

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Лашкевич Ксения Александровна

**ИЗУЧЕНИЕ ВРЕМЕННОЙ И ПРОСТРАНСТВЕННОЙ РЕГУЛЯЦИИ
ТРАНСЛЯЦИИ УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫМИ МЕТОДАМИ
мРНК-ТРАНСФЕКЦИИ**

03.01.03 Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в лаборатории регуляции синтеза белка отдела химии и биохимии нуклеопротеидов, лаборатории системной биологии старения и отделе взаимодействия вирусов с клеткой Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель – *Дмитриев Сергей Евгеньевич*, кандидат биологических наук

Официальные оппоненты – *Никитин Николай Александрович*, доктор биологических наук, заведующий сектором кафедры вирусологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

Шеваль Евгений Валерьевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией ультраструктуры клеточного ядра научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

Лябин Дмитрий Николаевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории регуляции биосинтеза белка Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт белка Российской академии наук

Защита диссертации состоится «17» декабря 2020 г. в 17:00 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. 389.
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). Со сведениями о регистрации участия в защите в удаленном интерактивном режиме и с диссертацией в электронном виде также можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/329600896/>

Автореферат разослан « » ноября 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.В. Комарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Регуляция экспрессии генов на уровне трансляции играет важную роль в процессах пролиферации, дифференцировки, запрограммированной смерти, ответе на инфекцию и стрессовые воздействия. Считается, что именно на стадии инициации контроль трансляции является самым оперативным и результативным. Глобальная регуляция инициации у эукариот осуществляется посредством модификации ключевых инициаторных факторов (eIF2, eIF4E). Тем не менее, такому контролю подвержены не все мРНК. Уникальной особенностью некоторых эукариотических мРНК является возможность иницировать трансляцию несколькими различными способами, зачастую в обход ряда факторов инициации, что исключает такие мРНК из глобальной регуляции, придавая им особые трансляционные свойства. Однако систематического исследования трансляционных свойств мРНК с различными механизмами инициации в условиях изменения трансляционного статуса (например, при стрессе) в живой клетке в рамках одного исследования, в котором можно было бы их корректно сравнивать, а также с применением адекватных и физиологически значимых методов, предпринято не было.

Несмотря на активное развитие методологии изучения трансляции и ее регуляции, целый ряд вопросов в этой области остается изученным недостаточно хорошо. Так, компартиментализация трансляции, т.е. пространственное разграничение этого процесса внутри клетки, а также ее особенности, вызывают повышенный интерес. В литературе стали появляться указания на то, что внутриклеточная локализация мРНК и ее избирательная трансляция в определенном компартменте клетки, а также предшествующие этому события (например, процессинг первичного мРНК-транскрипта в ядре), оказывают существенное влияние на эффективность трансляции этой мРНК, включая характер трансляционного ответа на стрессовые воздействия. Таким образом, современная наука предлагает считать компартмент-зависимую регуляцию трансляции в клетке еще одним этапом регуляции генной экспрессии на уровне трансляции. Однако до сих пор не было попыток изучить эти события с помощью метода репортёрных мРНК.

Другой важный вопрос, не получивший пока большого внимания, это временная динамика трансляции при ответе на стресс и механизмы регуляции этого ответа. Подавляющая часть исследований в этом направлении ограничивается несколькими избранными временными точками, а то и вовсе одной, на основании чего невозможно получить полную картину экспрессии генов во времени в зависимости от меняющихся условий.

В рамках данного диссертационного проекта мы попытались изучить такие актуальные аспекты трансляции, как ее пространственная и временная регуляция,

объединив исследование этих направлений с помощью наших оригинальных методических разработок.

Цель и задачи работы

Целью данной работы было описание и анализ краткосрочной и долговременной динамики трансляции широкого набора репортёрных мРНК в условиях стрессов различной природы, а также в зависимости от локализации трансляции в эукариотической системе.

Для этого были поставлены следующие **задачи**:

- охарактеризовать первичный трансляционный ответ в условиях стрессов различной природы на наборе репортёрных мРНК с различными механизмами инициации трансляции методом краткосрочной мРНК-трансфекции;

- наладить метод прижизненного измерения люминесценции в режиме реального времени в культивируемых клетках и применить его к изучению динамики трансляции репортёрных конструкций в норме и в условиях стрессов;

- разработать и приготовить репортёрные конструкции, трансляция которых ассоциирована с разными клеточными компартментами: происходит либо в цитоплазме, либо на мембране эндоплазматического ретикулума, либо на внешней мембране митохондрий, а также мРНК с интроном в кодирующей части для отслеживания трансляции мРНК, претерпевшей сплайсинг;

- сравнить эффективности трансляции полученных репортёрных мРНК в клетках млекопитающих при помощи разработанных методов мРНК-трансфекции в норме и в условиях стрессов.

Научная новизна и практическая значимость работы

В ходе выполнения диссертационной работы был разработан ряд новых экспериментальных подходов к изучению трансляции, включая метод краткосрочной мРНК-трансфекции, а также методологию длительного измерения активности репортёров в живых клетках. Новые методические подходы были применены к изучению трансляции большого набора репортёрных мРНК, включая мРНК с различными механизмами инициации трансляции, и позволили выявить дифференциальные эффекты в ответ на стрессовые условия, в том числе ранее не описанные в литературе.

Впервые были описаны трансляционные свойства безлидерной мРНК в культивируемых клетках эукариот и показана ее устойчивая трансляция в условиях стрессов разной природы и интенсивности, при которых трансляция репортёрной мРНК с классическим кеп-зависимым клеточным лидером значительно ингибировалась или полностью подавлялась.

Показано, что антибиотик амикумацин А ингибирует элонгацию трансляции репортёрных мРНК в клетках эукариот, что может быть использовано в дальнейшем для разработки нового противоопухолевого препарата. Для другого рибосомного ингибитора, бластицидина S, показана активность ингибировать трансляцию у эукариот преимущественно на стадии элонгации.

Метод мРНК-трансфекции впервые применен для оценки влияния локализации мРНК на ее трансляцию. Выявлены дифференциальные трансляционные эффекты репортёрных мРНК с разной локализацией трансляции в ответ на некоторые виды клеточных стрессов.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработан метод краткосрочной мРНК-трансфекции и с его помощью показано, что репортёрные мРНК с разными механизмами инициации трансляции проявляют дифференциальные первичные трансляционные эффекты в ответ на стрессовые воздействия в клетках млекопитающих.
2. Разработан метод длительного измерения люминесценции в живых клетках в режиме реального времени и применен к изучению долговременной динамики трансляции репортёрных мРНК в условиях стресса.
3. Локализация трансляции репортёрных мРНК на мембране эндоплазматического ретикулаума оказывает существенное влияние на уровень продукции белка, временной профиль экспрессии и характер их изменений при стрессе.
4. Анализ влияния митохондриальных стрессов на репортёрную мРНК, трансляция которой направлена на внешнюю мембрану митохондрий, не выявил различий в регуляции трансляции по сравнению с мРНК, транслируемой в цитозоле.
5. Искусственная мРНК, содержащая интрон, подвергается сплайсингу в трансфицированных пролиферирующих клетках и способна эффективно транслироваться.
6. Антибиотик амикумацин А ингибирует трансляцию в эукариотической системе на стадии элонгации.

Методология исследования

В основе исследования лежит метод мРНК-трансфекции культивируемых клеток, который мы модифицировали, используя новые методологические подходы, а затем применили в своем исследовании. Для получения плазмидных конструкций использовали стандартные методы молекулярного клонирования, репортёрные мРНК получали на матрице ПЦР-продуктов в системе *in vitro* транскрипции с последующим кэпированием. Культивируемые клетки млекопитающих трансфицировали готовыми транскриптами, анализ люминесценции проводили в клеточном лизате или в живых клетках. Трансляцию репортёрных мРНК проводили также в бесклеточной системе, полученной из цитоплазматических клеточных экстрактов. Клеточные линии с нокаутом гена получали методом CRISPR/Cas9 редактирования. Эффективность нокаута оценивали вестерн-блоттингом. Ту-принтинг использовали для анализа позиции рибосомных комплексов на мРНК.

Личный вклад соискателя

Личный вклад соискателя состоял в анализе литературных данных, планировании и проведении экспериментов, анализе результатов, представлении результатов на конференциях и участии в подготовке публикаций.

Степень достоверности результатов

Результаты были получены с применением классических, а также новых современных методов, с использованием современного оборудования и качественных реактивов. Все эксперименты были поставлены в нескольких технических и биологических повторах с соответствующими контролями и хорошо воспроизводились.

Апробация работа и публикации

По материалам работы опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных системах цитирования (Web of Science, Scopus, PubMed) и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.01.03 - молекулярная биология.

Диссертация апробирована на научном семинаре отдела взаимодействия вирусов с клеткой Научно-исследовательского института Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Результаты работы были представлены на 42-м конгрессе европейского биохимического общества FEBS Congress, Иерусалим, Израиль, 10-14 сентября 2017; конференции EMBO Conference: Protein Synthesis and Translational Control, Heidelberg, Германия, 6-9 сентября 2017; XXIV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов – 2017", МГУ имени М.В.Ломоносова, Россия, 20 апреля 2017; конференции EMBO Conference: Protein Synthesis and Translational Control, Cold Spring Harbor, США, 1-4 сентября 2020.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 138 страницах и включает следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы, Список литературы. Диссертация содержит 44 рисунка и 3 таблицы. Список литературы включает 168 источников.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Часть I. Регуляция трансляции во времени: краткосрочные эффекты и длительная динамика

Разработка методологии краткосрочной мРНК-трансфекции (FLERT)

В основу нашего исследования лег метод липокатионной мРНК-трансфекции культивируемых клеток. Исходя из цели работы – изучения первичных эффектов от стрессов различной природы на трансляцию в живых клетках, мы оптимизировали и модифицировали стандартный протокол.

Общая схема методологии представлена на рис. 1 А: в качестве репортёрных генов были выбраны люциферазы светлячка firefly (Fluc) и *Renilla* (Rluc).

Искусственные репортёрные мРНК получали в системе *in vitro* на основе ПЦР-продуктов, содержащих T7-промотор на одном конце и поли(Т)-хвост – на другом. Готовые кэпированные мРНК, качество которых было проверено электрофорезом, вводили в культивируемые клетки методом липокатионной трансфекции.

Мы оптимизировали стандартный протокол (рис.1 Б), рекомендуемый фирмой-производителем трансфицирующего реагента, с целью снизить конкуренцию репортёрных мРНК с эндогенными мРНК, в том числе за трансляционные компоненты, и избежать перегрузки клетки экзогенной мРНК, что может служить дополнительным стрессом и затруднить оценку трансляционных эффектов непосредственно от индуцированного стресса. В случае, когда мы ко-трансфицировали m^7G -кэпированную мРНК Rluc с m^7G -кэпированным транскриптом Fluc, мы наблюдали значимое снижение абсолютных значений активности Rluc по сравнению с таким же экспериментом, когда транскрипт Fluc был кэпирован нефункциональным кэп-аналогом (А-кэп) (рис. 1 Б, стандартный протокол). Это свидетельствует о значительной конкуренции за кэп-связывающий фактор eIF4E в случае, когда обе мРНК были m^7G -кэпированы. Путем снижения общей концентрации мРНК наряду со снижением количества липокатионного реагента нам удалось в значительной степени уменьшить эффект конкуренции мРНК (рис. 1 Б, оптимизированный протокол).

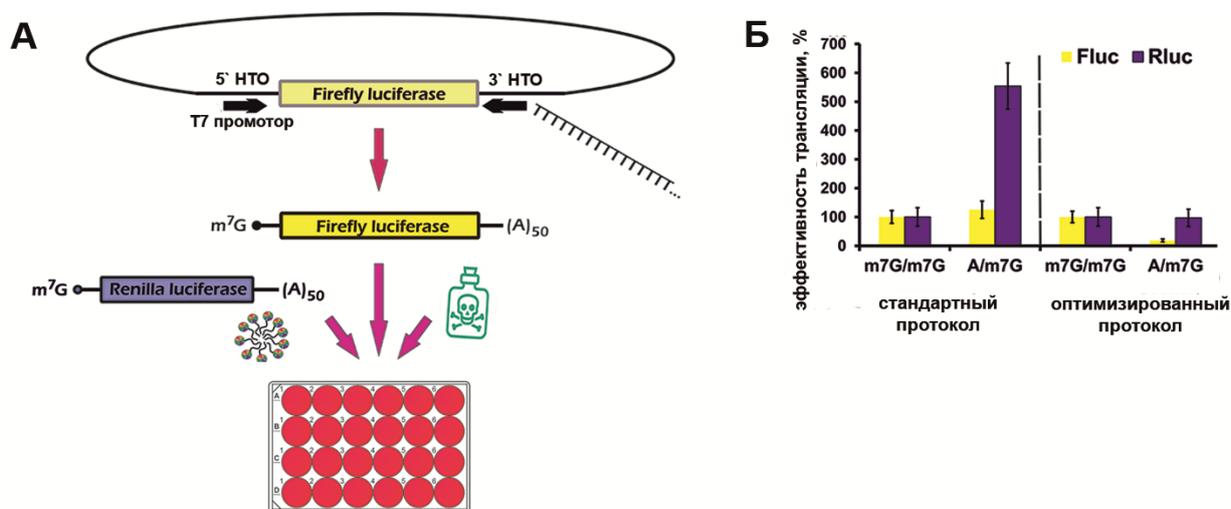


Рис. 1. Методология FLERT. (А) Схематическое представление метода, описание в тексте. (Б) Сравнение стандартного протокола и протокола, оптимизированного для изучения трансляционных эффектов. Клетки трансфицировали смесью мРНК m^7G -кэпированной Fluc / m^7G -кэпированной Rluc или мРНК m^7G -кэпированной Fluc / А-кэпированной Rluc по стандартному и оптимизированному протоколу для оценки взаимной конкуренции мРНК. Абсолютные значения люминесценции приняты за 100%.

С целью изучить краткосрочные трансляционные эффекты стрессов в клетках мы ограничили временные рамки до 2 часов, поэтому метод мы назвали FLERT (от *англ.* FLEeting mRNA Transfection – «краткосрочная мРНК-трансфекция»). Стандартные методики предполагают более длительное время инкубации клеток после трансфекции, от 4 до 72 часов, с целью получения более

высокого уровня сигнала от репортёра. Однако важно отметить, что в случае стресса в клетке происходит запуск многоступенчатого процесса адаптации и восстановления, и более поздние (3-6 часов) вторичные эффекты, предполагающие запуск транскрипционного ответа, усложняют картину интерпретации первичного трансляционного эффекта.

Анализ эффекта клеточных стрессов на трансляцию мРНК с различными механизмами инициации трансляции

Используя новый оптимизированный подход, мы провели систематический анализ трансляционных свойств набора репортёрных мРНК с различными механизмами инициации трансляции (перечислены в таблице 1) в условиях индуцированных стрессов различной природы: окислительного стресса, индуцированного разными способами, ингибирования mTOR, стресса эндоплазматического ретикулума, а также изучили эффекты низкомолекулярных рибосомных ингибиторов на эукариотическую трансляцию. В рамках автореферата будут рассмотрены случаи окислительного стресса и ингибирования mTOR.

Схема репортёрных мРНК представлена на рис. 2 А. Альтернативные механизмы инициации трансляции изучаемых мРНК были обусловлены особенностями организации их 5'-нетранслируемой области (5'-НТО), поскольку все они имели одинаковые кодирующие последовательности (люциферазу Fluc), 3'-НТО (вируса SV40), 50-нт поли(А)-хвост. В качестве контроля во всех экспериментах выступала мРНК Actin-Rluc, кодирующая люциферазу *Renilla* (Rluc) под контролем 5'-НТО из мРНК человеческого β-актина.

Таблица 1. Список изучаемых мРНК и особенности инициации их трансляции

мРНК	организация 5'-НТО и особенности инициации трансляции
Actin-Fluc Actin-Rluc	классический клеточный лидер, инициация по механизму кэп-зависимого сканирования
(CAA)5-Fluc	15-нуклеотидный одоцепочечный кэп-зависимый лидер (последовательность триплетов CAA повторена 5 раз), возможна инициация без eIF4A-зависимого сканирования
ATF4-Fluc	кэп-зависимый лидер с альтернативными рамками считывания, инициация по механизму реинициации
cI-Fluc	безлидерная мРНК, несколько механизмов инициации, включая прямое связывание 80S
EMCV-Fluc	IRES, eIF4E- и кэп-независимая инициация
HCV-Fluc	IRES, прямое связывание 40S, требуются только eIF3 и либо eIF2, либо eIF5B
CrPV-Fluc /BQCV-Fluc	IRES, прямое связывание 80S, независимость от канонических факторов инициации и инициаторной Met-тРНК

Индукция окислительного стресса арсенитом натрия приводила к закономерному доза-зависимому ингибированию eIF2-зависимой трансляции (рис. 2 Б и В). Трансляция репортёрной мРНК с лидером гена ATF4 (ATF4-Fluc), содержащей три uORF, продемонстрировала небольшую стимуляцию трансляции только при низких концентрациях арсенита, в остальных случаях ее трансляция ингибировалась, хотя в меньшей степени, чем контрольной мРНК (рис. 2 Г).

В то время как каноническая трансляция в клетке блокировалась практически полностью, трансляция мРНК с IRES-элементами HCV и CrPV существенно стимулировалась (рис. 2 Е и Ж). Такая независимость от инактивации eIF2 в случае HCV-Fluc объясняется его способностью использовать альтернативный путь доставки инициаторной Мет-тРНК^{Мет} посредством фактора eIF5B. В случае IRES-элемента CrPV для инициации трансляции не требуются вообще никакие факторы, и стимуляцию трансляции можно объяснить снижением конкуренции с клеточными мРНК из-за высвобождения клеточных трансляционных ресурсов (рибосом, факторов элонгации, терминации и др.).

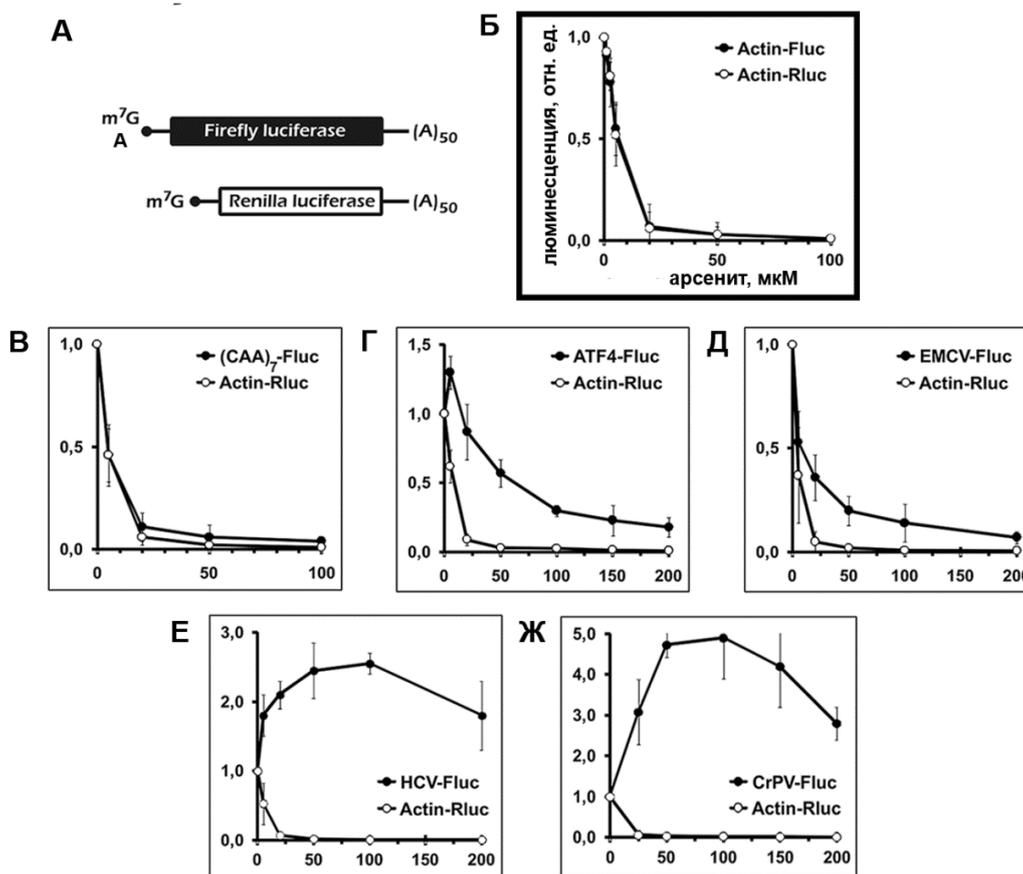


Рис. 2. Эффект окислительного стресса, индуцированного арсенитом натрия, на трансляцию репортёрных мРНК с разными 5'-НТО. (А) Схема пары репортёрных мРНК – опытной Fluc и контрольной Rluc. (Б-Ж) Результаты трансфекции. Арсенит натрия добавляли к клеткам (HEK293T) за несколько минут до трансфицирующих комплексов. По оси ординат отложены уровни активности люцифераз Fluc и Rluc, отражающие экспрессию мРНК Fluc и Actin-Rluc, за «1» приняты уровни трансляции каждой мРНК в нормальных условиях. Показаны средние значения и стандартное отклонение.

Из литературы известно, что активный фактор eIF2 строго необходим для сборки инициаторного комплекса на EMCV IRES. Однако в нашем эксперименте мРНК с этим IRES показала небольшую, но воспроизводимую относительную устойчивость трансляции в условиях инактивации eIF2 (рис. 2 Д). Дальнейшие наши исследования выявили еще более любопытный характер трансляции этой мРНК (см. следующий раздел), что в совокупности заставляет пересмотреть представления о невозможности трансляции мРНК EMCV при частичной или даже полной инактивации eIF2 в клетке.

Любопытно, но при моделировании окислительного стресса с помощью другого агента – пероксида водорода – мы увидели несколько другую картину экспрессии некоторых мРНК (рис. 3). При пероксид-индуцированном стрессе происходит частичная инактивация фактора eIF4F. В этих условиях мРНК с IRES-элементами EMCV и HCV продолжали относительно устойчиво транслироваться на фоне падения трансляции Actin-Rluc (рис. 3 Б и В), а вот трансляция мРНК CrPV-Fluc парадоксальным образом оказалась даже чуть более чувствительной, чем Actin-Rluc (рис. 3 Г). Относительная устойчивость трансляции мРНК с IRES-элементами EMCV и HCV продиктована их свойством транслироваться в условиях инактивации eIF4F, однако ситуацию с CrPV объяснить сложнее, тем более на фоне вышеописанных результатов, полученных в опыте с арсенидом.

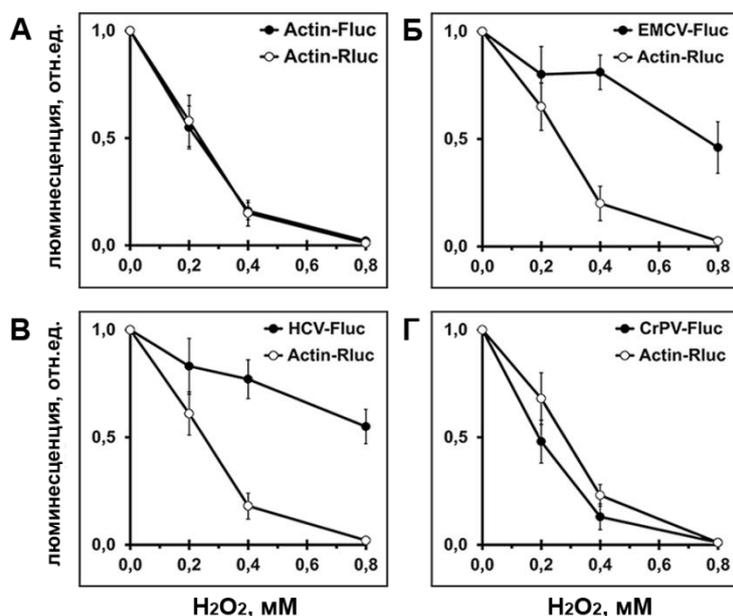


Рис. 3. Эффект окислительного стресса, индуцированного пероксидом водорода, на трансляцию репортёрных мРНК с разными 5'-НТО. Описание как на рис. 2.

Интересно, что похожую ситуацию с ингибированием трансляции CrPV-Fluc мы наблюдали при добавлении к клеткам ингибитора mTOR торина-1. (рис. 4). Ингибирование mTOR ведет к дефосфорилированию ингибирующего белка 4E-BP1, который в результате инактивирует кэп-связывающий фактор eIF4E, исключая его из процесса инициации, что закономерно ведет к затуханию кэп-зависимой трансляции в клетке, как мы это и наблюдаем на рис. 4 в случае «классической»

мРНК Actin-Fluc и мРНК ATF4-Fluc (рис. 4 А и Б). eIF4E-независимые IRES EMCV и HCV, что тоже ожидаемо, проявляют абсолютно устойчивую трансляцию (рис. 4 Г и Д). Известно, что mTOR также участвует в регуляции элонгации, в зависимости от условий изменяя активность киназы eEF2K элонгационного фактора eEF2. Поэтому падение трансляции CrPV-Fluc, сопоставимое с Actin-Rluc, в случае ингибитора mTOR и пероксида водорода можно было бы связать с инактивацией eEF2.

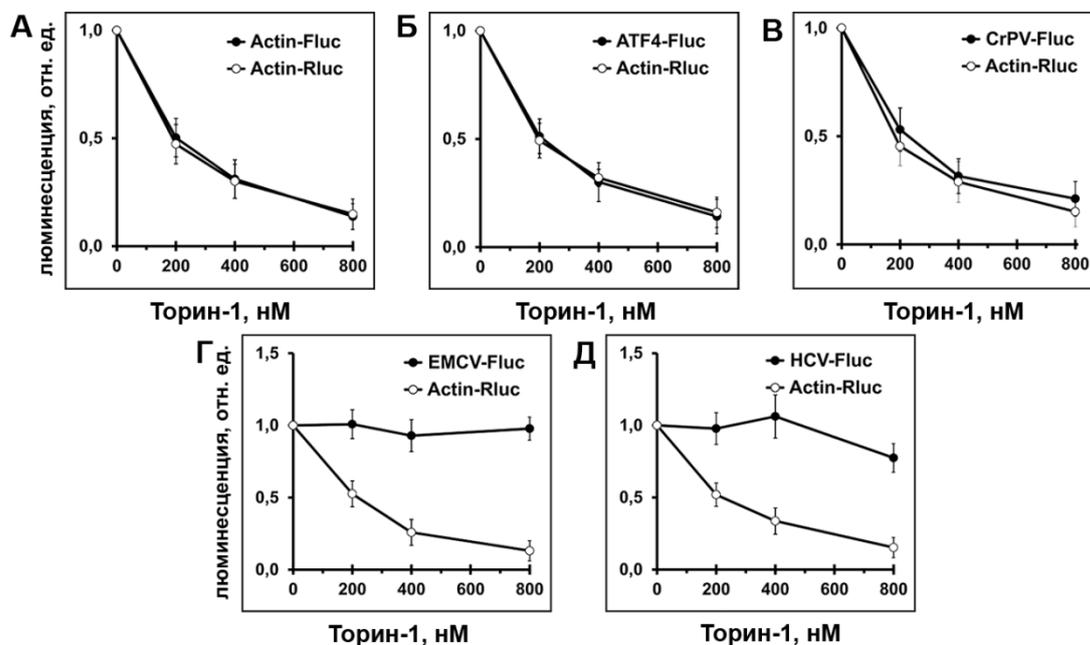


Рис. 4. Эффект ингибирования mTOR на трансляцию репортёрных мРНК с разными 5'-НТО. Описание как на рис. 2.

Таким образом, полученные нами новые и неожиданные результаты трансляции мРНК, направляемой IRES-элементом вируса CrPV, в условиях избранных стрессов в живых клетках поднимают важный вопрос о том, насколько свидетельства о полной eIF-независимости, полученные в *in vitro*-системе, соответствуют реальным трансляционным свойствам этого IRES *in vivo*, которые охарактеризованы в гораздо меньшей степени. Возможно, CrPV IRES все же требует каких-то дополнительных, на данный момент не идентифицированных, клеточных компонентов для инициации *in vivo*, которые инактивируются при данных видах стресса.

Есть и другая вероятность: особенности регуляции трансляции мРНК CrPV-Fluc могут быть связаны с ее большей чувствительностью к инактивации элонгационного фактора eEF2, который, по сути, выполняет «неканоническую» роль фактора инициации в случае этого IRES, катализируя псевдотранслокацию его доменов между сайтами рибосомы. Известно, что инактивация eEF2 путем фосфорилирования происходит при окислительном стрессе, вызванном непосредственно пероксидом водорода, а также при ингибировании mTOR. Мы попытались проверить этот механизм путем нокаута гена основной киназы eEF2 –

eEF2K, однако получили результат, свидетельствующий о том, что чувствительность трансляции CrPV-Fluc в условиях избранных стрессов не связана с активностью киназы eEF2K и фосфорилированием eEF2 (по крайней мере, по каноническому остатку Trp56), ведущему к инактивации этого фактора.

Трансляция безлидерной мРНК в живых клетках млекопитающих относительно устойчива к различным стрессовым условиям

Трансляционные свойства безлидерной мРНК, у которой отсутствует важный регуляторный элемент – 5'-НТО, в живых клетках млекопитающих были охарактеризованы впервые. В качестве модели безлидерной мРНК был взят транскрипт, кодирующий Fluc, на 5'-конце которого располагался участок в 40 нт из классической безлидерной мРНК cI (репрессора фага λ), перед стартовым AUG-кодоном которой находился единственный нуклеотид – G. В серии экспериментов по трансфекции клеток методом FLERT мы анализировали трансляцию безлидерной мРНК (cI-Fluc) совместно с контрольной Actin-Rluc в клетках HEK293T в условиях избранных нами стрессов (рис. 5). cI-Fluc демонстрировала уверенную трансляцию даже в условиях полного ингибирования трансляции «классической» мРНК Actin-Rluc, вызванных высокими концентрациями арсенита натрия и ДТТ (рис. 5 Б и В), что указывает на возможность использования данной мРНК eIF2-независимых механизмов для инициации трансляции в живых клетках млекопитающих, как минимум в условиях стресса. Трансляция cI-Fluc практически полностью устойчива к инактивации кЭП-связывающего аппарата eIF4F в результате ингибирования киназы mTOR торином-1 (рис. 5 А), что согласуется с низкой кЭП-зависимостью этой мРНК.

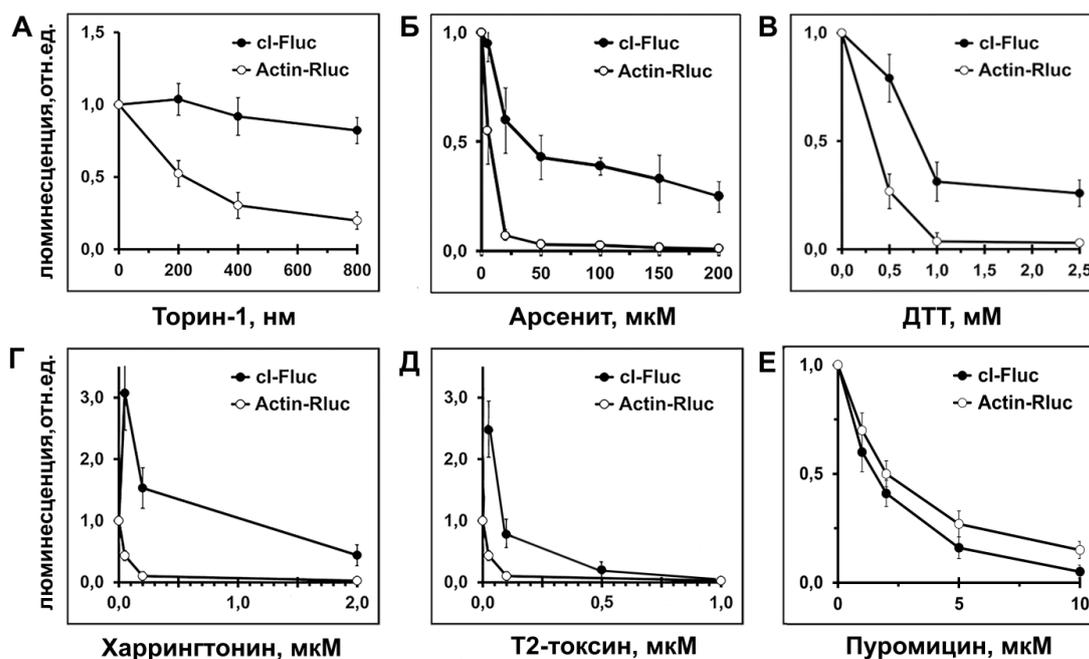


Рис. 5. Эффекты различных стрессов и рибосомных ингибиторов на трансляцию безлидерной репортёрной мРНК. Описание как на рис. 2.

Чтобы выяснить возможность инициации трансляции на безлидерной мРНК путем прямого связывания 80S рибосомы в живой клетке, мы использовали свойство некоторых рибосомных ингибиторов, в частности, харрингтонина и Т2-токсина, связываться только с отдельными субъединицами рибосомы (60S), но не проникать в элонгирующие 80S рибосомы внутри полисом или в вакантные 80S комплексы. В нашем эксперименте, в условиях, когда эти антибиотики значительно или полностью подавляли трансляцию Actin-Rluc, трансляция безлидерной мРНК даже стимулировалась или оставалась относительно устойчивой (рис. 5 Г и Д). В контроле с пурамицином (который тоже связывается с 60S рибосомой, однако такое связывание может происходить вне зависимости от вовлечения 60S в формирование 80S комплекса) такого эффекта не наблюдалось (рис. 5 Е).

Таким образом, мы показали, что безлидерная мРНК может транслироваться в условиях, приводящих к инактивации факторов eIF2 и eIF4F, что говорит о возможности инициации трансляции этой мРНК различными альтернативными способами, включая прямое связывание 80S рибосомы, в живых клетках млекопитающих.

Амикумадин А ингибирует трансляцию в эукариотической системе

Помимо известных и широко используемых антибиотиков (в том числе рибосомных ингибиторов), в своей работе мы исследовали новый антибиотик – амикумадин А, свойства которого ингибировать трансляцию ранее были исследованы только в бактериальной системе. Мы показали способность амикумадина А ингибировать трансляцию также и в эукариотах на модели клеток млекопитающих.

Ингибирование трансляции в клетках линии НЕК293Т методом FLERT в присутствии амикумадина А мы охарактеризовали для нескольких репортёрных мРНК с разными механизмами инициации трансляции (Actin-Rluc, EMCV-Fluc, HCV-Fluc, CrPV-Fluc), с учетом того, что антибиотик мог влиять также и на эту стадию. Амикумадин А эффективно ингибировал трансляцию репортёрных мРНК (рис. 6 А), однако некоторые IRES-содержащие мРНК (CrPV-Fluc и HCV-Fluc) проявили небольшую устойчивость трансляции при пониженных концентрациях антибиотика. Наблюдаемое различие можно объяснить дополнительным ингибирующим действием антибиотика на процесс инициации (сканирования) или вторичными эффектами (риботоксический стресс). Эксперимент по *in vitro* трансляции в бесклеточной системе (рис. 6 Б) не показал различий в трансляции между этими мРНК. Таким образом, действие амикумадина А на трансляцию мРНК в клетках млекопитающих, скорее всего, ограничено стадией элонгации и не зависит от способа инициации, а разница в эффектах, наблюдаемых в живых клетках, по-видимому, обусловлена вторичными эффектами. Чтобы однозначно в этом убедиться, мы провели анализ паттернов остановки рибосомы на мРНК с лидером от мРНК кроличьего β -глобина методом ту-принтинга в лизате из ретикулоцитов кролика (рис.7).

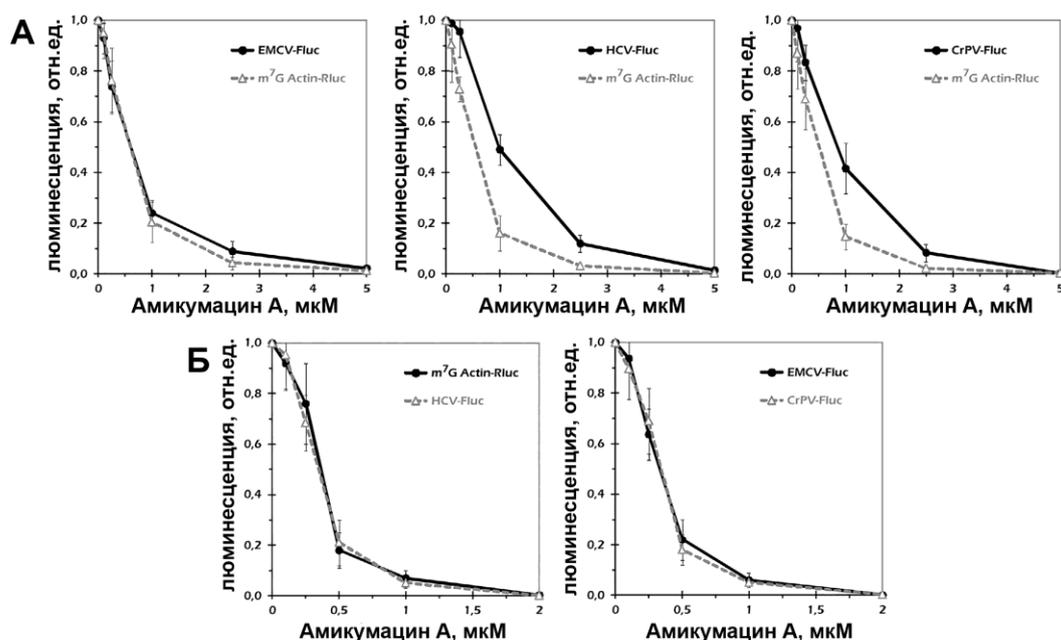


Рис. 6. Ингибирующее действие амикумацина *A* на трансляцию в живых клетках *HEK293T* (А) и в бесклеточной системе трансляции (Б). Анализ эффекта амикумацина методом FLERT. Трансляцию в бесклеточной системе на основе лизата клеток мышинной асцитоканциномы Кребс-2 проводили в режиме непрерывного измерения люминесценции, за единицы активности люциферазы были приняты значения люминесценции на 25 минуте реакции. За «1» принята эффективность трансляции каждой мРНК без антибиотика.

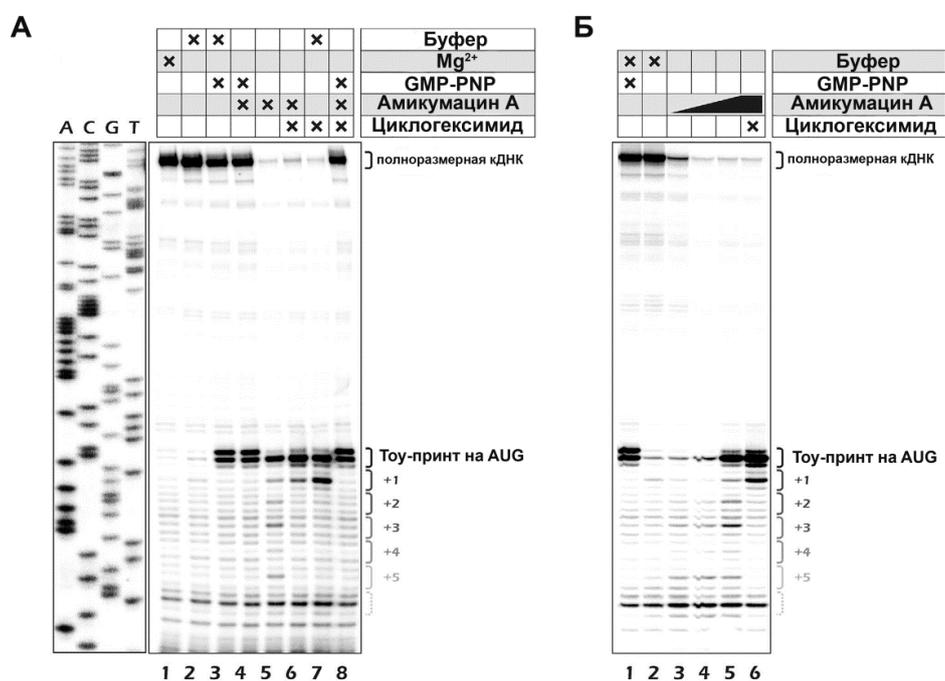


Рис. 7. Ту-принт анализ рибосомных стопов на мРНК в присутствии амикумацина *A* и других ингибиторов трансляции в лизате из ретикулоцитов кролика. (А) Конечные концентрации добавок: 15 мМ Mg(OAc)₂ (дорожка 1); 0,2% EtOH (2); 2 мМ GMPPNP и 0,2% EtOH (3); 2 мМ GMPPNP и 100 мкМ амикумацина (4); 100 мкМ амикумацина (5); 100 мкМ амикумацина *A* и 1 мМ циклогексимида (6); 1 мМ циклогексимида и 0,2% EtOH (7); 2 мМ GMPPNP, 100 мкМ амикумацина и 1 мМ циклогексимида (8). (Б) Концентрации амикумацина 0, 1, 10 и 100 мкМ в дорожках 1-2, 3,4 и 5-6, соответственно.

На рис. 7 можно наблюдать отчетливый сигнал ту-принта, соответствующий остановке рибосомы амикумацином А на AUG-кодоне (дорожки 5). В качестве контроля также приведен характерный паттерн 48S-комплексов (двойной сигнал, дорожка 3), полученный при добавлении негидролизуемого аналога GTP (GMPPNP), который не меняется в присутствии амикумацина А (дорожка 4), что свидетельствует об отсутствии его влияния на стадию инициации. Паттерн ту-принта в случае амикумацина А (одна полоса) соответствует 80S рибосоме.

Еще одна небольшая часть работы была посвящена исследованию механизма действия другого рибосомного ингибитора – бластицидина S. Мы показали, что этот антибиотик блокирует преимущественно стадию элонгации трансляции в эукариотической системе, в то время как ранее для бактерий была показана его способность ингибировать в первую очередь терминацию трансляции.

Длительная динамика трансляции репортёрных мРНК в живых трансфицированных клетках, подвергнутых стрессам

По сравнению с техникой краткосрочной мРНК-трансфекции FLERT, которую мы разработали ранее для исследования первичного трансляционного ответа в условиях стрессов, другой разработанный нами в рамках этого проекта метод, наоборот, позволяет наблюдать долгосрочные изменения в трансляции с высоким разрешением. Метод основан на детекции люминесценции в живых трансфицированных клетках в режиме реального времени, что достигается за счет технических возможностей современных планшетных ридеров, способных поддерживать подходящие условия культивирования клеток во время длительного эксперимента. Мы отработали методологию и подобрали оптимальные параметры протокола для эффективной трансляции репортёрных мРНК в трансфицированных культивируемых клетках и приступили к моделированию различных стрессовых воздействий и исследованию динамики трансляционного ответа на них.

По аналогии с FLERT-экспериментами, мы трансфицировали клетки линии HEK293T набором мРНК (Actin-Fluc, EMCV-Fluc, вместо CrPV-Fluc в этом эксперименте использовали BQCV-Fluc с IRES-элементом, имеющим сходный механизм инициации) и наблюдали динамику их трансляции в условиях избранных стрессов в течение как минимум 18 часов.

После индукции окислительного стресса 50 мкМ арсенита натрия трансляция Actin-Fluc была практически полностью подавлена вплоть до 2.5 часов, после чего активность частично восстанавливалась (рис. 8, Actin-Fluc, розовая кривая). После добавления арсенита к клеткам, которые уже транслировали эту репортёрную мРНК, мы сначала наблюдали резкое падение трансляции, но примерно через 3 часа она снова была частично восстановлена. Подобный профиль наблюдался также после обработки дитиотреитолом (ДТТ). Указанные временные рамки (2,5-3 часа), по-видимому, свидетельствуют о времени, необходимом для включения механизмов антистрессового ответа и восстановления трансляции после жесткого ингибирования инициации посредством фосфорилирования eIF2 α .

Однако в этих же условиях другая матрица, BQCV-Fluc, демонстрирует колоссальную стимуляцию трансляции в десятки раз через 9-10 часов после индукции стресса. А вот добавление ДТТ хоть и не ингибировало трансляцию BQCV-Fluc, как другие матрицы (Actin-Fluc, EMCV-Fluc), но и не приводило к заметной стимуляции, указывая на возможное нарушение работы других компонентов трансляционного аппарата (факторов элонгации, терминации).

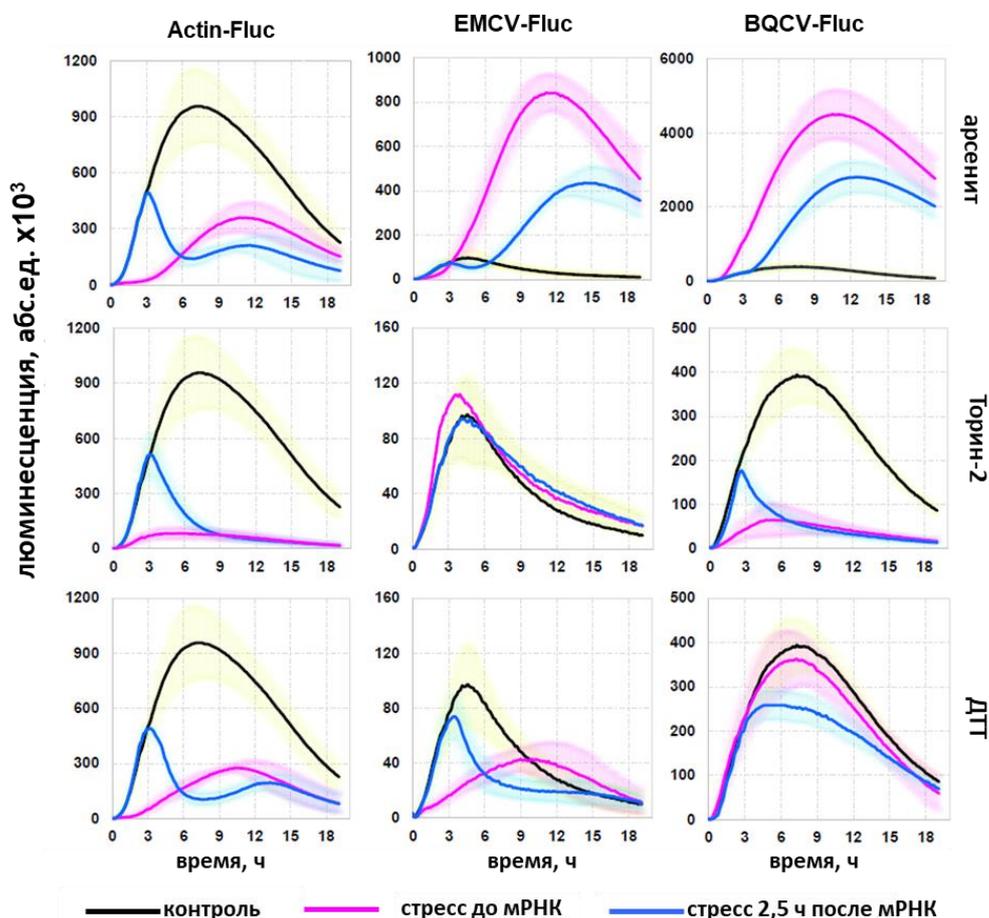


Рис. 8. Длительная динамика трансляции мРНК в стандартных условиях и условиях индуцированных клеточных стрессов. m^7G -этированная мРНК Actin-Fluc и А-этированные мРНК EMCV-Fluc и BQCV-Fluc трансфицировали в клетки HEK293T, Вещества, вызывающие стресс (50 мкМ арсенит; 100 нМ торин-2; 1 мМ ДТТ) добавляли либо за 5 минут до трансфицирующей смеси (розовые кривые), либо через 2,5 ч после трансфекции (синие кривые). Контрольные точки обозначены черным цветом. Затененные области представляют стандартное отклонение.

Неожиданное промежуточное положение между Actin-Fluc и BQCV-Fluc занимает мРНК EMCV-Fluc, трансляция которой в условиях арсенитного стресса сначала сильно ингибируется, аналогично Actin-Fluc, хотя и в меньшей степени, но затем многократно усиливается, подобно BQCV-Fluc (рис. 8, EMCV-Fluc). Эта картина идеально соотносится с концепцией «дуального механизма» трансляции мРНК EMCV, идея которой состоит в переключении трансляции мРНК пикорнавирусов (EMCV) на частичную независимость от eIF2 по мере развития вирусной инфекции. Важно заметить, что в нашем эксперименте вирусной

инфекции не было, а фосфорилирование eIF2 достигалось исключительно индукцией окислительного стресса низкомолекулярным веществом (арсенитом). Таким образом, полученные результаты дают веское основание для пересмотра этой идеи.

На основе наблюдения, что время восстановления трансляции Actin-Fluc совпадает со временем начала стимуляции трансляции EMCV-Fluc, мы предположили, что эта стимуляция, скорее, связана с активацией антистрессового ответа и ассоциирована с белками-участниками этого ответа. Однако детали этого механизма еще предстоит выяснить.

В результате обработки клеток ингибитором mTOR торином-2 (рис. 8), как и в опытах с использованием краткосрочной мРНК-трансфекции, мы наблюдали сильное ингибирование трансляции мРНК Actin-Fluc и BQCV-Fluc и стабильную трансляцию eIF4E-независимой мРНК EMCV-Fluc. К тому же наблюдение динамики трансляции этих мРНК в течение продолжительного времени позволило увидеть, что адаптации к этому виду стресса в клетках не наступает.

Сплайсинг искусственной мРНК в трансфицированных клетках

Метод измерения люминесценции в режиме реального времени позволил нам исследовать еще одно любопытное явление – сплайсинг искусственно синтезированной репортёрной мРНК в пролиферирующих клетках. Метод мРНК-трансфекции подразумевает внедрение в клетку «готовой» мРНК, содержащей необходимые для канонической трансляции элементы – кэп-структуру, 3'-концевой поли(А)-хвост – и не содержащей интронов. Мы задались вопросом: если трансфицировать клетки искусственной мРНК с интроном, будет ли она подвергаться сплайсингу и эффективно транслироваться? Ранее феномен сплайсинга искусственной мРНК в трансфицированных клетках был показан только на модели уникального типа цитоплазматического сплайсинга в нейронах, производимого «минорными» сплайсосомами. Мы показали, что это явление сплайсинга носит гораздо более широкий (возможно, универсальный) характер и происходит независимо от типа клеток.

Для этого мы приготовили репортёрную мРНК, в кодирующую часть которой был введен интрон таким образом, что в отсутствие сплайсинга с данной мРНК не образовывался активный продукт. Однако если трансфицировать такую мРНК в живые клетки, то с задержкой примерно в 1,5 часа в сравнении с контрольной мРНК начинает появляться люциферазная активность (рис. 9). Мы получили сходный результат на разных клеточных линиях, с использованием пары разных репортёрных мРНК, а также различных трансфицирующих реагентов, чтобы исключить возможные артефакты.

Дальнейшее исследование этого явления показало, что репортёрная мРНК попадает в ядро во время митоза, сплайсируется и выходит из ядра для последующей трансляции, а наблюдаемые 1,5 часа характеризуют временные рамки этих событий.

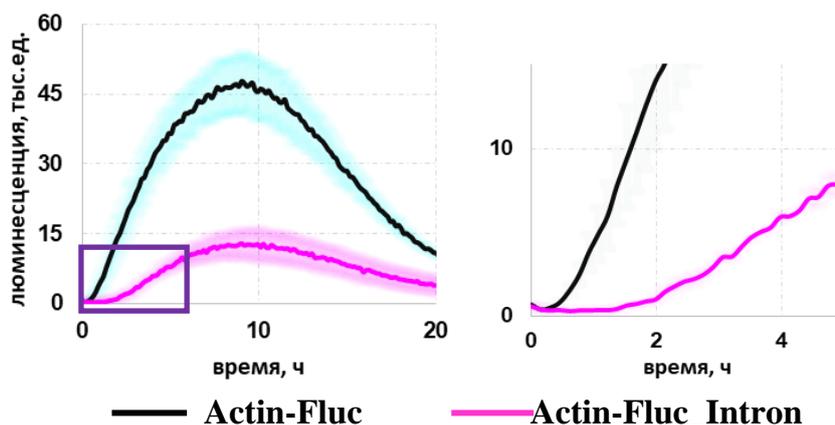


Рис. 9. Трансляция интрон-содержащей мРНК (Actin-Fluc_Intron) и контрольной мРНК (Actin-Fluc) в культивируемых клетках. Равное количество мРНК одновременно добавлялось к клеткам линии HEK293T. Затененные области представляют стандартное отклонение.

Часть II. Регуляция трансляции в пространстве: изучение эффекта локализации на трансляцию репортёрных мРНК

Мы предположили, что искусственная мРНК с интроном, которая претерпевает сплайсинг и, вероятно, ядерный экспорт, может обладать более адекватным репертуаром РНК-связывающих белков и модифицированных нуклеотидов и быть, таким образом, более приближенной физиологически к обычным клеточным мРНК. Сравнение такой мРНК с «обычной» искусственной репортёрной мРНК, не претерпевшей сплайсинг, послужило инструментом, с помощью которого мы попытались выяснить роль «ядерных событий» в регуляции трансляции репортёрных мРНК.

В силу того, что экспрессия репортёрного белка (люциферазы) с интрон-содержащей мРНК происходит с задержкой примерно в полтора часа в сравнении с контрольной мРНК, мы решили синхронизировать по времени именно момент выход продукта, а не момент трансфекции. Для этого мы заранее трансфицировали клетки интрон-содержащей мРНК и примерно к моменту начала экспрессии люциферазы с нее добавляли к другим клеткам контрольную мРНК. На основе этой схемы мы провели эксперименты по моделированию некоторых избранных стрессов, но они не выявили каких-либо значимых различий в трансляционном ответе между мРНК с интроном и без (рис. 10).

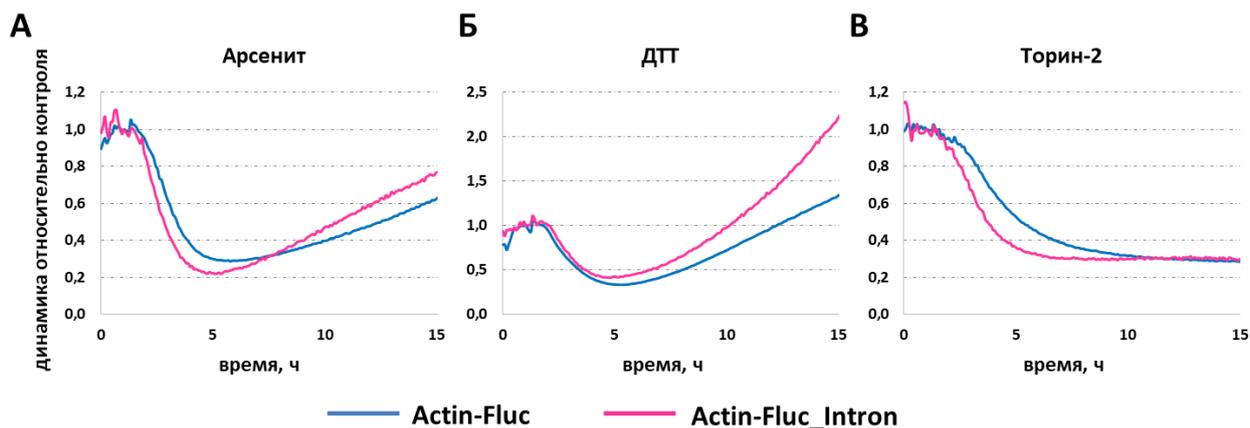


Рис. 10. Динамика трансляционного ответа мРНК с интроном (*Actin-Fluc_Intron*) и без (*Actin-Fluc*) в условиях стрессов. мРНК без интрона трансфицировали через 1,5 часа после мРНК с интроном, индукторы стрессов добавляли еще через 2 часа (активная фаза трансляции) в следующих конечных концентрациях: (А) арсенит 20 μM , (Б) ДТТ 0,5 мМ, (В) торин-2 150 нМ. Показано отношение значений в стрессированных и нормальных клетках для каждой мРНК. Репрезентативные кривые одного из трех опытов.

Дизайн и создание репортёрных конструкций с разной локализацией трансляции мРНК

Помимо исследования эффекта ядерной локализации на трансляцию репортёрной мРНК, мы исследовали эффект непосредственно локализации трансляции мРНК на ее регуляцию. Для этого был разработан ряд оригинальных репортёрных конструкций, представляющих модели трансляции, локализованной в цитоплазме, на мембране эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и внешней мембране митохондрий. Схема одной из конструкций представлена на рис. 11, описание следует далее.

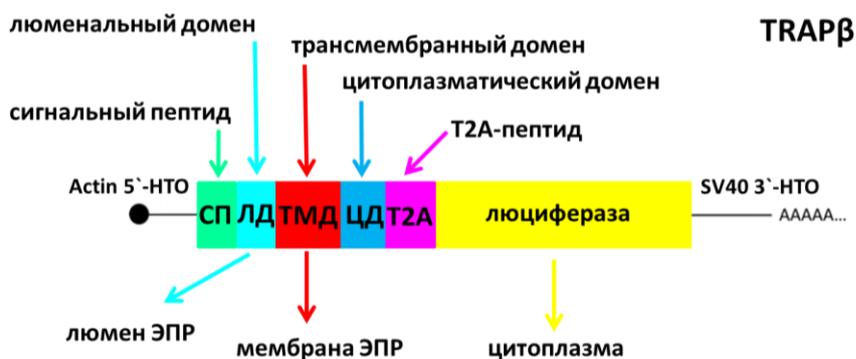


Рис. 11. Схема репортёрной конструкции TRAP β для изучения локализованной трансляции. Описание в тексте.

В качестве элемента с сигнальной последовательностью для одной из люциферазных конструкций (обозначена TRAP β , рис. 11) была выбрана природная последовательность человеческого гена *SSR2*, кодирующего бета-субъединицу транслокон-ассоциированного белка (TRAP β). Это трансмембранный белок ЭПР, имеющий процессируемый сигнальный пептид (СП) и несколько топологических доменов: люменальный (ЛД), трансмембранный (ТМД) и цитоплазматический (ЦД). После ЦД мы добавили последовательности Т2А пептида и люциферазы.

Основой для второй конструкции (обозначена Sec63) стала последовательность гена человеческого белка транслокона Sec63. По аналогии с конструкцией TRAP β , из последовательности этого гена мы взяли кодирующую часть, составляющую короткий N-концевой ЛД, ТМД и частично ЦД. После ТМД и короткого цитоплазматического фрагмента мы вставили последовательности T2A и люциферазы.

Помимо этого, была изготовлена еще одна конструкция – TOM20. По данным литературы, трансляция мРНК TOM20 ассоциирована с мембраной митохондрий. Из природного гена TOM20 были взяты последовательности, кодирующие сигнал адресации в митохондрию (SAM), ТМД, и часть ЦД. Аналогично первым двум конструкциям, после цитозольного домена были вставлены последовательности для T2A-пептида и люциферазы светлячка.

В качестве контрольной была приготовлена конструкция, обозначена CNTR, содержащая T2A-пептид в начале кодирующей части. В результате трансляции этой мРНК образуется люцифераза с аминокислотной последовательностью, идентичной люциферазе из вышеописанных конструкций, однако трансляция такой мРНК происходит на свободных рибосомах в цитозоле.

Принцип работы конструкций TRAP β и Sec63 предполагался следующий: после начала трансляции таких мРНК-конструкций SRP-частица узнает СП или ТМД, выходящие из рибосомного канала, останавливает трансляцию и транспортирует комплексы с рибосомой на транслокон мембраны ЭПР, где трансляция возобновляется, и растущая полипептидная цепь начинает транслоцироваться в люмен или встраиваться в мембрану. Так как модель конструкций предполагает высвобождение продукта в цитозоль, то последовательность T2A-пептида вставлена после трансмембранных доменов и фрагмента домена, экспонируемого в цитозоль. При синтезе T2A-пептида в определённый момент не происходит образования пептидной связи между глицином и пролином, но рибосома продолжает синтез следующей за пептидом люциферазы. Таким образом, рибосома в процессе синтеза будет ассоциирована с мембраной ЭПР, однако люцифераза в итоге высвободится в цитозоль и ее активность можно будет измерить и корректно сравнить с контрольной.

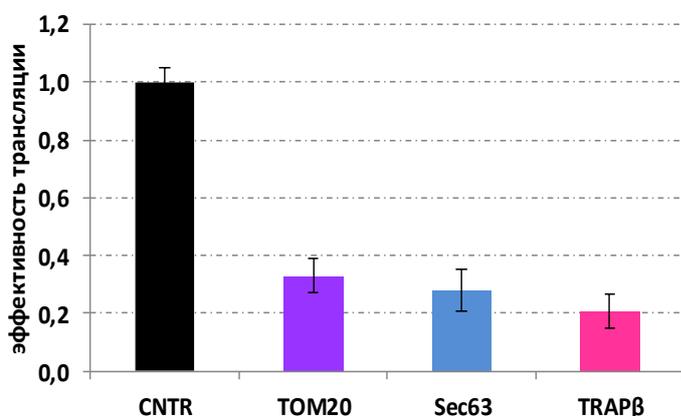
Правильность и эффективность работы наших конструкций и их элементов, в частности, СП/ТМД/SAM и T2A-пептида, мы проверили на примере аналогов, кодирующих вместо люциферазы флуоресцентные белки. Визуализация продуктов трансляции показала их верную ожидаемую локализацию в соответствии с заданными параметрами, что позволяет сделать вывод о корректной работе элементов приготовленных конструкций.

Трансфекция культивируемых клеток люциферазными репортёрами методом FLERT

После проверки наших конструкций, проведенной на примере их флуоресцентных аналогов, были поставлены эксперименты по мРНК-трансфекции

клеток линии НЕК293Т люциферазными репортёрами методом FLERT. В качестве внутреннего контроля и для нормировки с целевыми мРНК мы ко-трансфицировали клетки мРНК, кодирующей люциферазу *Renilla* (*Rluc*).

Несмотря на то, что наши репортёрные мРНК имели разную локализацию, продукт их трансляции, люцифераза, высвобождалась в цитозоль, при этом её последовательность была идентична у всех конструкций. Однако при сравнении абсолютных значений люминесценции (рис. 12) была заметна значительная разница в абсолютной эффективности трансляции конструкций *Sec63*, *TRAPβ*, *TOM20* и контрольной *CNTR* в стандартных условиях. Причина такой разницы не ясна, но она связана именно с разной локализацией мРНК при трансляции.



*Рис. 12. Соотношение относительных значений люминесценции репортёров с разной локализацией трансляции. Значения *Fluc* нормированы на *Rluc* и отнесены к значению *CNTR*.*

При моделировании различных клеточных стрессов (рис. 13), удалось обнаружить дифференциальный эффект некоторых воздействий на трансляцию цитоплазматической и ЭПР-направленных мРНК. В то же время при воздействии рибосомных ингибиторов трансляции (анизомидин, циклогексимид, пурамицин) дифференциального эффекта на трансляцию конструкций *Sec63*, *TRAPβ* и *CNTR* обнаружено не было.

Индукция стресса ЭПР разными способами продемонстрировала относительную устойчивость экспрессии ЭПР-направленных мРНК к данному типу стресса (*TRAPβ* в большей степени, чем *Sec63*). Известно, что в рамках адаптивного ответа на стресс развернутых белков (UPR) мРНК, кодирующие сигнальный пептид или трансмембранный домен, подвергаются частичной деградации по механизму RIDD (regulated IRE1-dependent decay). В соответствии с этим можно было ожидать, что экспрессия *Sec63* и *TRAPβ* будет падать в большей степени, чем контрольная *CNTR*. Однако мы наблюдаем обратный эффект. Чем вызвано повышенная устойчивость трансляции *Sec63* и *TRAPβ*, основываясь на нашем результате, однозначно сказать нельзя, хотя в литературе описаны случаи, когда в условиях стрессов (в частности, при стрессе ЭПР), ЭПР-ассоциированные мРНК получали преимущества в трансляции.

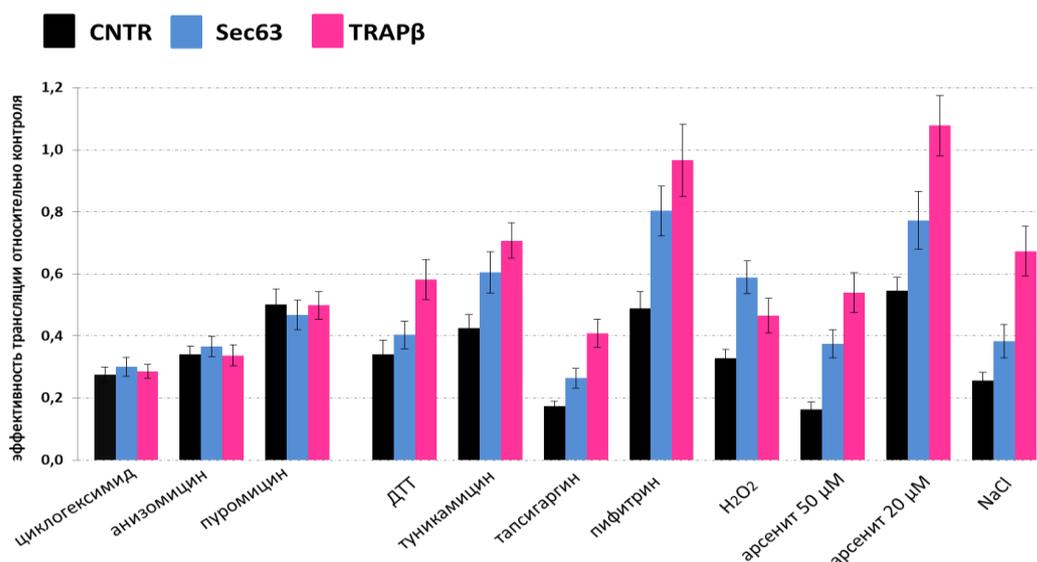


Рис. 13. Анализ трансляции цитозольной (CNTR) и ЭПР-направленных (Sec63, TRAPβ) репортёрных мРНК методом FLERT в условиях стрессов различной природы. Индукторы стресса добавляли за 5 мин до трансфицирующих комплексов в следующих конечных концентрациях: циклогексими́д 0,1 мМ, анизомицин 0,1 мМ, пурамицин 3 μM, ДТТ 0,5 мМ, туникамицин 13 μM, тапсигаргин 300 нМ, пифитрин 40 μM, H₂O₂ 0,5 мМ, асени́т натрия 20 и 50 μM, избыток NaCl 100 мМ. Клетки HEK293T трансфицировали смесью мРНК Fluc и Rluc, лизировали через 2 часа. Абсолютные значения активности Fluc нормированы на значения активности Rluc и отнесены к значениям в контрольной точке, принятой за 1.

Пифитрин-μ – ингибитор шаперонов семейства Hsp70, связывание с растущим пептидом которых происходит неспецифически на выходе его из пептидного рибосомного тоннеля. Ингибирование шаперонов пифитрином менее заметным образом сказывается на трансляции ЭПР-направленных мРНК, видимо, по причине конкурентного связывания новосинтезированных N-концевых СП или ТМД, выходящих из рибосомного канала, с SRP-частицей.

В результате обработки клеток асени́том натрия, экспрессия Sec63 и TRAPβ остается в несколько раз более устойчивой, чем CNTR. Асени́т – классический индуктор образования стресс-гранул, образующихся в клетке в большинстве случаев в результате фосфорилирования eIF2α. Свидетельства того, что ЭПР-связанные мРНК преимущественно не уходят в стресс-гранулы при асени́тном стрессе, хорошо согласуется с нашим результатом. На основании этого же свидетельства мы предполагаем механизм устойчивой трансляции Sec63 и TRAPβ в условиях гиперосмотического стресса, при котором индуцируется образование стресс-гранул в такой же высокой степени, как и при асени́те.

Трансфекция митохондриально-направленной конструкции TOM20 в условиях стрессов, в том числе митохондриальных (миксотиазол, динитрофенол, пиерицидин, и др.), не выявила никаких значимых отличий в трансляции от цитозольной мРНК CNTR (рис. 14).

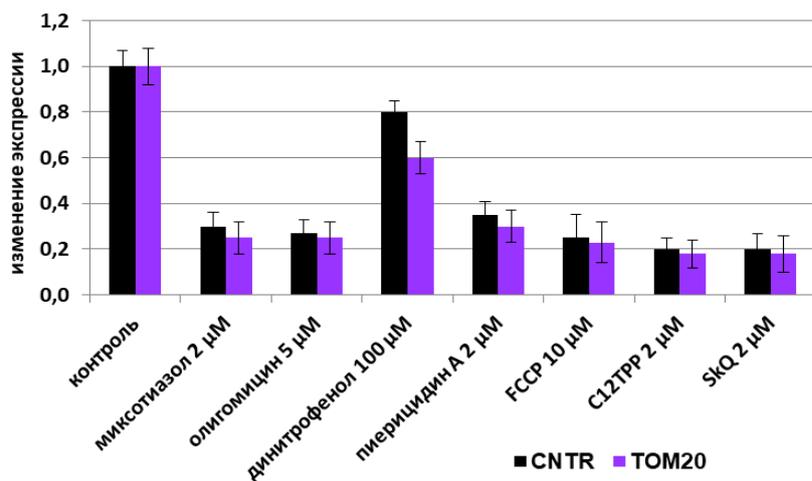


Рис. 14. Анализ экспрессии мРНК TOM20-Fluc и CNTR в культивируемых клетках в условиях митохондриальных стрессов методом FLERT. Абсолютные значения активности Fluc нормированы на значения активности Fluc и отнесены к значениям в контрольной точке, принятой за 1.

Исследование трансляции локализованных репортёров в динамике

На основании предыдущих результатов (рис. 13) мы отобрали несколько стрессов, которые давали дифференциальный эффект на трансляцию Sec63/TRAPβ и CNTR, и проследили динамику этого эффекта во времени (рис. 15).

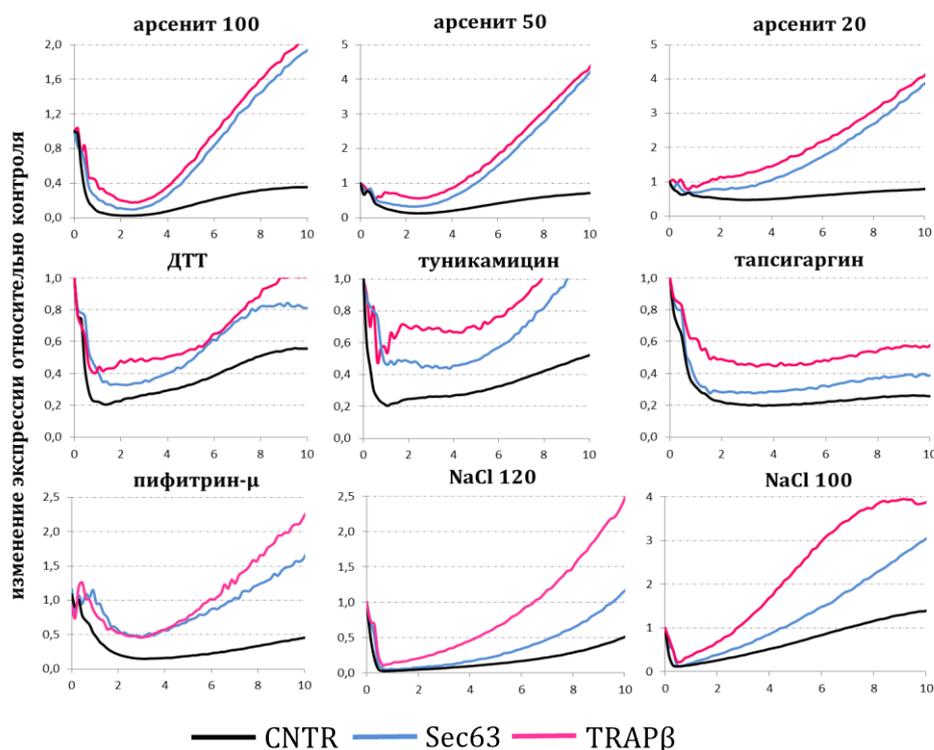


Рис. 15. Динамика экспрессии ЭПР-направленных мРНК (Sec63, TRAPβ) и контрольной цитоплазматической мРНК (CNTR) в условиях стрессов в клетках HEK293T. Индукторы стресса добавляли за 5 мин до трансфицирующей смеси в следующих конечных концентрациях: ДТТ 1 мМ, туникамицин 15 мМ, тапсигаргин 300 нМ, пифитрин-μ 40 мкМ, арсенит натрия 20, 50 и 100 мкМ, избыток NaCl 100 мМ. Измерение люминесценции проводили в режиме реального времени. Абсолютные значения активности Fluc при стрессе отнесены к значениям в стандартных условиях, принятых за 1.

В динамике дифференциальный эффект также сохраняется, в большей степени для мРНК TRAP β , а на более длительных временах в случае некоторых стрессов (арсенит, NaCl) разница значительно возрастает – для большей наглядности абсолютные результаты с NaCl и арсенитом для конструкций CNTR и TRAP β вынесены в отдельный рисунок (рис. 16).

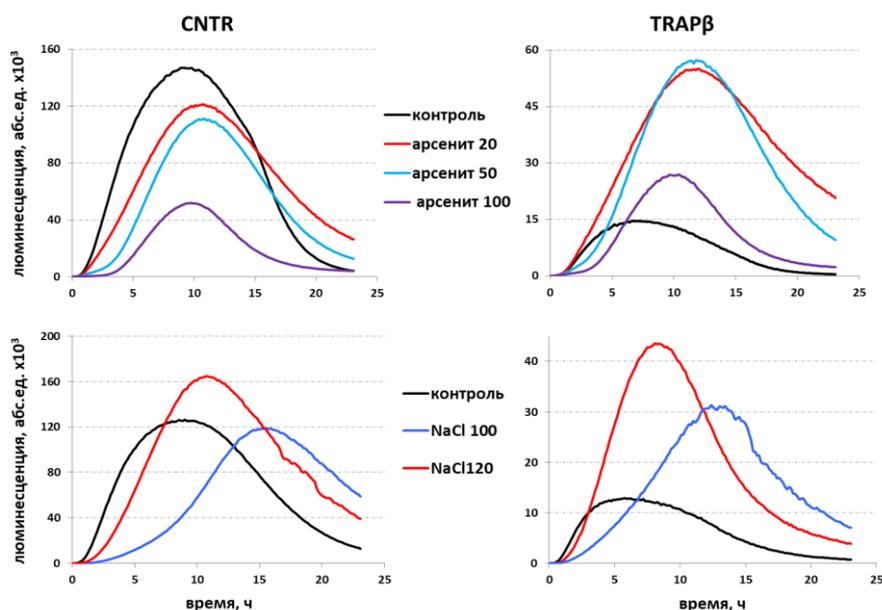


Рис. 16. Длительная динамика экспрессии мРНК TRAP β и CNTR в условиях арсенитного (сверху) и гиперосмотического (снизу) стрессов в клетках HEK293T. Абсолютные значения люминесценции. Репрезентативные кривые.

Тем не менее, можно заметить (рис. 16), что кривые накопления люциферазы, полученные в условиях стресса, похожи у CNTR и TRAP β , в то время как вид контрольных кривых для этих двух мРНК отличается (помимо разницы в абсолютных значениях, кривая трансляции TRAP β начинает загибаться на несколько часов раньше – примерно после 6 часов, а не 9, как CNTR). Поскольку мы пока не знаем, с чем связана эта разница в экспрессии двух репортёрных мРНК в нормальных условиях, сложно сделать какой-либо вывод о том, чем вызвано дифференциальное воздействие стресса на эти мРНК. Возможно, речь идёт о стабилизации мРНК TRAP β -Fluc, которая в обычных условиях нестабильна, либо о снятии некоего эффекта «замалчивания».

Подводя итог, можно сказать, что результаты, полученные с мРНК Sec63-Fluc и в особенности с TRAP β -Fluc, выглядят очень интригующе и больше склоняют к гипотезе о компартмент-зависимой регуляции трансляции, по крайней мере, на примере цитозоля и мембраны ЭПР. Однако дифференциальный эффект в уровне продукции люциферазы в условиях стрессов может быть вызван не столько различиями в регуляции трансляции этих мРНК, сколько разницей в характере их экспрессии в нормальных условиях. Но эта тема требует отдельного изучения.

ВЫВОДЫ

1. Безлидерная мРНК демонстрирует устойчивую трансляцию в живых клетках млекопитающих в условиях стрессов, вызывающих инактивацию eIF4E и eIF2, а также при обработке некоторыми рибосомными ингибиторами, что подтверждает возможность использования ею неканонических путей инициации трансляции *in vivo*.
2. Трансляция, направляемая IRES-элементом вируса CrPV, подавляется при обработке клеток ингибитором киназы mTOR и пероксидом водорода, в то время как трансляция мРНК с IRES-элементами EMCV и HCV устойчива к этим видам воздействий на клетку.
3. В условиях арсенитного стресса, приводящего к фосфорилированию фактора eIF2, экспрессия репортёрной мРНК с IRES-элементом вируса EMCV многократно усиливается по мере разворачивания антистрессового ответа.
4. Экспрессия репортёрных мРНК, локализованных на мембране эндоплазматического ретикулаума, более устойчива к некоторым стрессовым воздействиям, чем экспрессия контрольной мРНК, транслируемой свободными рибосомами в цитозоле.
5. Моделирование митохондриальных стрессов не выявило различий в трансляционном ответе между репортёрной мРНК, транслируемой в цитозоле, и мРНК, трансляция которой происходит на мембране митохондрий.
6. Синтезированная *in vitro* искусственная мРНК, содержащая интрон, при трансфекции в активно пролиферирующие клетки подвергается сплайсингу и эффективно транслируется; не выявлена разница в трансляционном ответе на стресс между обычной трансфицированной мРНК и мРНК, претерпевшей сплайсинг.
7. Амикумацин А и бластицидин S ингибируют трансляцию в эукариотической системе на стадии элонгации.

Список публикаций по теме диссертации

1. Prokhorova I.V., **Akulich K.A.**, Makeeva D.S., Osterman I.A., Skvortsov .A., Sergiev P.V., Dontsova .A., Yusupova G., Yusupov M.M., Dmitriev S.E. Amicoumacin A induces cancer cell death by targeting the eukaryotic ribosome // Scientific reports. 2016. V. 6. P. 27720. IF₂₀₁₉ (Web of Science) = 3.998.
2. **Akulich K.A.**, Andreev D.E., Terenin I.M., Smirnova V.V., Anisimova A.S., Makeeva D.S., Arkhipova V.I., Stolboushkina E.A., Garber M.B., Prokofjeva M.M., Spirin P.V., Prassolov V.S., Shatsky I.N., Dmitriev S.E. Four translation initiation pathways employed by the leaderless mRNA in eukaryotes // Scientific reports. 2016. V. 6. P. 37905. IF₂₀₁₉ (Web of Science) = 3.998.
3. **Lashkevich K.A.**, Shlyk V.I., Kushchenko A.S., Gladyshev V.N., Alkalaeva E.Z. and Dmitriev S.E. CTELS: a cell-free system for the analysis of translation termination rate // Biomolecules. 2020. V. 10 (6). P. 911. IF₂₀₁₉ (Web of Science) = 4.082.