

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

МОРДОВКИНА ДАРЬЯ АЛЕКСЕЕВНА

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО  
ТРАНСПОРТА БЕЛКА УВ-1

03.01.03. – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва-2022

**Работа** выполнена в группе регуляции биосинтеза белка Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт белка Российской академии наук».

**Научный руководитель:** **Лябин Дмитрий Николаевич**, кандидат биологических наук

**Официальные оппоненты:**

**Андреев Дмитрий Евгеньевич**, доктор химических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией биоинформационных методов комбинаторной химии и биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук»

**Шеваль Евгений Валерьевич**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией ультраструктуры клеточного ядра Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

**Величко Артем Константинович**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории стабильности генома Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биологии гена Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «2» июня 2022 г. в 16:00 часов 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»: <http://istina.msu.ru/dissertations/452269175/>

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

У-бокс-связывающий белок (УВ-1) — это многофункциональный ядерно-цитоплазматический белок млекопитающих. УВ-1 способен связываться с ДНК и РНК и взаимодействовать с множеством клеточных белков. Эти свойства УВ-1 объясняют множество функций белка в цитоплазме и ядре клетки. УВ-1 участвует в регуляции транскрипции многих генов, репарации ДНК. Связываясь с мРНК в момент ее синтеза, он сопровождает ее на всех стадиях созревания и функционирования: белок регулирует альтернативный сплайсинг некоторых пре-мРНК, участвует в упаковке мРНК, тем самым регулируя ее трансляционную активность и стабильность.

Такая многофункциональность УВ-1 определяет его участие в регуляции многих клеточных процессах, таких как клеточный рост, дифференцировка, ответ на стресс, апоптоз. Кроме того, увеличение количества УВ-1 и его ядерную локализацию связывают с развитием злокачественных опухолей. Связываясь с регуляторными участками ДНК, УВ-1 влияет на экспрессию генов, участвующих в росте и делении клеток, иммунном ответе, развитии множественной лекарственной устойчивости.

Один из способов регуляции функций УВ-1 — изменение его внутриклеточной локализации. В нормальных условиях роста клеток большая часть УВ-1 локализуется в цитоплазме, но в некоторых случаях наблюдается переход белка в ядро. Так, переход УВ-1 в ядро на границе G1 и S фаз и G2 и M фаз необходим для прохождения клеток по циклу. Также переход УВ-1 в ядро наблюдается при действии ДНК-повреждающих препаратов или УФ-облучении и в ядре УВ-1 принимает участие в репарации ДНК. В некоторых случаях переход УВ-1 в ядро сопровождается протеолитическим отщеплением С-концевого фрагмента белка, в котором находится сигнал удержания в цитоплазме. Такой механизм ядерно-цитоплазматического перехода наблюдается в эндотелиальных клетках при действии тромбина, при этом происходит активация генов, отвечающих за клеточную пролиферацию.

Ядерно-цитоплазматический транспорт УВ-1 его регуляция изучены недостаточно хорошо. Два мотива в С-концевом домене УВ-1 определяют его внутриклеточную локализацию: сигнал ядерной локализации (NLS, 186-205 aa) и сигнал удержания в цитоплазме (CRS, 267-293 aa), который превалирует над NLS, поэтому белок в нормальных условиях роста локализуется в цитоплазме. Однако транспортный фактор, необходимый для перехода УВ-1 в ядро, так не и был определен.

Помимо NLS и CRS, в другом домене - домене холодного шока есть два важных элемента, которые также могут принимать участие в регуляции

транспорта YB-1. На внешней поверхности домена холодого шока белка YB-1 находится область, участвующая в связывании РНК. В некоторых работах было показано, что замены в этой области, приводящие к снижению связывания с РНК также приводят к переходу белка в ядро. Однако, не было показано действительно ли снижение связывания YB-1 с РНК может привести к переходу белка в ядро. Вторым важным элементом является серин в положении 102. Он находится рядом с этой областью в гибкой петле и часто фосфорилируется при переходе белка в ядро. Однако, не было показано, важно ли фосфорилирование серина 102 для перехода белка YB-1 в ядро при снижении уровня мРНК в цитоплазме.

### **Цель и задачи работы**

**Цель** данной работы заключалась в выяснении молекулярных механизмов, обеспечивающих ядерный транспорт YB-1 и его регуляцию. В связи с этим были поставлены следующие задачи.

#### **Основные задачи работы:**

1. Определить транспортный фактор, необходимый для импорта YB-1:
  - а) Подобрать условия для проведения реакции импорта YB-1 в ядро в модельной системе;
  - б) Исследовать транспорт белка YB-1 в ядро в модельной системе в присутствии конкурирующих субстратов или в условиях ингибирования основных транспортных белков;
  - в) Исследовать в модельной системе транспорт белка YB-1 с мутациями в сигнале ядерной локализации, потенциально нарушающими взаимодействие с транспортным фактором;
  - г) Определить какой транспортный фактор взаимодействует с YB-1.
2. Выяснить, может ли снижение уровня мРНК в клетке вследствие остановки транскрипции (ингибирование РНК-полимеразы II) быть причиной накопления YB-1 в ядре;
3. Выяснить, влияет ли фосфорилирование YB-1 по Ser 102 на его транспорт в ядро в условиях остановки транскрипции (ингибирование РНК-полимеразы II) и снижения уровня мРНК.

#### **Научная новизна и практическая ценность работы**

В данной работе было показано, что YB-1 образует комплекс с транспортном 1 за счет прямых белок-белковых взаимодействий. Получена линия HeLa, экспрессирующая YB-1 с flag-мотивом и стрептовидин-связывающей последовательностью под контролем индуцибельного промотора. Подобраны условия для импорта в ядро полноразмерной (1-324) и укороченной

(1-219) форм YB-1 в транспортной системе. Показано, что различия в транспорте укороченной и полноразмерной форм YB-1 в транспортной системе нельзя объяснить простым изменением количества транспортных факторов. Показано, что транспорт белка YB-1 нарушается в присутствии конкурента и ингибитора транспорта 1, но не импортина- $\beta$ 1. Показано, что замены в сигнале ядерной локализации YB-1 приводят к нарушению транспорта как полноразмерной, так и укороченной форм белка. Установлено, что переход белка YB-1 в ядро может быть стимулирован не только повреждением ДНК, но и ингибированием РНК-полимеразы II. Показано, что ингибирование РНК-полимеразы II приводит к увеличению уровня фосфорилирования YB-1 и Акт-киназы. Обнаружено, что ингибиторы киназ препятствуют транслокации YB-1 в ядро при ингибировании транскрипции, но не влияют на уровень мРНК в цитоплазме.

Полученные в ходе работы данные значительно расширяют имеющиеся представления о механизме ядерно-цитоплазматического транспорта YB-1 и его сложной многоуровневой регуляции. Обнаруженные молекулярные механизмы регуляции внутриклеточной локализации YB-1 могут помочь в разработке терапевтических подходов для лечения онкологических заболеваний, при которых переход белка YB-1 в ядро является критическим этапом патогенеза и/или приводит к развитию множественной лекарственной устойчивости. При дальнейшем развитии тематики могут быть найдены или спроектированы химические соединения, препятствующие переходу белка YB-1 в ядро. Таким образом, настоящее исследование может иметь большое практическое значение как для фундаментальной, так и для прикладной науки.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Транспорт YB-1 в ядро осуществляется транспортином-1.
2. Переход YB-1 в ядро может вызываться снижением уровня мРНК в клетке (ингибирование РНК-полимеразы II), а не только повреждением ДНК.
3. Ингибирование транскрипции (ингибирование РНК-полимеразы II) сопровождается увеличением уровня фосфорилирования YB-1 и Акт-киназы.
4. Ингибиторы киназ (кофеин и вортманин) препятствуют транслокации YB-1 в ядро при ингибировании транскрипции, но не влияют при этом на уровень мРНК в цитоплазме.

## **Методология исследования**

Для получения плазмидных конструкций использовали стандартные методы генной инженерии. Белки выделены с использованием хроматографических методов с чистотой, пригодной для дальнейших экспериментов. Для изучения ядерного импорта белков использовалась система на основе пермеабелизованных эукариотических клеток (*in vitro transport assay*). Исследования проводились на клеточных культурах HeLa (клетки аденокарциномы шейки матки), Vero (клетки эпителия почки африканской зеленой мартышки). Внутриклеточная локализация белков определялась методом флуоресцентного окрашивания клеток. Поли-(A<sup>+</sup>)-РНК детектировалась методом гибридизации *in situ* с использованием флуоресцентно-меченного олиго-dT-зонда.

## **Личный вклад соискателя**

Личный вклад автора заключается в работе с литературными источниками, планировании и проведении экспериментов, анализе полученных результатов, подготовке материалов к печати и написании диссертации. Основные результаты диссертационной работы получены лично автором или при его непосредственном участии. Выделение белков было выполнено совместно с к.б.н. Е.Р. Ким. Работы с эукариотическими клетками проводились совместно с к.б.н. Е.Р. Ким и Кретовым Д.А.

## **Степень достоверности и 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 результатов и публикации**

По материалам диссертации опубликовано 5 статей 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.

Материалы диссертации были представлены на 16-, 22-, 23- Международных пуцинских школах-конференциях молодых ученых (Россия, Пущино, 2012, 2018, 2019), 25th Wilhelm Bernhard workshop on the cell nucleus (Россия, Нижний Новгород, 2017), 26th Wilhelm Bernhard workshop on the cell

nucleus (Франция, Дижон, 2019), 1-st Cold Shock Protein Symposium (Германия, Магдебург, 2019).

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа изложена на 204 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы и список литературы. Работа содержит 22 рисунка и 2 таблицы. Библиографический указатель включает 699 процитированных работ.

## **ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Несмотря на множество накопленных данных о том, в каких случаях белок YB-1 может изменять свою внутриклеточную локализацию и к каким критическим последствиям для клетки это может привести в случае нарушения регуляции этого процесса, некоторые важные аспекты, касающиеся ядерно-цитоплазматического транспорта YB-1 оставались невыясненными. Один из ключевых вопросов заключается в идентификации транспортного фактора, который обеспечивает переход белка YB-1 в ядро. Другим важным вопросом является изучение взаимосвязи ядерного импорта YB-1, взаимодействия белка с мРНК и фосфорилирования YB-1 по Ser102.

Цель первой части данной работы состоит в определении транспортного белка, необходимого для ядерно-цитоплазматического транспорта YB-1.

### **1. Подбор условий для изучения транспорта укороченной (1-219) и полноразмерной форм белка HA-YB-1 в транспортной системе из пермеабелизованных клеток HeLa**

Исследование ядерно-цитоплазматического транспорта белков технически довольно сложная задача, поэтому часто для этого используют специальные модельные системы, которые позволяют несколько упростить процесс.

Было описано несколько систем для изучения ядерно-цитоплазматического транспорта *in vitro*, воспроизводящих основные характеристики ядерно-цитоплазматического транспорта *in vivo*. Система, основанная на использовании пермеабелизованных клеток (с поврежденной плазматической мембраной), наиболее полно удовлетворяет всем требованиям о минимальных повреждениях клеточных структур и воспроизводит характеристики, свойственные ядерно-цитоплазматическому транспорту *in vivo* (Adam *et al.*, 1990; Adam *et al.*, 1994). Кроме того, эта система позволяет использовать различные ингибиторы ядерно-цитоплазматического транспорта. Этот подход быстр и относительно прост по сравнению с другими методами.

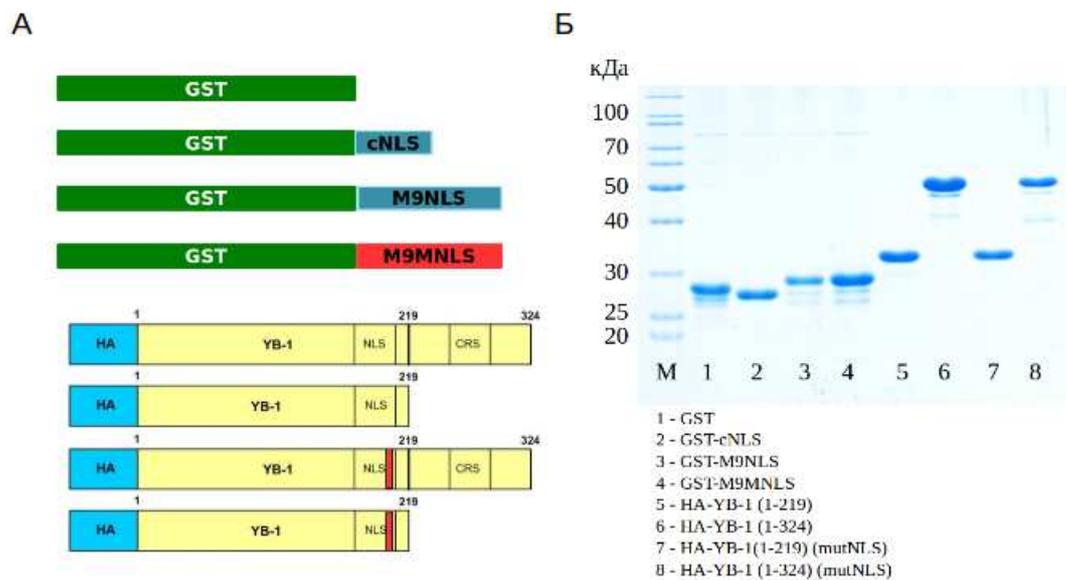
Поэтому система пермеабилizованных клеток стала ключевым методом изучения ядерно-цитоплазматического транспорта.

Пермеабилзация клеток осуществляется слабым неионным детергентом – дигитонином, который в низких концентрациях избирательно пермеабилзует плазматическую мембрану, оставляя мембраны клеточных органелл интактными. Это объясняется тем фактом, что в плазматической мембране выше содержание холестерина. Но при этом происходит вымывание ключевых цитозольных белков, осуществляющих транспорт. Поэтому при сборке транспортной системы необходимо добавление этих белков либо в чистом виде (так называемые «чистые» системы), либо в виде цитозольного экстракта, полученного из клеток с активным ядерно-цитоплазматическим транспортом. Помимо этого требуется добавление источников энергии (АТФ, ГТФ, АТФ-регенерирующая система), так как транспорт энергозависим. Последним компонентом системы является белок-субстрат, транспортируемый в ядро. После проведения реакции импорта необходима визуализация ее результатов, основанная на микроскопическом исследовании полученного препарата. Визуализация идет или за счет флуоресценции метки, конъюгированной с белком-субстратом, импортируемым в ядро, или за счет его окрашивания флуоресцентно-мечеными антителами (Adam *et al.*, 1990; Adam *et al.*, 1994). В зависимости от поставленной задачи данная методика может видоизменяться, что делает использование такой системы очень удобным методом для изучения транспорта белков.

В наших исследованиях молекулярного механизма транспорта YB-1 в ядро мы использовали модельную систему для изучения импорта белков в ядро на основе пермеабилizованных клеток HeLa.

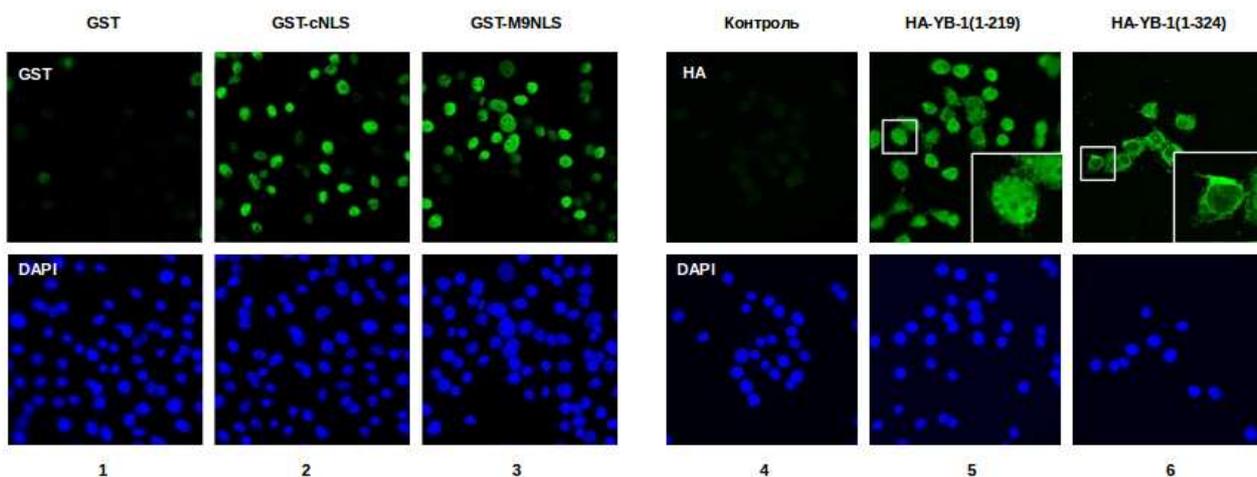
Ранее было показано, что укороченная форма белка YB-1 (1-219), лишенная сигнала цитоплазматического удержания, накапливается в ядре (Stenina *et al.* 2000; Sorokin *et al.* 2005). Мы предположили, что транспорт YB-1 (1-219) идет более активно, поэтому укороченная форма белка была также использована в работе. В качестве контрольных субстратов мы использовали следующие белки: GST (не имеет сигналов ядерной локализации и не транспортируется в ядро), GST-cNLS (содержит классический сигнал ядерной локализации (cNLS) большого Т-антигена вируса SV40 (GGGPKKKRKVED) и способен транспортироваться в ядро импортином  $\beta$ 1 (Adam *et al.*, 1990)) и GST-M9NLS (содержит сигнал ядерной локализации (M9 NLS) белка hnRNP A1 (GNYYNNQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPPRNQGG) и способен импортироваться в ядро транспортином 1 (Siomi *et al.*, 1995)). Также в следующих экспериментах мы использовали белок GST-M9MNL (искусственно созданная последовательность на основе NLS белков hnRNP A1 и

hnRNP M, связывающая транспортин 1 в 200 раз сильнее, чем исходные NLS (Cansizoglu *et al.*, 2007)) (рис. 1).



**Рис. 1. Белки GST, GST-cNLS, GST-M9NLS, GST-M9MNLS, HA-YB-1 (1–219) и HA-YB-1 (1–324), HA-YB-1 (mutNLS) (1–219) и HA-YB-1 (mutNLS) (1–324), используемые в работе.** (А) Схема строения белков (Б) и электрофореграмма препаратов выделенных белков GST, GST-cNLS, GST-M9NLS, GST-M9MNLS, HA-YB-1 (1–219) и HA-YB-1 (1–324), HA-YB-1 (mutNLS) (1–219) и HA-YB-1 (mutNLS) (1–324). Контрольный белок GST не имеет сигналов ядерной локализации и не должен транспортироваться в ядро. Белок GST-cNLS имеет классический сигнал ядерной локализации (cNLS) и транспортируется в ядро импортином- $\beta$ 1, используется как конкурент YB-1 за импортином- $\beta$ 1. Белок GST-M9NLS имеет сигнал ядерной локализации типа PY-NLS (NLS белка hnRNP A1 - M9NLS) и импортируется в ядро транспортинем 1, используется в работе как конкурент YB-1 за транспортин 1. Белок GST-M9M имеет искусственный NLS, (M9MNLS), созданный на основе NLS белков hnRNP A1 и hnRNP M и используется в качестве ингибитора транспортного фактора транспортина 1.

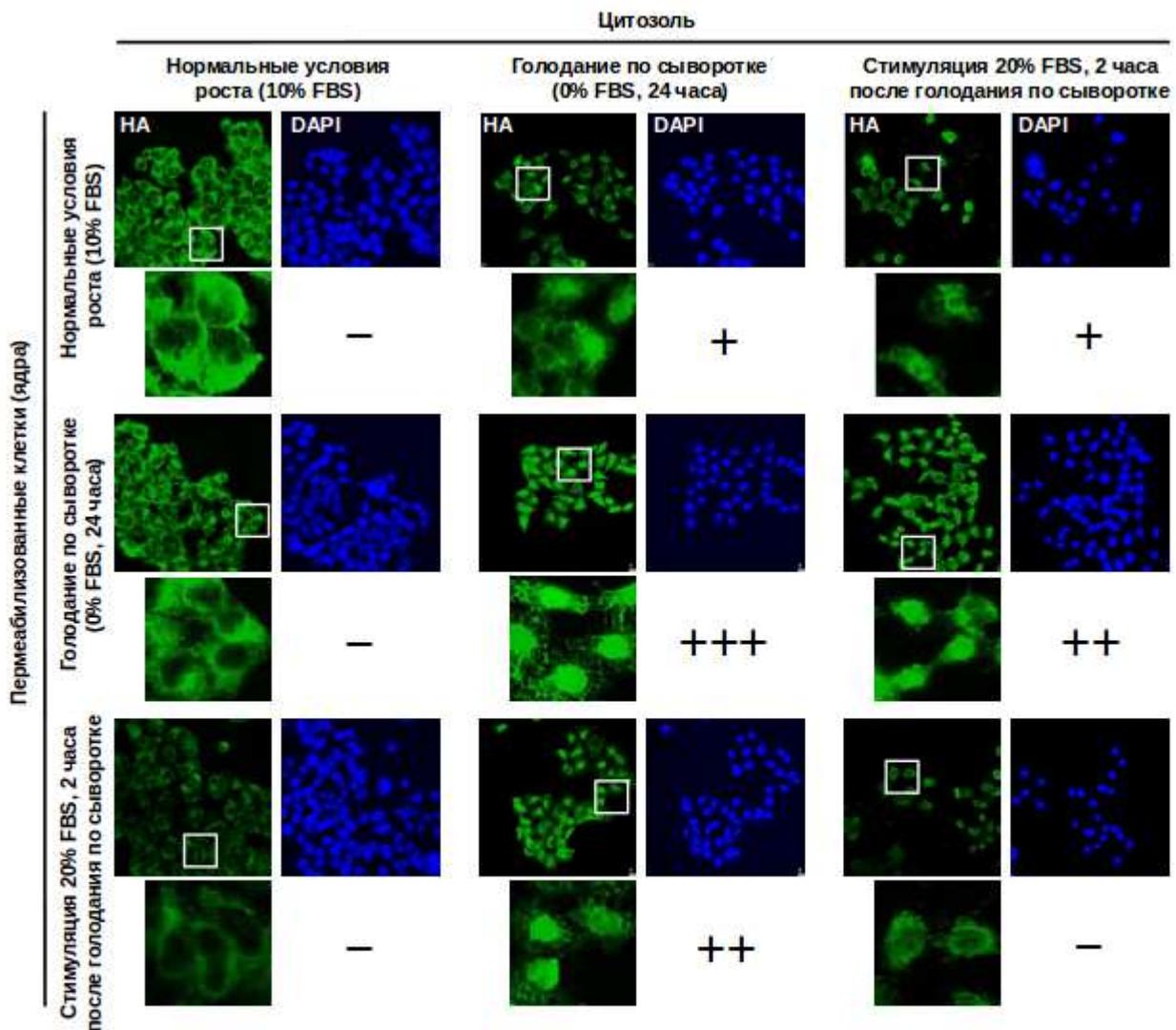
В качестве источника растворимых транспортных факторов в мы использовали цитозоль из клеток HeLa. Оказалось, что в таких условиях в ядро активно транспортируются не только модельные субстраты (рис. 2А), но и укороченная форма белка HA-YB-1 (1-219) (рис. 2Б, средняя панель). Однако полноразмерная форма HA-YB-1 (1-324) в ядре не обнаруживалась (рис. 2Б, правая панель), поэтому для дальнейших экспериментов нам потребовалось подобрать условия для транспорта полноразмерной формы белка YB-1 (1-324).



**Рис. 2. Исследование импорта белков GST, GST-cNLS, GST-M9NLS, HA-YB-1 (1–219) и HA-YB-1 (1–324) в лизате клеток HeLa.** Реакцию ядерного импорта проводили на пермеабелизованных клетках HeLa, выращенных в нормальных условиях, в присутствии пострибосомного лизата или лизата клеток HeLa в качестве источника растворимых транспортных факторов. Детекцию проводили окрашиванием клеток антителами против GST и HA-тага, конъюгированными с флуоресцентным красителем.

Отсутствие транспорта в ядро полноразмерной формы белка HA-YB-1 в тех же условиях, в которых осуществляется транспорт его укороченной формы, позволяет нам предположить, что для транспорта полноразмерного белка необходимы определенные модификации транспортной системы клетки. Возможно, эти модификации затрагивают растворимые транспортные факторы и/или компоненты ядерной поры и/или белков-партнеров YB-1. В пользу этого предположения говорят некоторые экспериментальные данные. Так, было обнаружено, что YB-1 переходит в ядро при стимуляции клеток ростовыми факторами, а также INF $\gamma$  (Sutherland *et al.*, 2005), (Higashi *et al.*, 2003). Известно, что стимуляция клеток ростовыми факторами вызывает активацию различных сигнальных каскадов, в том числе PI(3)K-Akt и MAPK. Очевидно, что при активации этих сигнальных каскадов происходят модификации различных белков, часть из которых, вероятно, имеют отношение к транспорту YB-1. Мы решили использовать этот подход для поиска условий, в которых бы наблюдался переход полноразмерной формы YB-1 в ядро. В качестве источника ростовых факторов мы использовали эмбриональную телячью сыворотку (fetal bovine serum, FBS). Клетки HeLa выращивали в разных условиях: обычные условия роста, 24-часовое голодание по сыворотке с последующей 2-часовой стимуляцией 20% сывороткой или же без стимуляции. Затем эти клетки использовали для получения цитозоля или пермеабелизованных клеток (ядра). Реакцию импорта проводили при различных сочетаниях компонентов. Мы обнаружили, что при некоторых сочетаниях компонентов наблюдается переход

полноразмерного НА-УВ-1 в ядро (рис. 3). Наиболее активно импорт полноразмерной формы НА-УВ-1 наблюдается в условиях, когда клетки для получения цитозоля и ядер были выращены в условиях голодания по сыворотке. В дальнейшем эти условия использовали для изучения механизма перехода полноразмерного белка НА-УВ-1 (1-324).



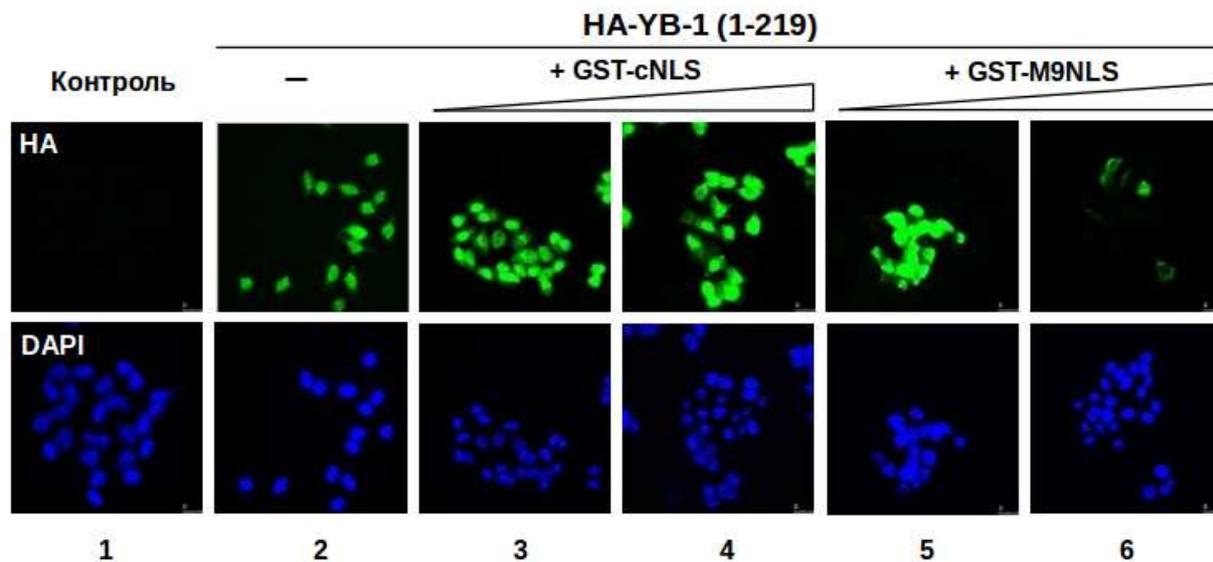
**Рис. 3. Подбор условий для исследования импорта НА-УВ-1 (1-324).** Реакцию ядерного импорта белка НА-УВ-1 (1-324) проводили на пермеабилizованных клетках HeLa, выращенных в разных условиях (указаны в графе «пермеабилizованные клетки/ядра») в присутствии и цитозоля из клеток HeLa, выращенных в разных условиях (указаны в графе «цитозоль»). Детекцию проводили окрашиванием клеток антителами против НА-тага, конъюгированными с флуоресцентным красителем. На рисунке суммированы данные о транспорте полноразмерного белка НА-УВ-1 в ядро в разных условиях: «+» – белок переходит в ядро (количество «+» коррелирует с количеством клеток с ядерной локализацией УВ-1), «-» – отсутствие перехода в ядро.

Можно предположить, что причиной разной способности цитозолей к транспорту НА-УВ-1 (1–324) могут быть модификации, а не простое изменение количества транспортных факторов. Нельзя исключить того, что полученные нами цитозоли могут различаться по количеству и/или модификациям белков-партнеров УВ-1, способствующих или ингибирующих его транспорт в ядро. Во второй половине С-концевого домена УВ-1 находится сигнал удержания в цитоплазме (CRS, 267-293 aa), механизм действия которого неизвестен. Один из потенциальных механизмов удержания белка УВ-1 в цитоплазме может заключаться в том, что эта последовательность служит местом связывания белка УВ-1 с другим цитоплазматическим белком, который и не дает белку перейти в ядро. Таким образом, УВ-1 может перейти в ядро либо в случае отщепления этой последовательности, либо в случае ослабления или нарушения этого взаимодействия. Взаимодействия между белками могут регулироваться различными модификациями. Можно предположить, при голодании клеток количество этого цитоплазматического белка-партнера снижается и/или он модифицируется таким образом, что больше не может взаимодействовать с УВ-1 и препятствовать его переходу в ядро. Подобный механизм может лежать в основе того наблюдения, что в транспортной системе, полученной из клеток, голодавших по сыворотке, полноразмерный УВ-1 способен переходить в ядро.

Хотя нам и не удалось установить причину наблюдаемых различий, полученные данные позволили нам использовать эти условия для дальнейшего изучения молекулярного механизма транспорта НА-УВ-1 (1–324).

## **2. Импорт белка НА-УВ-1 (1-219) в присутствии конкурентов за импортин-β1 и транспортин 1 в транспортной системе**

Для того чтобы подтвердить гипотезу о транспортин 1-зависимом транспорте УВ-1 в ядро мы решили провести реакцию импорта в модельной системе в присутствии конкурентов. В качестве конкурентов УВ-1 за транспортные факторы использовали модельные субстраты, описанные в пункте 1. Мы обнаружили, что присутствие в системе субстрата для импортина-β1 (GST-cNLS) не влияет на транспорт НА-УВ-1 (1–219) (рис. 4, третий и четвертый столбец). В тоже время увеличение содержания в системе субстрата для транспортина1 (GST-M9NLS) приводит к снижению транспорта НА-УВ-1 (1–219) в ядро (рис. 4, пятый и шестой столбец). Тот факт, что в присутствии конкурента некоторое количество НА-УВ-1 (1–219) продолжает переходить в ядро, можно объяснить избыточностью в системе транспорта транспортина 1 и достаточно длительным временем инкубации. Тем не менее, этот результат свидетельствует в пользу гипотезы о транспортин 1-опосредованном транспорте НА-УВ-1 (1–219).



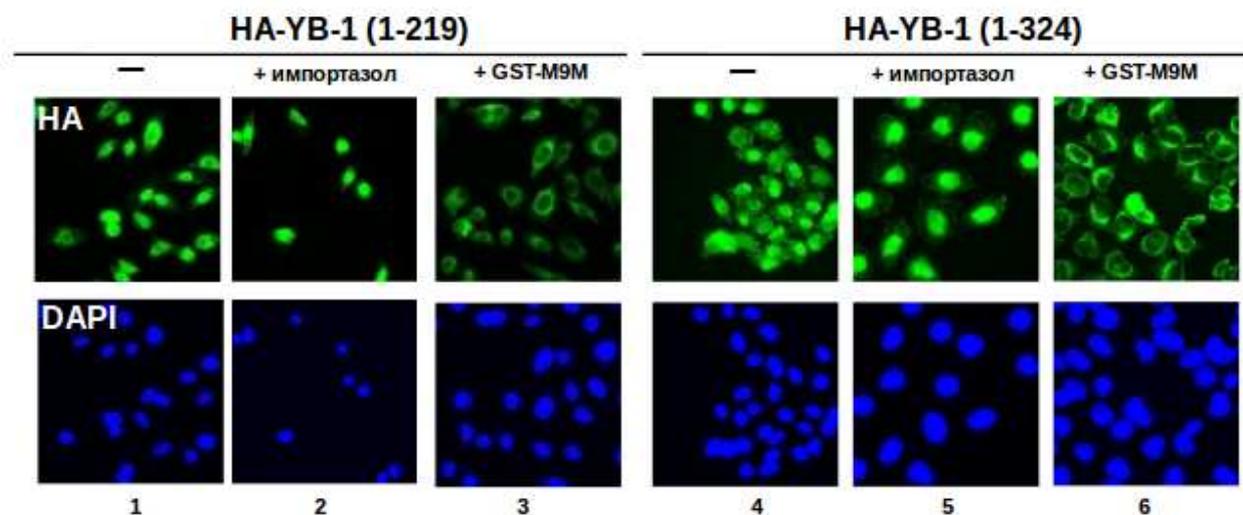
**Рис. 4. Исследование импорта HA-YB-1 (1-219) в условиях конкуренции с GST-cNLS и GST-M9NLS.** Реакцию ядерного импорта проводили на пермеабелизованных клетках HeLa, выращенных в нормальных условиях, в присутствии HA-YB-1(1-219), цитозоля из клеток HeLa в качестве источника растворимых транспортных факторов и увеличивающихся количеств конкурентного белка GST-cNLS (0 мкг, 1,5 мкг, 3 мкг) или GST-M9NLS (0 мкг, 1,5 мкг, 3 мкг). Детекцию проводили окрашиванием клеток антителами против HA-тага, конъюгированными с флуоресцентным красителем.

### **3. Импорт укороченной (1-219) и полноразмерной (1-324) форм HA-YB-1 в присутствии ингибиторов импортина- $\beta$ 1 и транспортного 1 в транспортной системе**

Далее мы решили проверить импорт укороченной и полноразмерной форм YB-1 в модельной системе в присутствии ингибиторов ядерного транспорта. Реакцию импорта укороченной формы YB-1 (1-219) проводили в транспортной системе, собранной из клеток HeLa, выращенных в обычных условиях роста (10% FBS). Реакцию импорта полноразмерной формы белка YB-1 (1-219) проводили в транспортной системе, собранной из клеток, выращенных в условиях голодания по сыворотке (0% FBS, 24 часа).

В качестве ингибитора импортина- $\beta$ 1 мы использовали импортазол, который препятствует взаимодействию импортина с адапторными белками импортинами- $\alpha$ . Для ингибирования транспортного 1 мы выделили пептидный ингибитор GST-M9M, который связывается с транспортным белком с более высокой аффинностью, чем другие белки (Cansizoglu *et al.*, 2007). Мы обнаружили, что присутствие в системе импортазола (ингибирует импортин- $\beta$ 1) не влияет на транспорт HA-YB-1 (1-219) и HA-YB-1 (1-324) (рис. 5, второй и пятый столбцы). В тоже время при наличии в системе GST-M9M (ингибирует

транспортин 1) транспорт НА-УВ-1 (1–219) и НА-УВ-1 (1-324) прекращается (рис. 7, третий и шестой столбцы).



**Рисунок 5. Исследование импорта НА-УВ-1 (1–219) и НА-УВ-1 (1–324) в условиях ингибирования импортина- $\beta$ 1 и транспортина 1.** Реакцию ядерного импорта белков НА-УВ-1 (1–219) и НА-УВ-1 (1–324) проводили на пермеабелизованных клетках HeLa, выращенных в нормальных условиях (укороченная форма) или в условия голодания по сыворотке (полноразмерная форма) и цитозоля из клеток HeLa, выращенных в аналогичных условиях в качестве источника растворимых транспортных факторов и увеличивающихся количеств ингибитора импортина- $\beta$ 1 (импортасол) или ингитора транспортина 1 (GST-M9M). Детекцию проводили окрашиванием клеток антителами против НА-тага, конъюгированными с флуоресцентным красителем.

#### 4. Мутации в сигнале ядерной локализации белка УВ-1 приводят к нарушению его ядерно-цитоплазматического транспорта

Альтернативным подходом к доказательству того, что УВ-1 транспортируется в ядро по транспортин-1-зависимому механизму, является мутационный анализ. Ранее было предположено, что сигнал ядерной локализации в молекуле УВ-1 относится к классу положительно заряженных РУ-NLS (Lee *et al.*, 2006) (рис. 6). Белки, имеющие такие сигналы ядерной локализации импортируются в ядро при участии транспортина 1.

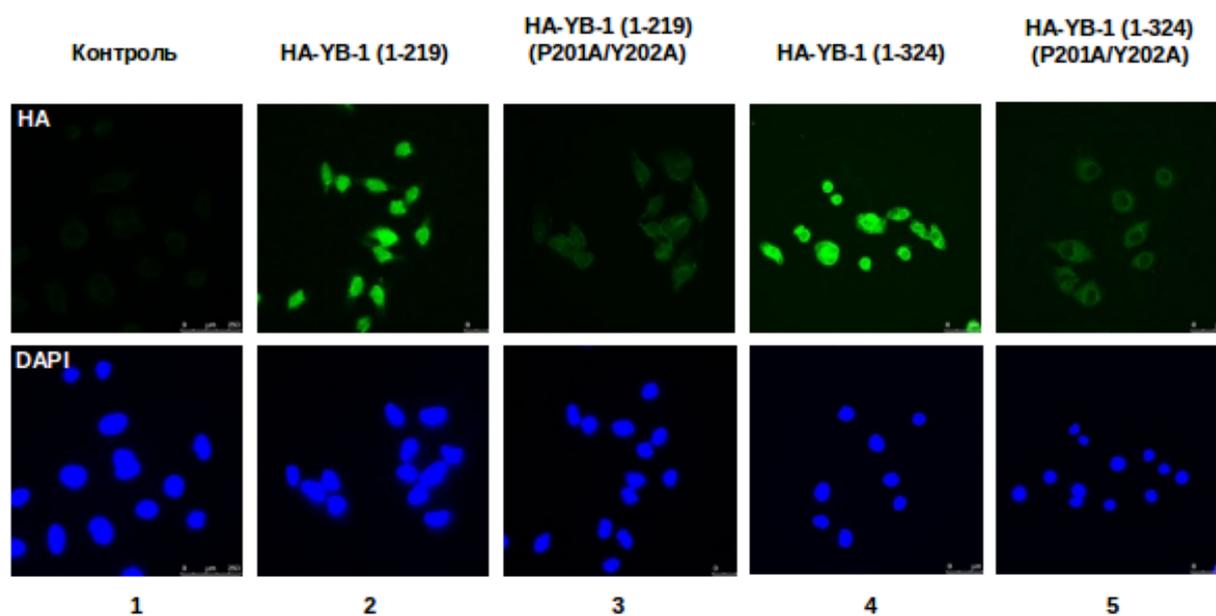
**Motif: basic-enriched<sub>(5-8)</sub>-X<sub>(8-10)</sub>-PY**

**УВ-1: S<sub>174</sub>ESAPEGQAQQRRPYRRRRFPPYYMRRPY<sub>202</sub>**

**Рис. 6. Структура сигнала ядерной локализации белка УВ-1.** Сигнал ядерной локализации (NLS) белка УВ-1 с изменениями из Lee *et al.*, 2006. Аминокислотные остатки, образующие мотив NLS выделены жирным. Показана консенсусная последовательность положительно заряженных сигналов ядерной локализации типа РУ-NLS.

Известно, что для функционирования NLS этого типа крайне важны остатки пролина и тирозина в С-концевой части сигнала (Lee *et al.*, 2006). Замена этих остатков на аланин приводит к инактивации сигнала и отсутствию транспорта в ядро в белках, имеющих такой NLS (мРНК-связывающий белок из *S. cerevisiae* Hrp1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 1) (Lange *et al.*, 2008), аналог PABPN1 у *S. pombe* белок Pab2 (Mallet *et al.*, 2013), FUS (Dormann *et al.*, 2010; Kino *et al.*, 2011), EWS (Leemann-Zakaryan *et al.*, 2011), Huntingtin (Desmond *et al.*, 2012).

В связи с этим мы решили получить полноразмерную и укороченную формы HA-YB-1 с указанными мутациями в области сигнала ядерной локализации. С полученными белками была проведена реакция импорта в ядро в модельной системе. Мы обнаружили, что мутантная форма как укороченного, так и полноразмерного (рис. 7) белка HA-YB-1 не транспортируются в ядро. Это еще раз подтверждает, что транспорт YB-1 в ядро идет по транспортин 1-зависимому пути.

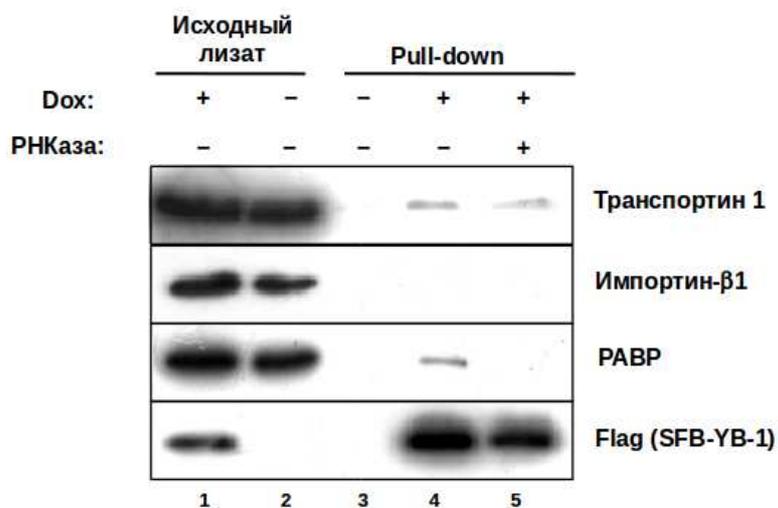


**Рисунок 7.** Исследование импорта белков HA-YB-1 (1-219), HA-YB-1 (1-219) (P201A,Y202A), HA-YB-1 (1-324) и HA-YB-1 (1-324)(P210A,Y202A). Реакцию ядерного импорта проводили в транспортной системы, полученной из клетках HeLa, выращенных в нормальных условиях роста (укороченная форма белка) и в условиях голодания по сыворотке (полноразмерная форма белка). Детекцию проводили окрашиванием клеток антителами против HA-тага, конъюгированными с флуоресцентным красителем.

### 5. YB-1 взаимодействует с транспортин 1

Далее мы решили подтвердить экспериментальные данные, свидетельствующие в пользу взаимодействия YB-1 и транспортина 1 (Guttinger *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006). Для этого мы получили стабильную клеточную

линию HeLa, в которой синтез белка YB-1 индуцировался добавлением среды доксициклина. Индуцированный YB-1 имел на N-конце два мотива: flag (использовался для детекции белка) и стрептавидин-связывающий пептид (использовался для иммобилизации белковых комплексов). Цитоплазматический экстракт клеток HeLa, не синтезирующих или синтезирующих SFB-YB-1, инкубировали со стрептавидин-сефарозой в присутствии РНКазы или без нее. Связавшиеся со смолой белковые комплексы элюировали и анализировали с помощью иммуноблоттинга (рис. 8).



**Рис. 8. Обнаружение транспортных факторов в комплексе с YB-1: ко-иммунопреципитация белковых комплексов за стрептавидин-связывающую последовательность (SF-YB-1) из лизата клеток HeLa.** Синтез SF-YB-1 индуцировался с плазмиды pDESt-SFB-YB-1 доксициклином (doхусуclin, doх) в течении 48 часов. Лизат клеток HeLa, обработанный (столбцы 3-4) или необработанный РНКазой (микрококковая нуклеаза) (столбец 5) инкубировали 1 час при комнатной температуре со стрептавидин-сефарозой. Элюированные комплексы разделяли электрофорезом в SDS-ПААГ. Связавшиеся белки анализировали иммуноблоттингом с использованием антител против flag (SFB-YB-1), транспортаина 1, импортина-β1 и PABP.

Образцы на 1 и 2 дорожках являются контрольными. Они показывают наличие исследуемых белков в клеточных лизатах до эксперимента. Как видно из рисунка, транспортин 1, импортин-β1 и PABP присутствуют в клеточном лизате. Кроме того, они позволяют оценить наличие YB-1 с дополнительными пептидными последовательностями (SFB-YB-1) до и после индукции синтеза белка. Как видно из рисунка (дорожка 1 и 2, нижняя панель), без добавления в среду доксициклина, синтез белка SFB-YB-1 не происходит. 3, 4 и 5 дорожки — анализ белков, выделенных из клеточных лизатов за стрептавидин-связывающий мотив YB-1. Отсутствие анализируемых белков в 3 дорожке говорит о том, что в отсутствие SFB-YB-1 не происходит неспецифической

сорбции клеточных белков на стрептавидин-сефарозе. 4 и 5 дорожка отличаются тем, что один из клеточных лизатов (5 дорожка) был предварительно обработан РНКазой. Сравнение этих двух дорожек позволяет оценить характер взаимодействия между белками (прямое белок-белковое или РНК-опосредованное). Примером РНК-опосредованного взаимодействия с УВ-1 является взаимодействие с белком РАВР. Как видно из рисунка 8, РАВР выделяется в комплексе с УВ-1 только в присутствии РНК. Импортин-β1 не обнаруживался в комплексе с УВ-1 ни при каких условиях. В случае транспортина 1 можно видеть, что он обнаруживается в комплексе с УВ-1 как в присутствии, так и отсутствии РНК. Можно сделать вывод о том, что именно транспортин 1, но не импортин-β1, взаимодействует с УВ-1 в клеточном лизате. Причем это взаимодействие прямое белок-белковое, так как обработка лизата РНКазами не приводила к нарушению взаимодействия между УВ-1 и транспортин 1.

Суммируя результаты первой части работы можно сделать вывод о том, что транспорт белка УВ-1 в ядро обеспечивается транспортным белком транспортин 1.

Вторая часть работы посвящена изучению взаимосвязи внутриклеточной локализации белка УВ-1, его взаимодействию с мРНК и влиянию фосфорилирования УВ-1 по Ser102 на импорт УВ-1.

## **6. Ингибирование РНК-полимеразы II индуцирует накопление УВ-1 в ядрах**

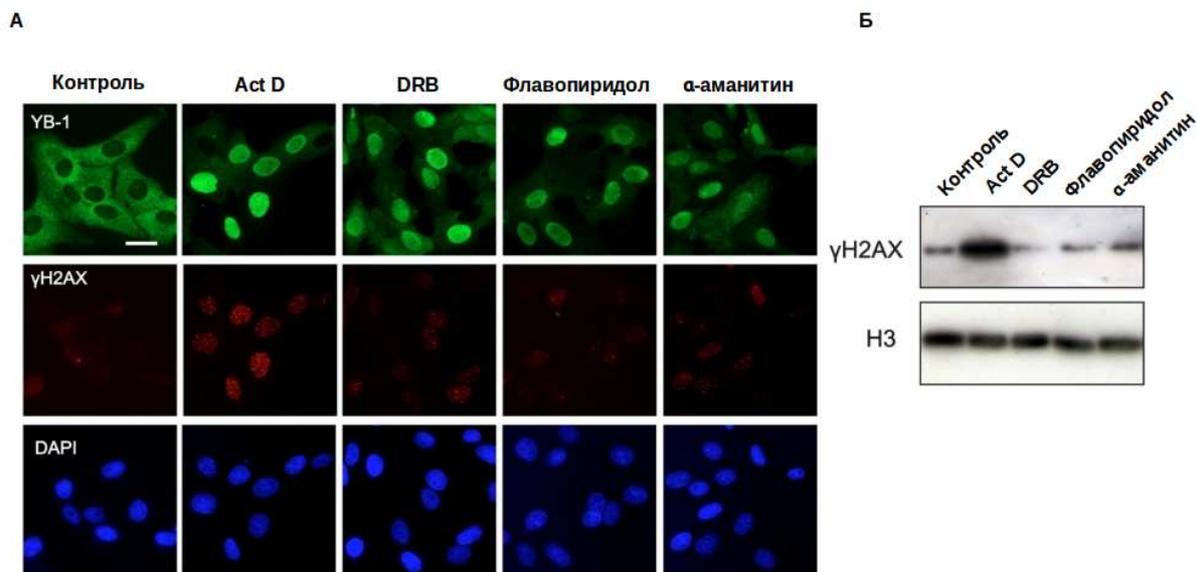
Многие исследования показали, что агенты, повреждающие ДНК, например, цисплатин, доксорубин, митомицин С, ультрафиолетовое облучение, могут вызывать ядерную транслокацию УВ-1 (Sorokin *et al.*, 2006; Koike *et al.*, 1997; Toulany *et al.*, 2011; Chattopadhyay *et al.*, 2008; Hayakawa *et al.*, 2002; Guay *et al.*, 2006; Fujita *et al.*, 2005; Ohga *et al.*, 1996; Yahata *et al.*, 2002; Cohen *et al.*, 2010). Однако, такие генотоксические агенты помимо их способности повреждать ДНК, также могут опосредованно влиять на транскрипционную активность клетки. Поэтому было важно выяснить, является ли остановка транскрипции сама по себе приводить к накоплению УВ-1 в ядре или накопление белка в ядре является следствием повреждения ДНК.

Поскольку в эукариотических клетках мРНК синтезируется РНК-полимеразой II, и именно мРНК является основным партнером белка УВ-1, мы решили сконцентрировать свое внимание на ней. Для своей работе мы выбрали несколько препаратов с разным механизмом ингибирования транскрипции. Мы использовали актиномицин D (ActD), ДНК-интеркалирующий агент, который

способствует двухцепочечным разрывам (DSB) в ДНК и блокирует транскрипцию. Другие выбранные нами соединения блокируют транскрипцию, но не вызывают повреждения ДНК. 5,6-дихлорбензимидазол, 1-D-рибофуранозид (DRB) и флавопиридол являются ингибиторами киназы CDK9, ингибирование которой предотвращает фосфорилирование С-концевого домена РНК-полимеразы II, тем самым обеспечивая прекращение транскрипции. Другой препарат,  $\alpha$ -аманитин, связывается с активным центром РНК-полимеразы II и нарушает его перемещение по ДНК после добавления нуклеотида.

Мы инкубировали клетки Vero с указанными ингибиторами транскрипции в течении суток, после чего анализировали внутриклеточную локализацию белка YB-1. Мы обнаружили, что в отличии от контрольных клеток, в клетках, обработанных ActD, DRB, флавопиридом и  $\alpha$ -аманитином, YB-1 локализуется в основном в ядре (рис. 9А).

Однако для ответа на поставленный вопрос: может ли остановка транскрипции приводить к накоплению YB-1 в ядре или накопление белка в ядре является следствием повреждения ДНК, нам было необходимо контролировать уровень повреждения ДНК в клетке. В качестве маркера повреждения ДНК в клетках, мы использовали фосфорилированный гистон H2AX ( $\gamma$ H2AX), который специфически маркирует двухцепочечные разрывы ДНК (DSB) в ядре. Мы анализировали количество фосфорилированного гистона H2AX в клетках при помощи флуоресцентной микроскопии и иммуноблотинга (рис. 9 А, Б). Как и ожидалось, ActD индуцировал сильное фосфорилирование H2AX. Однако при использовании других ингибиторов транскрипции увеличение уровня  $\gamma$ H2AX обнаружено не было. Этот факт указывает на то, что ядерная локализация YB-1, индуцированная DRB, флавопиридом и  $\alpha$ -аманитином, происходит в отсутствие двухцепочечных разрывов ДНК и связан только с ингибированием транскрипции.

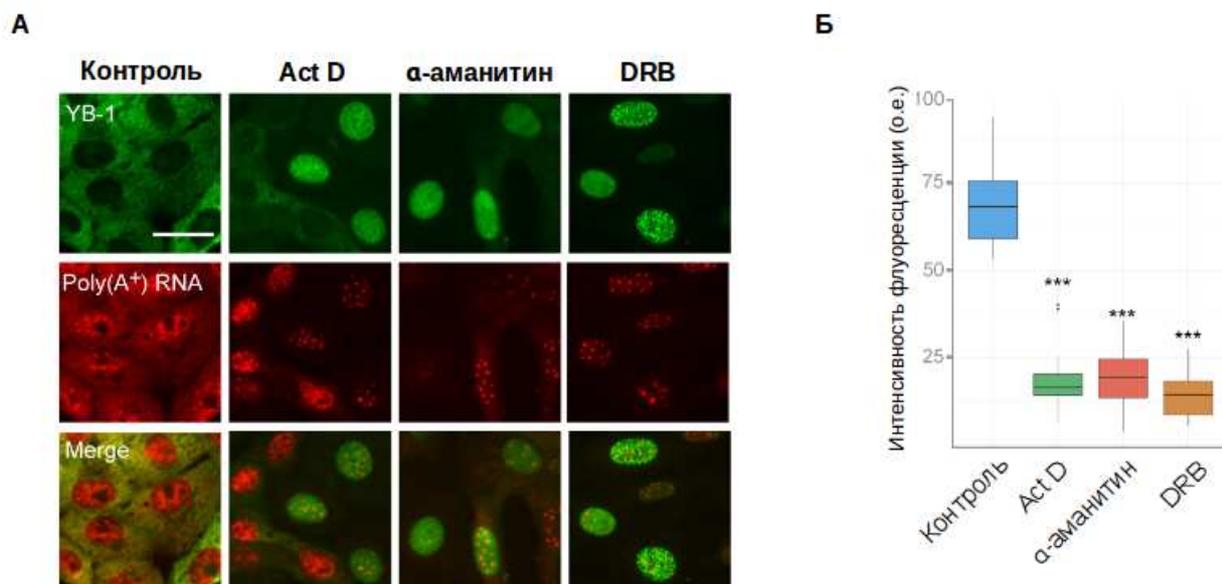


**Рис. 9. YB-1 накапливается в ядре при ингибировании транскрипции.** Клетки Vero инкубировали 24 часа с DMSO (контроль), актиномицином Д (ActD), 5,6-dichlorobenzimidazole 1-β-D-ribofuranoside (DRB), флавопиридолом, α-аманитином. После инкубации в клетках анализировали внутриклеточную локализацию белка YB-1 (А, верхняя панель) и наличие фосфорилированной формы гистона H2AX (γH2AX) (А, средняя панель) методом иммунофлуоресцентной микроскопии. Ядра (ДНК) окрашивали DAPI (А, нижняя панель). Клеточные экстракты этих клеток анализировали ИВ с анти-γH2AX и анти-histone H3 (Б).

## 7. Ингибирование РНК-полимеразы II влияет на распределение поли (A+) РНК в клетке

Довольно давно было высказано предположение, что YB-1 удерживается в цитоплазме за счет взаимодействия с мРНК. Таким образом, при снижении уровня мРНК в цитоплазме свободный от мРНК YB-1 мог бы переходить в ядро. Принимая во внимание эту гипотезу, нам было необходимо проверить, изменяется ли количество мРНК в цитоплазме при ингибировании РНК-полимеразы II за время эксперимента.

Для анализа распределения мРНК в клетках мы воспользовались методом гибридизация *in situ* с использованием флуоресцентно меченных олиго (dT) зондов, распознающих поли-(A) хвосты мРНК. При обработке клеток ActD, DRB или α-аманитином в течение 24 часов, мы наблюдали сильное снижение уровня поли (A+) мРНК в цитоплазме (рис. 10). Таким образом, деградация мРНК в цитоплазме коррелирует с транслокацией YB-1 в ядро. Из этого следует, что переход YB-1 в ядро может быть вызван снижением уровня мРНК в цитоплазме.



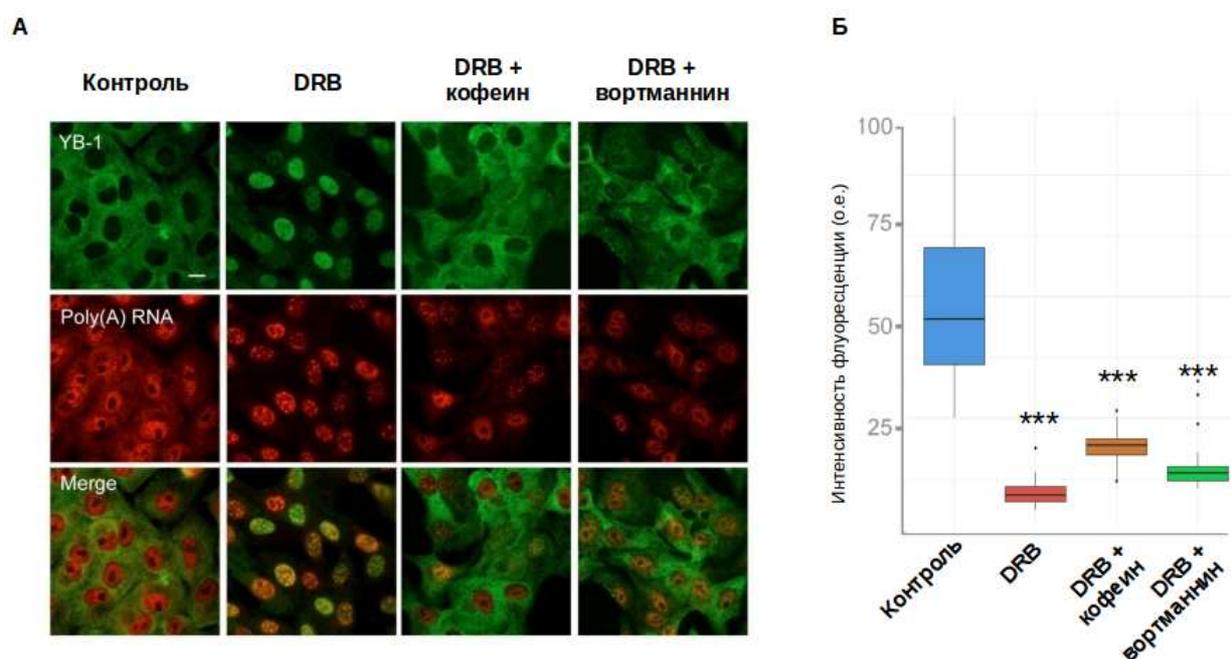
**Рис. 10. Ингибирование РНК-полимеразы II влияет на количество мРНК в клетках.** Клетки Vero инкубировали 24 часа с ингибиторами транскрипции (Act D, α-amanitin, DRB и DMSO в контрольных клетках). После инкубации в клетках определяли локализацию белка YB-1 методом иммунофлуоресцентной микроскопии (А, верхняя панель), уровень мРНК анализировали методом гибридизация *in situ* с олиго-dT-зондом (А, средняя панель). В части рисунка Б приведен обсчет интенсивности флуоресценции олиго-dT-зонда (поли-(A+)РНК) в цитоплазме контрольных клеток и клеток, обработанных ингибиторами транскрипции. Интенсивность флуоресцентного сигнала от олиго-dT-зонда в цитоплазме подсчитывали в программе ImageJ. Значимость отличия от контроля рассчитывали с помощью t-критерия Стьюдента. \*\*\* $p < 0.005$ .

## 8. Ингибирование РНК-полимеразы II вызывает фосфорилирование YB1 по Ser 102

Несколько посттрансляционных модификаций связаны с ядерным накоплением YB-1. Фосфорилирование YB-1 по Ser102 - одна из наиболее охарактеризованных модификаций YB-1, которую часто связывают с ядерной локализацией белка. Кроме того, было показано, что ингибирование некоторых киназ препятствует переходу белка YB-1 в ядро. Так, при ингибировании протеинкиназы С нарушается импорт YB-1, стимулированный ультрафиолетом (Higashi *et al.*, 2003), а при ингибировании Jak1/Jak2 — импорт, стимулированный INFγ (Koike *et al.*, 1997). Чтобы оценить потенциальное влияние фосфорилирования на ядерную транслокацию YB-1 в условиях ингибирования транскрипции, мы решили проанализировать внутриклеточную локализацию YB-1 при одновременном использовании ингибиторов транскрипции и ингибиторов киназ широкого спектра действия. Мы выбрали вортманин (wortmannin), ингибитор каскада PI(3)K-Akt (ингибирует PI3K киназу) и кофеин (caffeine), ингибитор более широкого спектра действия

(блокирует PI(3)K-Akt-каскад, ингибируя киназы PI(3)K и Akt, и активируя PTEN; ингибирует mTOR, ERK (в умеренных концентрациях, в высоких — активирует ERK1/2)) (Cui *et al.*, 2020).

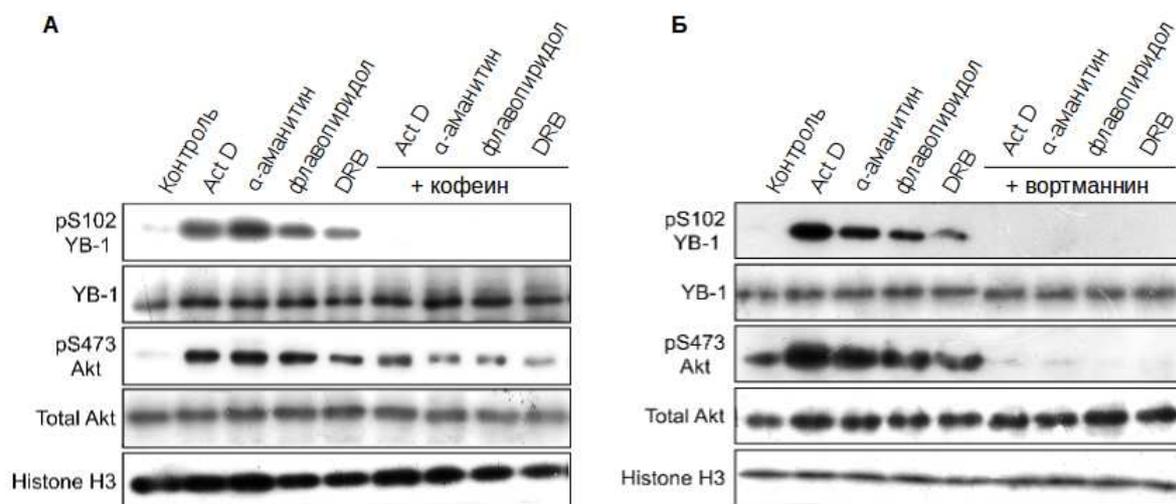
Мы обнаружили, что добавление кофеина и вортманина к клеткам одновременно с ингибитором транскрипции (DRB) сильно ослабляет ядерный импорт YB-1 (рис. 11 А). Мы также оценили уровень мРНК в цитоплазме и обнаружили, что он мРНК был заметно снижен. Но несмотря на это, YB-1 оставался в цитоплазме (рис. 11 Б), что говорит о том, что просто снижения уровня мРНК в цитоплазме недостаточно для ядерной транслокации YB-1.



**Рис. 11. Ингибиторы киназ (кофеин и вортманин) препятствуют индуцированному остановкой транскрипции переходу белка YB-1 в ядро.** Клетки Vero инкубировали 24 часа с ингибитором транскрипции DRB отдельно и одновременно с ингибиторами киназ (кофеин и вортманин). После инкубации в клетках анализировали внутриклеточную локализацию белка YB-1 иммунофлуоресцентной микроскопией. Уровень мРНК в клетках анализировали методом гибридизации *in situ* с олиго-dT-зондом. В части рисунка Б приведен обсчет интенсивности флуоресценции олиго-dT-зонда (поли-(A+)РНК) в цитоплазме контрольных клеток и клеток, обработанных ингибиторами транскрипции и ингибиторами киназ. Интенсивность флуоресцентного сигнала от олиго-dT-зонда в цитоплазме подсчитывали в программе ImageJ. Значимость отличия от контроля рассчитывали с помощью t-критерия Стьюдента. \*\*\* $p < 0.005$ .

Использованные нами ингибиторы киназ кофеин и вортманин хотя и не являются абсолютно специфическими, тем не менее, оба этих ингибитора блокируют активацию PI3K-Akt сигнального каскада. Как было показано ранее, Akt-киназа является одной из тех киназ, кто фосфорилирует YB-1 по серину 102 (S102). Мы предположили, что при ингибировании транскрипции происходит

активация Akt-киназы, которая фосфорилирует YB-1 по S102 и после этого YB-1 переходит в ядро. При одновременном добавлении ингибиторов транскрипции и ингибиторов киназ, активации Akt-киназы не происходит, YB-1 не фосфорилируется и не переходит в ядро. Чтобы проверить наше предположение, мы проанализировали фосфорилирование YB-1 и Akt-киназы (фосфорилирование по S473 говорит об активации фермента) в условиях ингибирования транскрипции и при добавлении кофеина (рис. 12 А) и вортманнина (рис. 12 Б).

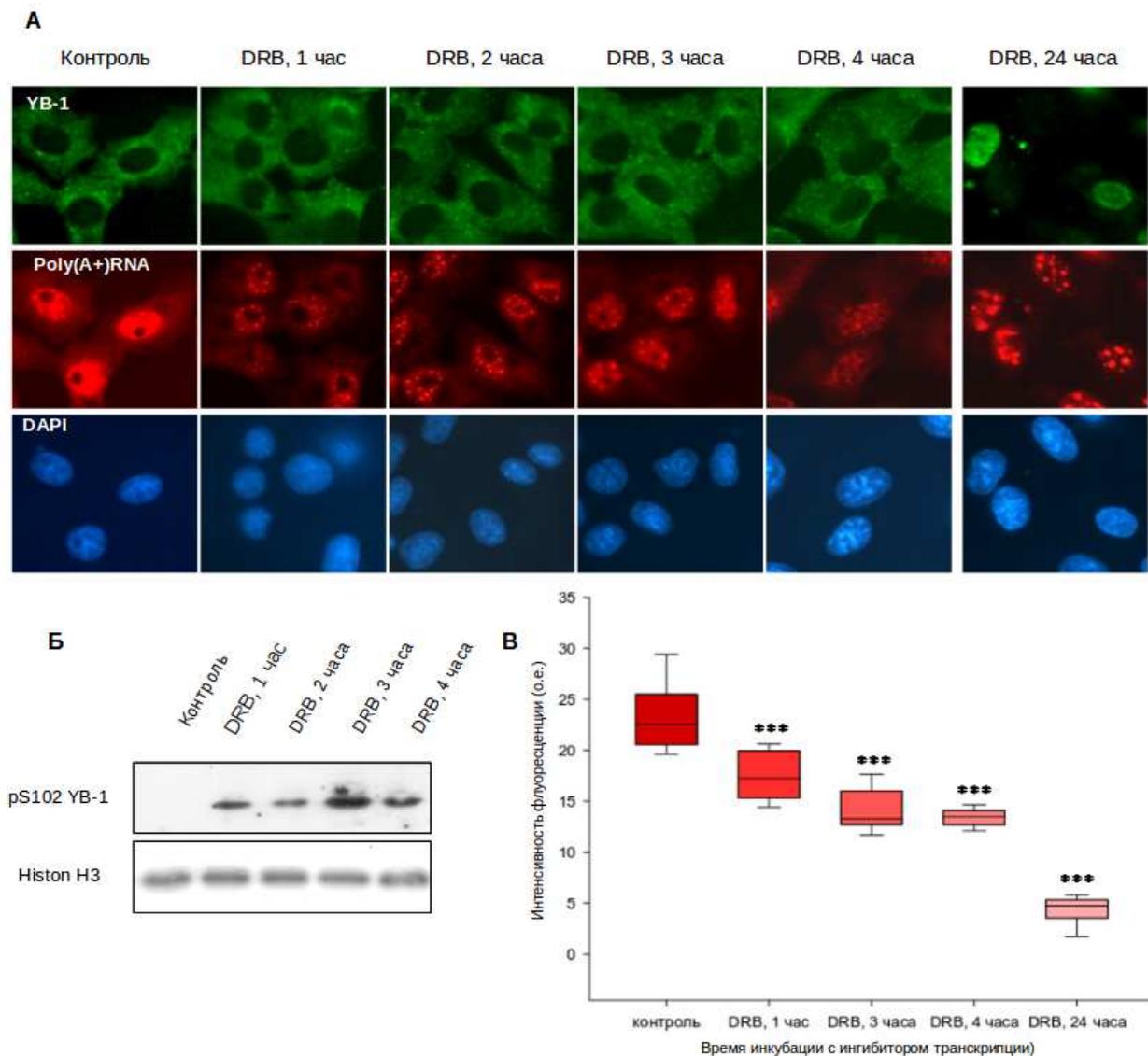


**Рис. 12. Ингибирование транскрипции приводит к увеличению фосфорилирования YB-1 (Ser102).** Клетки Vero инкубировали 24 часа с ингибиторами транскрипции (ActD, α-amanitin, Flavoperidol, DRB) отдельно и одновременно с ингибиторами киназ: кофеином (А) и вортманином (Б). После инкубации экстракты этих клеток анализировали ИВ с анти-pS102 YB-1, анти-YB-1, анти-pS473 Akt, анти-Akt, анти-гистон H3.

Мы обнаружили, что ингибирование транскрипции действительно приводит к активации (фосфорилированию) Akt-киназы и увеличению фосфорилирования YB-1. Ингибиторы киназ (кофеин и ворманин) приводят к снижению уровня фосфорилирования Akt-киназы и белка YB-1. Этот эксперимент показывает, что для транслокации YB-1 в ядро одной только деградации мРНК в цитоплазме недостаточно, необходимы посттрансляционные модификации YB-1, в частности, фосфорилирование по Ser102.

Далее мы решили проверить в какой момент времени после остановки транскрипции белок YB-1 начинает фосфорилироваться. Мы инкубировали клетки с ингибитором транскрипции DRB разные временные интервалы, после чего анализировали уровень фосфорилирования YB-1 по Ser 102 (рисунок 13, А) и его внутриклеточную локализацию (рисунок 13, Б). Оказалось, что YB-1

начинает фосфорилироваться уже в первые часы после остановки транскрипции, но при этом он остается в цитоплазме.

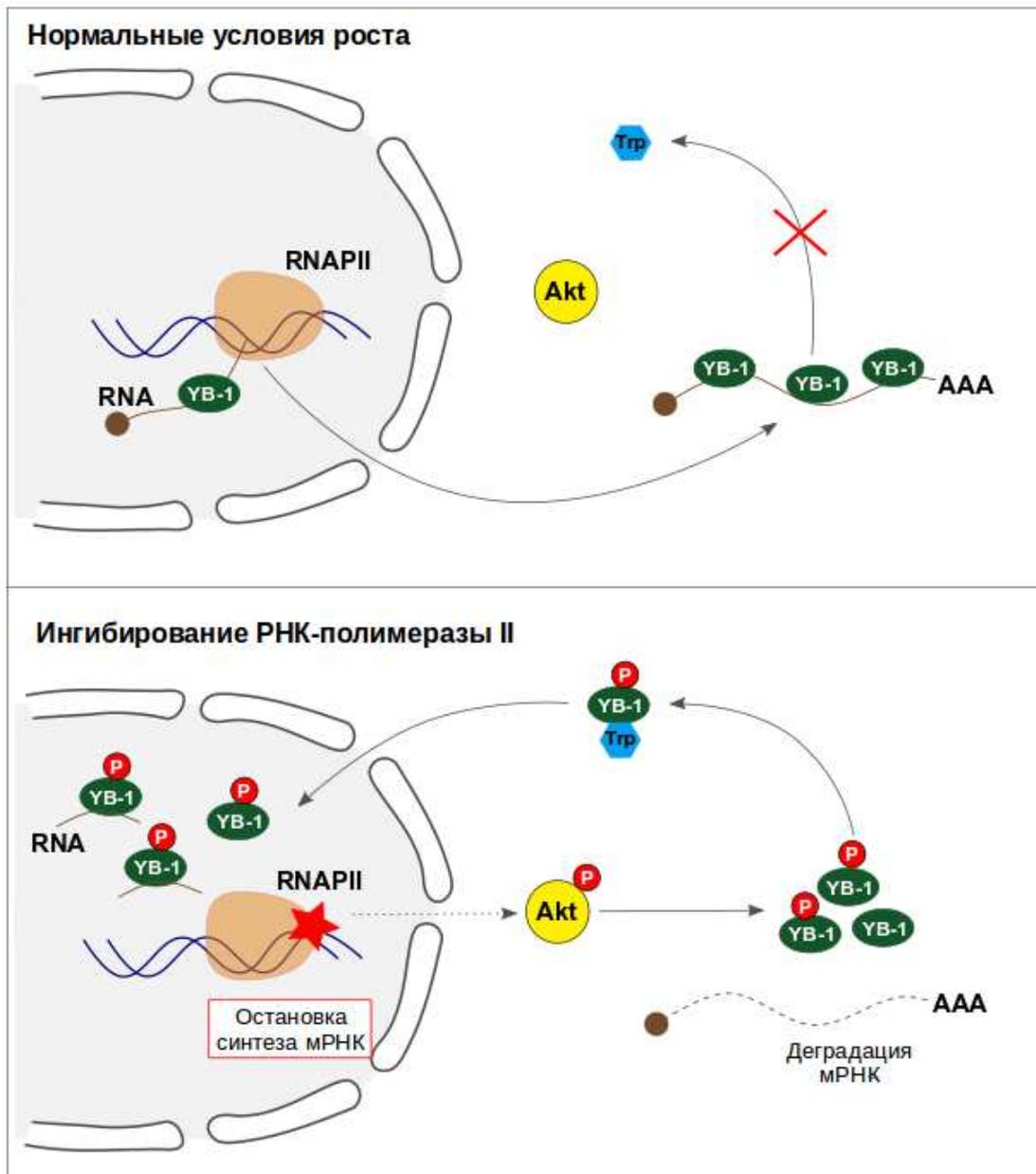


**Рис. 13. Фосфорилирование YB-1 по Ser102 при ингибировании транскрипции происходит в цитоплазме клетки и предшествует переходу белка в ядро.** Клетки Vero инкубировали 24 часа с ингибитором транскрипции DRB в течении указанного времени (0 (контроль), 1, 2, 3 или 4 часа). После инкубации в клетках анализировали внутриклеточную локализацию белка YB-1 иммунофлуоресцентной микроскопией (А, верхняя панель). Поли-(A+)РНК в клетках анализировали методом гибридизации *in situ* с олиго-dT-зондом (А, средняя панель). Ядра (ДНК) окрашивали DAPI (А, нижняя панель). После инкубации в клетках анализировали уровень фосфорилирования YB-1 по S102 методом ИВ с использованием антител анти-pS102 YB-1 (Б, верхняя панель). В качестве контроля нагрузки использовался гистон (антитела анти-гистон H3) (Б, нижняя панель). В части рисунка В приведен обсчет интенсивности флуоресценции олиго-dT-зонда (поли-(A+)РНК) в цитоплазме контрольных клеток и клеток, обработанных ингибитором транскрипции DRB. Интенсивность флуоресцентного сигнала от олиго-dT-зонда в цитоплазме подсчитывали в

программе ImageJ. Значимость отличия от контроля рассчитывали с помощью t-критерия Стьюдента. \*\*\* $p < 0.005$ .

Этот эксперимент показывает, что для транслокации YB-1 в ядро только фосфорилирования по Ser102 недостаточно. Переходу белка YB-1 в ядро при ингибировании транскрипции предшествует его фосфорилирование по Ser 102 и снижение уровня мРНК в цитоплазме.

На основании этих экспериментов мы предложили схему регуляции ядерного импорта белка YB-1 при ингибировании транскрипции (рисунок 14). При нормальных условиях роста клеток белок YB-1 локализуется в цитоплазме и находится в РНК-связанном состоянии. При ингибировании транскрипции наблюдается активация и фосфорилирование Akt-киназы, которая, в свою очередь, фосфорилирует белок YB-1 по Ser102 уже в первые часы после ингибирования РНК-полимеразы II. Однако переход белка в ядро осуществляется только через 16-24 часа после начала ингибирования РНК-полимеразы II. Можно предположить, что для перехода белка YB-1 в ядро при ингибировании транскрипции необходимо сочетание двух факторов: фосфорилирование YB-1 и снижение уровня мРНК в цитоплазме.



**Рис. 14. Принципиальная схема регуляции транслокации в ядро белка YB-1 при ингибировании транскрипции.** При нормальных условиях роста клеток белок YB-1 связан с мРНК и локализуется в цитоплазме. При ингибировании транскрипции происходит активация Akt-киназы, которая фосфорилирует белок YB-1 по Ser102 уже в первые часы после ингибирования РНК-полимеразы II. Через 16-24 часа после остановки транскрипции уровень мРНК в клетке снижается и YB-1 переходит в ядро. Вероятно, переход белка YB-1 в ядро при ингибировании транскрипции возможен только при сочетании двух факторов: фосфорилирование YB-1 и снижение уровня мРНК в цитоплазме. Обозначения на рисунке RNA - РНК, RNAPII — РНК-полимераза II, Trp — транспортин 1, Akt- киназа Akt.

## ВЫВОДЫ

1. Транспорт YB-1 в ядро осуществляется транспортин-1.
2. Переход YB-1 в ядро может вызываться снижением уровня мРНК в цитоплазме вследствие ингибирования РНК-полимеразы II, а не только повреждением ДНК.
3. Переход белка YB-1 в ядро при ингибировании транскрипции возможен только при сочетании двух факторов: фосфорилирование YB-1 и снижение уровня мРНК в цитоплазме.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) Mordovkina D.A., Kim E.R., Buldakov I.A., Sorokin A.V., Eliseeva I.A., Lyabin D.N. and Ovchinnikov L.P.: Transportin-1-dependent YB-1 nuclear import // Biochem Biophys Res Commun. -2016. -480. -№ 4. -P. 629-634. IF<sub>2021</sub> (Web of Science)=3,375
- 2) Kretov D.A., Mordovkina D.A., Lyabin D.N., Eliseeva I.A., Polyakov D.N., Joshi V., Desforges B., Hamon L., Lavrik O.I., Pastré D., Curmi P.A. and Ovchinnikov L.P.: Inhibition of transcription induces phosphorylation of YB-1 at S102 and its accumulation in the nucleus // Cells. -2019. -Vol.9. -№ 1. -P. 104. IF<sub>2021</sub> (Web of Science)=6,6
- 3) Mordovkina D., Lyabin D.N., Smolin E.A., Sogorina E.M., Ovchinnikov L.P., Eliseeva I.A.: Y-Box Binding Proteins in mRNP Assembly, Translation, and Stability Control // Biomolecules. -2020. -Vol. 10. -№ 4. -P. 591. IF<sub>2021</sub> (Web of Science)=4,879
- 4) Kim E.R., Mordovkina D.A., Sorokin A.V.: Targeting XPO1-dependent nuclear export in cancer // Biochemistry (Moscow). -2022. -Vol. 87. -S.178-191. IF<sub>2021</sub> (Web of Science)=2,487
- 5) Sogorina E.M., Kim E.R., Sorokin A.V., Lyabin D.N., Ovchinnikov L.P., Mordovkina D.A., Eliseeva I.A.: YB-1 Phosphorylation at Serine 209 Inhibits Its Nuclear Translocation // Int J Mol Sci. -2021. -Vol. 23. -№ 1. -P. 428. IF<sub>2021</sub> (Web of Science)=5,923