

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА**

*На правах рукописи*

Смирнова Виктория Владимировна  
**Изучение функции белка DAP5 в трансляции**

03.01.03 – Молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Москва 2022**

Работа выполнена в лаборатории регуляции синтеза белка отдела химии и биохимии нуклеопротеидов Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова.

**Научные руководители:** *Шатский Иван Николаевич, доктор химических наук, доцент*

*Теренин Илья Михайлович, кандидат химических наук*

**Официальные оппоненты:** *Сергиев Петр Владимирович, доктор химических наук, профессор кафедры химии природных соединений Химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»*

*Малыгин Алексей Аркадьевич, доктор химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник Лаборатории структуры и функции рибосом ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук»*

*Алкалаева Елена Зиновьевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий Лабораторией механизмов и контроля трансляции ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук»*

Защита диссертации состоится «02» июня 2022 г. в 14 часов 30 минут 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](mailto: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/445376502/>

Автореферат разослан «\_\_» апреля 2022 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук



Т.В. Комарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Трансляция полипептидов с матричной РНК является одним из важнейших и древнейших процессов, необходимых для жизни клетки. Регуляция трансляции сопутствует таким важным событиям, как дифференцировка, рост, движение, апоптоз и другие. Изучение любого аспекта трансляции одновременно вносит вклад в фундаментальную науку и расширяет возможности поиска средств лечения различных заболеваний, в особенности раковых, так как сильно повышенный уровень трансляции является характерным для раковых клеток.

Фактор инициации трансляции DAP5 (известный также как eIF4G2, Nat1 и p97) был открыт 25 лет назад, однако ни его функции в клетке, ни механизм его работы до сих пор не ясны. К настоящему времени опубликовано более 50 работ, в которых представлены различные экспериментальные данные о DAP5, но они не только не складываются в единую картину, но и зачастую противоречат друг другу. Кроме того, значительная часть этих исследований посвящена изучению возможного участия DAP5 во внутренней инициации трансляции, но в последние годы стало понятно, что стандартная методология их изучения не вполне корректна и приводит к артефактам.

### Цель работы

Цель данной работы – изучение функции белка DAP5 в инициации трансляции: поиск неизвестных ранее аспектов работы этого фактора и проверка некоторых уже опубликованных данных.

### Поставленные задачи:

1. Идентификация мРНК, трансляция которых зависит от DAP5, посредством рибосомного профайлинга клеток, лишённых DAP5 путём генетического нокаута либо транзientной РНК-интерференции.
2. Верификация обнаруженных и некоторых известных ранее мРНК-мишеней методом РНК-трансфекции соответствующих репортерных конструкций.
3. Изучение взаимодействия eIF4G1 и DAP5 в инициации трансляции.
4. Исследование влияния белка PCBP2 на трансляцию мРНК DAP5 в клетке.

## Научная новизна и практическая значимость работы

В рамках данной работы были идентифицированы и подтверждены новые мРНК-мишени DAP5. Кроме того, с помощью корректного метода РНК-трансфекции были подтверждены некоторые ранее опубликованные мишени.

Впервые исследован вопрос взаимодействия DAP5 и eIF4G1 в кэп-зависимой инициации трансляции в противовес рассматриваемой в большинстве работ роли DAP5 в альтернативных механизмах.

Показана неизвестная ранее взаимная регуляция трансляции DAP5 и PCBP2, исследована DAP5-зависимость различных вариантов транскрипта BCL-2.

## Положения, выносимые на защиту

1. С помощью рибосомного профайлинга обнаружены новые мРНК-мишени DAP5.
2. Валидированы мишени Pcbp2, Map3k3, Maf1, Stard7, CCNI, PPFIA4, CES2.
3. Подтверждена DAP5-зависимость трансляции APAF-1 и нескольких вариантов транскрипта BCL-2.
4. DAP5 участвует в кэп-зависимой инициации трансляции.
5. DAP5 и eIF4G1 частично взаимозаменяемы.
6. PCBP2 и DAP5 регулируют друг друга, образуя систему с отрицательной обратной связью.

## Методология исследования

Основные методы данной работы: рибосомный профайлинг, позволяющий определить трансляционные мишени DAP5, и метод трансфекции репортерных мРНК, служащий для подтверждения мишеней и дальнейшего изучения их трансляции. Для деплеции изучаемого белка в клетках использовались РНК-интерференция или CRISPR-опосредованный нокаут, эффективность деплеции оценивалась по Вестерн блоту. Для получения репортерных мРНК использовались методы молекулярного клонирования и *in vitro* транскрипции. Рекомбинантный PCBP2 экспрессировали в *E. coli* и очищали методом афинной хроматографии. *In vitro* трансляция проводилась в экстракте S30 асцитной карциномы Кребс-2.

## Личный вклад соискателя

Личный вклад соискателя состоит в анализе литературы, планировании и проведении экспериментов, обработке и анализе полученных данных и подготовке публикаций. Основные результаты, представленные в данной работе, получены самим автором. И. Теренин, Е. Шестакова и Д. Бикметов участвовали в изготовлении генетических конструкций и выполняли отдельные повторности некоторых трансфекций. И. Остерман и А. Чугунова получили нокаут DAP5 в клетках NIH/3T3. Т. Зацепин и Т. Приказчикова выполняли подбор и синтез формулированных киРНК. М. Логачёва секвенировала подготовленные нами библиотеки для рибосомного профайлинга, И. Кулаковский и Д. Ногина проводили биоинформатический анализ результатов секвенирования.

## Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов, представленных в данной работе, обусловлена использованием современных методов исследования со всеми необходимыми контролями и подтверждается их воспроизводимостью (несколько биологических повторностей в разных биологических моделях) и согласованностью данных, полученных разными методами.

По теме диссертационной работы было опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в международных системах цитирования и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология».

## Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 79 страницах и включает следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы, Список литературы. Диссертация содержит 21 рисунок и 5 таблиц. Список литературы включает 127 источников.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Инициация трансляции – лимитирующая и наиболее регулируемая стадия биосинтеза белка. Кэп-зависимый механизм инициации с участием каркасного белка eIF4G1 является наиболее изученным и считается основным в эукариотической клетке. Тем не менее, некоторые данные о трансляции не вписываются в классическую модель. По всей видимости, существуют либо неизвестные пока аспекты этой модели, либо альтернативные механизмы инициации.

DAP5 - белок, открытый 25 лет назад, очевидно является фактором инициации трансляции, но его место в ней до сих пор не определено. DAP5 гомологичен фрагменту канонического фактора инициации eIF4G1, и теоретически мог бы как подменять его в классической инициации, так и независимо участвовать в альтернативной. Согласно одним данным, он стимулирует кэп-зависимую инициацию, согласно другим – кэп-независимую. В разных исследованиях показано участие DAP5 в процессах дифференцировки и апоптоза, а также в трансляции отдельных мРНК. В данной работе мы хотели продвинуться в понимании роли DAP5 в инициации трансляции.

### Рибосомный профайлинг

#### Метод рибосомного профайлинга

Новый метод изучения трансляции в полногеномном масштабе предложил Nicholas Ingolia. В основе метода рибосомного профайлинга лежит определение активно транскрибирующихся областей за счет глубокого секвенирования защищенных рибосомой фрагментов мРНК (Ribosome Protected Fragments, RPFs, также называемые «отпечатками» (футпринты - footprints)). Для получения футпринтов лизат клеток, в которых рибосомы «заморожены» на мРНК различными антибиотиками, обрабатывают рибонуклеазой, выделяют защищенные от расщепления RPFs из рибосомной фракции лизата, на основе этих фрагментов РНК готовят библиотеки кДНК и секвенируют их методами следующего поколения (Next Generation Sequencing, NGS) (Рис. 1(A)).

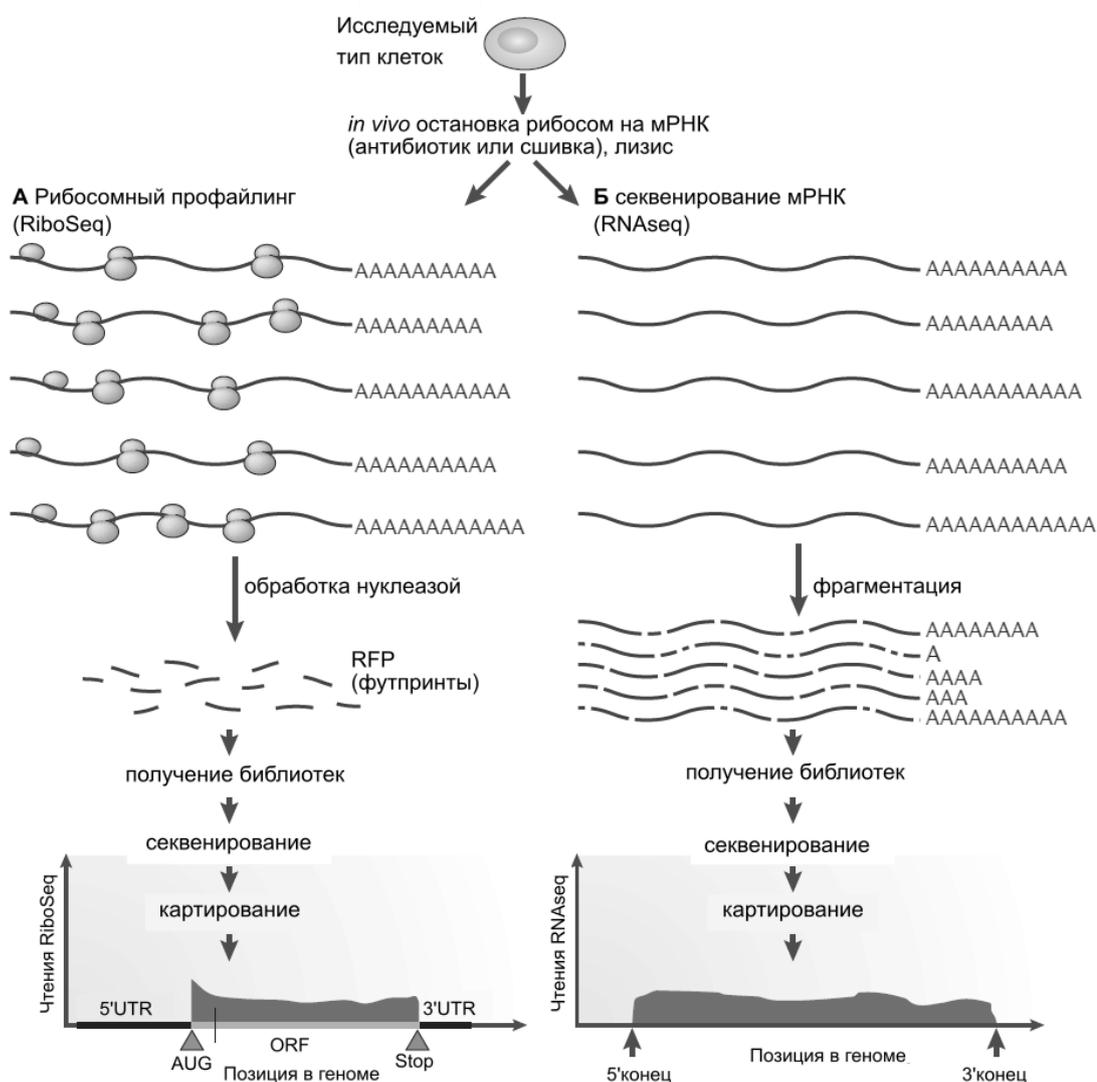


Рис. 1. Схема метода рибосомного профайлинга. Объяснения см. в тексте. Адаптировано из Brar и Weissman (2015)

Оценка эффективности трансляции требует нормировки количества транслируемых молекул мРНК на общее количество молекул мРНК, поэтому необходимо также секвенировать общий пул клеточной матричной РНК, которая, для большей корректности сравнения, фрагментируется, и секвенируются фрагменты, совпадающие по длине с RPF (Рис. 1(Б)). Прочитанные фрагменты (чтения) картируются на геном или транскриптом, и полученные результаты можно визуализировать в виде плотности покрытия участка генома чтениями. Статистическая обработка количественных результатов картирования позволяет сравнивать эффективности трансляции отдельных генов, оценивать изменение трансляционного профиля в ходе различных событий в клетке (стресс, дифференцировка, ответ на различные воздействия и др.), определять новые и уточнять известные открытые рамки считывания и многое другое.

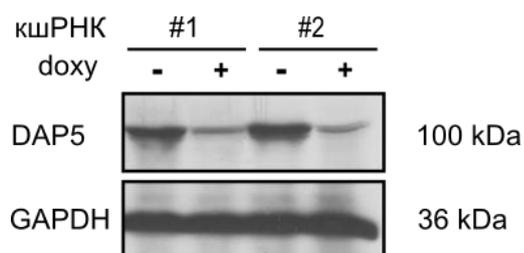
В ходе нашего исследования мы применили метод рибосомного профайлинга для выявления мРНК, в трансляции которых принимает участие DAP5 («мишени DAP5»). Для этого мы использовали клеточные линии, отличающиеся уровнем экспрессии DAP5, и анализировали дифференциальную экспрессию генов в этих линиях с помощью рибосомного профайлинга. Для каждой клеточной линии были получены данные по экспрессии мРНК в клетке («RNA-seq», результаты секвенирования фрагментированной общей клеточной РНК) и по трансляции мРНК («Ribo-seq», результаты секвенирования защищенных рибосомой фрагментов). Обработку результатов секвенирования проводила группа под руководством И. Кулаковского.

#### Поиск мишеней DAP5 в клетках 293Т

Для первого рибосомного профайлинга мы выбрали созданные нами линии клеток 293Т с индуцируемым нокдауном DAP5. Использовались две клеточных линии, отличающиеся экспрессируемой короткой шпилечной РНК (кшРНК) к мРНК DAP5, что позволяет получить более достоверные результаты – профайлинг двух линий дает одновременно две повторности и возможность исключить эффект неспецифического действия кшРНК. Таким образом в результате профайлинга было получено 4 набора данных, по 2 для каждой клеточной линии: контрольный и при индукции нокдауна DAP5. Индукция нокдауна была подтверждена с помощью вестерн-блота: количество DAP5 в индуцированных клетках по сравнению с контрольными снизилось в 5-7 раз (Рис. 2). Данные профайлинга подтвердили эффективность нокдауна: экспрессия DAP5 на уровне мРНК упала в 3 раза, на уровне трансляции – в 6-7 раз.

Статистическая обработка результатов RNA-seq не выявила мРНК, количество которых значительно изменялось бы при нокдауне DAP5 (кроме, конечно, мРНК самого DAP5).

Такой результат является вполне закономерным, так как мы ожидаем участие DAP5



*Рис. 2. Индуцируемый нокдаун DAP5 в линиях клеток 293Т, использовавшихся для рибосомного профайлинга. Нокдаун (экспрессию кшРНК) индуцировали добавлением доксициклина до 100 нг/мл на 48 часов.*

в трансляции, а не в транскрипции. Анализ дифференциальной экспрессии выявил 23 гена, эффективность трансляции которых значимо снижалась, и 15 генов, эффективность трансляции которых значимо повышалась при нокадауне DAP5 в обеих клеточных линиях (Табл. 1).

А				Б					
мПНК	FC	мПНК	FC	мПНК	3Т3	mES	мПНК	3Т3	mES
MTRNR2L1	0.37	POLR2L	1.49	Agap1	0.67	0.5	Mib1	0.66	0.62
UHMK1	0.42	TMSB10	1.49	Alkbh5	0.65	0.66	Msi1	0.65	0.5
<b>PPFIA4</b>	0.45	MIB2	1.51	Ankib1	0.67	0.6	Mprip	0.59	0.44
EPB41L4A	0.47	SLC25A23	1.52	Arhgap35	0.67	0.64	Nme2	1.7	0.72
RIMS3	0.49	RPL41	1.54	Bcr	0.64	0.44	Nlk	0.66	0.72
SLC7A11	0.55	TMA7	1.54	Bdp1	0.66	0.68	<b>Pcbp2</b>	0.63	0.57
<b>CES2</b>	0.57	PHLDA3	1.56	Cdr2l	0.66	0.91	Pcgf2	0.64	0.57
LRP3	0.57	LIMK1	1.56	Cmip	0.63	0.71	Pdzd4	0.52	0.73
VPS54	0.58	C17orf89	1.56	Crebbp	0.7	0.46	Plekha3	0.58	0.68
KLHL2	0.59	GOLGA1	1.65	Dact3	0.58	0.67	Ppp2r5a	0.52	0.55
RPS6KA2	0.6	TP53I3	1.72	Dennd5a	0.7	0.73	Prdm4	0.57	0.71
SLC30A5	0.63	BTG2	1.72	Dgkz	0.67	0.73	Raf1	0.62	0.64
DENND5A	0.63	CYB5D2	1.79	Dicer1	0.67	0.72	RbmX	0.58	0.63
C6orf62	0.64	SMOX	1.89	Fnip2	0.64	0.7	Rfx7	0.64	0.61
MLXIPL	0.64	LRRC24	2.1	Gas2l1	0.63	0.88	Sh3bp5l	0.56	0.73
<b>TNRC6C</b>	0.64			Hipk1	0.69	0.51	Sos1	0.66	0.41
ATF3	0.64			Hipk3	0.67	0.87	Srf	0.63	0.71
PTAR1	0.66			Jak2	0.58	0.62	<b>Stard7</b>	0.72	0.7
UHRF1BP1	0.66			<b>Maf1</b>	0.63	0.56	Tet3	1.37	0.66
<b>CCNI</b>	0.66			<b>Map3k3</b>	0.64	0.46	Thbs1	1.64	1.45
EHD3	0.66			Mark3	0.67	0.45	Ulk2	0.53	0.55
PANK3	0.66			Mast2	0.56	0.62	Usp31	0.67	0.6
<b>ARRDC4</b>	0.67			Mbp	0.19	0.53	Ust	0.54	0.16
				Med13	0.71	0.53	Zcchc14	0.64	0.55
				Med13l	0.66	0.58	Zdhhc3	0.66	0.69

Табл. 1 (А) Гены, эффективность трансляции которых значимо ( $p$ -value<0.001) изменяется в клетках 293Т с индуцируемым нокадауном DAP5 согласно результатам рибосомного профайлинга (FC (Fold Change) – кратное изменение эффективности трансляции после индукции нокадауна). (Б) Гены, эффективность трансляции которых значимо ( $p$ -value<0.001) изменяется в клетках NIH3Т3 (наши результаты) и mES (Sugiyama et al.(2017)) при нокауте DAP5 согласно результатам рибосомного профайлинга (указано кратное изменение эффективности трансляции в клетках с нокаутом по сравнению с клетками дикого типа). Отмечены эффекты, значительно различающиеся по результатам двух исследований.

Выделены названия генов, отобранных нами для дальнейшей валидации.

Как видно из таблицы 1 (А), в основном эффект нокадауна на трансляцию не превышает 2 раз. Возможно, более значительные эффекты невозможно отследить в нашем опыте из-за недостаточной глубины секвенирования – на ген изначально или после подавления трансляции из-за нокадауна приходится слишком мало

картированных футпринтов, недостаточно для статистически значимых выводов. Тем не менее, данные рибосомного профайлинга позволили нам выделить несколько генов, чья трансляция с большой вероятностью зависит от присутствия в клетке DAP5 – мы называем такие гены мишенями DAP5. Необходимо, однако, использовать и другие методы для доказательства того, что трансляция мРНК этих генов напрямую зависит от DAP5 и обнаруженные с помощью профайлинга эффекты не являются вторичными или неспецифичными.

#### Поиск мишеней DAP5 в клетках NIH3T3

Результаты вышеописанного рибосомного профайлинга клеток с индуцируемым нокаутом DAP5 позволили определить статистически значимый эффект на трансляцию некоторых генов, однако для определения функции DAP5 хотелось получить более заметный масштабный эффект деплеции DAP5. Мы предположили, что при нокауте остается достаточное для поддержания физиологического уровня трансляции количество DAP5, поэтому необходимо использовать клетки, в которых DAP5 не экспрессируется вообще. Второй рибосомный профайлинг был проведен нами на двух линиях клеток NIH3T3 – дикого типа и с нокаутом DAP5. Нокаутная линия для наших нужд была выведена в лаборатории Донцовой О.А. с помощью CRISPR-системы. Нокаут DAP5 подтвержден вестерн-блотом (Рис. 4(Г)) и секвенированием, кроме того, отсутствие трансляции нормального DAP5 видно в профайлинге. Мы планировали выполнить рибосомный профайлинг как минимум в двух повторностях, однако достаточным для анализа качеством обладали библиотеки, полученные в результате только одного из повторений эксперимента. Кроме того, результаты повтора эксперимента, который по стечению обстоятельств был проведен значительно позже, плохо согласовались с результатами первого, что можно объяснить адаптацией клеток к нокауту. Тем не менее, результаты этого рибосомного профайлинга могут служить источником генов-кандидатов, чья DAP5-зависимость требует проверки другими методами.

Дополнительным контролем результатов нашего профайлинга могут служить результаты рибосомного профайлинга эмбриональных стволовых клеток мышей (mES) – дикого типа и с нокаутом DAP5 – полученные Sugiyama et al. (2017). Сравнение влияния нокаута DAP5 на эффективность трансляции некоторых мРНК в

клетках NIH3T3 и mES представлено в табл. 1. Как и в нашем профайлинге на линии 293T, эффект нокаута на трансляцию не превышает двух раз, что также может объясняться адаптацией клеточной линии к постоянной деплеции DAP5.

#### Подтверждение обнаруженных мишеней DAP5

С помощью рибосомного профайлинга мы смогли составить список кандидатов в мишени DAP5 (Табл. 1). Анализ этих генов инструментом PANTHER проекта Gene Ontology – классификация генов и поиск перепредставленных свойств (выполняемых генами функций или процессов, в которых они задействованы), - не выявил существенного функционального родства мишеней. 5' нетранслируемые области соответствующих мРНК также как кажется не объединены общими свойствами: они имеют различную длину, GC-состав, могут содержать или не содержать короткие рамки считывания. Из списка мы выбрали несколько генов для подтверждения их DAP5-зависимости: 5 генов человека (CCNI (циклин), PPFIA4 (тирозинфосфатаза), CES2 (карбоксилэстераза), ARRDC4 (участвует в убиквитинилировании), TNRC6C (участвует в миРНК-зависимой регуляции)), и 4 гена мыши (Pcbr2 (распространенный РНК-связывающий белок), Map3k3 (серин/треониновая киназа, участвует в регуляторных каскадах), Maf1 (репрессор РНК-полимеразы III) и Stard7 (переносчик фосфатидилхолина)).

Для проверки зависимости трансляции генов-кандидатов от DAP5 мы использовали трансфекцию репортерных мРНК в клетки дикого типа и с деплецией DAP5. Мы создали репортерные ДНК-конструкции, включающие в себя 5'UTR предполагаемых мишеней перед ORF люциферазы с 3'UTR SV40. Путем ПЦР этих конструкций получали матрицы для *in vitro* транскрипции экпированных полиаденилированных (A<sub>50</sub>) мРНК. Репортерные мРНК доставлялись в клетки путем липофекции, и на основе измерений люциферазной активности (через 3 часа после трансфекции) делался вывод об эффективности трансляции мРНК с такими 5'UTR. Для нормировки в транскрипционной смеси помимо опытной репортерной мРНК присутствовала контрольная референсная, кодирующая отличный тип люциферазы под 5'UTR β-глобина (в молярном соотношении 1:10 к опытной).

Метод РНК-трансфекции репортёров лучше всего подходит для изучения особенностей трансляции мРНК с определенным 5'UTR. ДНК-трансфекция,

несмотря на простоту и удобство метода, обладает рядом недостатков. Главной проблемой является невозможность гарантировать синтез мРНК исключительно в конфигурации, задуманной исследователем. Криптические промоторы, альтернативный сплайсинг и альтернативное полиаденилирование – частые причины появления aberrантных транскриптов. Даже если таких транскриптов заметно меньше, чем правильных, их вклад в трансляцию может быть весьма значителен. Еще одно преимущество РНК-трансфекции – кратковременность. От трансфекции до измерения люминисценции проходит всего несколько часов, что позволяет снизить влияние вторичных эффектов, связанных с транскрипцией, сплайсингом и транспортом мРНК.

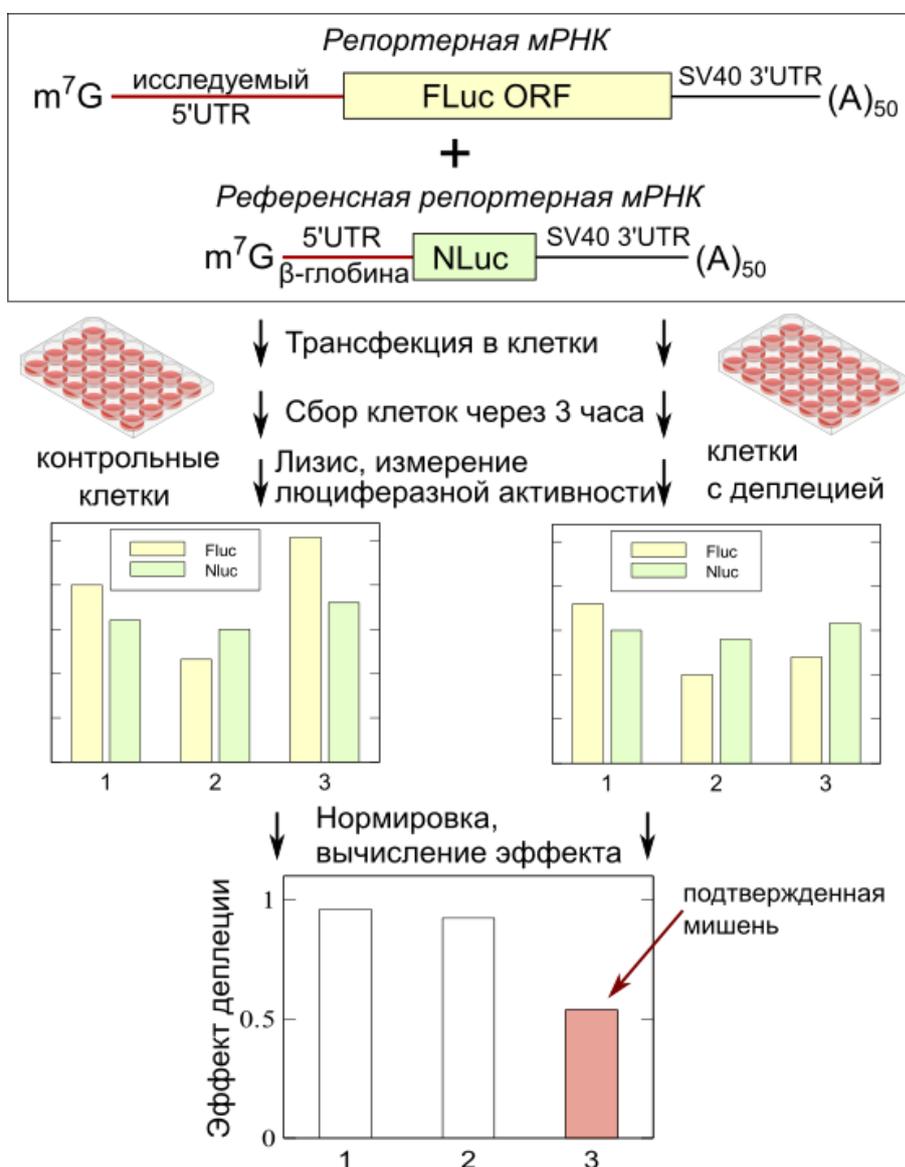


Рис. 3. Схема репортерных конструкций и подтверждения DAP5-зависимости мишеней методом РНК-трансфекции (объяснение см. в тексте)

Мы клонировали 5'UTR мРНК перечисленных выше генов-кандидатов и самого DAP5 и генов, которые, как утверждалось в опубликованных к тому времени работах, были DAP5-зависимыми: APAF1, BCL-2 (в нашем профайлинге покрытие этих генов чтениями слишком мало). В качестве контроля использовались 5'UTR мРНК  $\beta$ -глобина и  $\beta$ -актина. Из-за слабой эффективности трансляции для репортеров ARRDC4, TNRC6C, CES2, CCNI и PPFIA4 в качестве репортёрного гена использовалась более ярко светящая нанолюцифераза (Nano, NLuc), для остальных – люциферазы светлячка (Firefly, Fluc). Измеренная в лизате клеток активность люциферазы исследуемого репортера нормировалась на активность люциферазы контрольного (референсного) репортера. Количественный эффект деплеции DAP5 определялся как отношение нормированных значений, полученных в деплетированных клетках, к значениям из контрольных клеток (схемы репортерных мРНК и всего эксперимента представлены на Рис. 3).

Трансфекция проводилась в клетки NIH/3T3, дикого типа и нокаутные по DAP5 (те же, что использовались для профайлинга), и в клетки 293T, контрольные и с нокадауном DAP5 (нокадаун достигался путем РНК-интерференции). В обоих типах клеток деплеция DAP5 практически не влияла на эффективность трансляции референсной репортерной мРНК (с 5'UTR  $\beta$ -глобина). Для снижения вероятности неспецифических эффектов РНК-интерференции использовались две различные киРНК к разным областям мРНК DAP5, но достигаемая с их помощью степень деплеции DAP5 (в 10-20 раз, Рис. 4(B)) и её эффект на трансляцию репортеров были практически одинаковыми, поэтому полученные в результате использования двух киРНК данные были объединены для удобства восприятия.

Большая часть репортеров с 5'UTR генов-кандидатов (Pcbp2, Map3k3, Maf1, Stard7, CCNI, PPFIA4, CES2, APAF1, BCL-2) продемонстрировали значительную зависимость от присутствия DAP5: эффективность их трансляции значительно снижалась в клетках с нокадауном/нокаутом DAP5 по сравнению с контрольными (в среднем в 2-3 раза) (Рис. 4(A, Б)). Тем не менее, на трансляцию некоторых репортеров (DAP5 и кандидаты в мишени ARRDC4, TNRC6C) заметного эффекта не наблюдалось, как и в случае с контрольными мРНК ( $\beta$ -глобин,  $\beta$ -актин). Возможно, DAP5 регулирует трансляцию ARRDC4 и TNRC6C не через 5'UTR, или механизм регуляции не

воспроизводится при трансфекции репортеров, или профайлинг отражает для этих генов вторичные или случайные эффекты, не имеющие отношения к непосредственному взаимодействию DAP5 и мРНК.

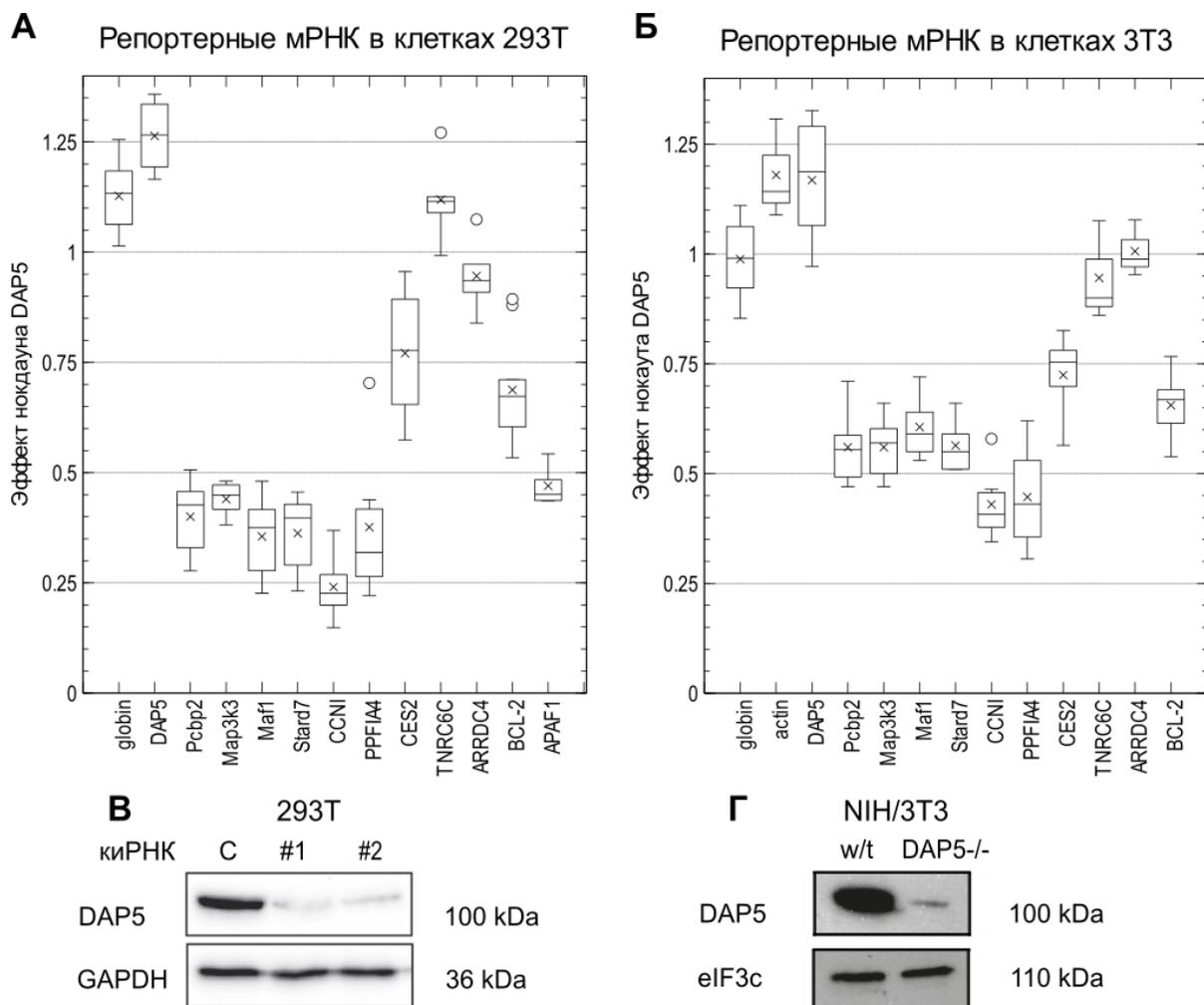


Рис. 4. (А, Б) Влияние деpleции DAP5 в клетках 293Т (А, нокадаун) и NIH/3Т3 (Б, нокаут) на эффективность трансляции репортеров с 5'UTR различных мРНК. Отражено отношение нормализованных репортерных значений в клетках, деплетированных по DAP5, к значениям в контрольных клетках. (В, Г) Подтверждение эффективности деpleции DAP5 в клетках 293Т (В, нокадаун трансфекцией одной из двух киРНК (#1 и #2)) и NIH/3Т3 (Г, нокаут) методом Вестерн блота. Блот eIF3c и GAPDH представлен в качестве контроля нанесения и переноса материала.

Таким образом, рибосомный профайлинг деплетированных по DAP5 клеточных линий выявил список генов, трансляция которых может быть зависима от DAP5. В небольшой выборке из этого списка для большинства кандидатов DAP5-зависимость трансляции подтвердилась при трансфекции *in vitro* транскрибированных репортеров, содержащих 5'UTRы этих генов. Как показали результаты вышеизложенной серии экспериментов, сравнительный рибосомный профайлинг клеточных линий дикого типа и деплетированной по искомому белку

позволяет выявить список генов-кандидатов, чья трансляция может быть зависима от этого белка, но этот список не является исчерпывающим и может содержать ошибки.

## Взаимодействие eIF4G1 и DAP5

DAP5, как обсуждалось выше, гомологичен фрагменту eIF4G1, и можно предположить, что он работает в определенных условиях вместо eIF4G1. Наиболее очевидным и важным отличием DAP5 от eIF4G1 является отсутствие связывающего eIF4E фрагмента, необходимого для канонической кэп-зависимой инициации. В силу этого можно предположить, что DAP5 работает в условиях, когда такая инициация по какой-то причине подавлена. В то же время, другой гомолог eIF4G, PAIP1, способен образовывать тройственный комплекс PAIP1-eIF3-eIF4G1. Это позволяет допустить, что и DAP5 вполне может ассистировать фактору eIF4G1 или подменять его на более поздней стадии раунда трансляции, начатого с участием eIF4G1, когда связь с кэпом скорее всего прерывается. Чтобы получить представление о том, как именно взаимодействуют DAP5 и eIF4G1, мы исследовали влияние ингибитора кэп-зависимой инициации трансляции на клетки, деплетированные по DAP5, и эффект нокадауна DAP5 в клетках с нокадауном eIF4G1.

Кэп-зависимая инициация трансляции в клетке может ингибироваться в случае стресса путём инактивации киназы mTOR. Исследователям доступен ряд ингибиторов mTOR, благодаря которым можно моделировать такую ситуацию. Мы использовали PP242, современный селективный ингибитор mTOR, чтобы подавить кэп-зависимую трансляцию.

При концентрации 1 мкМ в среде PP242 снижал трансляцию референсной репортерной мРНК с 5'UTR  $\beta$ -глобина, транслирующейся строго по кэп-зависимому механизму, в 2.8 раз. Эффективность трансляции безлидерной мРНК при этом практически не менялась (Рис. 5, *leaderless*), так как она устойчива к ингибированию кэп-зависимой инициации. Среди мишеней DAP5 оказались мРНК различной степени устойчивости к PP242: практически полностью устойчивые (PPF1A4), в заметной степени устойчивые (более устойчивые, чем  $\beta$ -глобин: APAF1, Maf1), и чувствительные (на уровне  $\beta$ -глобина: CCNI, Pcbp2, Map3k3, Stard7). При этом нокадаун DAP5 практически не влиял на эффект PP242 (Рис. 5). Если бы DAP5

участвовал в кэп-независимой инициации трансляции, например, привлекая рибосому на мРНК по eIF4E-независимому механизму, можно было бы ожидать увеличение его вклада в трансляцию мишеней в условиях инактивации mTOR.

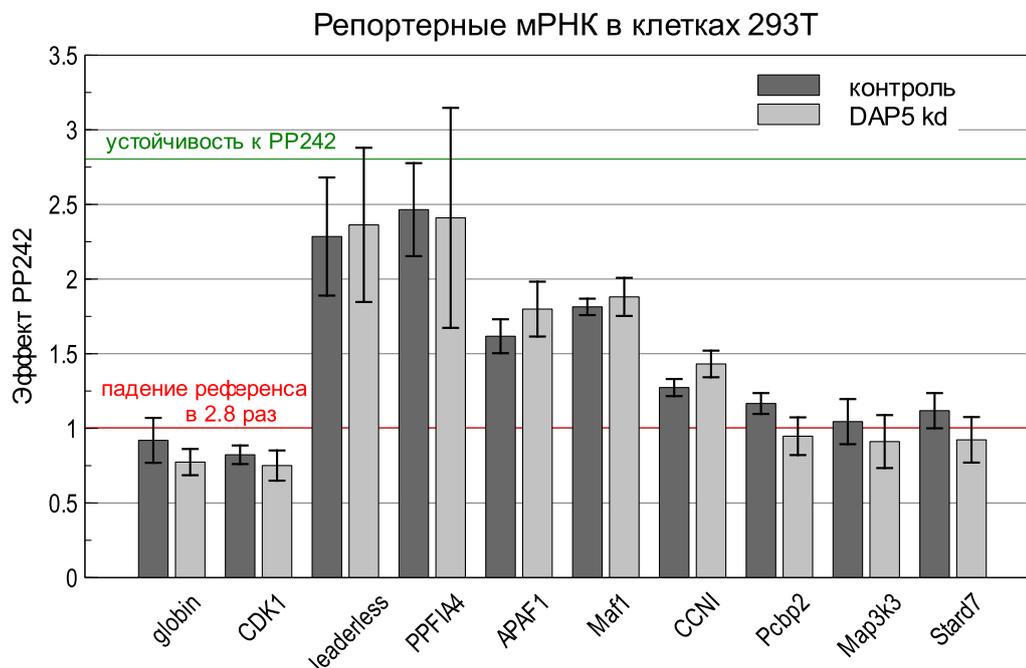


Рис. 5. Влияние добавления 1мкМ PP242, вызывающего ингибирование кэп-зависимой инициации трансляции, на эффективность трансляции репортеров в контрольных клетках 293Т (темные столбцы) и клетках с нокадаун DAP5. Отражено отношение нормализованных репортерных значений, вследствие чего эффект на уровне 1 (красная линия) соответствует поведению репортера, совпадающему с поведением референсного репортера β-глобина, эффект 2.8 (зеленая линия) соответствует устойчивости к действию PP242 (во столько раз в среднем падает эффективность трансляции референсной мРНК).

Для изучения взаимодействия eIF4G1 и DAP5 мы сравнили эффект нокадауна DAP5 и эффект одновременного нокадауна обоих генов. Чтобы исключить вклад в трансляцию eIF4G3, близкого гомолога eIF4G1, точная функция которого (если она отличается от функции eIF4G1) до сих пор не ясна, тот же эксперимент проводился на клетках RKO, в которых ген eIF4G3 был нокаутирован. Нокаут выполнен методом CRISPR/AsCpf1, подтвержден секвенированием. Клеточная линия RKO была выбрана в связи с неудобством осуществления нокаута методом CRISPR в линии HEK293Т: последняя известна увеличенным числом копий многих хромосом и агрегацией клеток в процессе клонирования.

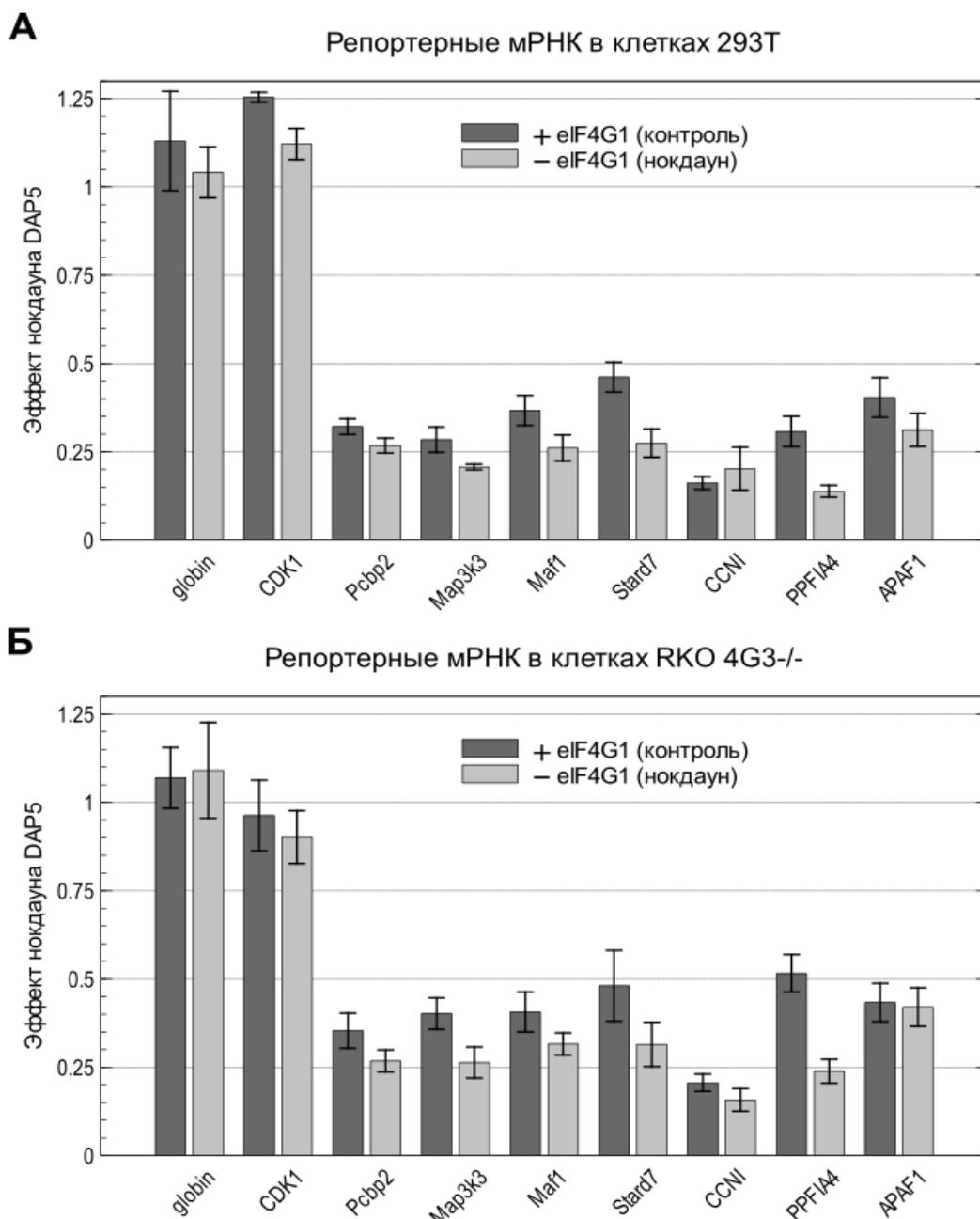


Рис. 6. Сравнение эффекта нокдауна DAP5 на эффективность трансляции репортерных мРНК в условиях наличия (контроль) или деплеции (нокдаун) eIF4G1 в клетках. Отражено отношение нормализованных репортерных значений в клетках, деплетированных по DAP5, к значениям в клетках без кнРНК к DAP5. Приведены результаты, полученные на клеточных линиях 293Т (А) и RKO(eIF4G3<sup>-/-</sup>) (Б).

В обеих клеточных линиях (293Т и RKO eIF4G3<sup>-/-</sup>) эффект нокдауна DAP5 для большинства репортерных мРНК более выражен в случае отсутствия (нокдауна) eIF4G1 (Рис. 6). Так же выглядит ситуация, если представить данные иначе: эффект от нокдауна eIF4G1 усиливается в случае деплеции DAP5 (не показано). Другими словами, двойной нокдаун DAP5 и eIF4G1 оказывает более заметный отрицательный эффект на трансляцию мишеней DAP5, чем нокдаун любого из этих

факторов по отдельности (эффективность нокдаунов подтверждена Вестерн-блотом).

В основном наблюдавшийся дополнительный эффект был небольшим, или различался в двух линиях, но можно выделить два случая значительного вклада двойного нокдауна, одинаково проявлявшегося в обеих линиях: на эффективность трансляции репортерной мРНК *Stard7* деплеция DAP5 влияла в 1.5 раза сильнее в случае нокдауна eIF4G1, а PPF1A4 – в 2 раза.

На сам нокдаун eIF4G1 мишени также реагируют неодинаково: трансляция большинства из них изменяется примерно так же, как трансляция референса, но эффективность трансляции *CCNI*, *Map3k3* и *Stard7* снижается в 1.5-2 раза относительно референса (данные не представлены).

Полученные результаты позволяют предположить, что DAP5 участвует в кэп-зависимой инициации трансляции (иначе эффект нокдауна усиливался бы в условиях ее ингибирования), при этом DAP5 и eIF4G1 могут в какой-то мере заменять друг друга, так как в двойном нокдауне эффект каждого одинарного усиливается.

### Взаимная регуляция трансляции PCBP2 и DAP5

Поли(rC)-связывающий белок PCBP2 (PolyC Binding Protein 2) привлек наше внимание в связи с DAP5 дважды: мРНК PCBP2 оказалась в числе мишеней DAP5, выявленных в рибосомном профайлинге, а белок PCBP2 оказался одним из нескольких, преципитирующихся вместе с мРНК DAP5 *in vitro* (этот факт был обнаружен в нашей лаборатории И. Терениным).

PCBP2 принадлежит к семейству многофункциональных поли(С)-связывающих белков; известно, что он участвует в транспорте железа и в IRES-опосредованной инициации трансляции полиовируса. Обнаружен также случай негативной регуляции трансляции мРНК через взаимодействие PCBP2 с её 3'-UTR. Для того, чтобы узнать, влияет ли PCBP2 на трансляцию мРНК DAP5, мы изучили поведение соответствующей репортерной мРНК при трансфекции в клетки 293Т, деплетированные по PCBP2.

## PCBP2 регулирует трансляцию DAP5 *in vivo*

Нокдаун PCBP2 осуществлялся посредством РНК-интерференции, в качестве контроля выступали клетки, трансфицированные неспецифической киРНК (Рис. 7(В)). Мы сравнивали эффективность трансляции репортерных мРНК в клетках с нокдауном по сравнению с контрольными клетками, соотношение этих значений отражено на рисунке 7(А). В клетках с деплецией PCBP2, как 293Т, так и Huh7, наблюдался значимо повышенный уровень трансляции репортерной мРНК с 5'UTR DAP5 (до 1.5 раз), что говорит о негативном влиянии PCBP2 на эффективность трансляции мРНК DAP5. При этом контрольные репортеры – мРНК с 5'UTR β-глобина, актина и PCBP2 – транслировались, наоборот, значительно хуже в клетках 293Т с нокдауном, чем в контрольных клетках, поэтому мы приводим здесь так же результаты трансфекции в клетки Huh7, в которых нокдаун практически не влиял на трансляцию контрольных мРНК.

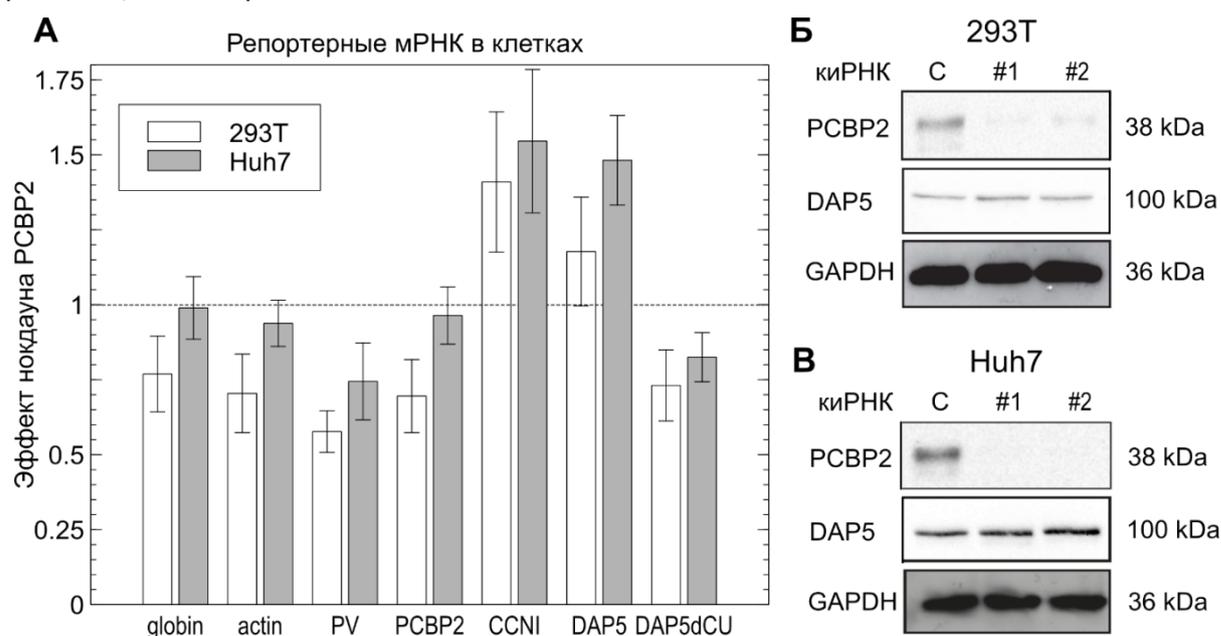


Рис. 7. PCBP2 подавляет трансляцию поли(rC)-содержащих мРНК DAP5 и CCNI. (А) Влияние нокдауна PCBP2 в клетках 293Т и Huh7 на эффективность трансляции репортерных мРНК. Отражено отношение нормализованных репортерных значений в клетках, деплетированных по PCBP2, к значениям в контрольных клетках. (Б, В) Вестерн-блот анализ эффективности нокдауна PCBP2 посредством РНК-интерференции в клетках 293Т (Б) и Huh7 (В) (С – контрольная неспецифическая киРНК, #1 и #2 – две различных киРНК к PCBP2).

В ходе анализа 5' нетранслируемых областей обнаруженных с помощью рибосомного профайлинга мРНК-мишеней DAP5 мы обратили внимание, что последовательность 5'UTR CCNI также богата полипиримидиновыми блоками.

Можно было ожидать, что трансляция мРНК CCNI регулируется PCBP2. Действительно, соответствующая репортерная мРНК демонстрирует повышенную эффективность трансляции при деплеции PCBP2 (в 1.5 раза) (Рис. 7 (А)).

В проекте ENCODE опубликованы результаты eCLIP (полногеномный поиск сайтов связывания белков в мРНК по усовершенствованному протоколу) против PCBP2 в HepG2 клетках (набор данных ENCSR339FUJ). Согласно этим данным полипиримидиновый тракт в середине 5'UTR DAP5 является сайтом связывания PCBP2. Мы удалили CU-богатый фрагмент длиной 78 нт (86-164 нт) из 5'UTR DAP5. Для репортерной мРНК DAP5 с удаленным полипиримидиновым трактом пропадает стимулирующий эффект нокдауна PCBP2 в клетках 293T и Huh7, напротив, наблюдается небольшой ингибирующий эффект на такую РНК (Рис. 7, «DAP5dCU»). Таким образом, C-богатые участки в 5'UTR DAP5 необходимы для того, чтобы трансляция этой мРНК регулировалась PCBP2.

Рекомбинантный PCBP2 подавляет трансляцию DAP5 *in vitro*

Изучение функции белка в клеточных системах позволяет наблюдать различные явления в максимально естественных условиях, но в клетках невозможно тонко регулировать параметры процессов, а огромное количество компонентов системы приводит к артефактам и вторичным эффектам, так что часто невозможно сделать однозначные выводы исходя из результатов наблюдений. Эксперименты *in vitro* – наблюдение процессов в бесклеточных системах на основе клеточного лизата и/или очищенных компонентов – позволяют точно регулировать практически все условия процесса и наблюдать только за непосредственным эффектом изменения отдельных параметров.

На данный момент нам не удалось получить функциональный рекомбинантный белок DAP5 в достаточных количествах. Выделение рекомбинантного PCBP2, напротив, не вызвало существенных проблем, и мы изучили его влияние на трансляцию *in vitro*. Известно как минимум 7 изоформ PCBP2, возникающих в ходе альтернативного сплайсинга. Альтернативный сплайсинг затрагивает только кодирующую часть мРНК, поэтому трансляция всех изоформ должна регулироваться DAP5, так как их 5'UTRы совпадают. При клонировании кодирующей

последовательности РСВР2 случайно были получены две изоформы, рекомбинантные белки были сделаны на основе обеих (РСВР2е и РСВР2f).

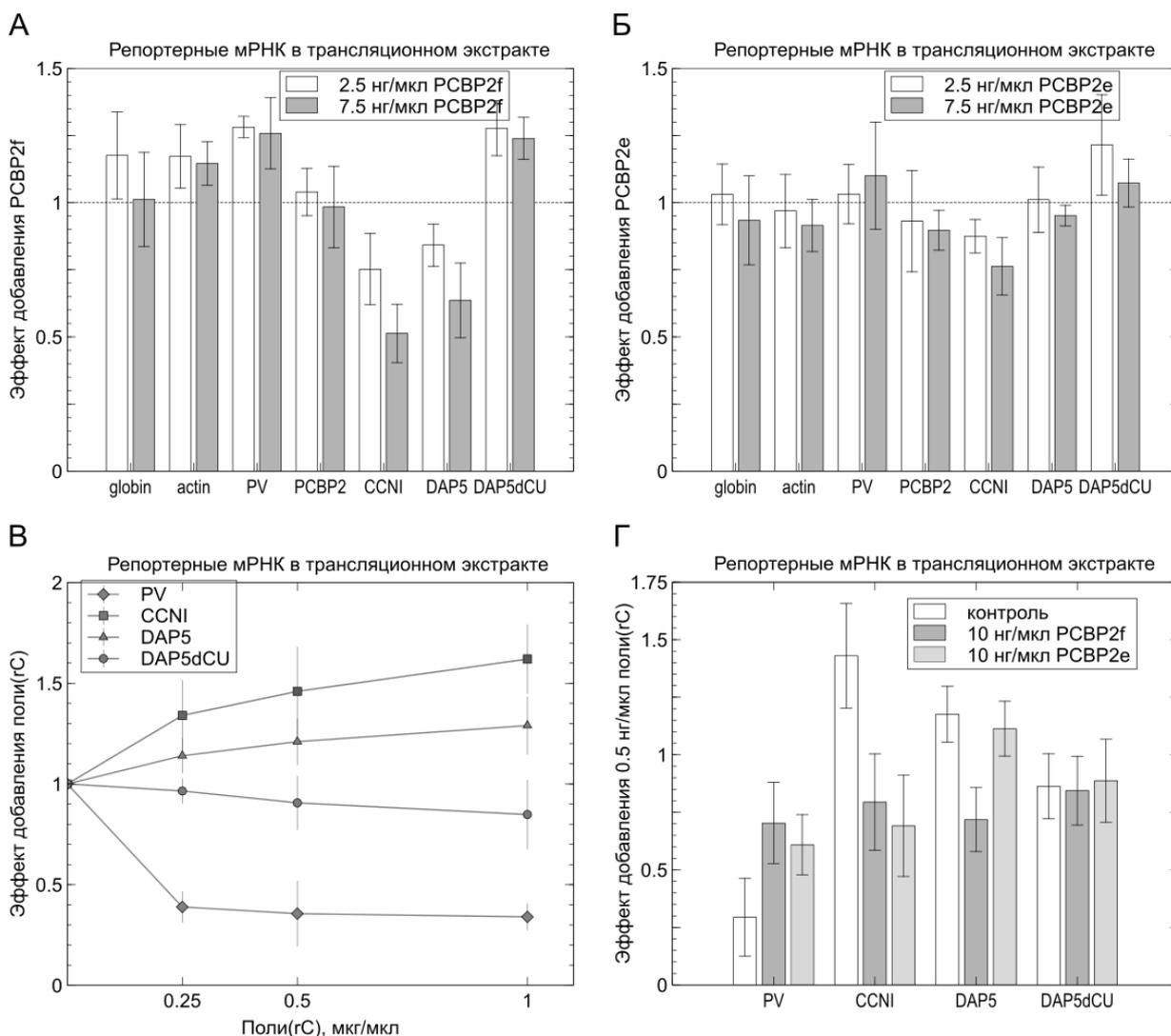


Рис. 8. Влияние рекомбинантного РСВР2 на трансляцию репортерных мРНК *in vitro*. (А) Эффект добавления рекомбинантного РСВР2, f изоформа, на трансляцию репортерных мРНК. (Б) Эффект добавления рекомбинантного РСВР2, e изоформа, на трансляцию репортерных мРНК. (В) Трансляция репортерных мРНК в присутствии поли(гС) в зависимости от концентрации. (Г) Влияние добавления рекомбинантного РСВР2 в присутствии поли(гС) в сравнении с необработанным лизатом.

Трансляцию проводили в клеточном экстракте S30 из клеток асцитной карциномы Кребс-2, который хорошо подходит для изучения трансляции кэп-зависимых мРНК. В соответствии с результатами, полученными *in vivo*, добавление 25 или 75 нг (на 10 мкл реакционной смеси) РСВР2f снижало уровень трансляции репортерных мРНК с 5'UTR DAP5 и CCNI в 1.5-2 раза, но не влияло на контрольные мРНК и мРНК DAP5dCU (Рис. 8(А)). Изоформа РСВР2е влияла только на трансляцию CCNI, и в меньшей степени, чем РСВР2е (Рис. 8(Б)).

Таким образом, наши данные позволяют утверждать, что PCBP2 репрессирует трансляцию DAP5, связываясь с 5'UTR этой мРНК. При этом, согласно приведенным выше результатам профайлинга клеток, деплетированных по DAP5, и трансфекции в них репортеров, DAP5 стимулирует трансляцию PCBP2. В результате такой замкнутой цепочки взаимодействий образуется саморегулирующаяся система, способная поддерживать постоянный уровень этих белков в клетке.

## DAP5-зависимость мРНК BCL-2

BCL-2 – один из первых обнаруженных регуляторов апоптоза, и нарушения его экспрессии часто имеют онкогенные последствия. Так, ген был открыт именно в связи с участием в хромосомной транслокации, наблюдавшейся в лимфомах, позднее выяснилось, что вследствие транслокации ген попадает под энхансер иммуноглобулина, и нарушается регуляция экспрессии BCL-2. Как и для многих других протоонкогенов, для BCL-2 был предположен IRES-опосредованный механизм инициации трансляции, а затем была предложена роль DAP5 в этом механизме. Ни в одном исследовании, обсуждающем IRES-элемент BCL-2, не используются корректные подходы к доказательству его существования.

Нас волновал вопрос DAP5-зависимости трансляции BCL-2. Как уже отмечалось выше, по результатам наших рибосомных профайлингов выводы об этом сделать нельзя, так как фрагменты мРНК BCL-2 и относящиеся к ней футпринты практически не представлены среди чтений вследствие недостаточной глубины секвенирования.

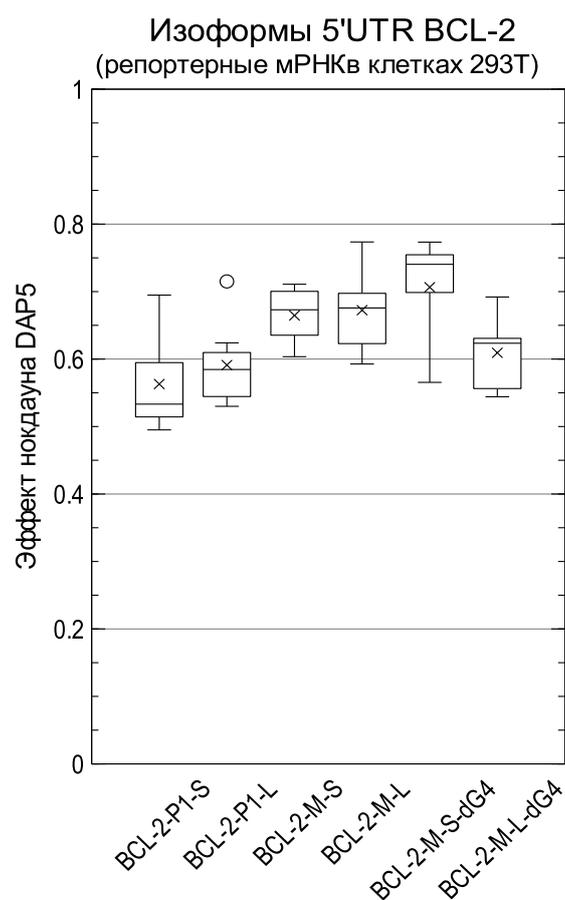


Рис. 9. Трансляция различных изоформ мРНК BCL-2 в клетках 293Т одинаково зависит от DAP5 (описание изоформ см. в тексте) Отражено отношение нормализованных значений в клетках, деплетированных по DAP5, к значениям в контрольных клетках.

5'UTR мРНК BCL-2 известен в двух изоформах, в зависимости от промотора (P1 или M). Мы клонировали оба варианта, и случайно получили также несплайсированные (L) версии каждого, с интроном. Транскрипт с несплайсированным интроном в 5'UTR является физиологичным, частота сплайсинга этого интрона, как и частота использования альтернативных промоторов, различается в зависимости от типа ткани. Кроме того, было показано, что 5'UTR мРНК BCL-2 содержит мотив, формирующий G-квадруплекс, который так же может влиять на регуляцию синтеза белка. На основе M-версии 5'UTR мы сделали варианты с мутированным квадруплексом (dG4), чтобы проверить, не играет ли эта структура роль в DAP5-зависимости. На основе этих шести вариантов 5'UTR были созданы репортерные конструкции, как описывалось ранее.

При трансфекции в клетки 293Т с нокадауном DAP5 все репортеры транслировались в ~1.6 раз менее эффективно, чем в контрольных клетках, независимо от промотора, наличия или отсутствия интрона и делеции G-квадруплекса (Рис. 9). Полученные результаты согласуются с литературными данными о DAP5-зависимости BCL-2, причем мы показали, что это верно для всех распространенных вариантов этой мРНК.

## Заключение

В данной работе мы попытались продвинуться в понимании роли DAP5 в инициации трансляции. Используя метод рибосомного профайлинга, мы сравнили трансляционный профиль клеток с деплецией DAP5 с профилем клеток дикого типа. Хотя наши ожидания не оправдались, и результаты профайлинга не выявили закономерностей влияния DAP5 на трансляцию в масштабах всего транслятома, мы смогли определить список возможных мРНК-мишеней DAP5. Часть этих мишеней были подтверждены методом трансфекции транскрибированных *in vitro* репортерных мРНК.

Исследуя одну из мишеней DAP5, PCBP2, мы обнаружили взаимную регуляцию этих двух белков: DAP5 стимулирует трансляцию PCBP2, в то время как PCBP2 в свою очередь связывается с мРНК DAP5 и снижает эффективность ее трансляции. Таким

образом образуется замкнутая саморегулирующаяся система, направленная на постоянный баланс ее компонентов.

Мы показали, что DAP5 регулирует трансляцию большей части мишеней через их 5'-нетранслируемую область, но в дальнейшем предстоит понять, какие именно особенности 5'UTR связаны с этим свойством. В совместной работе с И. Терениным и Е. Шестаковой из нашей исследовательской группы было показано, что для некоторых мишеней DAP5-зависимость определяется наличием коротких рамок считывания: мутация инициаторных кодонов у таких коротких рамок приводит к полному исчезновению зависимости от DAP5. Сделан вывод, что потребность в DAP5 возникает тогда, когда каркасный фактор eIF4G1 дает сбой и диссоциирует из сканирующих комплексов при их интерференции с элонгирующими 80S рибосомами. Обнаружено, однако, что не все DAP5-зависимые 5'UTRs содержат открытые короткие рамки считывания. Так, 5'UTR ряда мРНК-мишеней DAP5, например, PCBP2, не содержит uORF.

Наблюдение за влиянием DAP5 на трансляцию в условиях подавления кэп-зависимой (eIF4E-зависимой) инициации и при деплеции канонического фактора eIF4G1 указывает на участие DAP5 в канонической кэп-зависимой инициации трансляции. Можно предположить, что DAP5, являясь укороченной версией каркасного фактора eIF4G1, может подменять его на более поздних стадиях инициации, когда связь иницирующего комплекса с кэпом уже не требуется. Например, DAP5 мог бы увеличивать процессивность сканирования в случае недостатка eIF4G1 или на нетранслируемых областях, на которых eIF4G1 с большей вероятностью диссоциирует. Такая диссоциация может происходить в случае присутствия различных препятствий – вторичных структур, РНК-связывающих белков, коротких рамок считывания, – и ее вероятность растет с увеличением количества этих препятствий и длины 5'UTR.

Приведенная модель не противоречит полученным нами данным, но нуждается в дополнительном подтверждении. Мы планируем использовать модификацию метода селективного рибосомного профайлинга и метод сборки трансляционного комплекса из очищенных компонентов или в экстракте для более детального изучения механизма работы DAP5.

## Выводы

1. Рибосомный профайлинг обнаруживает список генов-кандидатов в мишени DAP5, нуждающихся в дополнительном подтверждении.
2. Трансляция мРНК Pcbp2, Map3k3, Maf1, Stard7, CCNI, PPFIA4, CES2, APAF1 и BCL-2 стимулируется DAP5 через 5'UTR.
3. DAP5 участвует в кэп-зависимой (eIF4E-зависимой) инициации трансляции, однако не на стадии привлечения рибосомы на мРНК, а, по всей видимости, на стадии сканирования 5' нетранслируемых областей.
4. eIF4G1 и DAP5 взаимозаменяемы на стадии сканирования, хотя в нормальных условиях основным «сканирующим» фактором является именно eIF4G1.
5. DAP5 и PCBP2 регулируют трансляцию друг друга, образуя самоподдерживающуюся систему.
6. Трансляция наиболее распространенных вариантов транскриптов BCL-2 (P1 и M промотор) в равной степени зависит от DAP5.

## Список публикаций по теме диссертации

Соискатель имеет 3 статьи по теме диссертации, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных системах цитирования и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

1. **V. V. Smirnova**, E. D. Shestakova, D. S. Nogina, P. A. Mishchenko, T. A. Prikazchikova, T. S. Zatsepin, I. V. Kulakovskiy, I. N. Shatsky, and I. M. Terenin. Ribosomal leaky scanning through a translated uORF requires eIF4G2 // *Nucleic Acids Research*. — 2022. — Vol. 50, no. 2. — P. 1111–1127. IF<sub>2020</sub> = 16.971
2. **V. V. Smirnova**, E. D. Shestakova, D. V. Bikmetov, A. A. Chugunova, I. A. Osterman, M. V. Serebryakova, O. V. Sergeeva, T. S. Zatsepin, I. N. Shatsky, and I. M. Terenin. eIF4G2 balances its own mRNA translation via a PCBP2-based feedback loop // *RNA*. — 2019. — Vol. 25, no. 7. — P. 757–767. IF<sub>2020</sub> = 4.942
3. I. N. Shatsky, I. M. Terenin, **V. V. Smirnova**, and D. E. Andreev. Cap-independent translation: What's in a name // *Trends in Biochemical Sciences*. — 2018. — Vol. 43, no. 11. — P. 882–895. IF<sub>2018</sub> = 16.889