMA64* и *APC4* также оказалось сильно измененно: в данных RNA-Seq для штаммов, нокаутных по *TMA64*, наблюдается появление дополнительной плотности ридов, отражающей смещение старта транскрипции в 5'-сторону (появление удлиненной с 5'-конца версии мРНК *APC4*).

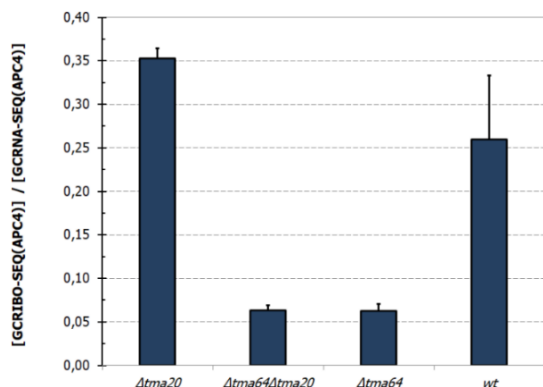


Рис. 1. Значения покрытия рибосомами (RO) мРНК *APC4* в разных штаммах по данным рибосомного профайлинга. В качестве биологических реплик использовались эксперименты с выращиванием клеток дрожжей в разных средах.

В геноме дрожжей ген *APC4* располагается на хромосоме в непосредственной близости от гена *TMA64*. Они закодированы в противоположных цепях ДНК на расстоянии всего 238 пар нуклеотидов и, по-видимому, имеют общую промоторную область. В геномах дрожжей, нокаутных по *TMA64* ($\Delta tma64$ и $\Delta tma64\Delta tma20$), кодирующая часть *TMA64*, заменена на стандартные генетические кассеты, экспрессирующие гены устойчивости к антибиотикам G418 или гигромицину (KanMX или HygMX, соответственно). В результате в обоих случаях поблизости от начала гена *APC4* оказывается мощный конститутивный промотор P_{TEF1} , используемый в кассетах. По-видимому, это соседство так изменяет активность всего геномного локуса, что старт транскрипции гена *APC4* смещается в 5'-сторону. При этом в состав транскрипта случайно попадают AUG-триплеты, которые становятся стартовыми кодонами новых uORF, отсутствующих в канонической, более короткой версии мРНК *APC4*. В случае штаммов $\Delta tma64$ и $\Delta tma64\Delta tma20$ области этих коротких рамок считывания покрыты рибосомными футпринтами, что говорит об их трансляции (Рис. 2). В диком типе такого покрытия не наблюдается. Очевидно, появление uORF и приводит к наблюдаемому падению уровня трансляции основной рамки считывания, кодирующей *APC4*.

Ген *APC4* кодирует субъединицу циклосомы APC/C – убиквитин-лигазы, регулирующей переход клеточного цикла от анафазы к метафазе. Любопытно, что полногеномный анализ генетических взаимодействий, проводившийся с использованием аналогичных нокаутных штаммов, показал наиболее сильные связи *TMA64* именно с генами контроля клеточного цикла, в первую очередь – с генами других субъединиц циклосомы. Наши данные позволили выявить причину этих генетических взаимодействий и наглядно показать, что они связаны вовсе не с

отсутствием белка ТМА64 в соответствующих нокаутных штаммах, а с нарушением синтеза АРС4 в результате изменения транскрипции и трансляции его мРНК под влиянием соседствующей генетической кассеты.

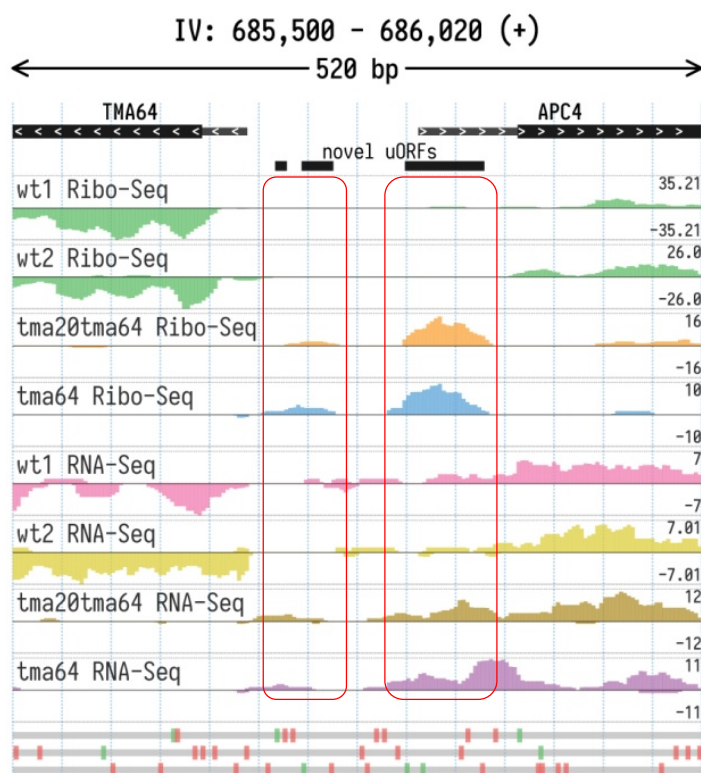


Рис. 2. Покрытие 5'-концевых частей генов *TMA64* и *APC4*, а также межгенного спейсера ридами RNA-Seq и Ribo-Seq. Черным цветом обозначены транслируемые открытые рамки считывания, серым – 5'-НТО мРНК *TMA64* и *APC4*, стрелки указывают направление прочтения мРНК рибосомой. Положительные и отрицательные значения Ribo-Seq или RNA-Seq покрытия соответствуют покрытию плюс или минус цепи в штаммах дрожжей, нокаутных по *TMA64* (синий, фиолетовый), *TMA64* и *TMA20* (оранжевый, коричневый), и в штамме wt (зеленый, розовый). Красным обозначены области с дифференциальным покрытием. В нижней части обозначены старт-кодоны (зеленый) и стоп-кодоны (красный), закодированные на плюс цепи в трех рамках считывания. Изображение получено с помощью программы svist4get:

(<https://bitbucket.org/artegorov/svist4get/>).

2.3 Нокаут генов *TMA20* и *TMA64* приводит к изменению в экспрессии генов *MAT*-локуса

У гаплоидных клеток *S. cerevisiae* существует два разных типа спаривания, **a** и **α**, между которыми возможно переключение в ходе жизненного цикла клетки путем генетической рекомбинации. Принадлежность к тому или иному типу спаривания определяется единственным локусом *MAT*, который регулирует наличие признаков, характерных для каждого типа спаривания. В результате конверсии генов в локусе *MAT* может оказаться либо генетическая кассета *MATa*, определяющая тип спаривания **a**, либо кассета *MATα*, специфичная для клеток типа **α**. Кассеты *MATa* и *MATα* имеют схожее строение и кодируют два транскрипта с общей промоторной областью на противоположных цепях ДНК: транскрипты *MATa1* и *MATa2* закодированы в последовательности *MAT*-локуса клеток типа **a**, *MATa1* и *MATa2* – в *MAT*-локусе **α** дрожжей. Продукты всех транскриптов, кроме *MATa2*, являются функциональными транскрипционными факторами, определяющими соответствующий тип спаривания или специфичный фенотип в диплоидных клетках. На данный момент считается, что продукт транскрипта *MATa2* не несет никакой функции в клетке. Транскрипт *MATa2* содержит две последовательные открытые рамки считывания, вторая из которых кодирует консервативный полипептид, гомологичный С-концевому ДНК-

связывающему участку белка МАТ α 2. Вполне возможно, что этот гипотетический белок (МАТ α 2-2) способен конкурировать с МАТ α 2 за связывание с ДНК или даже обладает собственной транскрипционной активностью. Однако в обычном случае синтез этого полипептида подавлен в связи с наличием первой открытой рамки считывания, располагающейся перед рамкой МАТ α 2-2.

Дрожжевой штамм ВУ4741 (wt) и нокаутные линии, полученные на базе ВУ4741, являются штаммами с типом спаривания **a**, однако в базе данных Ensembl представлен аннотированный геном только линии *S.cerevisiae* S288c с **α** -типом спаривания, на который мы картировали наши данные рибосомного профайлинга. Поэтому данные секвенирования были отдельно прокартированы на последовательность МАТ α -локуса, представленную в базе данных GenBank. Результаты картирования представлены на Рис. 3А. Распределение ридов RNA-Seq не отличается в различных штаммах, так же как и распределение рибосомных футпринтов в области транскрипта МАТ α 1. А вот плотность покрытия футпринтами рибосом на рамке МАТ α 2-2 увеличена в штаммах $\Delta tma20$ и $\Delta tma64\Delta tma20$ (Рис. 3А).

Мы предполагаем, что в клетках штаммов $\Delta tma20$ и $\Delta tma64\Delta tma20$ (возможно, в $\Delta tma64$ тоже, но с меньшей эффективностью) после прочтения короткой рамки МАТ α 2 рибосома способна с высокой эффективностью реинициировать на следующей за ней (частично перекрывающейся) рамке МАТ α 2-2, что приводит к появлению в клетке белка МАТ α 2-2. Нельзя исключать, что такая дерегуляция экспрессии МАТ-локуса может объяснять ранее описанное нарушение споруляции штамма, нокаутного по гену ТМА64.

2.4 Нокаут генов ТМА20 и ТМА64 приводит к изменениям в трансляции коротких открытых рамок считывания в 5'-НТО мРНК GCN4

Еще один случай отличия трансляции в нокаутных клетках по сравнению со штаммом дикого типа, который мы увидели в результате анализа данных рибосомного профайлинга, касается трансляции коротких открытых рамок считывания в 5'-НТО мРНК глобального транскрипционного регулятора GCN4.

мРНК GCN4 содержит 4 транслируемые короткие открытые рамки считывания в 5'-НТО перед основной рамкой. Регуляция синтеза белка GCN4 основана на изменении трансляции этих рамок считывания в условиях аминокислотного голодания. Мы обнаружили, что при одновременном отсутствии ТМА20 и ТМА64 в клетке распределение ридов рибосомного профайлинга по 5'-НТО этой мРНК значительно изменяется. На рис. 3Б представлено покрытие 5'-концевой части мРНК GCN4 ридами RNA-Seq и Ribo-Seq в разных штаммах. В wt-клетках плотность ридов соответствует каноническому представлению о регуляции трансляции генов данными uORF: наибольшая плотность наблюдается на первой рамке считывания (uORF1), затем на последующих рамках видна значительно более низкая плотность рибосом. Это

соответствует ситуации, когда сканирующая 40S субъединица инициирует на первом от 5'-конца стартовом кодоне, после чего происходит трансляция этой короткой рамки считывания с последующей терминацией и рециклингом рибосомы. В случае штамма дрожжей $\Delta tma64\Delta tma20$ мы увидели сильное увеличение покрытия второй, третьей и четвертой uORF, а также основной кодирующей части GCN4. Это может указывать на повышенную частоту реинициации трансляции 40S субъединицами, закончившими читать uORF1. Аналогичный, хотя и менее яркий эффект наблюдался в случае остальных мутантных штаммов.

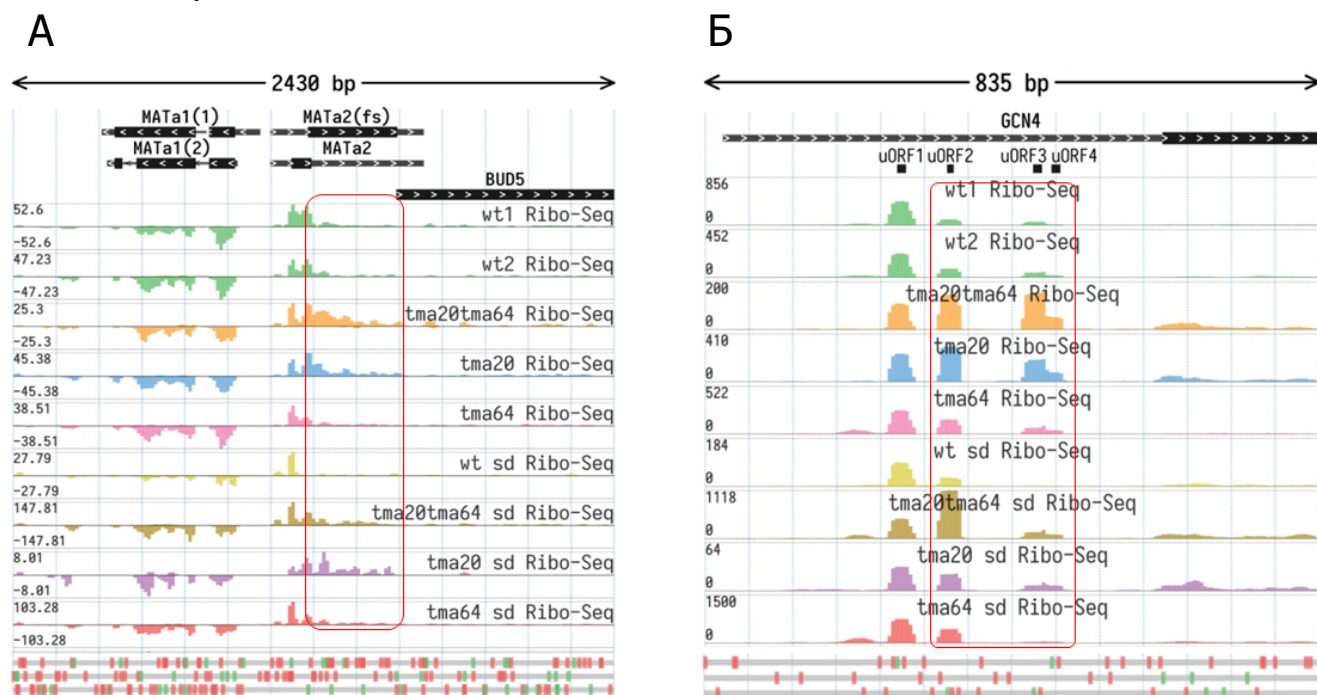


Рис. 3. **А** – Увеличение плотности покрытия второй рамки считывания транскрипта MATa2 (MATa2-2, обозначена как MAT2 (fs) в Ribo-Seq данных штаммов $\Delta tma20$ и $\Delta tma64\Delta tma20$. **Б** – Изменение плотности покрытия Ribo-Seq ридами 4 коротких OPC (uORF1, uORF2, uORF3, uORF4) в 5'-НТО гена GCN4. Черным цветом обозначены транслируемые открытые рамки считывания, серым – 5'- и 3'-НТО мРНК транскриптов, стрелки указывают направление прочтения мРНК рибосомой. Положительные и отрицательные значения Ribo-Seq покрытия соответствуют покрытию плюс или минус цепи в штаммах дрожжей, выращенных в разных средах. Представлены данные для штаммов дрожжей, выращенных в среде YPD или минимальной среде SD, нокаутных по TMA64 (розовый, красный), TMA20 (синий, фиолетовый), TMA64 и TMA20 (оранжевый, коричневый), и для штамма дикого типа (зеленый, желтый). В нижней части обозначены старт-кодоны (зеленый) и стоп-кодоны (красный), закодированные на плюс цепи в трех рамках считывания. Изображение получено с помощью программы svist4get (<https://bitbucket.org/artegorov/svist4get/>). Красным обозначены области с дифференциальным покрытием ридами Ribo-Seq.

3 TMA20/TMA22 (MCT-1/DENR) и TMA64 (eIF2D) подавляют реинициацию трансляции *in vitro*

В рамках этой работы нашими коллегами из лабораторий Николаса Гайдоша и Алана Хиннебуша (НИН, Бетесда, США) был сделан рибосомный профайлинг штамма дрожжей $\Delta tma64\Delta tma20$ по протоколу, немного отличавшемуся от нашего: при подготовке лизата клеток циклогексимид добавляли не в среду, а позже – на стадии

лизиса клеток. В полученных ими данных рибосомного профайлинга нокаутного штамма на метагеномном профиле в области перед стоп-кодом (на расстоянии ~30 нуклеотидов от пика, соответствующего месту локализации терминирующей рибосомы) наблюдался пик покрытия (Рис. 4). Такого пика плотности не было в клетках дикого типа. Пик же в области остановки терминирующей рибосомы, который наблюдался у дикого типа, напротив, отсутствовал в нокаутных клетках. Такая ситуация возможна, если в клетках $\Delta tma64\Delta tma20$ пост-терминационная рибосома успешно проходит первую стадию рециклинга – разъединение рибосомных субъединиц, но дальнейшей разборки комплекса 40S с мРНК не происходит.

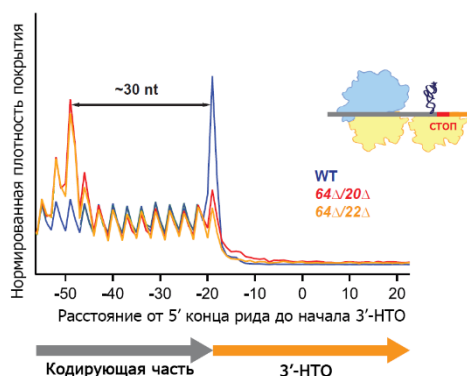


Рис. 4. Нормированная плотность покрытия рибосомами в области стоп-кодона всех генов, последовательности которых были выровнены по стоп-кодону. Показаны метагеномные профили для штаммов, нокаутных по *TMA64* и *TMA20* (красная кривая), *TMA64* и *TMA22* (желтая кривая) и штамма дикого типа (синяя кривая).

Мы предположили, что отсутствие факторов *TMA20* и *TMA64* приводит к неэффективному рециклингу 40S субъединицы, в результате чего она остаётся на мРНК, может заново связать факторы инициации трансляции и продолжить сканирование мРНК. В этом случае может происходить эффективная реинициация трансляции после прочтения uORF, как, например, в случае трансляции uORF2, 3 и 4 после прочтения uORF1 мРНК GCN4 или рамки MATa2-2 мРНК, закодированной в *MATa*-локусе.

Чтобы проверить предположение о том, что изучаемые нами факторы подавляют реинициацию трансляции после uORF, мы подготовили трансляционные системы из цитоплазматических экстрактов клеток дрожжей дикого типа и нокаутных штаммов, у которых одновременно отсутствовали гены *TMA64* и *TMA20* ($\Delta tma64\Delta tma20$) или *TMA64* и *TMA22* ($\Delta tma64\Delta tma22$).

Затем мы сделали набор репортерных мРНК-конструкций, содержащих различные 5'-НТО и ген люциферазы светлячка (*Fluc*) в основной рамке считывания для *in vitro* трансляции в полученных бесклеточных системах. При трансляции в реакционную смесь добавляли субстрат для люциферазы (люциферин) и измеряли интенсивность люминесценции, которая отражала эффективность трансляции основной рамки считывания.

3.1 Отсутствие факторов TMA64 (eIF2D) и TMA20 (MCT-1) специфически усиливает трансляцию мРНК с uORF

На первом этапе работы мы решили посмотреть, как наличие и расположение uORF будет влиять на трансляцию репортерной мРНК в трансляционных лизатах нокаутных штаммов. Для этого были подготовлены репортерные мРНК, в которых содержалась uORF длиной в 5 а.о. с различным расположением относительно основной рамки считывания, кодирующей *Fluc*: на расстоянии 30 н.о. от её начала (uORF3luc), 5 н.о. (uORF2luc) или с перекрыванием стоп-кодона uORF и старт-кодона *Fluc* в 1 нуклеотид (uORF1luc) (Рис. 5B). Во всех репортерных конструкциях кодирующая часть *Fluc* и uORF находятся в разных рамках считывания – таким образом, мы исключили вероятность того, что наблюдаемая люминесценция является результатом ошибки терминации после uORF и образования слитого продукта люциферазы с uORF. Значения эффективности трансляции мРНК с uORF здесь и далее нормировали на эффективность трансляции контрольной мРНК, не содержащей uORF (no_uORFluc).

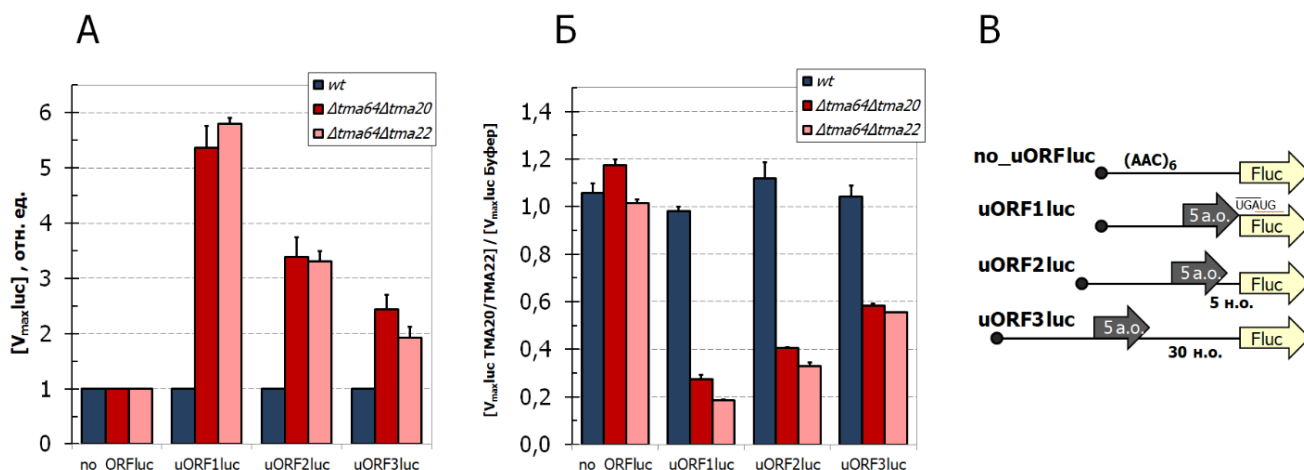


Рис. 5. Влияние наличия uORF и её расположения относительно основной кодирующей части на эффективность реинициации при отсутствии TMA20/TMA22. мРНК, содержащие uORF (ORF1luc, uORF2luc, uORF3luc), или контрольную мРНК без uORF (no_uORF) транслировали в бесклеточных системах, полученных из клеток дрожжей дикого типа (*wt*), нокаутных по TMA64 и TMA20 ($\Delta tma64\Delta tma20$) или нокаутных по TMA64 и TMA22 ($\Delta tma64\Delta tma22$). **А** – Отсутствие факторов TMA64/TMA20 и TMA64/TMA22 приводит к увеличению эффективности трансляции мРНК с uORF. Значения максимальной скорости накопления активной люциферазы (максимальную скорость трансляции) нормировали на значения, полученные для контрольной мРНК. **Б** – Добавление димера TMA20/TMA22 приводит к обратному подавлению трансляции uORF-содержащих мРНК в клеточных экстрактах из нокаутных клеток. Показаны значения максимальной скорости трансляции мРНК при добавлении в реакцию смесь димера TMA20/TMA22 (0.01 мкг/мкл), нормированные на значения, полученные для реакции с добавлением буфера. **В** – Схематичное изображение репортерных мРНК. Серыми стрелками обозначено расположение uORF в последовательности мРНК, относительно основной рамки, кодирующей люциферазу (*Fluc*, желтая стрелка).

В трансляционных лизатах $\Delta tma64\Delta tma20$ и $\Delta tma64\Delta tma22$ наблюдалось увеличение эффективности трансляции мРНК с uORF по сравнению с лизатом *wt*. При этом с увеличением расстояния между uORF и основной рамкой эффект снижался, однако даже в случае самого дальнего расположения, когда стоп-кодон uORF

находился на расстоянии 30 н.о. от старт-кодона *Fluc*, мРНК транслировалась в лизатах из нокаутных клеток в два раза лучше, чем в лизатах из клеток дикого типа. В случае uORF₁*luc*, когда стоп-кодон uORF перекрывался с последовательностью стартового кодона *Fluc* (последовательность стыка рамок была в виде UGAUG) отсутствие факторов сказывалось наиболее сильно: эффективность трансляции такой мРНК в лизате из нокаутных клеток была увеличена более чем в 5 раз.

Чтобы показать, что усиление трансляции обусловлено именно отсутствием факторов TMA₂₀/TMA₂₂ и TMA₆₄, в реакционную смесь добавляли рекомбинантный димер TMA₂₀/TMA₂₂. В результате добавления TMA₂₀/TMA₂₂ (0.01 мкг/мкл) происходило обратное подавление трансляции uORF-содержащих мРНК в лизатах *Δtma64Δtma20* и *Δtma64Δtma22* и практически не изменялась трансляция таких мРНК в лизате *wt* (Рис. 5Б). То есть добавление димера возвращало уровень трансляции мРНК к таковому в лизате *wt*, тем самым подтверждая зависимость наблюдаемых эффектов от специфического действия белков.

3.2 Эффект не является результатом проявления «leaky scanning» или рибосомного слайдинга

Узнавание стартового кодона рамки располагающегося после uORF может происходить не только в результате реинициации рибосомой после прочтения uORF, но также в случае, если не происходит эффективная инициация трансляции на стартовом кодоне uORF в результате рибосомного слайдинга или механизма “leaky scanning”.

Чтобы убедиться, что в данном случае идет речь именно о реинициации трансляции, мы посмотрели, как влияет увеличение перекрывания последовательности uORF с последовательностью, кодирующей *Fluc*. Если бы работа белков была связана с изменениями в выборе стартового кодона (например, повышала бы вероятность инициации трансляции на стартовом кодоне uORF), это также бы приводило к подавлению трансляции *Fluc* мРНК uORF₁*luc*, uORF₂*luc* и uORF₃*luc*, однако не зависело бы от того, перекрывается uORF с последовательностью *Fluc* или нет.

Как видно из Рис. 6А, эффект от отсутствия TMA₂₀/TMA₂₂ и TMA₆₄ снижался с увеличением перекрывания рамок и фактически полностью отсутствовал при перекрывании рамок на 27 кодонов (uORF₅*luc*). При таком большом перекрывании последовательностей реинициация после прочтения uORF на стартовом кодоне *Fluc* уже невозможна, и единственным способом доставки сканирующего 43S комплекса на старт-кодон люциферазы является «leaky scanning» или рибосомный слайдинг. Добавление рекомбинантного димера TMA₂₀/TMA₂₂ также приводило к меньшему подавлению трансляции мРНК uORF₄*luc* (с перекрыванием с uORF в 6 кодонов) по сравнению с uORF₁*luc*, а трансляция uORF₅*luc* практически не зависела от присутствия TMA₂₀/TMA₂₂ в реакционной смеси (Рис. 6Б).

Мы также решили посмотреть, зависит ли эффект отсутствия ТМА20/ТМА22 и ТМА64 от длины uORF, т.к. считается, что с увеличением длины uORF рибосоме после терминации становится сложнее заново приобрести факторы для инициации на следующей рамке считывания и, соответственно, уровень реинициации снижается. Действительно, эффект изучаемых белков на трансляцию мРНК uORF6luc, в которой uORF имела длину в 15 а.о., был меньше, чем в случае uORF1luc (Рис. 6А,Б).

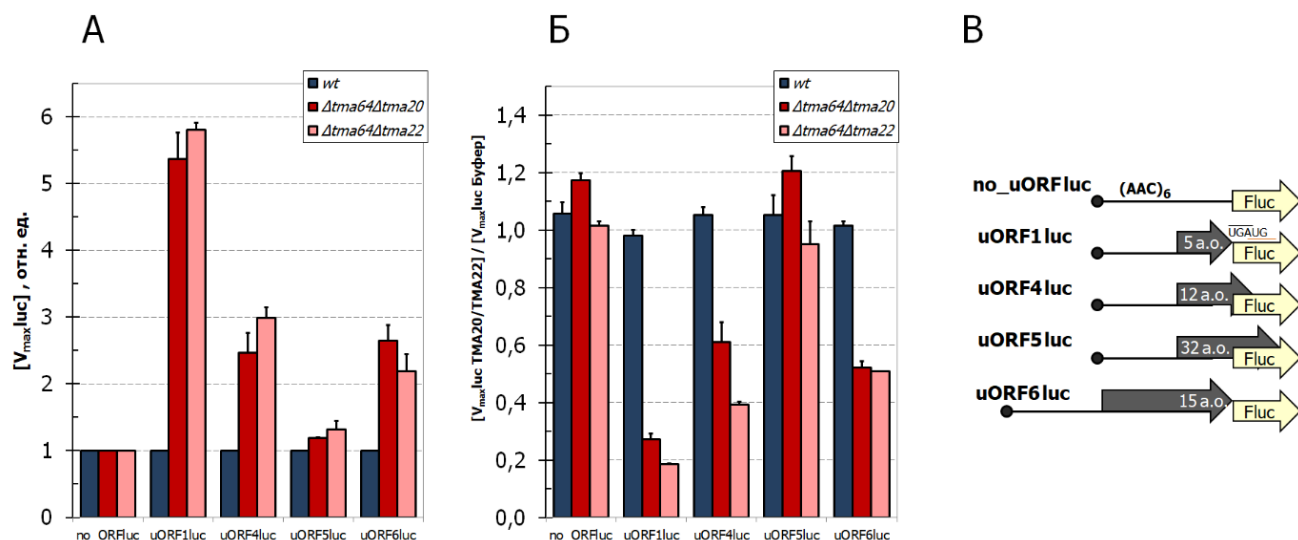


Рис. 6. Эффект отсутствия ТМА20/ТМА22 и ТМА64 снижается при уменьшении уровня реинициации. **А** – Эффект отсутствия ТМА20/ТМА22 и ТМА64 снижается с увеличением длины uORF, а также с увеличением длины перекрытия uORF с основной рамкой. Данные получены в результате трансляции мРНК с uORF с длиной 5 и 15 кодонов (uORF1luc, uORF6luc), а также мРНК с пересечением с основной рамкой считывания в 6, 15 или 27 кодонов (uORF4luc, uORF5luc и uORF6luc, соответственно). Показаны значения максимальной скорости трансляции, нормированные на значения, полученные для контрольной мРНК без uORF (no_uORF). **Б** – Добавление димера ТМА20/ТМА22 убирает эффект отсутствия ТМА64/ТМА20 и ТМА64/ТМА22 в клеточных экстрактах из нокаутных штаммов. Показаны значения максимальной скорости трансляции мРНК при добавлении в реакционную смесь димера ТМА20/ТМА22 (0.01 мкг/мкл), нормированные на значения для реакции с добавлением буфера. **В** – Схематичное изображение репортерных мРНК. Серыми стрелками обозначено расположение uORF, относительно основной рамки, кодирующей люциферазу (Fluc, желтая стрелка) с указанием длины полипептидов, образующихся в результате их прочтения.

Таким образом, тенденция уменьшения влияния от отсутствия белков при снижении общего уровня реинициации трансляции указывает на то, что работа ТМА20/ТМА22 и ТМА64 не связана с изменением уровня трансляции uORF, а влияет исключительно на эффективность реинициации после ее прочтения.

3.3 Отсутствие факторов ТМА20/ТМА22 и ТМА64 приводит к повышенной реинициации после трансляции полноразмерной рамки считывания

Мы также решили проверить, как влияет отсутствие ТМА20/ТМА22 и ТМА64 на трансляцию мРНК с uORF, когда вклад “leaky scanning” и рибосомного слайдинга минимален. Для этого мы посмотрели на трансляцию мРНК, в которых роль uORF играет открытая рамка считывания, кодирующая полноразмерный белок, т.к. в этом

случае рибосома может оказаться на второй рамке только в результате реинициации (ведь в отличие от случая с короткой uORF, здесь первая рамка не может быть преодолена сканирующей рибосомой из-за слишком большого количества AUG-триплетов, с одного из которых она рано или поздно инициирует трансляцию).

Мы сделали репортерные мРНК, кодирующие сразу два белка: люциферазу кораллового полипа *Renilla* (*Rluc*) и люциферазу светлячка (*Fluc*). В бицистронной мРНК RF2 белки были закодированы в разных рамках считывания, перекрывавшихся на 4 нуклеотида; в другой мРНК, RF3, расстояние от стоп-кодона *Rluc* до старта *Fluc* составляло 67 нуклеотидов. В качестве контрольной мРНК использовали третью мРНК, RF1, в которой отсутствовал стоп-кодон *Rluc*, а последовательности люцифераз были закодированы в одной рамке считывания: в результате трансляции этой мРНК образовывался полипептид, состоящий из люцифераз *Rluc* и *Fluc*, соединенных коротким линкером (Рис. 7В).

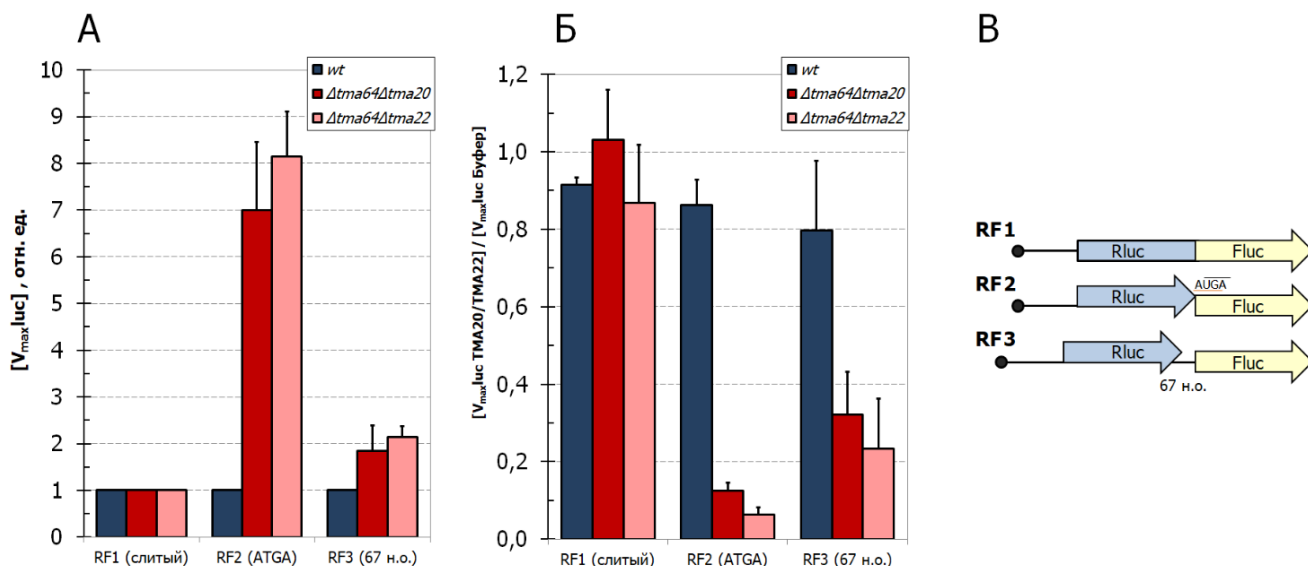


Рис. 7. ТМА20/ТМА22 и ТМА64 подавляют реинициацию после uORF, кодирующей полноразмерный белок. **А** – Отсутствие ТМА64/ТМА20 и ТМА64/ТМА22 в трансляционном экстракте приводит к увеличению реинициации после прочтения *Rluc*. Транслировали мРНК, кодирующие люциферазы *Rluc* (*Renilla*) и *Fluc* (*Firefly*) с перекрыванием кодирующих последовательностей (RF2) или расположенных на расстоянии 67 нуклеотидов (RF3). Максимальную скорость трансляции репортерных мРНК нормировали на значения для контрольной мРНК с одной рамкой считывания, кодирующей слитые белки *Fluc* и *Rluc*. **Б** – Добавление димера ТМА20/ТМА22 (0.01 мкг/мкл) в трансляционные экстракты *Δtma64Δtma20* и *Δtma64Δtma22* приводит к обратному подавлению реинициации, после прочтения *Rluc*. Показаны значения максимальной скорости трансляции *Fluc* при добавлении в реакционную смесь димера ТМА20/ТМА22, нормированные на значения, полученные для реакции с добавлением буфера. **В** – Схематичное изображение репортерных мРНК. Синими стрелками обозначено расположение последовательности *Rluc* относительно основной рамки, кодирующей люциферазу *Fluc* (желтая стрелка).

Как и в случае мРНК с короткими uORF, трансляция мРНК RF2 и RF3 в лизатах из мутантных штаммов дрожжей давала больше продукта второй рамки (*Fluc*) по сравнению с лизатами из штамма *wt*, причём эффект отсутствия факторов снижался при увеличении расстояния между рамками (Рис. 7А,Б). Как и ожидалось, в случае RF2

эффекты отсутствия факторов проявлялись более сильно, чем в описанных выше случаях мРНК с короткими uORF (поскольку при отсутствии вклада рибосомного слайдинга и “leaky scanning” в трансляцию *Fluc* эффекты от изменённой реинициации проявлялись ярче). Однако стоит отметить, что более сильное увеличение эффективности реинициации также может быть объяснено тем, что в случае мРНК RF2 перекрывание рамок выглядело как AUGA и, соответственно, чтобы при реинициации AUG кодон оказался в Р-сайте терминировавшей на стоп-кодоне первой рамки рибосомы, необходимо перемещение мРНК в рибосоме всего на 2 нуклеотида, тогда как в мРНК uORF1_{luc} (где последовательность перекрывания рамок имела вид UGAUG) для реинициации необходимо переместить мРНК на 5 нуклеотидов.

3.4 Белки MCT-1/DENR и eIF2D человека, ортологичные дрожжевым TMA20/TMA22 и TMA64, способны заменять TMA20/TMA22 *in vitro*

В нашем распоряжении также были рекомбинантные человеческие белки MCT-1/DENR и eIF2D, гомологичные факторам TMA20/TMA22 и TMA64, соответственно. Для того чтобы посмотреть, способны ли человеческие гомологи восполнять отсутствие дрожжевых белков в дрожжевой трансляционной системе, мы транслировали мРНК uORF1_{luc} в лизатах из мутантных штаммов с добавлением MCT-1, димера MCT-1/DENR или eIF2D.

Действительно, димер MCT-1/DENR специфично подавлял трансляцию uORF1_{luc} и в системе $\Delta tma64\Delta tma20$, и в $\Delta tma64\Delta tma22$ (Рис. 8А). Аналогично, хотя и с меньшей эффективностью, трансляция uORF1_{luc} была подавлена при добавлении eIF2D. Эффект от добавления димера на трансляцию основной рамки считывания, кодирующей *Fluc*, уменьшался с увеличением перекрывания и расстояния между последовательностями uORF и *Fluc* аналогично тому, как это происходило в случае с дрожжевыми TMA20/TMA22 (Рис. 8Б).

Чтобы проверить, способен ли человеческий MCT-1 работать в паре с TMA22 в составе химерного димера MCT-1/TMA22, мы также проверили, как влияет добавление отдельного MCT-1 на трансляцию uORF1_{luc} в системе $\Delta tma64\Delta tma20$ (в которой отсутствует ортолог MCT-1, TMA20, но присутствует TMA22, ортологичный белку-партнеру DENR). На уровне аминокислотной последовательности дрожжевой TMA20 и человеческий MCT-1 имеют идентичность 48%. Как оказалось, добавление MCT-1 эффективно подавляло трансляцию uORF1_{luc} в этой системе, однако не влияло на трансляцию мРНК в системе $\Delta tma64\Delta tma22$, в которой отсутствует TMA22 (Рис. 8А).

Эти результаты говорят о том, что человеческие MCT-1/DENR (так же как и eIF2D) способны компенсировать отсутствие своих дрожжевых ортологов TMA20/TMA22, а MCT-1 функционален в составе димера с партнером из другого организма, TMA22.

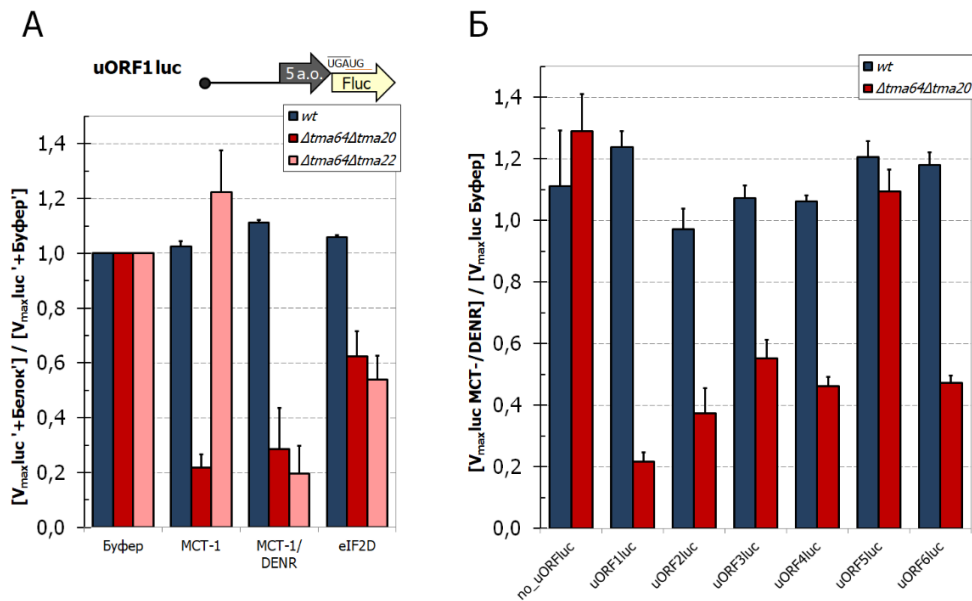


Рис. 8. eIF2D, MCT-1/DENR человека способны заменять TMA20/TMA22 в цитоплазматическом экстракте клеток дрожжей. **А** – Влияние eIF2D, MCT-1 и димера MCT-1/DENR человека на эффективность трансляции мРНК uORF1luc. мРНК uORF1luc транслировали в клеточных экстрактах *wt*, *Δtma64Δtma20* и *Δtma64Δtma22*. В реакционную смесь добавляли белок до конечной концентрации 0.01 мкг/мкл (MCT-1/DENR, eIF2D) или 0.005 мкг/мкл (MCT-1) и непрерывно измеряли накопление люминисценции (скорость трансляции). Максимальную скорость трансляции нормировали на значения, полученные для реакции с добавлением буфера. **Б** – Димер MCT-1/DENR подавляет реинициацию после прочтения uORF в дрожжевом трансляционном экстракте *Δtma64Δtma20*. Набор мРНК, содержащих uORF (uORF1luc-uORF6luc) транслировали в системе *Δtma64Δtma20* с добавлением димера MCT-1/DENR (0.01 мкг/мкл). Максимальную скорость трансляции нормировали на значения, полученные для реакции с добавлением буфера.

3.5 Влияние отсутствия факторов TMA20/TMA22 и TMA64 на реинициацию трансляции мРНК с природными лидерами

Были подготовлены репортерные мРНК, кодирующие люциферазу *Rluc* и содержащие 5'-концевые участки природных дрожжевых мРНК, трансляция которых была увеличена в клетках, нокаутных по TMA20 и TMA64 по данным рибосомного профайлинга. В качестве таких участков были выбраны 5'-НТО из мРНК генов *RMD6* (его продукт участвует в процессах, связанных со споруляцией дрожжей), *SSK22* (кодирует киназу MAPK-каскадного пути) и *MATa2-1* (находится в MATa-локусе, см. выше). Также была подготовлена мРНК MATa2-2, которая состояла из 5'-НТО MATa2 и следующей за ней рамки MAT2-1, присоединённых к *Rluc*.

Трансляция мРНК с 5'-НТО *RMD6*, *SSK22* и *MATa2-2* в *Δtma64Δtma20* системе значительно подавлялась при добавлении димера TMA20/TMA22 или MCT-1 (Рис. 9). Этого не происходило в системе *wt*. Таким образом, изменение трансляции этих мРНК, наблюдавшееся в данных рибосомного профайлинга, действительно было вызвано отсутствием факторов. Из-за того, что 5'-НТО этих мРНК содержат транслируемые uORF, мы предполагаем, что, как и в случае искусственных конструкций uORF1luc и

др., отсутствие TMA20 и TMA64 в клетке приводит к неэффективной разборке комплекса 40S-мРНК-тРНК и в результате – к более высокой реинициации трансляции на основной рамке этих мРНК. При этом работа факторов не связана с первым раундом инициации трансляции, поскольку трансляция мРНК MATa2-1, не содержащей uORF, не зависит от наличия факторов (Рис. 9).

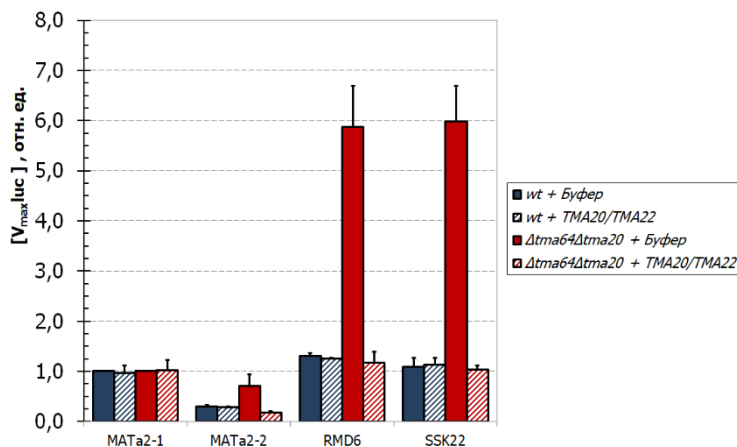


Рис. 9. Отсутствие TMA20/TMA22 и TMA64 приводит к увеличению эффективности трансляции природных мРНК, содержащих uORF. мРНК, содержащие 5'-концевые части транскриптов, кодирующих MATa2-1 (без uORF), MATa2-2 (с uORF, кодирующей MATa2-1), RMD6 и SSK22 транслировали в двух трансляционных системах (*wt*, $\Delta tma64\Delta tma20$) с добавлением димера TMA20/TMA22 (0.01 мкг/мкл) или буфера. Значения максимальной скорости трансляции нормировали на значения, полученные для мРНК MATa2-1, не содержащей uORF, транслируемой в той же трансляционной системе.

В совокупности все вышеприведенные результаты, полученные из данных рибосомного профайлинга и экспериментов по *in vitro* трансляции репортерных мРНК, говорят о работе факторов TMA64 (eIF2D) и TMA20/TMA22 (MCT-1/DENR) на последней стадии рибосомного рециклинга. На основании полученных данных, а также результатов предыдущих экспериментов, можно предложить два возможных (и не взаимоисключающих) пути работы факторов в клетке, блокирование которых приводило бы к нарушению высвобождения терминировавшей 40S субъединицы и подавлению реинициации на стартовом кодоне следующей после uORF рамки считывания.

Один из механизмов может быть следующим: факторы необходимы для высвобождения деацилированной тРНК из Р-сайта 40S субъединицы рибосомы, с последующей диссоциацией 40S с мРНК. В отсутствие eIF2D (TMA64) и MCT-1/DENR (TMA20/TMA22) функцию высвобождения тРНК может взять на себя eIF1, при этом терминировавшая 40S субъединица остается связанной с мРНК, приобретает подвижность и после прихода тройного комплекса eIF2-ГТФ-Мет-тРНК способна реиницировать трансляцию нижерасположенной рамки считывания. Это объясняет увеличение плотности рибосомного покрытия в области стоп-кодона в данных рибосомного профайлинга, увеличение оптической плотности в области, соответствующей по подвижности 40S рибосомным субъединицам на профилях УФ-поглощения, полученных при центрифугировании в градиенте сахарозы, а также увеличение эффективности трансляции мРНК с uORF. Однако эта модель не

объясняет, почему зависимость от присутствия факторов в клетке отличается для мРНК с разным расстоянием между uORF и AUG-кодоном люциферазы (Рис. 5).

Возможно и другое объяснение, согласно которому факторы стабилизируют деацилированную тРНК в Р-сайте терминировавшей 40S субъединицы и своим присутствием блокируют повторную посадку тройного комплекса eIF2-ГТФ-Мет-тРНК, в результате чего не происходит повторной инициации на следующей рамке после uORF. В этом случае, однако, остаётся загадкой, как же всё-таки происходит высвобождение тРНК и диссоциация 40S субъединицы. Точный механизм работы факторов ещё предстоит выяснить в будущем.

4 Белки eIF2D, MCT-1 и DENR релокализируются в стресс-гранулы при окислительном стрессе, индуцированном арсенитом

Ранее было показано, что канонические факторы инициации трансляции вместе с малой рибосомной субъединицей и нетранслируемой poly(A)-мРНК являются компонентами стресс-гранул, возникающих в клетке в условиях жёсткого стресса (например, окислительного стресса, индуцируемого арсенитом натрия). У млекопитающих присутствие в составе стресс-гранул было показано не только для факторов инициации трансляции, но и для некоторых факторов элонгации, а у дрожжей также и для факторов терминации. Более того, не так давно в работе Гарсиа-Морено с соавт. была описана локализация фактора eIF2D в стресс-гранулах, образующихся при обработке клеток арсенитом. Мы решили посмотреть, как меняется клеточная локализация всех трех изучаемых нами белков, а также другого фактора рибосомного рециклинга, ABCE1, в результате арсенитного стресса, когда происходит сборка стресс-гранул. Для этого модифицированные клетки HeLa, экспрессирующие белок GFP-PABP (флуоресцентный маркер стресс-гранул), обрабатывали арсенитом натрия в концентрации 250 мкМ, затем через час фиксировали в метаноле с дофиксацией в 3% параформальдегиде, после чего проводили иммуноцитохимическое окрашивание с антителами к ABCE1, eIF2D, DENR или MCT-1.

При обработке клеток арсенитом натрия в течение часа в них образуются гранулы, содержащие белок GFP-PABP. На рис. 10 показаны результаты иммуноцитохимического окрашивания контрольных клеток и клеток, обработанных арсенитом. Как оказалось, в нормальных условиях все факторы равномерно распределены в цитоплазме клетки, а в условиях стресса частично релокализируются в стресс-гранулы (Рис. 10).

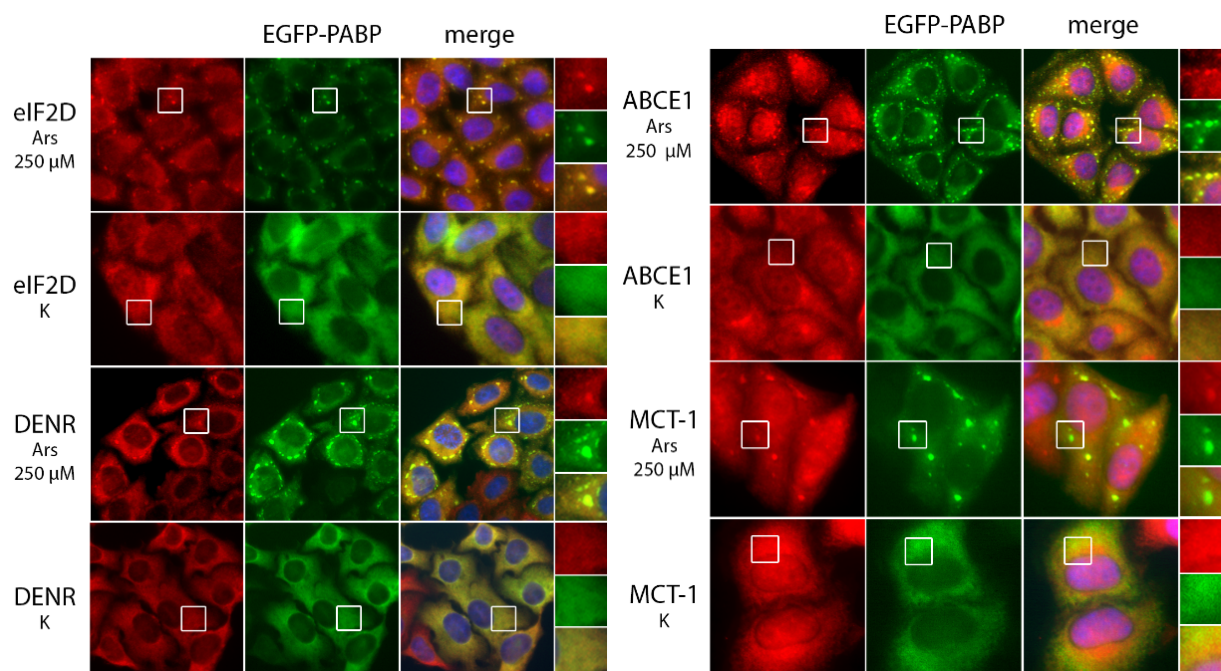


Рис. 10. Релокализация факторов рециклинга в стресс-гранулы при окислительном стрессе. Клетки HeLa, экспрессирующие GFP-PABP (зелёный канал), растили до плотности 70-80%. Затем клетки, обработанные 250 мкМ арсенитом натрия в течение часа, или контрольные клетки фиксировали в метаноле, с дофиксацией в 3% параформальдегиде и проводили иммуноокрашивание с использованием антител к eIF2D, MCT-1, DENR и ABCE1 (красный канал). Для каждого образца в правом столбце показаны области, выделенные белым квадратом, в увеличенном размере.

Частичное рекрутирование факторов рибосомного рециклинга в стресс-гранулы во время стресса может приводить к меньшей доступности этих факторов для тех мРНК, которые остаются в цитоплазме и продолжают транслироваться. Вполне вероятно, что в этих условиях у мРНК, содержащих uORF, уровень реинициации на основной рамке может повышаться (как это происходило в лизатах дрожжевых клеток, в которых отсутствовали TMA20/TMA22 и TMA64). Для проверки этой гипотезы клетки HEK293T обрабатывали арсенитом натрия, после чего применяли метод краткосрочной РНК-трансфекции (FLERT): клетки трансфицировали мРНК uORF1luc, no_uORF, RF1 или RF2; через 1 или 2 часа после трансфекции клетки лизировали, добавляли люциферин и измеряли уровень люминесценции в полученных лизатах, отражающий эффективность трансляции Fluc. Чтобы убрать влияние погрешностей, связанных с эффективностью трансфекции, значения нормировали на значения люминесценции, полученные в результате измерения активности референсной люциферазы Rluc, вносимой на отдельной мРНК Rluc (в случае no_uORF1 и uORF1luc) или на одной мРНК вместе с Fluc (в случае RF1 и RF2) (Рис. 11Б).

Уровень трансляции Fluc в случае мРНК RF2 и uORF1luc, содержащих uORF, как и ожидалось, был значительно ниже, чем в случае мРНК без uORF (Рис. 11А). Обработка клеток арсенитом натрия также приводила к сильному подавлению трансляции (данные не показаны), однако если в обычных условиях мРНК uORF1luc

транслировалась в ~4 раза хуже, чем мРНК без uORF, при стрессе эта разница фактически исчезала (Рис. 11А). Аналогичный эффект наблюдался и для пары мРНК RF1 и RF2: в нормальных условиях эффективность трансляции мРНК RF1, в которой трансляция *Fluc* возможна только в результате реинициации, почти в 300 раз меньше эффективности трансляции мРНК RF1, однако в клетках, обработанных арсенитом натрия, данная разница в эффективности трансляции *Fluc* между мРНК сокращалась до 8 раз (Рис. 11А).

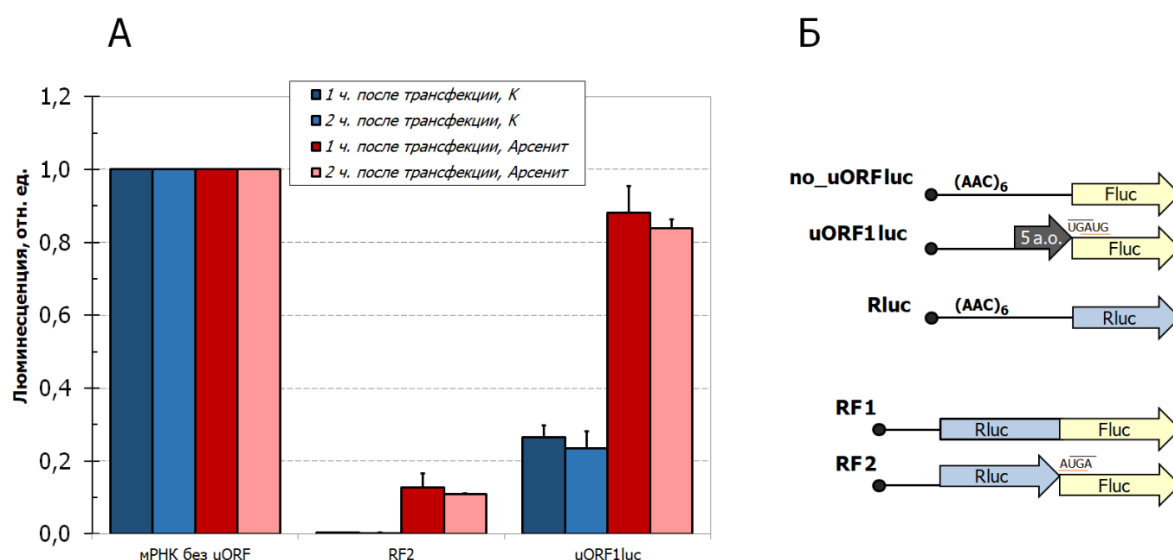


Рис. 11. Уровень реинициации трансляции увеличивается в условиях окислительного стресса. **А** – Клетки HEK293T после обработки арсенитом натрия (150 мкМ, 1 час) или без обработки трансфицировали одной (RF1, RF2) или двумя ([no_uORFluc, Rluc] или [uORFluc, Rluc]) репортерными мРНК, затем лизировали через 1 или 2 часа после трансфекции и измеряли уровень активности люцифераз (Fluc, Rluc) в полученных лизатах. Fluc/Rluc данные для каждой мРНК нормировали на таковые для соответствующей мРНК без uORF (no_uORFluc или RF1). При обработке клеток арсенитом натрия наблюдается значительное увеличение эффективности трансляции мРНК, содержащих uORF, по сравнению с контрольными мРНК без uORF. **Б** – Схематичное изображение мРНК конструкций, используемых в эксперименте.

Полученные данные могут указывать на то, что в клетках, обработанных арсенитом натрия, доля рибосом, готовых участвовать в реинициации после трансляции первой рамки считывания, увеличивается. Вполне возможно, что факторы eIF2D и MCT-1/DENR являются важными участниками механизма регуляции трансляции мРНК с uORF в условиях окислительного стресса. Впрочем, большая относительная устойчивость трансляции uORF-содержащих мРНК к арсенитному стрессу может быть связана и с другими причинами – например, с изменением частоты узнавания AUG-кодона uORF, обусловленным снижением числа рибосом на лидере. Тем не менее, наши данные добавляют в список возможных объяснений устойчивости трансляции uORF-содержащих мРНК к стрессам ещё одно, связанное с ослаблением контроля реинициации из-за ухода факторов рибосомного рециклинга в стресс-гранулы.

5 Трансляция мРНК eIF2D при осмотическом стрессе регулируется uORF в её 5'-НТО

Известно, что экспрессия мРНК многих факторов инициации трансляции регулируется различными *cis*-элементами. Мы обратили внимание, что стартовый кодон основной рамки мРНК, кодирующей eIF2D человека, имеет субоптимальный нуклеотидный контекст: в +4 положении последовательности располагается характерный для слабого контекста тимин. При этом в последовательности 5'-НТО мРНК eIF2D есть 17-аминокислотная транслируемая рамка считывания со стартовым кодоном в каноническом сильном Козак-контексте (Рис. 12А, Б). Чтобы проверить, возможна ли специфическая регуляция трансляции этой мРНК, был синтезирован репортерный транскрипт eF2D_wt, состоящий из 5' концевой последовательности мРНК eIF2D с первыми 45 кодонами кодирующей части и последовательностью *Fluc* в той же рамке считывания (Рис. 12А). В качестве контрольной мРНК использовали транскрипт без uORF, кодирующий *Rluc* под контролем 5'-НТО β-актина человека. Клетки HEK293Т подвергали различным видам стресса, трансфицировали репортерными мРНК, затем через два часа после трансфекции лизировали и измеряли активность люцифераз в лизате. Как оказалось, при повышении концентрации NaCl в среде (+75 mM NaCl) эффективность трансляции мРНК eIF2D_wt снижалась в ~4 раза сильнее, чем трансляция мРНК с 5'-НТО β-актина (Рис. 12В). Для аналогичной мРНК с лидером eIF2D, но не содержащей uORF (стартовый кодон uORF AUG был заменен на UGA) такого эффекта «гиперчувствительности» к осмотическому стрессу не наблюдалось. Чтобы понять, как влияет изменение последовательности uORF на трансляцию основной рамки, в последовательность мРНК eIF2D_wt была введена однонуклеотидная замена сразу после стартового кодона, которая приводила к сдвигу рамки и укорочению uORF до 6 кодонов (uORF_6, Рис. 12В). Трансляция такой мРНК также специфически подавлялась в условиях осмотического стресса. По-видимому, само по себе наличие uORF необходимо для проявления гиперчувствительности, однако длина и аминокислотная последовательность uORF не имеют принципиального значения.

Чтобы понять, на какой стадии осуществляется регуляция – в результате блокирования реинициации после прочтения uORF или же в результате увеличения эффективности распознавания стартового кодона uORF – мы посмотрели, сохраняется ли феномен гиперчувствительности в случае, когда вклад реинициации отсутствует. Для этого использовали репортерную мРНК uORF_77, в которой стоп-кодон UGA в uORF был заменен на GGA, в результате чего uORF имела длину 77 триплетов и перекрывалась с последовательностью основной рамки. Оказалось, что в случае, когда вклад реинициации после прочтения uORF отсутствовал, эффект трансляционной гиперчувствительности мРНК при стрессе также исчезал (Рис. 12В). Полученные данные указывают, что феномен не связан с изменением эффективности узнавания

AUG-кодона, а вызван уменьшением доли реиницирующих рибосом или нарушениями в терминации на стоп-кодоне uORF в условиях стресса.

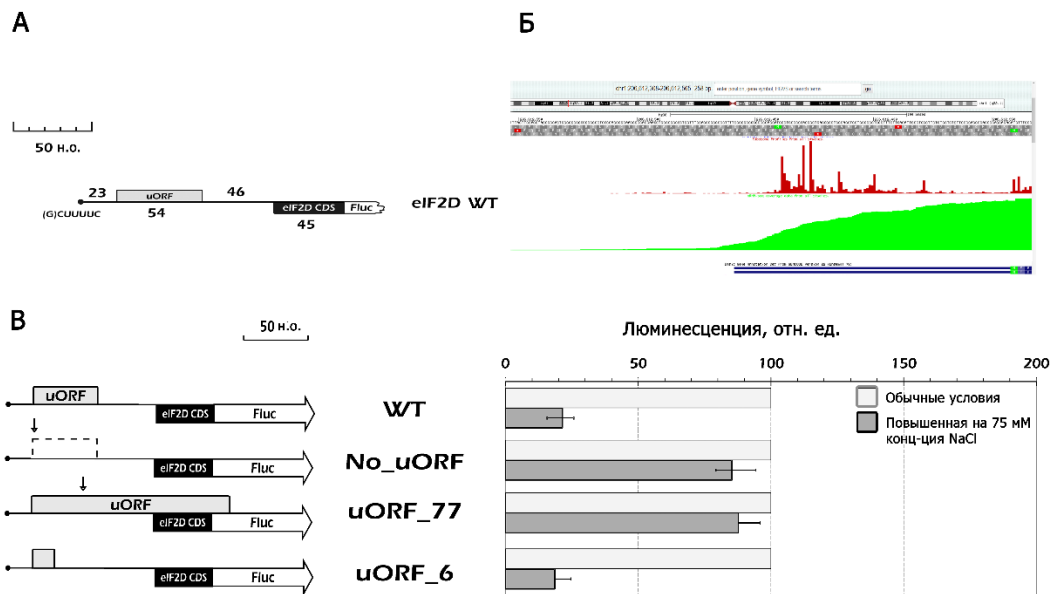


Рис. 12. Трансляция мРНК с 5'-НТО мРНК *eIF2D* специфически подавляется в условиях осмотического стресса. **А** – Схематичное изображение репортерной мРНК *eIF2D_wt* с 5'-НТО мРНК *eIF2D*. Обозначены uORF (серый), участок начала гена *eIF2D* (черный) с указанием длины последовательностей. **Б** – Плотность рибосомного покрытия и покрытия RNA-Seq на 5'-НТО мРНК *eIF2D*, согласно агрегированным данным из БД GWIPS-viz (<https://gwips.ucc.ie/>). Зеленые и красные квадраты показывают последовательности старт- и стоп-кодонов в трех рамках считывания (верх). Рибосомная плотность покрытия показана красным, данные RNA-Seq покрытия показаны зеленым (середина). Темно-синим обозначена последовательность мРНК *eIF2D*, в которой зеленым отмечен старт основной рамки считывания (внизу). **В** - Клетки HEK293T, после добавления дополнительного NaCl (+75 мкМ, 5 мин) или без добавления, трансфицировали репортерной мРНК, содержащей лидер *eIF2D* и последовательность *Fluc*, и контрольной мРНК с лидером β-актина человека и *Rluc*. Клетки лизировали через 2 часа после трансфекции и измеряли уровень активности люцифераз (*Fluc*, *Rluc*) в полученных лизатах. Слева: схематичное изображение используемых конструкций на основе лидера *eIF2D*. Справа: показаны данные, нормированные на таковые для мРНК β-актина. Наблюдается значительное снижение эффективности трансляции мРНК с 5'НТО *eIF2D* (wt) в условиях осмотического стресса

ВЫВОДЫ

1) Факторы TMA64 и TMA20/TMA22 затрудняют освобождение 40S субъединиц со стоп-кодона мРНК, что приводит к снижению частоты реинициации на основной рамке мРНК, содержащих uORF;

2) Одновременное отсутствие факторов TMA64 и TMA20/TMA22 приводит к повышенной частоте реинициации на основной рамке в репортерных мРНК, содержащих uORF; этот эффект снижается с увеличением длины uORF, длины перекрывания с основной рамкой и удаленности uORF от основной рамки;

3) Замена гена *TMA64* на стандартную кассету канамициновой устойчивости смещает старт транскрипции соседнего гена *APC4*, результатом чего является драматическое снижение эффективности трансляции мРНК *APC4*;

4) Жесткий окислительный стресс, вызванный арсенитом натрия, приводит к релокализации факторов рециклинга eIF2D, MCT-1, DENR и ABCE1 в цитоплазматические стресс-гранулы и к увеличению частоты реинициации при трансляции мРНК, содержащих uORF;

5) Трансляция репортерной мРНК с 5'-НТО гена eIF2D человека специфически подавляется в условиях умеренного гиперосмотического стресса, вызванного повышением концентрации NaCl в среде.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

(1) Young, D. J., **Makeeva, D. S.**, Zhang, F., Anisimova, A. S., Stolboushkina, E. A., Ghobakhlou, F., Shatsky, I. N., Dmitriev, S. E., Hinnebusch, A. G., and Guydosh, N. R. Tma64/eIF2D, Tma20/MCT-1, and Tma22/DENR recycle post-termination 40S subunits *in vivo*. *Molecular Cell* (IF₂₀₁₈= 14.5) 71, 5 (2018), 761–774.e5.

(2) Akulich, K. A., Sinitcyn, P. G., **Makeeva, D. S.**, Andreev, D. E., Terenin, I. M., Anisimova, A. S., Shatsky, I. N., and Dmitriev, S. E. A novel uorf-based regulatory mechanism controls translation of the human MDM2 and eIF2D mRNAs during stress. *Biochimie* (IF₂₀₁₈= 3.4) 157 (2019), 92–101.

(3) **Makeeva, D. S.**, Lando, A. S., Anisimova, A., Egorov, A. A., Logacheva, M. D., Penin, A. A., Andreev, D. E., Sinitcyn, P. G., Terenin, I. M., Shatsky, I. N., Kulakovskiy, I. V., and Dmitriev, S. E. Translatome and transcriptome analysis of TMA20 (MCT-1) and TMA64 (eIF2D) knockout yeast strains. *Data in Brief* (CiteScore₂₀₁₉= 0.93) 23 (2019), 103701.

Материалы конференций

(1) **Makeeva D.S.**, Stolboushkina E.A., Lomakin I.B., Dmitriev S.E. Structural and functional insights into eukaryotic translation reinitiation and ribosome recycling orchestrated by eIF2D and MCT-1/DENR. Российская международная конференция по криоэлектронной микроскопии RICSEM-2019, Москва, Россия, 2-5 июня 2019.

(2) **Makeeva D.S.**, Anisimova A.S., Stolboushkina E.A., Shatsky I.N., Dmitriev S.E. Translation factors TMA20/MCTS1, TMA22/DENR and TMA64/eIF2D clear mRNA stop codon from a post-termination complex, to counteract illegitimate reinitiation. Международная научная конференция "XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова" VIII Российский симпозиум "Белки и пептиды", Москва, Россия, 18-22 сентября 2017.

(3) Young D., **Makeeva D.S.**, Zhang F., Anisimova A.S., Stolboushkina E.A., Shatsky I.N., Hinnebusch A., Dmitriev S.E., Guydosh N.R. The yeast orthologs of eIF2D, MCT-1 and DENR function in recycling of 40S subunits at stop codons *in vivo*. Gordon Research Conference "Translation Machinery in Health & Disease. Decoding Translation for Homeostasis", Galveston, TX, США, 19-24 марта 2017.

(4) **Makeeva D.S.**, Stolboushkina E.A., Dmitriev S.E., Anisimova A.S. The role of the TMA64 (eIF2D) and TMA20 (MCTS1) proteins in translation reinitiation on uORF containing mRNAs. International Symposium at the Collaborative Research Center 944 "Physiology & Dynamics of Cellular Microcompartments" of University of Osnabrück, Collaborative Research Center 944 "Physiology & Dynamics of Cellular Microcompartments" of University of Osnabrück, Германия, 14-15 июля 2016.