

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*

Лябин Дмитрий Николаевич

РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА  $\gamma$ -БОКС-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА 1  
И ЕГО РОЛЬ В ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

Специальность 1.5.3.– молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Москва – 2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	5
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	7
<b>ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	13
<b>1. СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ YB-1</b> .....	13
1.1. Структура YB-1 .....	13
1.2. Взаимодействие с нуклеиновыми кислотами .....	18
1.3. Образование мРНК частиц при участии YB-белков.....	25
1.4. YB-1 как ингибитор трансляции .....	26
1.5. YB-1 как стимулятор трансляции .....	30
1.6. Роль YB-1 в контроле стабильности мРНК .....	32
1.7. YB-1 как транскрипционный фактор .....	35
1.8. YB-1 как фактор сплайсинга .....	39
1.9. Участие YB-1 в репарации ДНК .....	41
1.10. Секретия и экстраклеточные функции YB-1.....	44
<b>2. РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИЙ YB-1</b> .....	47
2.1. Посттрансляционные модификации YB-1 и их влияние на активность YB-1.....	47
2.2. Ядерно-цитоплазматический транспорт YB-1 .....	50
2.3. Влияние некодирующих РНК на активность YB-1.....	53
<b>3. ПРОЯВЛЕНИЕ СВОЙСТВ И ФУНКЦИЙ YB-1 НА КЛЕТОЧНОМ УРОВНЕ И УРОВНЕ ЦЕЛОГО ОРГАНИЗМА.</b> .....	56
3.1. Роль YB-1 в эмбриональном развитии .....	56
3.2. Влияние YB-1 на пролиферацию клеток .....	57
3.3. Роль YB-1 в клеточном старении.....	58
3.4. Влияние YB-1 на апоптоз .....	59
3.5. Участие YB-1 в адаптации клеток к стрессовым условиям .....	60
3.6. Участие YB-1 в (де)дифференцировке клеток .....	63
3.7. YB-1 и воспалительные процессы .....	64
3.8. Роль YB-1 в онкогенезе .....	65
<b>4. РЕГУЛЯЦИЯ КОЛИЧЕСТВА YB-1</b> .....	69
4.1. Структура гена <i>YBX1</i> и его экспрессия .....	69
4.2. Регуляция количества YB-1 на уровне транскрипции.....	71
4.3. Стабильность мРНК <i>YB-1</i> .....	74
4.4. Стабильность белка YB-1 .....	76
<b>5. ПОПЫТКИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ YB-1 В ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ЦЕЛЯХ</b> .....	77
<b>6. ФУНКЦИИ ДРУГИХ Y-БОКС-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ</b> .....	80
6.1. Участие YB-2 и YB-3 в регуляции трансляции.....	80
6.2. Участие YB-3 в регуляции транскрипции .....	81
6.3. Участие YB-3 в регуляции стабильности мРНК .....	83

<b>7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	83
<b>МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	85
1. Трансформация <i>Escherichia coli</i> плазмидной ДНК .....	85
2. Препаративный вариант выделения плазмидной ДНК из <i>Escherichia coli</i> .....	85
3. Аналитический вариант выделения плазмидной ДНК из <i>Escherichia coli</i> .....	86
4. Обработка ДНК эндонуклеазами рестрикции .....	86
5. Полимеразная цепная реакция .....	86
6. Электрофорез ДНК в геле агарозы .....	87
7. Выделение фрагментов ДНК из геля.....	87
8. Лигирование линейных фрагментов ДНК с помощью Т4-ДНК-лигазы.....	87
9. Лигирование ДНК-фрагментов методом SLIC (Sequence and Ligation Independent Cloning).....	88
10. Получение тотальной РНК из культур эукариотических клеток .....	88
11. Получение препарата тотальной кДНК.....	88
12. Плазмидные конструкции и их получение .....	89
13. Синтез РНК <i>in vitro</i> .....	97
14. Электрофорез РНК в полиакриламидном геле в присутствии мочевины .....	101
15. Биотинилирование РНК.....	102
16. Выделение белков из лизата ретикулоцитов кролика и культивируемых клеток с использованием биотинилированной РНК .....	103
17. Электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия .....	103
18. Иммуноблоттинг.....	104
19. Выделение белков hnRNP Q, 4E-BP1 и eIF4A(R362Q), синтезированных в <i>Escherichia coli</i> .....	106
20. Дефосфорилирование РНК.....	108
21. Мечение фрагмента РНК по 5'-концу и отчистка.....	109
22. Связывание комплексов hnRNP Q и РНК на нитроцеллюлозных фильтрах.....	109
23. Бесклеточная система трансляции (БСТ) из ретикулоцитов кролика.....	109
24. Поддержание клеточных культур .....	110
25. Получение экстрактов органов кролика и экстрактов культивируемых клеток для иммуноблоттинга и анализа распределения мРНК между фракциями полисом и свободных мРНК .....	111
26. Нозерн-блоттинг .....	111
27. Анализ распределения мРНК между фракциями полисом и свободных мРНК .....	112
28. Анализ уровня синтеза УВ-1 в культивируемых клетках методом метаболического мечения.....	112
29. Кислотно-мочевинный электрофорез белков .....	113
30. Обработка клеток ксенобиотиками и стрессовые воздействия на клетки.....	113
31. Трансфекция клеток генетическими мРНК и конструкциями.....	114

32. Измерение активности люциферазы в клетках .....	114
33. Анализ последовательности 5'-концов мРНК (5'RACE, 5' Rapid Amplification of cDNA Ends). .....	114
34. Анализ длины 5'НТО мРНК <i>YB-1</i> с помощью РНКазы H.....	115
35. Количественная ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР в реальном времени) ...	115
36. Анализ стабильности белка .....	119
37. Определение стабильности мРНК .....	119
38. Сшивки под действием ультрафиолета (УФ-сшивки).....	120
39. Получение клеточных культур с нокаутом по генам <i>YBX1</i> и/или <i>YBX3</i> .....	120
40. Сборка и тоу-принт анализ 48S и 80S комплексов инициации трансляции в лизате ретикулоцитов кролика (RRL) с альтернативной мРНК <i>YB-1</i> .....	122
41. Иммунофлуоресцентная микроскопия.....	122
42. Измерение общего уровня трансляции по включению азидогомоаланина.....	123
43. Анализ распределения мРНК между полисомами и свободными мРНК методом центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы .....	124
44. Рибосомный профайлинг (Ribo-Seq) и RNASeq .....	124
45. Иммунопреципитация и секвенирование РНК (RIP-Seq).....	125
46. PAR-CLIP (photoactivatable ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation, фотоактивируемые рибонуклеозид-опосредованные сшивки с последующей иммунопреципитацией) .....	126
47. Высокопроизводительное секвенирование и обработка данных .....	127
<b>РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....</b>	<b>129</b>
<b>I. РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ мРНК <i>YB-1</i>.....</b>	<b>129</b>
1. Регуляция трансляции мРНК <i>YB-1 in vitro</i> при участии YB-1 и PABP.....	129
2. hnRNPQ – новый игрок в регуляции трансляции мРНК <i>YB-1</i> .....	132
3. Регуляция синтеза YB-1 в клетках.....	139
4. Альтернативные формы белка YB-1 и мРНК <i>YB-1</i> .....	181
<b>II. ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА БЕЛКА YB-1 НА ТРАНСКРИПТОМ И ТРАНСЛАТОМ КЛЕТОК.....</b>	<b>198</b>
1. Влияние оверэкспрессии и нокаута YB-1 на транскриптом и транслятом клеток НЕК293Т .....	198
2. YB-3 заменяет YB-1 в клетках НЕК293ТΔYB-1 при связывании мРНК .....	210
3. Регуляция синтеза YB-3 при участии YB-1 .....	218
4. Функциональная взаимозаменяемость YB-1 и YB-3.....	236
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>244</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>247</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>248</b>
<b>БЛАГОДАРНОСТИ .....</b>	<b>285</b>
<b>Приложение.....</b>	<b>286</b>



**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

**YB-1/2/3** – Y-бокс-связывающий белок 1/2/3;

**мРНК** – матричная рибонуклеиновая кислота (РНК);

**мРПП** – матричные рибонуклеопротеиды;

**оцДНК** – одноцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота;

**дцДНК** – двухцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота;

**НТО** – нетранслируемая область мРНК;

**hnRNPQ** – белок Q гетерогенных ядерных РПП;

**PABP** – poly(A)-binding protein, поли(А)-связывающий белок;

**ОТ-ПЦР** – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией;

**lncRNA** (дн РНК) – long-noncoding RNA, некодирующая РНК;

**miRNA** – микроРНК, микрорегуляторная РНК;

**circRNA** – циркулярная некодирующая РНК;

**RNA-Seq** – высокопроизводительное секвенирование РНК с оценкой численности отдельных транскриптов в экстракте РНК;

**Ribo-Seq** – рибосомный профайлинг, метод, основанный на высокопроизводительном секвенировании фрагментов мРНК, взаимодействующих с рибосомами, и позволяющий наблюдать за трансляцией;

**RIP-Seq** – RNA immunoprecipitation sequencing, метод, основанный на высокопроизводительном секвенировании мРНК, взаимодействующих с целевым белком и выделенных с помощью антител к этому белку;

**iCLIP** – individual-nucleotide resolution Cross-Linking and ImmunoPrecipitation, метод выявления сайтов связывания клеточных РНК-связывающих белков с помощью РНК-белковых сшивок с последующей иммунопреципитацией и высокопроизводительным секвенированием РНК-фрагментов;

**PAR-CLIP** – photoactivatable ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation, метод выявления сайтов связывания клеточных РНК-связывающих белков с помощью фотоактивируемой усиленной рибонуклеозидом сшивки с последующей иммунопреципитацией и высокопроизводительным секвенированием РНК-фрагментов;

**ChIP-on-ChIP** – метод анализа ДНК-белковых взаимодействий, основанный на иммунопреципитации хроматина (ChIP) с последующим микрочип-анализом;

**ChIP-Seq** – метод анализа ДНК-белковых взаимодействий, основанный на иммунопреципитации хроматина (ChIP) и высокоэффективном секвенировании ДНК;

- mTOR** – mammalian target of rapamycin, мишень рапамицина млекопитающих – серин-треониновая протеинкиназа, субъединица сигнальных комплексов TORC1 и TORC2, которые регулируют клеточный рост и выживание;
- CSD** – cold shock domain, домен холодового шока;
- CTD** – C-terminal domain, С-концевой домен;
- ЯМР** – ядерный магнитный резонанс;
- eIF** – eukaryotic initiation factor, эукариотический фактор инициации трансляции;
- ЭМП** – эпителиально-мезенхимальный переход;
- NLS** – nuclear localization signal, сигнал ядерной локализации;
- CRS** – cytoplasmic retention signal, сигнал удержания в цитоплазме;
- SG** – stress granules, стресс гранулы;
- БСТ** – бесклеточная система трансляции;
- TSS** – transcription start site, стартовый сайт транскрипции;
- 5'ТОР** мРНК – 5' Terminal Oligo Pyrimidine мРНК, мРНК, содержащие олигопиримидиновую последовательность на 5' конце;
- 4ЕВР** – eIF4E- связывающий белок;
- GSEA** – Gene Set Enrichment Analysis, анализ обогащения по функциональной принадлежности.

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

Эукариотический Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1) получил свое название более 30 лет назад, когда был идентифицирован как транскрипционный фактор, взаимодействующий с так называемой Y-бокс-последовательностью в промоторах некоторых генов. Однако впервые он и его гомологи были обнаружены гораздо раньше, в 70-х годах XX века, как мажорные белки цитоплазматических мРНК, имеющие молекулярную массу около 50 кДа. Главной структурной особенностью YB-1 является наличие центрального домена холодового шока, имеющего структуру  $\beta$ -бочонка, и отсутствие упорядоченной пространственной структуры остальной части белка (N- и C-концевые домены). При этом домен холодового шока и C-концевой домен способны к связыванию нуклеиновых кислот, а все три домена YB-1, и особенно C-концевой, взаимодействуют с большим количеством белков-партнеров. Именно благодаря этим свойствам YB-1 участвует в регуляции экспрессии генов на уровне транскрипции и трансляции мРНК, в регуляции её стабильности, в репарации ДНК и др. Как следствие, YB-1 вовлечен во многие клеточные процессы, такие как пролиферация и дифференцировка клеток, клеточный ответ на стресс, клеточное старение, апоптоз, воспалительные реакции. Этим же определяется участие YB-1 в онкогенезе. Раковые клетки зачастую отличаются повышенным содержанием YB-1 и его ядерной локализацией, что делает YB-1 одним из ярких маркеров злокачественного перерождения клеток и потенциальной мишенью при лечении онкологических заболеваний. Таким образом, исследование функций YB-1 имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение.

Один из малоизученных вопросов в отношении YB-1 заключается в том, как регулируется содержание этого белка в клетках. В данной работе исследованы механизмы регуляции трансляции мРНК *YB-1*, которые позволяют поддерживать уровень белка YB-1 на уровне, оптимальном для жизнедеятельности клетки. Знание механизмов регуляции количества YB-1 важно и с точки зрения исследования его функции, поскольку обнаружение механизмов, влияющих на количество YB-1, неизбежно указывает на те процессы, в которых YB-1 задействован. Кроме того, целенаправленный контроль за экспрессией YB-1 может позволить перейти к использованию YB-1 в качестве терапевтической мишени при лечении, в первую очередь, онкологических заболеваний, при которых повышенная экспрессия гена *YBX1* зачастую коррелирует с тяжестью заболевания и плохим прогнозом лечения.

Следует отметить, что накопившиеся знания о функциях YB-1 представляют собой данные, полученные на единичных генах или мРНК либо, в лучшем случае, на группе генов. До сих пор не было проведено исследований, показывающих влияние YB-1 на экспрессию всех клеточных генов, в частности не исследованы изменения транскриптома и транслатома клеток в

условиях снижения и повышения количества YB-1, не сопоставлены эти данные с данными о том, какой набор мРНК связывает YB-1 в клетках. В данной диссертационной работе будут впервые представлены результаты подобных исследований, позволяющих выявить полный набор контролируемых белком YB-1 генов, и приближающих нас к пониманию функций этого белка в клетке, к пониманию того, в каких клеточных процессах YB-1 выступает как трансляционный регулятор, а в каких как транскрипционный. Кроме того, основываясь на литературных данных, можно было предположить, что функции YB-1 могут частично перекрываться с функциями его гомолога, белка YB-3, и доказательства в пользу этого предположения впервые будут приведены в настоящей работе. Безусловно, это придаст импульс для исследования детальных механизмов работы YB-1 и для решения более прикладных задач, связанных с применением YB-1 в качестве терапевтической мишени при лечении раковых и воспалительных заболеваний.

### **Цель и задачи исследования**

Цель настоящей работы состояла в поиске механизмов регуляции синтеза белка YB-1, а также в исследовании изменений транскриптома и транслатома клеток при изменении экспрессии гена *YB-1(YBX1)*.

В соответствии с целями предполагалось решить следующие задачи:

1. Выяснить роль hnRNP Q, одного из белков, взаимодействующих с 3'НТО мРНК *YB-1*, в регуляции трансляции мРНК *YB-1* в бесклеточной системе трансляции.
2. Разработать подходы к изучению уровня синтеза YB-1 в культивируемых клетках млекопитающих.
3. Выяснить, существует ли авторегуляция синтеза YB-1 в культивируемых клетках млекопитающих.
4. Установить условия, при которых изменяется синтез YB-1 в культивируемых клетках млекопитающих, и исследовать механизм, лежащий в основе найденных изменений.
5. Исследовать возможность и механизм синтеза альтернативных форм белка YB-1 в клетках млекопитающих.
6. Методами высокопроизводительного секвенирования выяснить изменения в транскриптоме и транслатома клеток при оверэкспрессии и нокауте гена *YBX1*.
7. Исследовать регуляцию количества белка YB-3 в клетках белком YB-1.
8. Методами высокопроизводительного секвенирования выяснить изменения в транскриптоме и транслатома клеток при одновременном нокауте генов *YB-1* и *YBX3*, а также при восстановлении экспрессии одного или обоих YB-белков. На основании

полученных данных сделать вывод о функциональной взаимозаменяемости YB-1 и YB-3.

**Объект исследования** – Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1).

**Предмет исследования** – функции и регуляция синтеза YB-1.

### **Научная новизна работы и практическая значимость работы**

В диссертационной работе показано, что помимо YB-1 и поли(A)-связывающего белка PABP, в регуляции трансляции мРНК *YB-1* может принимать белок гетерогенных ядерных мРНК hnRNP Q. Взаимодействие hnRNP Q с регуляторным элементом в 3'НТО мРНК *YB-1* способствует снижению связывания с этим элементом PABP и повышению связывания YB-1, что приводит к подавлению трансляции мРНК *YB-1*.

В настоящей работе впервые показано, что авторегуляцию трансляции мРНК *YB-1*, обнаруженную ранее в бесклеточной системе трансляции, можно наблюдать в культивируемых эукариотических клетках, а негативное действие YB-1 на трансляцию собственной мРНК опосредовано нетранслируемыми областями.

С помощью разработанного метода детекции синтеза YB-1 в культивируемых клетках впервые установлено, что синтез белка YB-1 зависит от пролиферативного статуса клеток. Замедление клеточного деления, вызванного отсутствием стимулирующих его факторов, приводит к снижению синтеза YB-1 и впоследствии к снижению его количества. Ключевую роль в этом играют активность mTOR-сигнального каскада и 5' нетранслируемая область мРНК *YB-1*.

Важное достижение данной работы состоит в открытии альтернативных форм мРНК *YB-1*, которые образуются за счет минорных стартов транскрипции в первом интроне гена *YBX1* и удлиненной с N-конца формы белка YB-1, образующейся при инициации трансляции на неканоническом стартовом кодоне AUC в 5'НТО основной формы мРНК *YB-1*, находящемся в той же рамке считывания, что и основной стартовый AUG-кодон. В случае альтернативных форм мРНК *YB-1* инициация их трансляции также происходит не на каноническом AUG-кодоне, а продуктом трансляции является белок YB-1 без N-концевого домена. Предположено, что формы белка YB-1 с удлиненным N-концевым доменом или вовсе без него могут обладать иными свойствами и функциями по сравнению с основной формой белка YB-1, что может влиять на регуляцию экспрессии генов-мишеней YB-1. Количество альтернативных форм YB-1 в клетках и тканях, вероятно, мало по сравнению с основной формой белка YB-1 и мРНК *YB-1*, однако может достигать значимого уровня в некоторых тканях или в раковых клетках. В случае последних, наличие альтернативных форм мРНК *YB-1* может рассматриваться как диагностический признак.

В диссертационной работе впервые показано, что нокаут гена *YBX1* в клетках не приводит к глобальным изменениям в транскриптоме и транслятоме благодаря повышению в клетках количества гомолога YB-1 – белка YB-3, который способен заменять YB-1 по крайней мере в РНК-зависимых функциях – в первую очередь, в трансляции. Кроме того, было установлено, что указанное повышение количества YB-3 связано с регуляцией белком YB-1 трансляции и стабильности мРНК *YB-3* за счет его прямого взаимодействия с нетранслируемыми областями этой мРНК.

Знание механизмов контроля за экспрессией YB-1 может в перспективе позволить перейти к использованию YB-1 в качестве терапевтической мишени при лечении в первую очередь онкологических заболеваний, при которых повышенная экспрессия гена *YBX1* зачастую коррелирует с тяжестью заболевания и плохим прогнозом лечения. Кроме того, предполагаемое использование при терапии некоторых заболеваний выключение синтеза YB-1 может повышать экспрессию YB-3, что может как компенсировать экспрессию YB-1, так и привносить новые неожиданные и, возможно, негативные эффекты. Этот факт необходимо учитывать при использовании YB-1 в качестве терапевтической мишени.

### **Методология диссертационного исследования**

При проведении экспериментов использовали современные биохимические, молекулярно-биологические, генно-инженерные методы, методы работы с культурами эукариотических клеток, а также методы секвенирования нового поколения и биоинформатические методы.

Анализ содержания белков и мРНК в образцах проводился методами иммуноблоттинга, нозерн-блоттинга и ОТ-ПЦР в реальном времени. Используемые в работе белки продуцировались и выделялись из штаммов *E. coli*. Методы анализа РНК-белковых комплексов включали в себя метод ультрафиолетовых и фотохимических сшивок, иммунопреципитации и связывания РНК-белковых комплексов на нитроцеллюлозных фильтрах. Генно-инженерными методами создавались плазмиды, кодирующие как природные мРНК, так и репортерные мРНК с различными 5'НТО и 3'НТО, а также их варианты, включающие делеции и точечные замены. С помощью этих плазмид методом транскрипции *in vitro* получали соответствующие мРНК, которые энзиматически кэпировали и в некоторых случаях полиаденилировали. Анализ трансляции полученных мРНК проводился как в бесклеточных системах трансляции на основе клеток млекопитающих, так и в культурах эукариотических клеток. Детекцию продуктов трансляции проводили либо по включению радиоактивной метки ( $^{35}\text{S}$ -метионин), либо флюоресцентной метки (азидогомоаланин и Alexa488), либо по активности синтезируемых с репортерных мРНК люцифераз *Photinus pyralis*, *Renilla reniformis* или *Oplophorus gracilirostris*.

Клеточные линии с нокаутом генов *YB-1* и *YBX3* получали методом редактирования генома CRISPR/Cas9. Полногеномное изучение трансляции в клетках проводили с помощью рибосомного профайлинга (Ribo-Seq). Анализ транскриптома клеток проводили методом высокопроизводительного секвенирования РНК (RNA-Seq).

### Основные положения, выносимые на защиту

1. Авторегуляцию трансляции мРНК *YB-1*, обнаруженную ранее в бесклеточной системе трансляции, можно наблюдать в культивируемых эукариотических клетках. Ингибирующее действие *YB-1* на трансляцию собственной мРНК опосредовано её нетранслируемыми областями.
2. Помимо белков *YB-1* и *PABP* в регуляции трансляции мРНК *YB-1* может принимать участие белок гетерогенных ядерных мРНК Q (hnRNP Q). Усиливая взаимодействие *YB-1* с 3'НТО мРНК *YB-1* и ослабляя взаимодействие с ней *PABP*, hnRNP Q ингибирует трансляцию мРНК *YB-1* в бесклеточной системе трансляции.
3. Синтез белка *YB-1* зависит от пролиферативного статуса клеток. Замедление клеточного деления приводит к снижению синтеза *YB-1* и впоследствии к снижению его количества. Ключевую роль в этом играют активность mTOR-сигнального каскада и 5' нетранслируемая область мРНК *YB-1*.
4. Альтернативные формы мРНК *YB-1* образуются за счет минорных стартов транскрипции в первом интроне гена *YBX1* и способны транслироваться. Инициация их трансляции происходит не на каноническом AUG-кодоне, а на смежной паре кодонов AUCGUG. Продуктом трансляции альтернативных форм мРНК *YB-1* является белок *YB-1* без N-концевого домена. С основной формы мРНК *YB-1* помимо основного продукта (белка *YB-1*) синтезируется удлиненная с N-конца форма белка *YB-1*, образующаяся за счет инициации трансляции на неканоническом стартовом кодоне AUC в 5'НТО, находящемся в той же рамке считывания, что и основной стартовый AUG-кодон.
5. Нокаут гена *YBX1* в клетках HEK293T не приводит к глобальным изменениям в транскриптоме и транслатоме благодаря повышению в клетках количества гомолога *YB-1* – белка *YB-3*, который способен заменять *YB-1* по крайней мере в РНК-зависимых функциях – в первую очередь, в трансляции.
6. Повышение количества *YB-3* в клетках HEK293T при нокауте гена *YBX1* связано с регуляцией белком *YB-1* трансляции и стабильности мРНК *YB-3* за счет его прямого взаимодействия с нетранслируемыми областями этой мРНК.

### **Степень достоверности результатов**

В работе использовали современные методики измерений и приборы, а также применялись адекватные методы статистического анализа. Использовались реактивы от ведущих российских и международных компаний. Последовательности генов и фрагментов ДНК проверялись секвенированием и соотносились с заданными.

### **Апробация работы**

Результаты работы в виде устных и стендовых докладов были представлены автором лично на международных конференциях и конгрессах: EMBO Conference: Protein Synthesis and Translational Control, г. Гейдельберг, Германия (2005, 2007, 2009, 2011); Translational Control meeting, г. Колд Спринг Харбор, США (2004, 2006, 2010, 2012, 2016); FEBS Congress, г. Санкт-Петербург (2013) и г. Сочи (2022); Ribosomes & Translation, г. Санкт-Петербург (2018), III International Meeting “Early events in Human Pathologies”, г. Барбизон, Франция (2010).

### **Публикации**

Основные результаты диссертационной работы представлены в 15 публикациях в международных рецензируемых журналах, индексируемых в системах Web of Science, Scopus и РИНЦ.

### **Личный вклад автора**

Результаты исследований были получены лично автором, либо сотрудниками под его непосредственным руководством. В совместных работах ему принадлежит ключевая роль в выборе методов исследования, постановке задач, анализе литературы, интерпретации полученных данных. Автор принимал непосредственное участие в планировании и проведении экспериментов, в обработке экспериментальных данных, в написании публикаций и в представлении полученных данных на конференциях.

### **Структура и объем работы**

Диссертация состоит из следующих глав: «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Выводы», «Список цитируемой литературы» (раздел состоит из 532 ссылок), «Благодарности» и «Приложение». Работу иллюстрируют 86 рисунков и 4 таблицы. Общий объем диссертации 316 страниц.



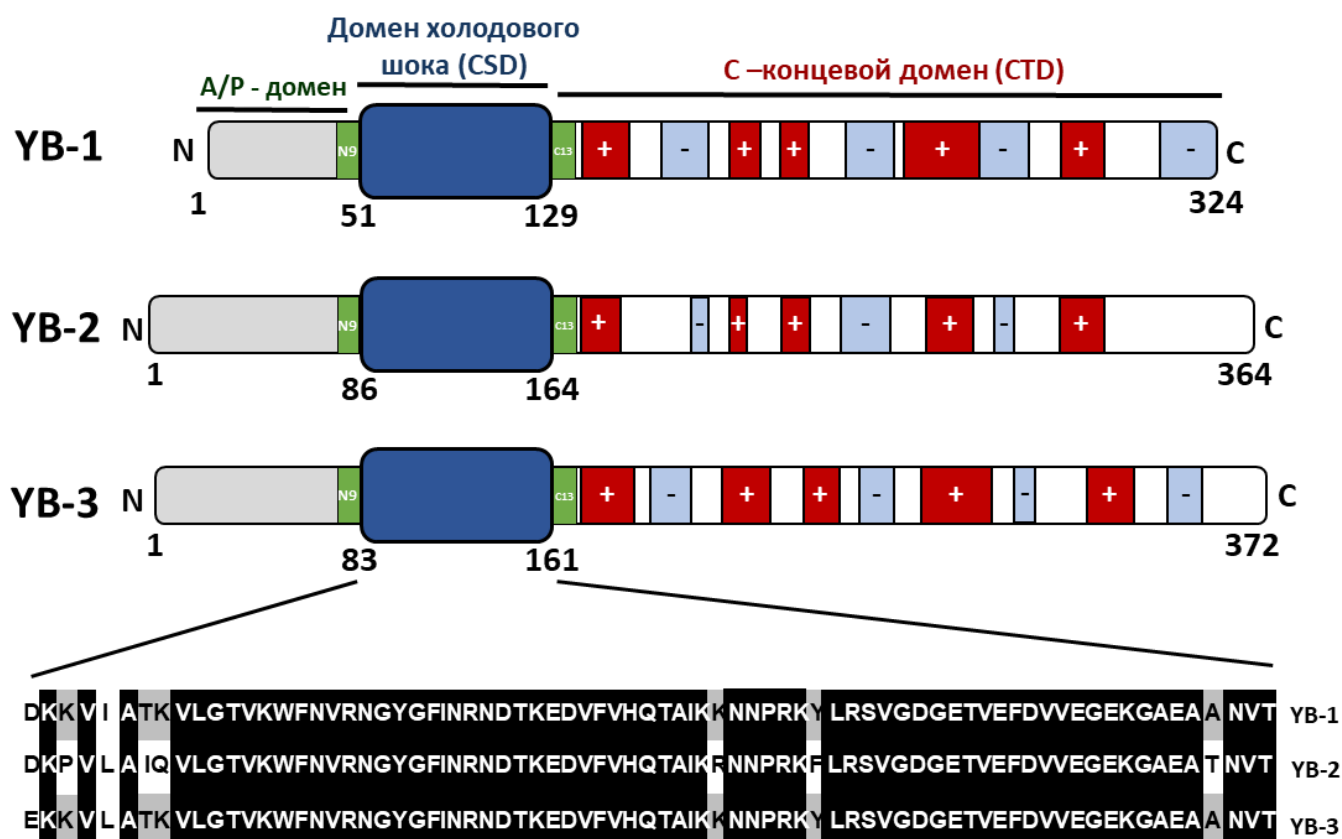
## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1. СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ YB-1

Y-бокс-связывающие белки впервые были идентифицированы в различных организмах как ДНК-связывающие белки, вовлеченные в регуляцию транскрипции [1-6]. Одной из их главных особенностей считалось связывание с двухцепочечной ДНК, содержащей так называемый Y-box мотив (AATTG, инвертированный CAATT-box). Ранее эти белки изучались как основные универсальные компоненты цитоплазматических мРНК из различных организмов и клеток [7-13]. Секвенирование этих РНК-связывающих белков из *Xenopus laevis* [14], мыши [15] и кролика [16] подтвердило их идентичность Y-бокс-связывающим белкам. Известно три Y-бокс-связывающих белка, YB-1 (другие названия dbpB, p50, NSEBP1, EFl-A, MSY1, RYB-a, FRGY1), YB-2 (Contrin, dbpC, MSY2, FRGY2, p54/p56) и YB-3 (dbpA, MSY3/4, ZONAB), структура которых во многом сходна, а функции связаны со взаимодействием с нуклеиновыми кислотами. Поскольку главным объектом исследования данной работы является YB-1, этому белку и будет в основном уделено внимание в последующих главах «Обзора литературы». Кроме того, будет справедливо отметить, что во многом наши знания о Y-бокс-связывающих белках основаны на исследовании именно YB-1.

#### 1.1. Структура YB-1

Анализ аминокислотной последовательности позволил установить, что Y-бокс-связывающие белки принадлежат более обширной группе белков, содержащих домен холодового шока — домен структурно и функционально схожий с белками холодового шока прокариот. Этот домен у YB-белков окружен N-концевым аланин-пролин-богатым доменом (A/P) и C-концевым протяженным доменом, обогащенным положительно и отрицательно заряженными аминокислотными остатками, расположенными кластеризованно (Рис. 1) [17]. При этом домен холодового шока на более чем 90% идентичен у всех трех представителей семейства, а остальные домены похожи аминокислотным составом и распределением заряженных аминокислотных остатков. Между доменами можно также выделить короткие консервативные спейсерные участки N9 и C13 [18], однако стоит отметить, что N9 можно отнести и к домену холодового шока, поскольку он является частью тяжа  $\beta$ 1 [19, 20].

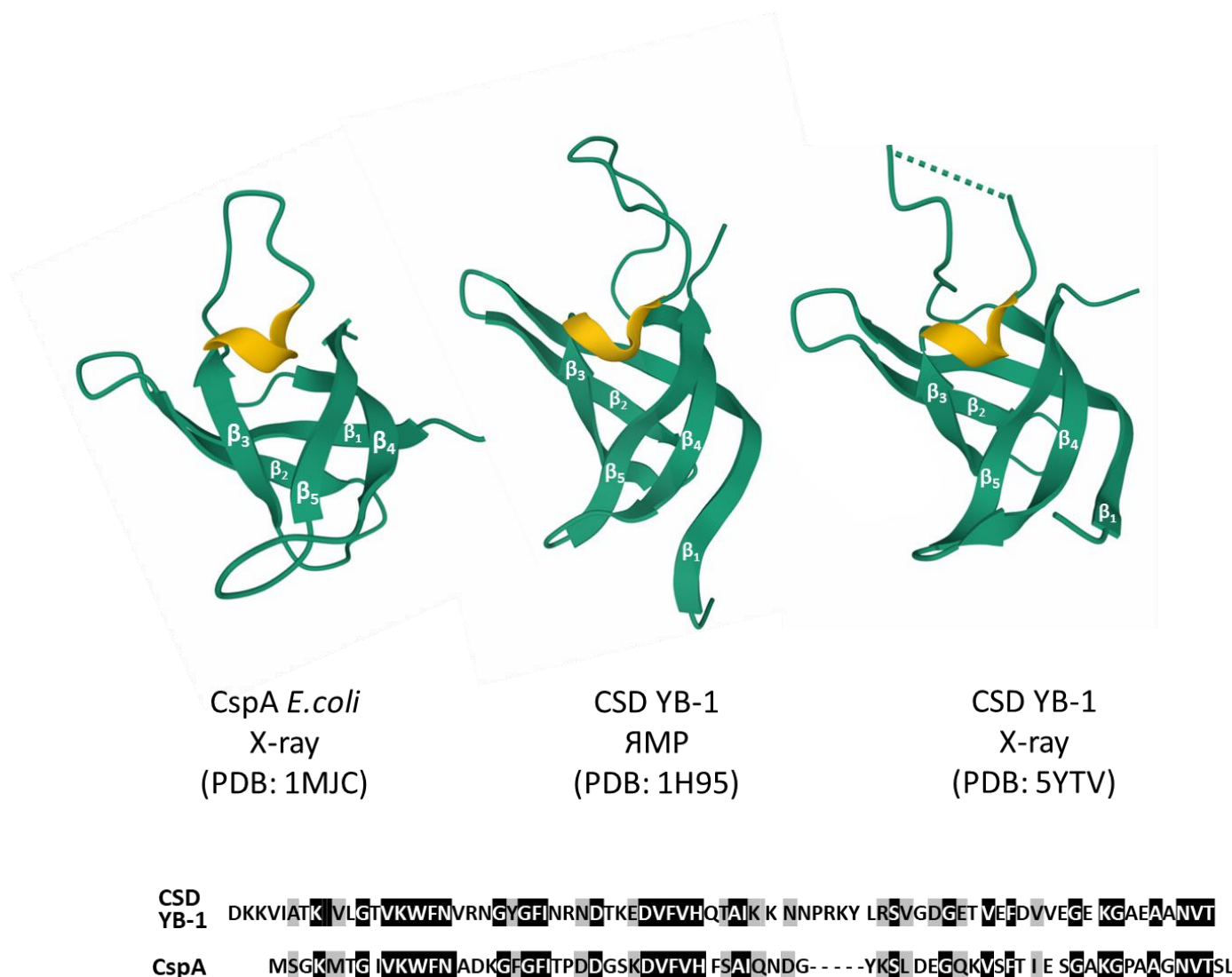


**Рисунок 1.** Доменная организация Y-бокс-связывающих белков. Обозначены аланин/пролин-богатый N-концевой домен (A/P-домен), домен холодового шока (CSD), окруженный 9-аминокислотным и 13 аминокислотным спейсерами, и C-концевой домен (CTD), в котором показаны кластеры положительно и отрицательно заряженных аминокислотных остатков. Внизу приведено сравнение аминокислотных последовательностей доменов холодового шока Y-бокс-связывающих белков человека.

CSD белка YB-1 является на данный момент единственной частью Y-бокс-связывающих белков, пространственная структура которой определена. Впервые она была установлена методом ЯМР [19], а совсем недавно удалось провести рентгеноструктурные исследования комплекса CSD с РНК-фрагментом [20]. Пространственная структура CSD YB-1 оказалась очень сходна с пространственной структурой главных белков холодового шока бактерий (Рис. 2), что не удивительно в виду их высокой степени гомологии (~45% идентичности белку CspA *E. coli*),

В то же время, CSD YB-1 почти полностью идентичен по аминокислотной последовательности CSD YB-2 и YB-3, что предполагает практически идентичную пространственную структуру CSD всех Y-бокс-связывающих белков. CSD состоит из пяти  $\beta$ -тяжей, уложенных антипараллельно в компактный  $\beta$ -бочонок ( $\beta$ -баррель). Согласно данным ЯМР, CSD YB-1 имеет низкую стабильность: при 25°C в растворе только 70% молекул CSD находится в нативном состоянии [21]. Низкая стабильность эукариотического CSD подтверждается микрокалориметрическими исследованиями. Так, по данным Guryanov et al.

[22] температура середины перехода между нативным и денатурированным состояниями CSD белка YB-1 равна 35°C, в то время как белок CspA *E. coli* плавится при значительно более высокой температуре (56°C)[23].



**Рисунок 2. Пространственная структура белка холодового шока CspA *E. coli* и домена холодового шока белка YB-1 человека. Внизу приведено сравнение аминокислотных последовательностей домена холодового шока YB-1 и CspA.**

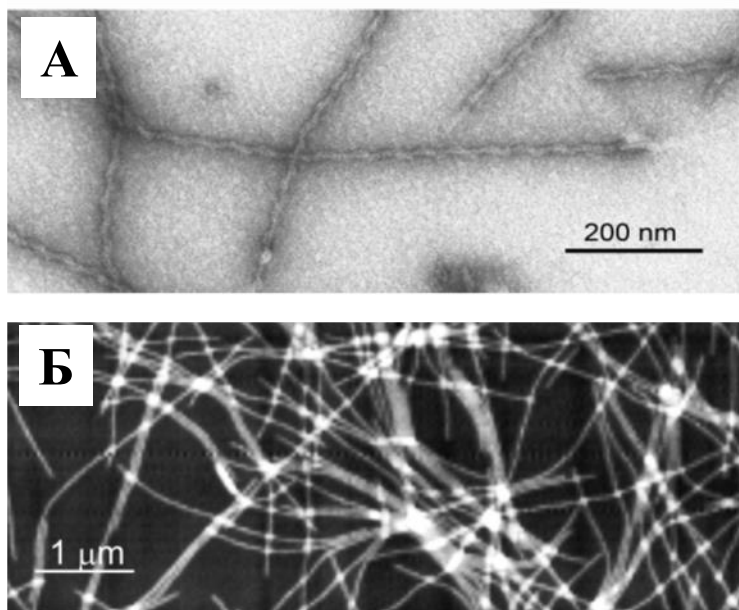
Такое различие в стабильности CSD про- и эукариот связывают с наличием в CSD YB-1 длинной подвижной петли, которая отсутствует в прокариотических белках. Стоит также отметить, что ароматические аминокислотные остатки тяжей  $\beta_1$ - $\beta_3$  в основном располагаются на поверхности белка, что весьма необычно, поскольку присутствие гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности зачастую дестабилизирует структуру белка. Однако гидрофобный участок на поверхности домена холодового шока, по-видимому, наоборот, стабилизирует его структуру, поскольку их замены в этом кластере на другие аминокислотные остатки, как полярные, так и неполярные, снижают общую стабильность CSD-белков [24-26].

Точная причина стабилизирующего действия гидрофобного кластера на структуру CSD-белков неизвестна, но предполагается, что большую роль здесь может играть сеть гидрофобных взаимодействий между ароматическими остатками кластера, которая нарушается при замене их на другие остатки.

Пространственная структура С-концевого домена, как и N-концевого домена, не определена. Данные дифференциальной сканирующей микрокалориметрии подтверждают наличие кооперативной третичной структуры только в CSD. В остальной части белка по результатам как биоинформатического анализа, так и спектроскопии кругового дихроизма (КД) регулярной вторичной структуры не было обнаружено. Кроме того, спектроскопия КД показала, что в белке присутствует значительная доля структуры полипролиновой спирали второго типа (поли(Pro) II) [22]. Известно, что такая структура характерна для нативно неупорядоченных белков и принимает участие в межмолекулярном узнавании [27]. Можно отметить, что многие РНК-связывающие белки в свободном виде в значительной степени не упорядочены [28]. Примерами таких белков являются некоторые рибосомные белки и белки РНК-содержащих вирусов [29, 30]. При взаимодействии с РНК в этих белках может происходить переход в упорядоченное состояние. Возможно, что и YB-белки могут приобретать определенную структуру при связывании с мРНК или одним из его многочисленных белковых партнеров, однако до сих пор данных об успешности подобных исследований нет.

Тем не менее, по крайней мере YB-1 в растворе представляет собой компактную молекулу с коэффициентом седиментации, характерным для глобулярных белков [22]. Кроме того, в зависимости от условий (в первую очередь от ионной силы) и концентрации YB-1 способен образовывать олигомеры различного состава (от 3 до 10 молекул) [22]. Важно, что фрагменты белка CSD и AP-CSD не обладают такой компактностью и способностью к олигомеризации, а вторая половина CTD склонна к агрегации. Из этого можно заключить, что для олигомеризации важен именно С-концевой домен YB-1. Способность к олигомеризации чистого белка была продемонстрирована и для FRGY1 и FRGY2 [6]. И в этом случае за мультимеризацию отвечал CTD. Однако недавно было показано, что домен холодового шока способен димеризоваться, и важную роль в этом играют аминокислотные остатки Tyr99 и Asp105 длинной петли между 3-м и 4-м  $\beta$ -тяжами [20].

Помимо этого, в определенных условиях YB-1 способен к формированию иных мультимерных структур. Так, в условиях высокой ионной силы YB-1 образует обратимые амилоидоподобные фибриллы [31] (Рис. 3).



**Рисунок 3.** ЭМ-изображения негативно контрастированного препарата белка YB-1 после 24 ч инкубации в 2 М LiCl (А) и изображение аналогичного препарата, полученное методом атомно-силовой микроскопии (Б).

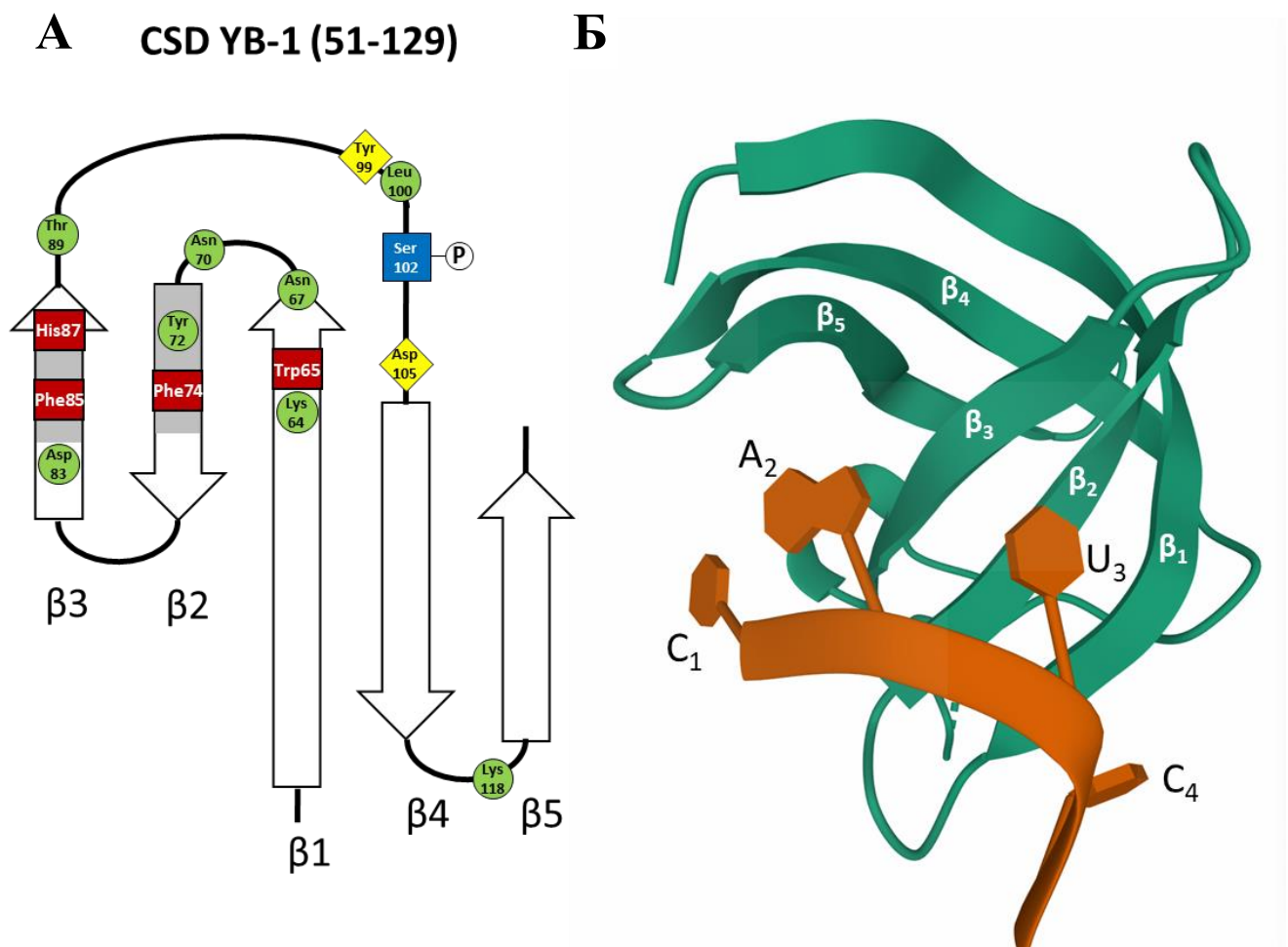
В формировании кросс- $\beta$ -структуры ключевую роль играет домен холодового шока YB-1, который способен формировать фибриллы не только при высокой, но и при физиологической ионной силе. Неупорядоченные N- и C-концевые домены YB-1 модулируют этот процесс: A/P домен стимулирует образование фибрилл, в то время как первая часть STD подавляет его при любом уровне ионной силы, а его последняя часть устраняет это подавляющее действие [32]. Способность YB-1 образовывать фибриллы может лежать в основе образования гранул РНК (стрессовые гранулы, Р-тельца, мРНК и др.) в клетке (см. раздел «ПРОЯВЛЕНИЕ СВОЙСТВ И ФУНКЦИЙ YB-1 НА КЛЕТОЧНОМ УРОВНЕ И УРОВНЕ ЦЕЛОГО ОРГАНИЗМА», пункт «Стресс»). Было показано, что несколько белков, взаимодействующих с мРНК и имеющих так называемую low complexity sequence (LCS) (повторы G/SYG/S), способны к формированию обратимых филаментов с характерными признаками кросс- $\beta$ -структуры [33]. Оказалось, что специфический агент b-isox (biotinylated isoxazole) стимулирует фибриллообразование и при добавлении в клеточные лизаты вызывает образование преципитатов, состав которых напоминает состав стрессовых гранул (мРНК, белки мРНК, рибосомные белки и факторы белкового синтеза). Удаление мРНК под действием эндонуклеазы приводит к освобождению из преципитата рибосомных белков и факторов, в то время как LCS-белки остаются в преципитате, т.е., по-видимому, образуют коровую часть стресс-гранул. YB-1, хотя и не имеет выраженной low complexity sequence, также был обнаружен в составе таких РНК-гранул и,

возможно, участвует в их формировании наряду с LCS белками благодаря своей способности образовывать обратимые фибриллы.

## 1.2. Взаимодействие с нуклеиновыми кислотами

### Роль CSD

Как и у прокариотических белков, в CSD YB-1 имеется два консенсусных мотива – РНП1 и РНП2, которые, соответственно, находятся на  $\beta$ 2- и  $\beta$ 3-тяжах. И так же, как у бактериальных CSD-белков, ароматические аминокислотные остатки этих консенсусов в основном располагаются на поверхности белка и участвуют в связывании нуклеиновых кислот [19, 20] (Рис. 4).



**Рисунок 4. Взаимодействие домена холодного шока с нуклеиновыми кислотами.** А. Домен холодного шока YB-1 (51–129). Аминокислотные остатки, участвующие в димеризации CSD или связывании нуклеиновых кислот ( $\pi$ - $\pi$  стеклинг и другие взаимодействия), показаны желтым, красным и зеленым цветом соответственно. РНП-I и РНП-II-консенсусы выделены серым цветом. Фосфорилируемый аминокислотный остаток Ser102 выделен синим цветом. Б. Пространственная структура комплекса CSD (зеленый цвет) с фрагментом РНК CAUC (оранжевый). NDB: 5YTV

У CSD YB-1 это остатки – Phe74, Phe85, His87. Кроме того, Trp65, находящийся в  $\beta$ 1-тяже и не входящий РНП-консенсус 1, также участвует в образовании гидрофобной поверхности для связывания с НК. Интересно, что согласно данным X-ray, Tyr72 CSD, соответствующий Phe18 CspA, не вовлечен во  $\pi$ - $\pi$  взаимодействие с НК, а для ЯМР этот остаток оказался невидимым («unobservable»). При взаимодействии с РНК-олигомером гидрофобные аминокислотные остатки His87, Phe85, Phe74 и Trp65 образуют  $\pi$ - $\pi$ -stacking pairs с четырьмя азотистыми основаниями РНК. Перечисленные аминокислотные остатки очень консервативны и присутствуют в CSD прокариот и эукариот [18]. Замена любого из них на Ala приводит к потере взаимодействия с РНК-олигомером [20]. Кроме того, было показано, что замена Phe74Leu также разрушает стекинг-взаимодействия [34]. Впрочем, в таких экспериментах необходимо контролировать сохранение структуры CSD, поскольку для Csp прокариот показано критичное влияние подобных замен на стабильность белка [24, 26].

Стоит отметить, что важную роль в связывании CSD с НК играют не только указанные выше гидрофобные аминокислотные остатки. Так, по данным ЯМР Arg69 и Lys118, находящиеся между тяжами 1 и 2, и 4 и 5, соответственно и некоторые другие остатки также вовлечены во взаимодействие с ДНК-олигомером [19]. По кристаллографическим данным [20], полученным на комплексе CSD с CAUC-содержащим РНК-олигомером, C<sub>1</sub> образует сеть межмолекулярных водородных связей с Thr89 и His87, а 2' гидроксильная группа его рибозы формирует водородную связь с Lys118. Этот же остаток не только образует солевой мостик и водородную связь с фосфатной группой A<sub>2</sub>, но и накладывается поверх A<sub>2</sub>, обеспечивая стекинг-взаимодействие, а также участвует в формировании водородной связи с N6 основания A<sub>2</sub>. Неудивительно, что замена Lys118 на Ala приводит к полной потере связывания с РНК-олигомером. Другим важным аминокислотным остатком для взаимодействия с РНК, замена которого также полностью разрушает РНК-связывание, является Lys64. Этот остаток взаимодействует посредством водородной связи с O2 третьего основания (U<sub>3</sub>) в РНК-олигомере, а также опосредованно через солевой мостик между Asp83 и N3 основания U<sub>3</sub>. Для взаимодействия с C<sub>4</sub> важны стекинг с Trp65, водородные связи с Trp65, Asn67, Asp105, Asn70 и Tyr72. В целом же можно сказать, что, согласно кристаллографическим данным, образование дополнительных водородных связей и солевых мостиков при взаимодействии CSD с РНК может определять специфичность этого взаимодействия. Yang et al подтвердили, что CAUC-мотив имеет большее сродство к CSD YB-1, поскольку в случае этого мотива достигается большее количество дополнительных связей [20].

Интересно также отметить, что в домене холодового шока белка YB-2, в положении 99 расположен фенилаланин, а не тирозин как у CSD YB-1 и YB-3. Это может влиять на ДНК- и РНК-связывающие свойства YB-2 [18].

Структура доменов CSD эукариот и прокариот очень сходна, однако имеются и отличия, наиболее заметное из которых, как уже упоминалось, заключается в более протяженной петле, соединяющей  $\beta$ 3- и  $\beta$ 4-тяжи YB-1. Согласно ЯМР, Leu100, находящийся в этой петле и окруженный тремя положительно заряженными и одним ароматическим остатками, показал достоверное изменение химического сдвига после связывания CSD YB-1 с ДНК-олигомером, что говорит о вовлеченности этой петли во взаимодействие с НК [19]. Кроме того, было показано, что замена петли между  $\beta$ 3- и  $\beta$ 4-тяжами в прокариотическом CspA на соответствующую петлю из YB-1 приводит к появлению способности белка связывать двухцепочечную ДНК, а не только одноцепочечную [34]. Интересно, что замена Phe на Leu в CspA (Phe20 соответствует Phe74 CSD YB-1) снижает его сродство к ssDNA, а в случае CspA где петля, соединяющая  $\beta$ 3- и  $\beta$ 4-тяжи, заменена на таковую из YB-1, замена Phe20Leu слабо влияет на взаимодействие с ssDNA [34]. Эти данные подтверждают, что не только гидрофобная поверхность, образованная тяжами  $\beta$ 1 и  $\beta$ 3, участвует в связывании, по крайней мере, с ДНК.

### *Роль CTD*

О том, как взаимодействует с НК С-концевой домен сказать трудно, поскольку пространственная структура целого белка или CTD в комплексе с НК не определена. Однако его наличие увеличивает сродство CSD как к РНК, так и к ДНК [35, 36]. Было предположено, что взаимодействие CTD с НК основано на электростатическом взаимодействии положительно заряженных аминокислотных остатков, которыми богат этот домен, с сахаро-фосфатным остовом РНК или ДНК [37]. Однако не исключено, что сродство к НК усиливается и за счет того, что CTD способствует мультимеризации белка [6, 38], и, как следствие, сближению нескольких центров связывания НК. Единственной на данный момент работой, в которой исследовалась пространственная структура комплексов фрагмента белка YB-1, содержащего аминокислотные остатки С-концевого домена (фрагмент 1-180), с нуклеиновыми кислотами (30-мер) является работа Кретьова с сотрудниками [39]. В ней было показано, что 1-180 образует с РНК/оцДНК протяженные филаменты, а методом ЯМР было установлено, что при взаимодействии этого белка с 30-нуклеотидной РНК или оцДНК некоторые из а.о. с 130-156 (первый + кластер), но не остатки 166–180, демонстрировали усиление химического сдвига. При этом молекулярное моделирование показало взаимодействие аргининов этого участка с фосфатами НК, расположенными на поверхности CSD. Предполагается, что при таком взаимодействии с РНК фрагмент 1-180 нейтрализует фосфаты последовательности ДНК (РНК), с которой связан прилежащий CSD соседней молекулы 1-180, что способствует разрушению вторичной структуры нуклеиновых кислот и позволяет сформировать линейный филамент. Нужно отметить, что целый белок не способен при взаимодействии с РНК образовывать такие



филаменты, вероятно потому, что оставшаяся часть СТД нейтрализует фосфаты более протяженного участка НК, а это мешает взаимодействию проксимальной части СТД с прилежащим доменом холодового шока другой молекулы 1-180 [39].

### ***Взаимодействие с НК in vitro***

Интересно, что первоначально предпочтительным партнером для связывания YВ-белков считалась двухцепочечная ДНК, содержащая Y-бокс мотив [2-6, 40, 41]. Затем появились работы, в которых YВ-белки проявляли предпочтение к пиримидин-богатым фрагментам dsDNA [1, 42-44], к апуриновым сайтам в ДНК [45, 46], к одноцепочечной ДНК [1, 43]. Наконец, с идентификацией YВ-белков как основных компонентов мРНК, стали очевидны РНК-связывающие способности этих белков [5, 14, 16, 47]. Разумеется, появились вопросы:

- 1) К какой нуклеиновой кислоте (ДНК или РНК) YВ-белки имеют большее сродство?
- 2) Проявляют ли они специфичность к определенным нуклеотидным последовательностям или мотивам?
- 3) Какие части белка обеспечивают такую специфичность?

На основании многих исследований взаимодействия YВ-белков с НК можно сказать, что сродство этих белков выше к РНК, чем к дцДНК ( $K_d \sim 10^{-8}$  for RNA [48-50] and  $10^{-6}$  for DNA [51]). При этом для некоторых YВ-белков показано, что их сродство к dsRNA заметно ниже или вообще отсутствует [20, 52]. Наконец, очень убедительно было показано, что YВ-белки проявляют заметно большее сродство к одноцепочечной форме ДНК по сравнению с двухцепочечной [19, 20, 36, 42, 45, 49, 52, 53]. За связывание с ДНК и РНК отвечают СSD и СТД YВ-белков. При этом изолированный СТД или его фрагменты не способны взаимодействовать с ДНК, но неплохо связываются с РНК [6, 36, 49]. СSD необходим для взаимодействия с ДНК и участвует во взаимодействии с РНК. Также можно отметить, что СТД (даже единственный проксимальный кластер заряженных а.о.) усиливает взаимодействие СSD с РНК [36]. Частично эти выводы подтверждаются данными изотермической титрационной калориметрии взаимодействия YВ-1 с НК [51]. Моделирование взаимодействия СSD с НК методами молекулярной динамики также показало более высокое сродство СSD к РНК, чем к ДНК [54].

Весьма непросто является вопрос о специфичности YВ-1 белков. Первоначально предполагалось, что они специфически связываются с Y-бокс содержащей ДНК. Многие опыты с ДНК-олигонуклеотидами, содержащими Y-бокс, подтверждали это (например, [55, 56]). Однако с течением времени стало появляться всё больше сообщений о способности YВ-белков взаимодействовать с фрагментами ДНК, в которых не содержится Y-бокс мотив [42, 44, 45, 57],

но присутствуют последовательности, обогащенные пиримидинами. Анализ специфичности связывания YB-1 кролика с различными последовательностями одноцепочечных и двухцепочечных фрагментов ДНК показал, что YB-1 связывает широкий спектр последовательностей, обнаруживая наибольшее предпочтение к одноцепочечному мотиву GGGG, затем к одноцепочечным и двуцепочечным мотивам CACC и CATC, а к Y-боксу проявляя лишь умеренное сродство [58].

Интересно отметить, что на взаимодействие YB-белков с ДНК очень сильно влияют различные типы нарушений вторичной структуры ДНК, вызываемые различными повреждающими агентами [36, 45, 46, 59, 60]. Кроме того, недавно методом AFM было показано, что YB-1 связывается преимущественно с суперскрученной ДНК в местах перекрещивания ДНК. [61].

YB-1 и его ближайшие гомологи могут взаимодействовать с любыми последовательностями РНК, хотя есть некоторое предпочтение к участкам с А и С обогащенным составом и сочетанием нуклеотидов CANC [17, 35, 62-66]. В работе Yang et al. [20] кристаллизация домена холодового шока YB-1 проводилась как раз со специфической последовательностью, содержащей мотив CAUC. Там же было показано, что фрагменты РНК с этой последовательностью имеют в 2-3 раза большее сродство к YB-1, чем неспецифические РНК-фрагменты, и этот факт прекрасно соотносится с данными, полученными на длинном фрагменте РНК, содержащем специфический сайт связывания YB-1 [67]. Есть данные, что YB-1 способен специфически взаимодействовать с 5'-фрагментом tRNA<sup>Ala</sup>, вероятно с олигогуанидиновым мотивом на его 5'-конце [68], что несколько выбивается из общей картины специфичности взаимодействия YB-белков с РНК, но совпадает с данными на микрочипах с ДНК [58].

Уже довольно давно показано, что домен холодового шока YB-белков определяет специфичность взаимодействия, а С-домен и, возможно, N-концевой А/Р-домен значительно стабилизируют эту связь [6, 35]. Возможно С-концевой домен определяет неспецифическое связывание YB-белков с НК. При этом STD, вероятно, образует контакты почти исключительно с сахаро-фосфатным остовом РНК [37]. Однако существует мнение, что по аналогии с некоторыми другими РНК-связывающими белками аргинин-богатые мотивы (ARM) в STD YB-белков также способны определять специфичность связывания с НК, но доказательств этой гипотезы пока нет [18]. Важно отметить, что сродство к РНК двух РНК-связывающих доменов YB-белков может зависеть от изменений внешних параметров, таких как ионная сила, концентрация Mg<sup>2+</sup> и гепарина [51, 69]. Повышение концентрации Mg<sup>2+</sup> подавляет связывание с РНК CSD, а повышение концентрации гепарина – связывание С-домена. Кроме того, от этих параметров зависит и специфичность взаимодействия с РНК [69]. Повышение ионной силы

снижает константу связывания полноразмерного белка с РНК, но не влияет на связывание CSD с РНК [51]. В совокупности эти данные подтверждают, что природа сил, обеспечивающих взаимодействие с РНК двух доменов, различается. Не стоит забывать, что при изучении связывания YB-белков нужно учитывать и длину НК. Как показано, при уменьшении длины РНК по крайней мере ниже 30 нуклеотидов сродство FRGY2 к такой РНК существенно падает [35].

Наконец, сложность в определении специфичности YB-белков может быть частично обусловлена способностью этих белков плавить вторичную структуру НК [16, 70]. Этим свойством они похожи на Csp-белки прокариот [71]. Это позволяет говорить о том, что ключевую роль в этой способности играет домен холодового шока. Интересно, что в отличие от РНК-хеликаз, расплетающих РНК за счет гидролиза АТФ, YB-белки и Csp не требуют для этой активности дополнительных источников энергии, однако точный механизм этого процесса неизвестен. Эксперименты с микрочипами показали, что YB-1 наиболее эффективно дестабилизирует двуспиральные участки ДНК с мотивами GGTG, GATG и GTGG, в то время как GGGGG-содержащие дуплексы, наоборот, стабилизируются белком YB-1 [58]. Помимо этого, было обнаружено, что YB-1 может на три порядка ускорять ренатурацию двухцепочечной ДНК при физиологических условиях [70]. Эксперименты с РНК показали, что YB-1 плавит её вторичную структуру, однако плавление происходит не полностью (при взаимодействии с YB-1 в мРНК  $\alpha$ -глобина плавится до 60% первоначальной вторичной структуры) [16]. Будет ли YB-1 плавить или, наоборот, стабилизировать вторичную структуру НК, по-видимому сильно зависит от соотношения белок/НК, а также от состава нуклеотидов и протяженности комплементарных участков НК. Это означает, что YB-1 может по-разному взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами с разной последовательностью нуклеотидов и оказывать разное влияние на её пространственную структуру.

### ***Взаимодействие с НК in vivo***

О взаимодействии YB-белков с клеточными мРНК в масштабах всего транскриптома стало возможно говорить только с развитием высокопроизводительных методов. Первые данные такого рода были получены в опытах по иммунопреципитации синтезированного в клетках с плазмиды HA-YB-1 за антитела против HA-тэга с последующим анализом мРНК из иммунопреципитата на микрочипах [72]. Выяснилось, что YB-1 связывает только 20% клеточных мРНК. Однако недавние iCLIP-эксперименты на клетках глиобластомы показали, что YB-1 связывается примерно с 15000 матриц, что сопоставимо с размерами всего транскриптома [73].

Что касается YB-2, то поскольку этот белок специфичен для половых клеток, изучение его РНК-мишеней ограничивается только этими клетками. Данных о всём спектре РНК, взаимодействующих с YB-2 нет (RIP-Seq, например), однако показано, что YB-2 и YB-3 модулируют трансляцию множества мРНК семенников, а это предполагает связывание с большим набором матриц [74]. При этом существует зависимость ингибирования трансляции этих мРНК от наличия в них специфического мотива связывания YB-белков, что косвенно подтверждает повышенное сродство YB-2 и YB-3 к матрицам, содержащим такие мотивы.

iCLIP эксперименты позволили определить предпочтительный сайт связывания YB-1 с мРНК —  $U^C/U$ AUC (UYAUC), а также установить, что большинство сайтов его связывания находятся в кодирующей области и 3'НТО мРНК [73]. Этот сайт обнаруживается примерно в 18% всех YB-1-связанных мРНК, что говорит о том, что с остальными РНК YB-1 связан неспецифически. В этих экспериментах также было показано, что YB-1 связывается и с miRNA, и с non-coding RNA, и с pre-mRNA. Интересно отметить, что были проведены PAR-CLIP эксперименты, в которых в нескольких клеточных линиях был оверэкспрессирован YB-1-Flag (т.е. содержал довесок Flag) [75]. В результате был найден специфический мотив CAUC для связывания YB-1, однако ему должен был предшествовать мотив UCUUU. Впрочем, биоинформатический анализ в этой статье показывает, что сайт довольно вырожденный и должен содержать скорее только CANc мотив. Кроме того, в методически похожей работе Goranenko et al. [76] обнаружен был несколько иной основной мотив для YB-1 — CUCU, а также множество других мотивов, а в целом авторы утверждают, что для YB-1 ими обнаружены вырожденные консенсусные последовательности, которые преимущественно локализуются в 3'НТО мРНК. Помимо своеобразной обработки данных PAR-CLIP, в этих работах использовалась оверэкспрессия YB-1. Это тоже могло повлиять на результат, поскольку возможно, что повышение уровня белка сверх нормального приводит к его неспецифическому связыванию с РНК, что «размывает» специфический мотив. Наконец, использование антител, специфичных не к самому YB-1, а к его довеску (Flag-tag), также вносит немалый вклад в неверный анализ результатов экспериментов [77].

Важно отметить еще одно исследование [78], в котором YB-1 был обнаружен как белок, взаимодействующий с мотивами ACCAGCCU, CAGUGAGC и UAAUCCCA, которые, предположительно, являются мотивами, необходимыми для сортировки РНК в экзосомы [79]. Любопытно, что другим белком, взаимодействующим с одним из таких мотивов, оказалась 5mC-РНК-метилтрансфераза NSUN2, а недавно было показано, что YB-1 *Danio rerio* имеет повышенное сродство к метилированной по С мРНК [80] и обеспечивает стабилизацию материнской РНК в ходе активации эмбрионального генома (см. раздел «Роль YB-1 в контроле стабильности мРНК»).

Что касается доменов YB-белков, для которых показано взаимодействие с РНК в клетках, то с помощью метода фотоактивируемых сшивок с последующей масс-спектрометрией высокого разрешения удалось установить только, что с РНК перешиваются пептиды, содержащие РНП-консенсусы I и II из  $\beta$ -тяжей 2 и 3 домена холодового шока [81]. Это могло бы свидетельствовать в пользу того, что в мРНП только CSD взаимодействует с РНК, а STD участвует в мультимеризации YB-белков или взаимодействии с другими РНК-связывающими белками. Однако нужно учесть, что подготовка образцов для масс-спектрометрии в таких экспериментах производится при участии трипсина, а эта протеаза специфична к аргинину и лизину, которыми изобилует STD YB-1, и в результате протеолиза YB-1 образуются очень короткие пептиды, в связи с чем их трудно идентифицировать как фрагменты именно YB-белков.

Взаимодействие YB-1 с ДНК изучалось методами CHIP-on-chip и CHIP-Seq [82, 83]. Однако детальный анализ этих данных, проведенный в работе Dolfini and Mantovani [84, 85], показал, что Y-box мотив (Y/ССААТ), который многие годы считался специфическим сайтом связывания YB-белков, таковым не является. Более того, найти выраженный мотив связывания для YB-1 с использованием более «правильных» биоинформатических методов, чем в статьях [82, 83], не удалось. Отсутствие такого мотива очень не типично для «классического» транскрипционного фактора. Возможно, причина того, что YB-1 преципитирует с хроматином, заключается в отсутствии рибонуклеазной обработки в ходе CHIP, а как известно [86], YB-белки могут взаимодействовать уже с синтезируемой РНК в ядре.

### 1.3. Образование мРНП частиц при участии YB-белков

Как уже было сказано, YB-белки были обнаружены как основные компоненты транслируемых и нетранслируемых мРНП, причем в последних как единственные мажорные белки. Разумеется возникла гипотеза, что одного YB-1 белка достаточно для формирования мРНП частиц с физико-химическими характеристиками природных нетранслируемых мРНП, таких как мРНП на глобиновых мРНК из ретикулоцитов кролика или мРНП из ооцитов *Xenopus laevis*. Действительно, согласно [38], при высоких соотношениях YB-1/РНК молекулы YB-1 взаимодействуют с мРНК посредством домена холодового шока, а С-домены вытесняются с мРНК и олигомеризуются, формируя крупный мультимерный комплекс с коэффициентом седиментации и плавучей плотностью как у природных мРНП. Строго говоря, результаты этой работы не исключают того, что с мРНК взаимодействует не только CSD, но и ближайшая к нему часть STD (до 198 а.о., по крайней мере). Такие комплексы с мРНК состоят примерно из 15-18 молекул белка. Эти мультимеры имеют диаметр примерно 20 нм, высоту – 6-7 нм и упаковывают на своей поверхности отрезок мРНК длиной около 600-700 н. [38].

Соответственно, на мРНК большей длины кратной 600-700 н. можно наблюдать больше количество мультимеров. Так на мРНК люциферазы длиной около 4000 н. можно видеть 4 мультимерных комплекса, а на РНК вируса табачной мозаики (6000 н.) – 8 [38]. В таком комплексе концы мРНК, вероятно, становятся недоступными для взаимодействия с белками аппарата инициации трансляции и экзонуклеазами. При низких соотношениях YB-1/РНК, YB-1 связан с мРНК в виде мономеров двумя РНК-связывающими доменами – CSD и STD. Это приводит к разворачиванию мРНК и, возможно, делает содержащуюся в них мРНК доступной для взаимодействия с аппаратом трансляции. Таким образом, упаковывая мРНК, YB-1 может влиять на её трансляционный статус и время жизни в клетке.

Однако такая ситуация, когда YB-белки являются единственными или мажорными белками мРНК, довольно редкая и реальная только в тех системах, в которых YB-белки присутствуют в большом количестве (ооциты, семенники, ретикулоциты). Кроме того, на белковый состав мРНК может влиять способ их выделения. В жестких высокосолевых условиях многие белки сходят с мРНК, в то время как такие белки как YB-1 могут сохранять довольно высокое сродство к мРНК. Это может приводить даже к увеличению количества YB-1 на мРНК, поскольку появляется много свободных участков связывания. В обычных культивируемых клетках, как рассчитано в статье [61], например, всего имеющегося YB-1 будет достаточно для полной упаковки небольшой доли всех молекул мРНК. Можно предположить, что YB-1 участвует в образовании нетранслируемых мРНК за счет мультимеризации только на специфических матрицах [61], а на остальных находится в меньших количествах. Альтернативно, YB-белки, хоть и синтезируются в клетках в большом количестве [87], являются только одними из многих РНК-связывающих белков, участвующих в упаковке как транслируемых так и нетранслируемых мРНК. Так например показано, что в состав всех мРНК может входить до 860 РНК-связывающих белков [88]. Не все из них, конечно, представлены в большом количестве, но, тем не менее, могут влиять на упаковку и транслируемость мРНК.

Помимо РНК, собранных на матричных РНК, YB-белки вероятно могут участвовать в формировании других РНК-содержащих частиц, таких как РНК-гранулы (стресс-гранулы и т.п.) [89], комплексы с miRNA для транспорта в экзосомы [90], сплайсосомы [91].

#### **1.4. YB-1 как ингибитор трансляции**

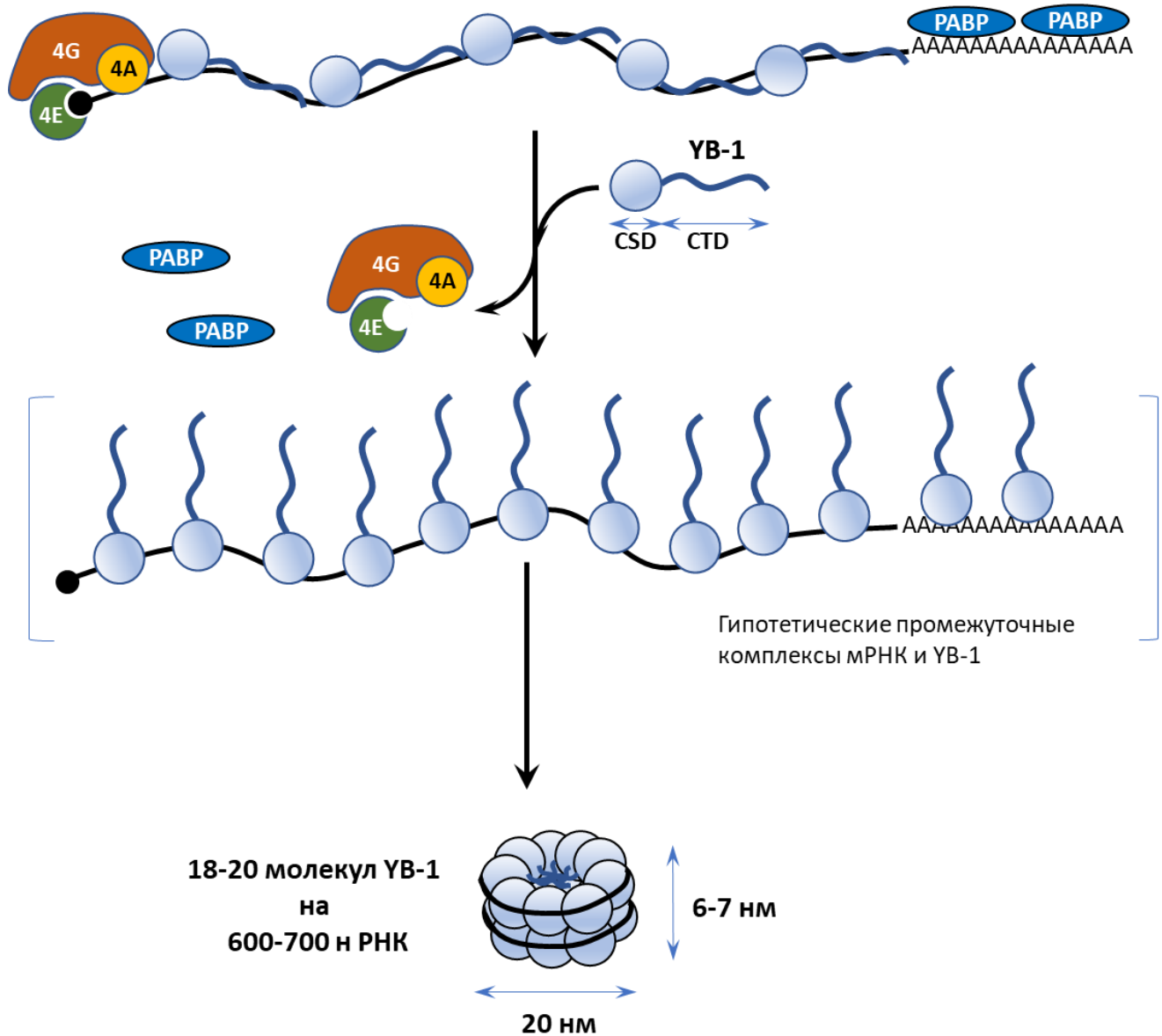
Первоначально YB-1 и другие YB-белки были идентифицированы как основные белки мРНК, которые упаковывают и стабилизируют мРНК. При высоком соотношении YB-1/РНК YB-1 ингибирует трансляцию путем упаковки мРНК в компактные нетранслируемые мРНК, где кэп-структура и поли(А)-хвосты недоступны для факторов инициации трансляции и поли(А)-связывающего белка (PABP) [92, 93]. В этих частицах мРНК чрезвычайно

чувствительны к эндонуклеазам и имеют тенденцию приобретать поверхностную локализацию [16], что, вероятно, позволяет регуляторным РНК-связывающим белкам или регуляторным РНК распознавать мРНК в нетранслируемых мРНК и направлять их на трансляцию, деградацию или контролировать их расположение в нужное время и в нужном месте. Этот механизм глобального контроля трансляции чрезвычайно важен для половых клеток, в ходе раннего развития эмбриона [94] и, вероятно, в ретикулоцитах. Известно, что YB-белки в большом количестве присутствуют в половых клетках [94], где они ингибируют трансляцию большого количества мРНК [74]. Более того, в ходе активации эмбрионального генома (Embryonic Genome Activation или Maternal to zygotic transition (MZT)) ингибирование трансляции, а не сама упаковка мРНК, вероятно, наиболее важно. Показано, что нарушения эмбрионального развития после нокаута YB-1 у рыбки *Danio rerio* можно преодолеть до некоторого этапа за счет сверхэкспрессии 4E-связывающего белка (4E-BP), который ингибирует глобальную трансляцию [95]. С другой стороны, несмотря на серьезные пороки развития и гибель плода у мышей с нокаутом YB-1, фибробластные клетки, выделенные из эмбрионов YB-1<sup>-/-</sup>, не обнаруживают значительных изменений в глобальной трансляции [96]. Вероятно, другие YB-белки, такие как YB-2 и YB-3, а возможно и другие РНК-связывающие белки могут функционально компенсировать потерю YB-1. Эта гипотеза косвенно подтверждается наличием еще более серьезных пороков развития и более ранней гибелью эмбрионов с двойным нокаутом YB-1 и MSY4 (YB-3 мыши) [97].

Данные о механизме ингибирования трансляции белком YB-1 получены, главным образом, в бесклеточной системе трансляции на основе лизата ретикулоцитов кролика [48, 98-100], однако проводились исследования и на культуре клеток HeLa [48, 72, 98-101]. При увеличении количества YB-1 в системе трансляции наблюдается уменьшение связывания с мРНК комплекса eIF4F, ингибирование трансляции и накопление мРНК в форме свободных мРНК. Считается, что снижение связывания eIF4F с мРНК обусловлено вытеснением с мРНК двух компонентов этого комплекса: eIF4G – С-концевым доменом YB-1, eIF4E – доменом холодового шока YB-1. Однако 4E и 4G (вместе с 4A) обычно находятся в комплексе, поэтому более правильно говорить о том, что YB-1 вытесняет комплекс eIF4F, а не его компоненты по отдельности [72, 100]. Механизм ингибирования трансляции белком YB-1 в бесклеточной системе трансляции и образования при этом нетранслируемых мРНК схематично изображен на рисунке 5.

Отдельный домен холодового шока, а также укороченный YB-1 (последовательность 1–180, содержащая А/Р домен, CSD и небольшую часть CTD), оказывают лишь незначительное ингибирующее действие на трансляцию [39]. Более того, YB-1 (1–180) не образует компактных комплексов мРНК, а только линейные филаменты [39], что еще раз говорит о важности

формирования правильных, компактных комплексов мРНК для ингибирования трансляции. Важно, что изолированный С-концевой домен способен сильно подавлять трансляцию [100], и это предполагает доминирующую роль этого домена в ингибировании, однако может объясняться склонностью изолированного С-концевого домена к агрегации и неспецифическому взаимодействию с большим количеством партнеров.



**Рисунок 5.** Схема, демонстрирующая особенности структурной организации ненасыщенных (транслируемых) и насыщенных белком YB-1 (нетранслируемых) комплексов мРНК с мажорными белками мРНК (YB-1 и PABP) и фактором инициации eIF4F.

В отношении роли YB-1 в глобальном ингибировании трансляции в соматических или культивируемых клетках до сих пор нет определенности. По некоторым оценкам количество YB-1 в соматических клетках составляет от 5 до 10 молекул на молекулу мРНК [101]. Так как



средняя длина мРНК человека составляет около 3500 нуклеотидов [102], для образования нетранслируемой частицы мРНК потребуется от 75 до 90 молекул YB-1 на мРНК. Очевидно, что даже дополнительная экспрессия с плазмиды не может дать столько дополнительного белка. Из всего этого следует, что только часть мРНК в соматических клетках подвергается упаковке и ингибированию. Гипотеза YB-1-опосредованной упаковки определенных мРНК в мРНК была выдвинута относительно недавно [61]. Поскольку YB-1 связывает РНК кооперативно, однажды сформированный комплекс мРНК остается стабильным, а свободные мРНК не конкурируют за связывание с YB-1, рекрутированным в этот комплекс. Другими словами, в клетке существуют YB-1-насыщенные мРНК, упакованные в мРНК, и свободные мРНК [61]. Принадлежность к той или иной группе мРНК, вероятно, продиктована несколькими факторами: конкретными сайтами связывания YB-1, РНК-связывающими белками-партнерами YB-1, а также длинными некодирующими РНК (lncRNA), которые рекрутируют YB-1 на определенные мРНК.

На данный момент можно лишь говорить, что в определенных условиях обнаружены сотни примеров ингибирования трансляции мРНК белком YB-1, но механизм ингибирования зачастую остается неясным. Приведем несколько наилучшим образом исследованных случаев.

Способность YB-1 вытеснять eIF4E с кэп-структуры и прилегающей области мРНК считается решающей при трансляции «слабых» мРНК, в том числе мРНК, связанных с клеточным ростом и пролиферацией [72]. Для этих мРНК характерно наличие протяженной GC-богатой 5' нетранслируемой области с выраженной вторичной структурой. Гипотеза заключается в том, что «слабые» мРНК чрезвычайно чувствительны к концентрации eIF4E, незначительное снижение которой может вызывать ингибирование трансляции [72]. Это подтверждается, в частности, данными рибосомного профайлинга (Ribo-Seq) [103]. Было показано, что ингибирование трансляции «слабых» мРНК, связанных со злокачественным перерождением клеток, зависит от статуса фосфорилирования YB-1 по Ser102 [72, 104]. Несмотря на то, что *in vitro* p-Ser102-YB-1 имеет ту же эффективность связывания РНК, что и нефосфорилированный YB-1 [72], фосфорилированный YB-1 не может эффективно связываться *in vivo* со слабыми мРНК и ингибировать их трансляцию за счет вытеснения eIF4E [72, 104]. При активации сигнальных каскадов, стимулирующих фосфорилирование YB-1 (в частности, PI3K-Akt-сигнального каскада), происходит высвобождение p-Ser102-YB-1 из комплекса с мРНК и повышается доступность фактора инициации eIF4E и активация трансляции слабых матриц. Следует отметить, что только часть фракции eIF4E-зависимых мРНК контролируется YB-1, и, следовательно, селективность ингибирования трансляции с помощью YB-1 не может быть связана только с eIF4E. Вероятно существует еще какой-либо партнер YB-1 или его модификации, регулирующие специфичность ингибирования трансляции на определенных

матрицах. Тем не менее, дальнейшие исследования показали, что вышеописанная модель согласуется с экспериментальными данными о регуляции трансляции мРНК, кодирующих компоненты цепи окислительного фосфорилирования (OXPHOS mRNAs) [105], мРНК ацетилхолинового рецептора  $\alpha$  [106] и мРНК глутаматного рецептора 2 GluR2 [107].

В качестве других примеров избирательного ингибирования трансляции белком YB-1 можно привести случаи, когда это ингибирование обусловлено специфическим связыванием YB-1 с определенными последовательностями, как правило в нетранслируемых областях мРНК. Так, YB-1 ингибирует трансляцию связанных со старением мРНК (IL8, CXCL1 и др.) [108], мРНК протаминов [63], собственной мРНК [65], некоторых вирусных мРНК [64, 109] посредством взаимодействия со специфическими последовательностями в 3'НТО этих мРНК. То же самое верно для ингибирования трансляции группы мРНК у рыбки *Danio rerio* (мРНК *sqt*, *nodal*, *lefty* и т.д.). В этом случае YB-1 специфично связывается с мотивом DLE (AGCAC, за которым следует короткая шпилька) внутри 3'НТО [104]. Интересен пример с мРНК *TGF $\beta$* . Рассчитанная теплота плавления вторичной структуры 5'НТО этой мРНК ниже достаточной для предотвращения сканирования 5'НТО 43S-преинициаторным комплексом. Тем не менее, мРНК *TGF $\beta$*  находится преимущественно в составе свободных мРНК, т.е. не транслируется. Было показано, что YB-1 связывается с высокоструктурированной G/C-богатой 5'НТО этой мРНК и, вероятно, стабилизирует вторичную структуру 5'НТО, что препятствует инициации трансляции [110].

Из всего вышеизложенного ясно, что YB-1 действует как общий и специфический ингибитор трансляции для сотен мРНК. Возникает предположение, что после нокаута YB-1 в клетках можно ожидать увеличения глобальной трансляции. Однако, как оказалось, нокаут YB-1 вызывает только небольшое снижение глобальной трансляции в клетках мыши [96]. В первую очередь это наблюдение может объясняться тем, что при нокауте YB-1 могут быть включены некоторые другие компенсаторные механизмы, такие как усиление распада мРНК или активация сигнальных каскадов регуляции трансляции. Кроме того, поскольку при низком соотношении YB-1/мРНК YB-1 может активировать трансляцию *in vitro*, его нокаут может привести к глобальному снижению трансляции.

### 1.5. YB-1 как стимулятор трансляции

При значительном уменьшении количества YB-1 в системе, трансляция также будет ингибироваться [111]. Добавление же YB-1 в такие лизаты ведет к активации трансляции [111-113]. YB-1 стимулирует процесс белкового синтеза на стадии инициации, не оказывая влияния на элонгацию и терминацию [111]. Предполагается, что при недостатке YB-1 факторы инициации, такие как 4F, будут равномерно распределяться по молекуле мРНК, а не

концентрироваться на её 5'-конце. Таким образом, инициация трансляции будет малоэффективна. При увеличении же количества YB-1, eIF4F будет вытесняться с «тела» мРНК, но успешно конкурировать с ним в 5' концевой области за счет большого сродства eIF4E к кэп-структуре мРНК [113, 114]. Подобный механизм «концентрирования» факторов трансляции белком YB-1, по-видимому, лежит также в основе стимуляции трансляции поли(А)-связывающим белком [115]. В отсутствие YB-1 PABP незначительно усиливает трансляцию мРНК, т.к. и без него сродство фактора eIF4F к мРНК достаточно, а конкурировать за связывание с YB-1 нет необходимости. Напротив, в присутствии YB-1 создается конкуренция за связывание между YB-1 и eIF4F. В этих условиях способность PABP взаимодействовать с eIF4F и повышать его сродство к мРНК приводит к существенной стимуляции трансляции.

Кроме того, стимулирующее действие YB-1 на трансляцию может быть обусловлено его РНК-шаперонной активностью [70]. Расплетая вторичную структуру, YB-1 может способствовать более эффективному сканированию 5' нетранслируемой области мРНК и, как следствие, более эффективной инициации трансляции.

На сегодняшний день нет прямых доказательств стимуляции глобальной трансляции YB-1 *in vivo*, однако примеров активации трансляции некоторых мРНК или групп мРНК предостаточно. Было обнаружено, что YB-1 стимулирует трансляцию мРНК, продукты трансляции которых участвуют в эпителиально-мезенхимальном переходе (ЭМП) и в ответе на различные стрессы (Snail1, HIF-1 $\alpha$ , G3BP1, MYC и др.) [108, 116-118]. Предполагается, что трансляция таких мРНК, обладающих высокоструктурированной 5'НТО, проходит по кэп-независимому механизму, для реализации которого необходима повышенная концентрация YB-1. При этом трансляция других мРНК может в таких условиях подавляться. Интересно, что IRES-зависимая трансляция также стимулируется высокими концентрациями YB-1, при которых кэп-зависимая трансляция сильно подавляется (к сожалению, эта работа Группы регуляции биосинтеза белка ИБ РАН так и не была опубликована). Причина стимулирующего эффекта YB-1 на кэп-независимую трансляцию пока доподлинно не известна. Одна из точек зрения состоит в том, что YB-1 расплетает вторичную структуру РНК [70] и способствует сканированию. Было показано, что комплекс малой рибосомной субчастицы с мРНК накапливается в истощенных по YB-1 системах трансляции [111], что может свидетельствовать об участии YB-1 в сканировании мРНК. Другая идея состоит в том, что мРНК, трансляцию которых стимулирует YB-1, содержат внутренний сайт посадки рибосомы (IRES), а YB-1 в этом случае функционирует как ITAF (IRES trans-acting factor) [116]. Однако убедительных доказательств наличия IRES в этих мРНК нет [119]. Напротив, наиболее изученная из таких мРНК – мРНК *HIF-1 $\alpha$* , как показано, не содержит IRES-элемент в 5'НТО [120, 121]. Тем не менее, есть данные, что YB-1 в условиях гипоксии взаимодействует с 5'НТО мРНК *HIF1 $\alpha$*  и

стимулирует её трансляцию [117]. Однако если одновременно с гипоксией клетки испытывают ЭР-стресс (стресс эндоплазматического ретикулума), связанный с избытком несвернутых белков (unfolded protein response, UPR), YB-1 не может стимулировать трансляцию мРНК HIF-1 $\alpha$ , что по-видимому объясняется снижением способности YB-1 связываться с 5'НТО мРНК HIF-1 $\alpha$  [122]. Однако возможно и другое объяснение. При UPR YB-1 локализуется в стрессовых гранулах (SG), образованных внутри клетки [123], и, следовательно, цитоплазматический свободный YB-1 недостаточен для стимуляции трансляции мРНК HIF-1 $\alpha$ . Кроме того, известно, что некоторые другие РНК-связывающие белки, такие как HuR, PTB, RBM38 и др., связываются с 5'НТО HIF-1 $\alpha$  и влияют на её трансляцию [124]. Предположительно, YB-1 способствует связыванию этих белков либо за счет расплетания локальной вторичной структуры РНК, либо за счет прямого взаимодействия с рассматриваемым белком. Взаимодействие YB-1 с 5'НТО мРНК HIF-1 $\alpha$  может регулироваться длиной некодирующей ДНК (днДНК) НГТТ (см. пункт «Влияние некодирующих РНК на активность YB-1» в разделе «РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИЙ YB-1»).

Для некоторых мРНК, таких как G3BP1, данные об участии YB-1 в контроле трансляции противоречивы. Некоторые исследователи сообщают, что YB-1 усиливает трансляцию мРНК G3BP1 за счет связывания с 5'НТО [125, 126], в то время как другие отрицают такую регуляцию [123, 127]. Разницу в выводах можно объяснить наличием или отсутствием регуляторных РНК-связывающих белков, связывание и активность которых модулируются YB-1.

Другой пример стимулирующего эффекта YB-1 на трансляцию – стимуляция трансляции мРНК, необходимых для клеточного самообновления и пролиферации (CDK1, CDK2, EZH2 и т. д.). Комплекс YB-1 и хеликазы DDX6 взаимодействует со структурой в пределах 3'НТО этих мРНК и каким-то образом рекрутирует eIF4E, что в итоге стимулирует трансляцию [128].

## 1.6. Роль YB-1 в контроле стабильности мРНК

YB-1 и его гомологи участвуют в регуляции стабильности и распада как в глобальном масштабе, так и в отношении определенных групп мРНК. Образуя компактные мРНП с недоступными экзонуклеазам 5'- и 3'-концами, YB-белки не только ингибируют трансляцию, но и стабилизируют мРНК [92]. Этот механизм очень важен для половых клеток, особенно ооцитов. Нокаут основного зародышевого белка MSY2 мыши ведет к дестабилизации мРНК и, следовательно, к остановке роста и созреванию ооцитов [129]. В ооцитах MSY2 упаковывает мРНК в очень компактные (нерастворимые в Triton X-100) комплексы мРНП, недоступные для клеточного аппарата деградации мРНК. Во время созревания ооцитов MSY2 фосфорилируется киназой CDK1, что вызывает переход MSY2-содержащих мРНП в менее компактные

(растворимые) комплексы. Таким образом запускается и трансляция, и распад мРНК [130]. Подробно изучена роль YB-1 рыбки *Danio rerio* (zYB-1) в регуляции стабильности и деградации мРНК при так называемом материнско-зиготическом переходе (maternal to zygotic transition, MZT) [80, 95]. Суть этого перехода состоит в замене материнских мРНК, хранившихся в ооците и работающих на первых этапах эмбриогенеза, на мРНК, синтезируемую уже диплоидным эмбрионом. Авторы этих исследований не наблюдали глобальной дестабилизации мРНК в ооцитах без zYB-1 до начала MZT [95]. Однако в ходе MZT в отсутствие zYB-1 были обнаружены нарушения распада нестабильных материнских мРНК [95] и повышенный распад стабильных материнских мРНК [80]. Это сопровождалось серьезными нарушениями в трансляции, вызывающими избыточный синтез белков и стресс несвернутых белков (UPR). У *Dani rerio* группа нестабильных мРНК деградирует в основном с помощью miR-430-зависимого пути [131]. Известно, что YB-1 регулирует процессинг miRNA [73]. Следовательно, можно предположить, что zYB-1 усиливает процессинг miR-430 или участвует в зависимом от этой miRNA распаде мРНК посредством своей РНК-плавающей или отжигающей активности. Напротив, материнские мРНК, демонстрирующие относительную стабильность во время MTZ, не нацелены на miR-430, но претерпевают модификацию - m5C [80]. Белок zYB-1 имеет повышенное сродство к m5C-модифицированным мРНК, связывается с ними и стабилизирует их, вероятно, за счет привлечения PABP [80].

Интересно, что аналогичный процесс наблюдается в случае карциномы мочевого пузыря человека, где повышенный уровень модификации m5C приводит к повышенной YB-1-зависимой стабильности некоторых мРНК [132]. Авторы указанной работы предположили, что YB-1 рекрутирует в этот процесс белок ELAVL1 (HuR), который известен своим стабилизирующим действием на некоторый набор мРНК.

В соматических клетках YB-1 в комплексе с другими РНК-связывающими белками участвует в регуляции распада мРНК, содержащих специфические стабилизирующие или дестабилизирующие последовательности. Например, связанные с иммунным ответом мРНК (CCL2, CCL7, BCL3 и т.д.) имеют GC-богатую специфическую последовательность в 5'НТО, которая связывает глюкокортикоидный рецептор (ГР). После стимуляции ГР рекрутирует комплекс белков PNRC2-UPF1-Dcp1, который, в свою очередь, рекрутирует YB-1 и HRSP12, тем самым запуская быстрый распад мРНК [133, 134]. Все указанные РНК-связывающие белки необходимы для распада мРНК [133, 134], но только декэпирующий фермент (Dcp1) и эндонуклеаза HRSP12 непосредственно инициируют распад. Точная роль других белков, включая YB-1, неизвестна.

Стабильность мРНК  $\beta$ -глобина контролируется элементом CUGGG в 3'НТО [135]. AUF1 и YB-1 связывают этот элемент и усиливают связывание PABP с мРНК  $\beta$ -глобина, что обеспечивает стабилизацию этой мРНК [135].

В некоторых других случаях участие YB-1 в стабилизации мРНК, вероятно, осуществляется за счет предотвращения их связывания с дестабилизирующими AU-богатыми элементами (ARE) в 3'НТО мРНК РНК-связывающих белков, запускающих распад мРНК. Регуляторные элементы, ответственные за связывание YB-1, могут располагаться в 5'- и 3'-НТО и не содержать известных специфических сайтов связывания YB-1. Например, 5'НТО мРНК *IL-2* содержит последовательность JRE (JNK response element, где JNK – это c-Jun N-terminal kinase), которая связывает YB-1 и нуклеолин и защищает мРНК *IL-2* от ARE-опосредованного распада [136]. После активации киназы JNK белок NF-90 (Interleukin Enhancer Binding Factor 3) переносится в цитоплазму, связывается с ARE и стабилизирует мРНК *IL-2* [137]. Предполагается, что YB-1 и нуклеолин способствуют связыванию NF-90 с мРНК *IL-2*. Комплексы, стабилизирующие эту мРНК, могут включать дополнительные белки. Показано, что комплекс, собирающийся на ARE-элементе, стабилизирующем мРНК *IL-2*, и подобный ему комплекс на мРНК *VEGF*, могут содержать РТВ и некоторые другие неидентифицированные белки [62]. В случае мРНК *GM-CSF*, YB-1 вместе с hnRNP и другим стабилизирующим ARE-связывающим белком ELAVL1 (HuR) связываются с ARE в 3'НТО после обработки клеток TNF- $\alpha$  (фактор некроза опухоли) и фибронектином [138, 139].

Еще один механизм, контролирующий стабильность мРНК, связан с трансляцией мРНК. В этом случае транслирующая рибосома вытесняет большой белковый комплекс, связанный с особой областью в кодирующей области мРНК (CRD, coding region determinant), тем самым запуская распад мРНК. В случае мРНК *c-Мус* белковый комплекс состоит из IGF2BP1 (IMP), YB-1, hnRNP, DHX9 и SYNCRIP [140]. Следует отметить, что IGF2BP связывается с мотивом GGm6AC на конце кодирующей области и, помимо вышеуказанных белков, привлекает ELAVL1 (HuR) и PABP, которые стабилизируют мРНК [141]. Судя по количеству мРНК, связанных с IGF2BP, описанный механизм достаточно широко распространен. Однако точная роль YB-1 в этом процессе неизвестна. Интересно, что недавно было обнаружено, что даже несмотря на то, что YB-1 и IGF2BP1 не взаимодействуют напрямую, они связывают одни и те же молекулы мРНК сразу после их ядерного экспорта [142].

Подобно YB-1, YB-3 может участвовать в контроле стабильности мРНК. Возможно, YB-3 связывает 3'НТО мРНК p21 [143], SLC7A5 и SLC3A2 (переносчики аминокислот) [144] и стабилизирует их. Однако о механизме ничего не известно.

Таким образом, даже несмотря на то, что YB-1 и YB-3 важны для стабильности и контроля распада определенных мРНК, почти ничего не известно об их точной роли в этом

процессе, особенно в соматических клетках. Предположительно, благодаря множеству белков-партнеров и способности к расплетанию вторичной структуры РНК, YB-белки способствуют образованию правильных комплексов мРНК, регулирующих стабильность и распад мРНК.

### 1.7. YB-1 как транскрипционный фактор

Первоначально YB-1 был открыт как фактор, связывающийся с промоторной областью гена MHC II и гена колониестимулирующего фактора роста гранулоцитов и макрофагов [2, 40]. При этом предполагалось, что связывание зависит от наличия в промоторе так называемой Y-бокс последовательности (5'-CTGATTGGC/TC/TAA-3'). Отсюда, стоит напомнить, и название белка - Y-бокс связывающий белок 1. Позже многочисленные эксперименты показали, что увеличение количества YB-1 в клетке или транслокация YB-1 из цитоплазмы в ядро сопровождается увеличением или уменьшением количества мРНК или белков, кодируемых многими генами, отвечающими за деление клеток, дифференцировку, множественную лекарственную устойчивость и т. д. Зачастую роль YB-1 как транскрипционного фактора рассматривалось сквозь призму его способности взаимодействовать с Y-боксом. Ярким примером может служить изучение регуляции транскрипции гена множественной лекарственной устойчивости. В первых работах, посвященных MDR1 и YB-1 отмечалось, что повышенная ядерная локализация YB-1 коррелирует с увеличением экспрессии MDR1 [145], а понижение экспрессии YB-1 под действием антисенс-РНК приводит к повышенной чувствительности клеток к ксенобиотикам [146]. Далее, опираясь на данные о способности YB-1 взаимодействовать *in vitro* с Y-бокс-содержащими олигонуклеотидами, многие исследователи сделали вывод, что повышение экспрессии MDR1 связано со способностью YB-1 усиливать транскрипцию этого гена, взаимодействуя с Y-бокс последовательностью в его промоторе (например, [147]). Позднее выяснилось, что YB-1 возможно взаимодействует не столько с Y-боксом, сколько с белками, связывающимися с промотором гена MDR1. Например, эндонуклеаза APE1 (apurinic/apyrimidinic (AP) endonuclease 1) при обработке клеток ксенобиотиками ацетируется и вовлекает YB-1 в активирующий транскрипцию комплекс, формирующийся на промоторе гена MDR1 [148]. Важно отметить, что APE1 является кофактором некоторых факторов транскрипции и взаимодействует с ними при стрессе, который вызывает его модификации, в частности ацетилирование. Таким образом, YB-1 участвует в регуляции транскрипции MDR1 и других генов только когда он связан с другими белками. Некоторые исследователи считают, что YB-1 вообще не участвует в регуляции экспрессии MDR1. Это мнение подкрепляется тем, что в клетках рака желудка и поджелудочной железы ингибирование экспрессии YB-1 не повлияло ни на количество Р-гликопротеина или мРНК MDR1, ни на чувствительность клеток к лекарствам [149]. Не исключено, что противоречивые

данные о влиянии YB-1 на экспрессию *MDR1* и других генов могут быть объяснены различным клеточным контекстом. Так как ряд белков участвует в регуляции транскрипции этого гена, их наблюдаемый эффект может различаться при разном количестве или модификациях этих белков.

В отношении многих других генов четких доказательств активации или подавления их экспрессии за счет связывания YB-1 именно с Y-боксы последовательностями нет. Зачастую выводы основаны на корреляции между количеством YB-1 в ядре или количеством YB-1, в целом и экспрессией того или иного гена [56], а также *in vitro* данными о специфичном связывании YB-1 с Y-боксы-содержащими олигонуклеотидами. Действительно, небольшую специфичность к Y-боксы YB-1 проявляет, однако данные микрочип-анализа свидетельствуют, что существуют и заметно более сильные сайты связывания для YB-1: одноцепочечный мотив GGGG, одно- и двухцепочечные мотивы CACC и CATC [58]. Что касается данных *in vivo*, то анализ результатов ChIP-on-Chip (иммунопреципитация хроматина с последующим микрочип-анализом) и ChIP-Seq (иммунопреципитация хроматина с последующим секвенированием) экспериментов для YB-1 [82, 83, 150] показал, что никакие использованные биоинформатические методы не позволяют обнаружить специфичности YB-1 к Y-боксы, а вероятно, и к какой-либо другой последовательности ДНК [84, 85]. Более того, существуют значительно более убедительные доказательства, что реальным Y-боксы связывающим белком является транскрипционный фактор NF-Y [84]. Впрочем, с развитием технологии высокопроизводительного секвенирования и биоинформатических методов стоит ожидать, что вопрос о специфичности взаимодействия YB-1 с ДНК *in vivo* еще получит развитие.

Тем не менее, участие YB-1 в транскрипции трудно отрицать. Однако это участие обусловлено, вероятно, взаимодействием с настоящими транскрипционными факторами и/или предпочтительным связыванием YB-1 с одноцепочечной формой ДНК. При этом YB-1 проявляет повышенное сродство к пиримидин-богатой цепочке ДНК в участках с сильно асимметричным распределением пуриновых и пиримидиновых оснований между двумя цепочками ДНК [36, 45, 151]. Кроме того, YB-1, как уже отмечалось выше, проявляет свойства шаперона нуклеиновых кислот [70]. В совокупности всё это способствует поддержанию одноцепочечного состояния ДНК и препятствует посадке транскрипционных факторов, предпочитающих ДНК-дуплексы, и способствует посадке других транскрипционных факторов, предпочитающих одноцепочечные участки. Можно привести несколько наиболее интересных примеров.

Предполагается, что ингибирование транскрипции гена коллагена (*COL $\alpha$ 2 (I)*) белком YB-1 происходит, во-первых, за счет предотвращения образования комплекса транскрипционного фактора Smad3 с гистонацетилтрансферазой p300. А во-вторых, YB-1



может стабилизировать одноцепочечную форму ДНК в промоторе COL $\alpha$ 2 (I), тем самым предотвращая связывание с ним факторов Smad3 и Sp1/3 [151].

Другой пример – регуляция транскрипции гена Fas-рецептора. Взаимодействие YB-1 с одной цепочкой ДНК в ингибиторном участке промоторной области и белка Puro с противоположной дестабилизирует двухцепочечную форму рядом расположенного активаторного участка. Это, в свою очередь, препятствует присоединению белков-активаторов c-Fos и c-Jun и подавлению транскрипции [152]. Таким образом, YB-1, связываясь с одноцепочечной ДНК, не только стабилизирует её в таком состоянии в области, с которой он связан, но и может дестабилизировать двухцепочечное состояние расположенных рядом областей. Вероятно, это один из наиболее распространенных механизмов влияния YB-1 на транскрипцию.

Транскрипция гена VEGF тонко регулируется в зависимости от внешних условий. Было обнаружено, что YB-1 участвует в одном из механизмов ингибирования транскрипции этого гена. YB-1 взаимодействует с некодирующей цепью ДНК в промоторе гена *VEGF*, а другой Y-бокс-связывающий белок – dbpA, гомолог YB-1 – взаимодействует с кодирующей цепью ДНК. Стабилизация одноцепочечного состояния ДНК в промоторе, по всей видимости, препятствует связыванию других транскрипционных факторов, что приводит к ингибированию транскрипции [62].

Стабилизация одноцепочечного состояния ДНК может приводить не только к ингибированию транскрипции. Так, связываясь с одноцепочечной ДНК в промоторе гена ДНК-полимеразы  $\alpha$ , YB-1 стимулирует транскрипцию. Возможно, это происходит в комплексе с другими белками [55]. Еще одним примером участия YB-1 в активации транскрипции может служить ген *c-тус*. YB-1 связывается с СТ-богатой последовательностью в промоторе этого гена и, вероятно, с ТАТА-связывающим белком (ТВР), что приводит к посадке коровых транскрипционных факторов и РНК-полимеразы II.

В случае гена *металлопротеиназы 2* связывание YB-1 в комплексе с белками AP-2 и p53 с одноцепочечным участком промоторной области приводит к активации транскрипции [153, 154].

Существует много примеров, показывающих, что в регуляции транскрипции YB-1 действует только в составе мультибелкового комплекса. В частности, YB-1 входит вместе с белками киндлином-2 и  $\beta$ -катенином в транскрипционный комплекс, который связывается с промотором EGFR и усиливает его транскрипцию [155]. В комплексе с белком EWS YB-1 активирует транскрипцию гена *BMP7* (Bone-Morphogenic Protein 7, BMP7) [156], а в комплексе с белком VAF60a (компонентом комплекса ремоделлинга хроматина) ингибирует транскрипцию гена *CPS1* [157]. Совместно с p53, YB-1 подавляет активность промотора LRP (Lung Resistance-

Related Protein). В нормальных условиях YB-1 привлекает гистондеацетилазу HDAC2 и p53 к промотору LRP, что обеспечивает подавление экспрессии LRP. При обработке клеток ксенобиотиками комплекс YB-1-p53-HDAC2 распадается, и экспрессия гена LRP усиливается [158], что необходимо для реализации лекарственной устойчивости клеток.

Не перестают появляться работы, в которых показано некоторое специфичное сродство YB-1 к ДНК. Так, было установлено, что под действием ретиноевой кислоты на клетки VSMC YB-1 фосфорилируется и переходит ядро. Эти события коррелируют с активацией или ингибированием транскрипции генов, содержащих GC-богатые последовательности в промоторах (SM22a, p21, cyclin D и др.). А в экспериментах *in vitro* установлено, что YB-1 способен связываться с такими последовательностями [159]. Независимо, другая группа исследователей обнаружила, что YB-1 активирует транскрипцию ряда «пролиферативных» генов в раковых клетках различной этиологии. Оказалось, что большинство промоторов активируемых генов содержат GC-богатые сайты связывания транскрипционных факторов семейства E2F [160]. Не исключено, что в случае G-богатых мотивов YB-1 стабилизирует двойные спирали [58], что может способствовать связыванию с ДНК факторов транскрипции, обладающих повышенным сродством к ДНК-дуплексам.

Интересно, что YB-1 может участвовать в регуляции транскрипции не только клеточных, но и вирусных генов при вирусной инфекции. Например, на ранней стадии развития полиомавируса JVC белок Puro связывает пурин-богатую цепочку в регуляторной области и активирует транскрипцию ранних генов, в том числе и T-антигена. Далее Puro взаимодействует с YB-1 и стимулирует его связывание с противоположной пиримидин-богатой цепочкой, что приводит к ингибированию транскрипции с раннего промотора. На поздних стадиях развития вируса T-антиген вытесняет Puro и в комплексе с YB-1 ингибирует транскрипцию с раннего промотора, а также активирует транскрипцию генов с позднего промотора [161-163]. При аденовирусной инфекции YB-1 стимулирует транскрипцию поздних вирусных генов с промотора E2 [164]. Другое исследование показало, что YB-1 может регулировать транскрипцию ВИЧ-1. В клетках, инфицированных ВИЧ-1, YB-1 связывается с РНК TAR и с взаимодействующим с ним белком Tat, незаменимым фактором вирусной транскрипции, что усиливает транскрипцию с промотора U3RU5 вируса [165].

Следует отметить, что случаев участия YB-1 в регуляции транскрипции довольно много и перечислять их все, вероятно, не имеет смысла. Тем более, что зачастую в них механизм действия YB-1 на транскрипцию исследован слабо [150, 166-169]. Впрочем, некоторые интересные случаи будут описаны в разделе, посвященном роли YB-1 в клеточных процессах.

Тем не менее, можно сделать общий вывод: YB-1 может выступать как активатор или как ингибитор транскрипции. При этом, стоит повториться, однозначное предпочтение к

определенным последовательностям у YB-1 в экспериментах *in vivo* или *ex vivo* пока не показано. Такое поведение характерно скорее не для транскрипционного фактора в классическом понимании, а для коактиватора/корепрессора, привлекаемого в транскрипцию другими белками или определенным состоянием хроматина.

Высказывается предположение, что YB-1 и вовсе связан с транскрипционным комплексом только за счет вновь синтезируемой РНК [84], к которой YB-1 имеет сродство большее, чем к ДНК. Однако, если это можно согласовать с активацией транскрипции, то при ингибировании транскрипции и, соответственно, при отсутствии синтезируемой РНК, белку YB-1 будет не с чем связаться.

Еще один ядерный процесс – сплайсинг пре-мРНК – проходит ко-транскрипционно. YB-1, как известно, входит в состав сплайсосом [91, 170] и может участвовать в сплайсинге некоторых мРНК (см. следующий раздел). Поэтому нельзя исключать, что взаимодействие YB-1 с транскрипционным комплексом происходит посредством сплайсосомы и связанных с ней белков.

### 1.8. YB-1 как фактор сплайсинга

YB-1 и/или его гомологи, по-видимому, присоединяются к пре-мРНК еще в ходе транскрипции и связаны с ней на всех этапах её созревания [86]. У млекопитающих YB-1 был обнаружен в сплайсосомах на этапах сборки А-комплекса (АТФ-зависимая ассоциация U2 snRNP с точкой ветвления в пре-мРНК) и В-комплекса (ассоциация U4, U5 и U6 snRNPs с пре-мРНК) [91, 170]. Однако маловероятно, что YB-1 участвует в сплайсинге всех пре-мРНК. Имеющиеся на данный момент данные свидетельствуют в пользу участия YB-1 в альтернативном сплайсинге некоторых пре-мРНК, содержащих специфический сайт узнавания YB-1.

На это указывала первая работа, в которой было обнаружено, что YB-1 стимулирует включение экзона v4 в мРНК CD44 путем распознавания А/С-богатого элемента (АСЕ) в этом экзоне [171]. Помимо YB-1, АСЕ связывает p72 и Tra2-β1, которые также стимулируют включение экзона v4 и экзона v5. Было показано, что функциональная активность фактора сплайсинга Tra2-β1 намного выше в присутствии YB-1 [172]. Вероятно эти белки функционируют в комплексе друг с другом, однако это предположение так и не было проверено. В другом исследовании было установлено, что YB-1, взаимодействуя с несколькими последовательностями CAUC в экзоне v5 и с полипиримидиновой последовательностью перед ним, также стимулирует включение экзона v5 в мРНК CD44. При этом YB-1 привлекает фактор сплайсинга U2AF65 [66]. Интересно, что согласно работе Wang и соавт. [173] по выявлению последовательностей в пре-мРНК, влияющих на сплайсинг, и белков, связывающихся с ними,

оверэкспрессия YB-1, наоборот, способствует пропуску экзонов, если в интронной области пре-мРНК присутствует CA-богатая последовательность (CACACCA). К этой последовательности YB-1 имеет повышенное сродство. Будет ли экзон включаться или пропускаться, по-видимому зависит не только от YB-1, но и от его белков-партнеров.

На участие YB-1 в регуляции альтернативного сплайсинга указывало и взаимодействие YB-1 с фактором сплайсинга SRp30c [174]. Оверэкспрессия этого фактора способствовала переходу YB-1 в ядро, где YB-1 влиял на выбор 5'-сайта сплайсинга в процессинге модельной аденовирусной пре-мРНК E1A.

Имеются и другие примеры. Так, в мРНК NF1 в пределах экзона 37 была выявлена область частых мутаций. Однонуклеотидные замены в этой области вызывают пропуск 37-го экзона в мРНК. Этот экзон содержит последовательность ACAAC, с которой связываются YB-1 и хеликаза p72. Мутации в этой последовательности уменьшают сродство к YB-1 и p72 и увеличивают сродство экзона 37 к негативным регуляторам сплайсинга DAZAP1, hnRNPA1 и hnRNPA2, тем самым стимулируя его исключение из мРНК [175]. Кроме того, YB-1 в комплексе с белками hnRNP C и hnRNP L стимулирует пропуск экзона 10 в мРНК тирозинкиназы *MuSK* [176], а вместе с хеликазой DHX9 индуцирует альтернативный сплайсинг мРНК *KLF5* [177].

Как известно, в эукариотических клетках сплайсинг пре-мРНК - это ко-транскрипционное событие. YB-1 может ассоциировать с комплексом транскрипции через его взаимодействие с протоонкопротеинами TLS и EWS. N-концы этих белков связаны с гиперфосфорилированной РНК-полимеразой II, а их C-концы связаны с YB-1 и другими сплайсосомными белками [178-180]. Интересно, что в клетках саркомы Юинга C-концевые части TLS и EWS заменяются на фрагменты других белков. Такие формы TLS и EWS способны связываться с РНК-полимеразой II, но уже не взаимодействуют с YB-1, что препятствует YB-1-опосредованному альтернативному сплайсингу [178]. Позже было показано, что ДНК-повреждающие стрессы влияют на взаимодействие EWS и YB-1, тем самым предотвращая участие YB-1 в сплайсинге различных мРНК и, в частности, мРНК *MDM-2*. При этом имеет место альтернативный сплайсинг пре-мРНК, в результате которого мРНК *MDM-2* лишается некоторых экзонов и становится менее стабильной, а синтезируемый с неё белок функционально непригодным [179]. Следует отметить, что MDM2 - это убиквитинлигаза белка p53, а p53 является опухолевым супрессором и активатором транскрипции. p53 наиболее важен для выживания клеток в неблагоприятных условиях или для запуска апоптоза при чрезмерно интенсивном стрессе. Стресс, повреждающий ДНК, способствует накоплению p53 частично за счет уменьшения количества *MDM-2* [179]. Предположительно, это результат перекрывания сайтов связывания p53 и EWS с молекулой YB-1. Связывание YB-1 с p53 может нарушать

связывание YB-1 с EWS, тем самым предотвращая участие YB-1 в сплайсинге мРНК *MDM-2* и, как следствие, способствуя увеличению количества самого p53. С другой стороны, взаимодействие между YB-1 и p53 способствует участию YB-1 в репарации и регуляции транскрипции при стрессе, повреждающим ДНК.

Таким образом, в сплайсинге роль YB-1, вероятно, состоит в распознавании определенных последовательностей внутри пре-мРНК и в привлечении некоторых факторов сплайсинга. YB-1, вероятно, не является основным компонентом сплайсосом, а скорее действует как регулятор альтернативного сплайсинга определенных мРНК.

YB-1 также может участвовать в процессинге некоторых микроРНК [73, 181], подавляя активность ферментов, необходимых для процессинга предшественников микроРНК (pre-miRNA). Это может происходить как за счет взаимодействия с pre-miRNA [73], так и за счет взаимодействия с самими ферментами (например, с Dicer)[181]. Разумеется, уменьшение экспрессии микроРНК приводит к дальнейшим последствиям. Так, например, подавляя биогенез miR-205/200b в клетках гепатоцеллюлярной карциномы, YB-1 стимулирует экспрессию гена *ZEB1*, что способствует миграционной и инвазивной активности раковых клеток. Имеется пример, когда YB-1, наоборот, способствует процессингу микроРНК. При стимуляции ангиогенеза в модельной системе YB-1 привлекает фермент Drosha к pri-miR-192, что стимулирует её процессинг [182].

Интересно, что уменьшение количества YB-1 в клетках в целом практически не влияет на количество зрелых микроРНК, что может говорить о том, что он не является непосредственным участником процессинга всех микроРНК [183]. Тем не менее, было показано, что YB-1 взаимодействует с семейством miR-320 и let-7, некоторыми snoRNA U29, U33 и U34, а так же фрагментами tRNA (Phe, Gly). Зная об отсутствии влияния YB-1 на количество зрелых miRNA или snoRNA, можно предположить, что его роль заключается в переводе таких РНК в тельца процессинга (P-bodies) или же их упаковку в экзосомы [183].

### **1.9. Участие YB-1 в репарации ДНК**

Репарация ДНК – процесс, который осуществляется в клеточном ядре. Естественно, что для выполнения своей роли в репарации YB-1 должен быть локализован в этом компартменте. Действительно, при многих видах ДНК-повреждающих стрессов, таких как ультрафиолетовое облучение, обработка ДНК-повреждающими химическими агентами и при окислительном стрессе, YB-1 может переходить в ядро [184-186]. Там YB-1 может регулировать транскрипцию некоторых генов (*p53*, *ДНК-полимераза α*, *MSH6* и *MSH2*, *MDR1*), что способствует выживаемости клеток при стрессе [55, 187, 188].

Однако YB-1 может участвовать и непосредственно в репарации ДНК, что было впервые предположено еще в начале 90-ых годов прошлого века. Тогда было показано, что YB-1 имеет повышенное сродство к ДНК с апуриновыми сайтами [45, 46]. В пользу этого свидетельствовало и повышенное сродство YB-1 к поврежденной цисплатином ДНК или к ДНК с неспаренными основаниями, а также способность YB-1 эффективно плавить дуплексы такой ДНК [36, 59, 60]. Кроме того, YB-1 демонстрировал незначительную 3'-5' экзонуклеазную и эндонуклеазную активности по отношению к одноцепочечной и двухцепочечной ДНК, которые сильно зависели от последовательности и структуры ДНК [36, 59, 189]. Такая активность теоретически может быть важна при некоторых видах репарации.

Эмбриональные стволовые клетки мыши, гетерозиготные по гену *YBX1* (*YB-1+/-*), демонстрируют повышенную чувствительность к сшивающим ДНК агентам, таким как цисплатин и митомицин С, но не к этопозиду, рентгеновскому или УФ-облучению [190]. По мнению авторов, это говорит о прямом участии YB-1 в репарации аддуктов ДНК, образование которых стимулировали цисплатин и митомицин С. В клетке ДНК, модифицированная этими средствами, репарируется либо системой репарации ошибочно спаренных нуклеотидов, либо системой эксцизионной репарации нуклеотидов. Предположительно, YB-1 может напрямую участвовать в обоих механизмах репарации. Было показано, что YB-1 взаимодействует *in vivo* и *in vitro* со многими белками, участвующими в репарации, и может влиять на активность некоторых из них. В частности, он взаимодействует с белками, участвующими в эксцизионной репарации оснований (PCNA [60], p53 [191], hNth1 [189, 192], NEIL-2 [184], ДНК-лигаза III $\alpha$  [184], ДНК-полимераза  $\beta$  [184], ДНК-полимераза  $\delta$  [59], WRN [59, 193], Ku80 [59], MSH2 [59], APE-1 [148, 194]), в эксцизионной репарации нуклеотидов (PCNA [60], p53 [191], ДНК лигаза III $\alpha$  [184], ДНК-полимераза  $\delta$  [59], APE-1 [148, 194], XPC-HR23B [195]), в репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (PCNA [60]; MSH2 [59]), в репарации одноцепочечных (ДНК-лигаза III $\alpha$  [184], APE-1 [148, 194]) и двухцепочечных (WRN [59, 193], Ku80 [59]) разрывов ДНК и в рекомбинационной репарации (WRN [59, 193], MSH2 [59]).

Показано, что YB-1 усиливает ферментативную активность ДНК-гликозилаз hNth1 и NEIL-2 [184, 189, 192] и взаимодействует с их белковыми партнерами PCNA и p53. Взаимодействуя с эндонуклеазой APE1, специфичной к апуриновым/апиримидиновым сайтам (AP-сайтам), и поврежденной двухцепочечной ДНК, YB-1 стабилизирует этот комплекс и стимулирует активность APE1 [196]. При этом он ингибирует её активность в случае, если субстратом является одноцепочечная ДНК. Возможно, такая избирательность необходима для предотвращения разрыва одноцепочечной цепи ДНК в процессах репарации или репликации [197].

Посредством С-концевого домена YB-1 также взаимодействует с ДНК-гликозилазой NEIL1 и ДНК-полимеразой  $\beta$ . При этом YB-1 стимулирует активность NEIL1 и ингибирует 5'-дезоксирибоза-фосфат-лиазную активность ДНК-полимеразы  $\beta$ . [198]. Как и в случае с APE1, YB-1 ингибирует расщепление NEIL1 AP-сайта, если AP-сайт находится в одноцепочечной ДНК [197].

Серия работ, выполненных относительно недавно, выявила еще один механизм участия YB-1 в репарации ДНК [199-202]. Оказалось, что YB-1 подвергается поли-(АДФ-рибозил)ированию (PARIированию) ферментами репарации ДНК PARP1 (поли-(ADP-рибоза)-полимераза 1) в присутствии поврежденной ДНК [201]. Поли-(АДФ-рибозил)ирование самой PARP, белков-субстратов и ДНК – одно из наиболее ранних событий, происходящих в ходе клеточного ответа на повреждение ДНК. Смысл этой модификации заключается, в первую очередь, в распознавании разрывов ДНК и в привлечении комплекса белков репарации, в первую очередь эксцизионной репарации [203, 204]. Роль YB-1 при этом состоит в следующем [205]. На первом этапе на поврежденной ДНК формируется гетеродимерный комплекс YB-1-PARP, в котором PARP поли(АДФ-рибозил)ирует в основном YB-1. После модификации, молекула YB-1 освобождается из комплекса с PARP1 и ДНК и замещается немодифицированной молекулой YB-1. Таким образом, удаление продукта реакции (PAR) вместе с молекулой YB-1 приводит к стимуляции процесса. При этом сама PARP1 аутомодифицируется и, при достижении PAR на молекуле PARP1 достаточной длины, связывание YB-1 с PAR начинает преобладать над взаимодействием YB-1 с PARP1 на поврежденной ДНК. Связываясь с PAR, ковалентно присоединенной к PARP1, YB-1 препятствует их деградации ферментом PARG. Важно отметить, что в присутствии YB-1 PARP1 более продолжительное время находится в каталитически активной конформации, что позволяет модифицировать большее количество белков субстратов. Кроме того, YB-1, находящийся в непосредственной близости к месту повреждения ДНК, может привлекать многие белки системы репарации, с которыми, как было сказано выше, он взаимодействует.

Любопытно, что YB-1 принимает участие в репарации не только ядерной ДНК, но и митохондриального генома. Митохондриальный геном подвержен сильному окислительному воздействию и повреждениям, и его целостность, естественно, поддерживается системой репарации. YB-1 способен участвовать в репарации ошибочно спаренных нуклеотидов в митохондриях человека, непосредственно связываясь с такими участками ДНК и привлекая ферменты репарации, в частности APE-1 [206, 207].

Одной из особенностей YB-1 является его способность процессироваться 20S протеасомой (см. подробнее пункт «*Стабильность белка YB-1*» в разделе «РЕГУЛЯЦИЯ КОЛИЧЕСТВА YB-1»). При обработке клеток ДНК-повреждающими агентами (например,

доксорубицином) YB-1 расщепляется 20S протеасомой между остатками Glu219 и Gly220, а укороченный N-концевой фрагмент YB-1 накапливается в ядре [208]. При этом укороченный белок ко-локализуется в местах разрывов ДНК с белками Mre11 и Rad50, участвующими в репарации двухцепочечных разрывов [209]. Важно, что оверэкспрессия полноразмерного белка и особенно его N-концевого фрагмента повышает выживаемость клеток при генотоксическом стрессе, вызванном обработкой доксорубицином [209]. Авторы этого исследования предполагают, что полноразмерный и укороченный YB-1 могут защищать клетки от действия ДНК-повреждающих агентов на уровне регуляции транскрипции генов, например за счет повышения экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости, и на уровне репарации, но укороченный белок, вероятно, более эффективен в репарации ДНК. Кроме того, укороченная форма YB-1 обладает чуть более высоким сродством к ДНК с неспаренными основаниями, чем полноразмерный белок [209].

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что YB-1 участвует в распознавании поврежденной ДНК, может выступать в качестве платформы при формировании репарационного комплекса на поврежденном участке ДНК и регулировать активность нескольких ферментов этого комплекса.

### **1.10. Секретция и экстраклеточные функции YB-1**

В 2009 году появилась публикация, которая позволила взглянуть на функции YB-1 с неожиданной стороны. Было обнаружено, что YB-1 может секретироваться из клеток в условиях воспалительного стресса при их обработке липополисахаридом, пероксидом водорода, фактором роста тромбоцитов PDGF-BB или TGF $\beta$  [210]. Важно, что в молекуле YB-1 отсутствует каноническая N-концевая сигнальная последовательность, необходимая для классической секретии белков, а при секретии YB-1 его молекулярная масса не уменьшается. Кроме того, секретия YB-1 не ингибируется брэфелдином А, ингибитором классической секретии белков. На основании этих фактов был сделан вывод, что YB-1 секретировается не по классическому механизму секретии белков через аппарат Гольджи и эндоплазматический ретикулум [210]. Однако транспорт YB-1 из клеток подавляется резерпином – ингибитором АТФ-зависимой упаковки биоаминов в везикулы. Исследования показали, что в условиях воспалительного стресса YB-1 колокализуется с одним из маркеров транспорта везикул – белком RAB7. Эти данные говорят о том, что YB-1 так же, как некоторые провоспалительные белки (IL-1 $\beta$ , MIF, HMGB1, FGF2), секретировается по неклассическому механизму в составе везикул эндолизосомального происхождения [211]. Это указывает на то, что YB-1 секретировается не сам по себе, а в составе экзосом (см. ниже). Стоит отметить, что при секретии



УВ-1 может фрагментироваться [210, 212], но какие ферменты в этом участвуют и на каком этапе происходит фрагментация, неизвестно.

Какие функции может выполнять внеклеточный УВ-1? Во-первых, УВ-1 может служить сам по себе сигнальной молекулой. Так, при добавлении к культивируемым клеткам в низких (наномолярных) концентрациях он стимулирует деление и миграцию мезангиальных клеток крысы и клеток почек человека [210]. Предполагается, что УВ-1, и даже только его 16-аминокислотный фрагмент из CSD (73–88), может функционировать как ростовой фактор. Обнаружено, что УВ-1 взаимодействует с EGF-подобными повторами экстраклеточного домена рецептора Notch-3. После взаимодействия с УВ-1 внутриклеточный домен Notch-3 переходит в ядро, где в комплексе с транскрипционным фактором RBP-Jк (Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J) активирует гены-мишени, в частности, транскрипционные факторы семейства HES (Hairy and enhancer of split) [213]. На крысиной модели мезангиопролиферативного нефрита в почечных клубочках был обнаружен высокий уровень как рецептора Notch-3, так и УВ-1. Более того, на 7-ой день заболевания УВ-1 и экстраклеточный домен Notch-3 детектируются в моче больных животных. Таким образом, присутствие УВ-1 в моче может служить диагностическим признаком мезангиопролиферативных заболеваний [213]. Кроме того, было обнаружено, что экстраклеточный УВ-1 может негативно регулировать экспрессию Notch-3 по неизвестному механизму [214]. Рецепторы семейства Notch важны в эмбриональном развитии организма, а их избыточная экспрессия связана с различными заболеваниями, в том числе и с раковыми [215]. Однако пока не ясно, какую роль при этом играет экстраклеточный УВ-1 и его взаимодействие с Notch-3.

При окислительном стрессе секретируемый клетками УВ-1 ингибирует пролиферацию принимающих клеток за счет блокирования клеточного цикла на границе G2/M фаз. Это связано, по всей видимости, с индукцией синтеза ингибитора циклин-зависимой киназы 1A CDKN1A (p21/WAF) [216]. Однако механизм этой индукции не был раскрыт.

Справедливости ради нужно отметить, что в указанных работах к клеточным культурам добавляли рекомбинантный белок УВ-1 в концентрации порядка десятка наномоль на литр культуральной среды (от 0,1 до 1 мкг/мл) [210]. Это довольно большое количество белка, возможно, превосходящее не только количество секретируемого клетками УВ-1, но и количество всего УВ-1, содержащегося в используемом количестве клеток, если проводить расчеты, исходя из того, что в клетке содержится около 2 млн. копий белка УВ-1 [87].

Вторая функция секретируемого УВ-1 непосредственно связана с его РНК-связывающей активностью. Оказалось, что УВ-1 участвует в упаковке некодирующих РНК и мРНК в экзосомы [78, 90]. Экзосомы – это внеклеточные везикулы эндолизосомального

происхождения, которые по современным представлениям необходимы для межклеточной коммуникации [217]. Эксперименты по определению РНК-связывающих белков, входящих в состав экзосом и принимающих участие в упаковке некоторых мРНК в экзосомы, показали, что YB-1 является наиболее подходящим кандидатом для этой роли [90]. Позднее было выяснено, что РНК, предназначенные для экзосом, содержат специфичные мотивы, которые узнаются сортирующими белками. Так, YB-1 принимает участие в сортировке и упаковке РНК в экзосомы, узнавая мотивы с высоким содержанием С/А. Было показано, что мотивы ACCAGCCU, CAGUGAGC и менее конкурентоспособный UAAUCCCA узнаются белком YB-1 [78, 218]. Интересно, что другим белком, взаимодействующим с одним из этих мотивов, является m5C-РНК-метилтрансфераза NSUN2, а, как недавно было показано, YB-1 рыбок данио (zYB-1) и дрозофил (YPS) проявляют повышенное сродство к m5C-метилованной мРНК [132, 219]. Поэтому не исключено, что важную роль в выборе РНК-субстратов для YB-1 при упаковке в экзосомы играет модификация РНК. На данный момент показано участие YB-1 в сортировке отдельных мРНК в экзосомы (miR-133 и miR-223) [90, 220], а также нескольких других типов малых некодирующих РНК (тРНК, Y РНК и vault РНК) [90]. Например, было установлено, что экзосомы, выделяемые эндотелиальными клетками-предшественниками, которые подверглись гипоксии, способствуют мезенхимально-эндотелиальному переходу (MendoT) клеток реципиентов. Это происходит благодаря микроРНК miR-133, упаковку которой обеспечивает YB-1 [220]. Имеются данные об участии YB-1 в регуляции уровня мРНК интерлейкина-6 (IL-6) в макрофагах, стимулированных липополисахаридом (ЛПС) [212]. YB-1 взаимодействует с этой мРНК, упаковывает её в везикулы, транспортируемые во внеклеточное пространство. Важно, что секреция YB-1 (в комплексе с мРНК) происходит в зависимости от типа клеток: в то время как макрофаги активно секретируют YB-1, дендритные клетки сохраняют его преимущественно в цитоплазме даже в ответ на ЛПС. При этом в дендритных клетках YB-1 участвует в стабилизации мРНК IL-6 [212].

Что касается регуляции секреции YB-1, то на данный момент известно, что она зависит от наличия в его С-концевом домене остатков лизина 301 и 304, так как замена этих остатков на аланин полностью ингибирует экспорт YB-1 из клетки. Предполагается, что ацетилирование остатков лизина 301 и 304 играет важную роль при секреции YB-1 из клетки [210]. Например, в дендритных клетках в отличие от макрофагов не происходит ацетилирование YB-1 в ответ на обработку липополисахаридами, и, как следствие, из дендритных клеток YB-1 не секретируется [212]. Кроме того, было обнаружено, что на секрецию YB-1 из клетки влияет его полиубиквитинирование убиквитинлигазой HACE1 [221]. Убиквитин на молекуле YB-1 узнает один из компонентов (белок TSG101) вакуолярного пути секреции белков посредством мультивезикулярных телец [221]. При этом интересно, что во внеклеточной жидкости

полиубиквитинилированный YB-1 обнаружен не был. Предполагается также, что, YB-1 может убиквитинилироваться в случае, если он не фосфорилирован по остатку Thr271 [78]. Этот остаток находится в сигнале удержания белка в цитоплазме (CRS), и его фосфорилирование, возможно, необходимо для локализации белка в цитоплазме. Дефосфорилированный по Thr271 YB-1 вероятно может подвергаться убиквитинилированию, необходимому для секреции.

Практически ничего не известно о том, как секреция YB-1 влияет на его внутриклеточную концентрацию. В большинстве исследований секреции YB-1 внутриклеточный уровень YB-1 не измерялся [210, 213, 222]. Только в одном исследовании сообщается, что при окислительном стрессе, вызванном обработкой арсенитом натрия или H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, YB-1 может секретироваться из клетки, и его внутриклеточная концентрация немного снижается [216]. Но это снижение может быть связано с изменением внутриклеточного содержания YB-1 при окислительном стрессе.

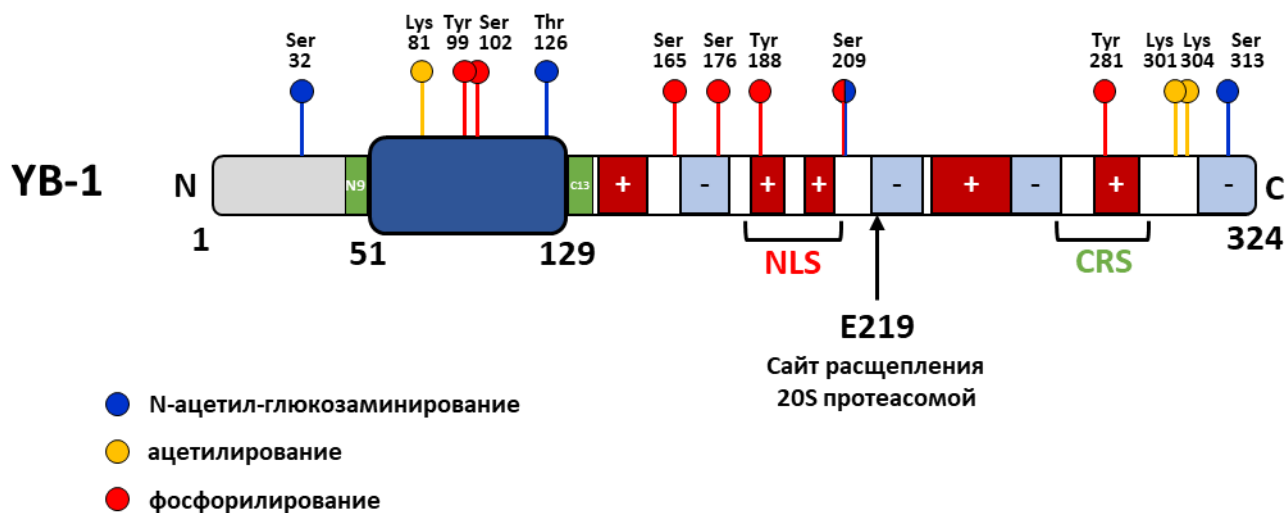
## **2. РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИЙ YB-1**

Функциональная активность YB-1 в клетке может модулироваться посттрансляционными модификациями YB-1, некодирующими РНК или субклеточной локализацией. Разумеется в функционировании YB-1 важную роль играет регуляция его количества в клетке, и этому вопросу будет посвящена отдельный раздел (см. раздел «РЕГУЛЯЦИЯ КОЛИЧЕСТВА YB-1»). Следует отметить, что довольно часто указанные способы регуляции активности YB-1 взаимосвязаны.

### **2.1. Посттрансляционные модификации YB-1 и их влияние на активность YB-1**

YB-1 может подвергаться фосфорилированию, ацетилированию, убиквитинилированию, N-ацетилглюкозаминированию и АДФ-рибозилированию (Рис. 6).

YB-1 фосфорилируется по множеству сайтов, однако наиболее изученным является фосфорилирование YB-1 по Ser102 киназами Akt и RSK. Согласно нескольким публикациям, эта модификация способствует переходу YB-1 в ядро или по крайней мере коррелирует с ядерной локализацией YB-1 [223-225]. При этом наблюдается изменение уровня транскрипции нескольких генов, что, по крайней мере в ряде случаев, связано со взаимодействием YB-1 с промоторами этих генов.



**Рисунок 6. Основные модификации и сигнальные последовательности белка YB-1. NLS- сигнал ядерной локализации, CRS – сигнал цитоплазматического удержания**

В частности, показано, что при индукции форболовым эфиром дифференцировки моноцитов YB-1 фосфорилируется киназой Akt, переходит в ядро, связывается с промотором гена *CCL5* (кодирует хемокин *CCL5*) и активирует его транскрипцию [223]. Интересно, что через некоторое время после индукции дифференцировки YB-1 дефосфорилируется кальциневрином (CaN) и уже не участвует в активации транскрипции гена *CCL5* [223, 226]. В другом исследовании показано, что при обработке мышинных эмбриональных фибробластов эпидермальным фактором роста киназа RSK фосфорилирует YB-1 по Ser102. Это способствует переходу YB-1 в ядро, где он связывается с промотором гена рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) и активирует его транскрипцию [168]. Подобный результат был получен в случае генов *HER2* и *EGFR* на нескольких клеточных линиях рака груди [169].

Однако в ряде случаев было показано, что фосфорилирование по Ser102 не обязательно приводит к ядерной локализации YB-1 и, более того, необходимо для выполнения им цитоплазматических функций. Так, фосфорилирование YB-1 способствует трансляции связанных с клеточным ростом мРНК [72, 104, 227], тогда как оверэкспрессия мутантного YB-1, не фосфорилируемого по Ser102, способствует трансляции генов, связанных с ЭМП [228]. Высказывается предположение, что при стимуляции клеток сывороткой или инсулиноподобным фактором роста 1 фосфорилирование YB-1 снижает способность YB-1 связывать мРНК белков, задействованных в окислительном фосфорилировании (NDUFA9, NDUFB8, SDHB и др.), тем самым способствуя их перераспределению в транслируемые мРНК (в полисомы)[105].

Такое кардинальное расхождение данных о влиянии фосфорилирования на локализацию YB-1 вероятно связано с несколькими факторами. Во-первых, результат зависит от типа

использованных клеточных культур («клеточный контекст»), а во-вторых, переход YB-1 в ядро зависит не только от модификации YB-1 по Ser102. Так, недавно в системе ядерного транспорта *in vitro* было показано, что замена Ser209Asp, имитирующая фосфорилирование по Ser209, приводит к тому, что YB-1 с заменой Ser102Asp, имитирующей фосфорилирование по Ser102, не транспортируется в ядро [229]. Иными словами, фосфорилирование по Ser209 препятствует переходу в ядро YB-1, фосфорилированного по Ser102.

Интересно, что еще одна модификация YB-1 – N-ацетил-глюкозаминирование YB-1 по остатку Thr126 – повышает уровень фосфорилирования Ser102 [230]. Модификацию, по-видимому, осуществляет N-ацетил-глюкозамин трансфераза OGT. Более того, фосфорилирование по Ser102 в свою очередь способствует N-ацетилглюкозаминированию Thr126. В совокупности обе модификации стимулируют клеточную пролиферацию, однако механизм этой стимуляции не ясен. N-ацетил-глюкозаминированию может подвергаться и Ser209 [230]. Можно предположить, что для перехода YB-1 в ядро необходима эта модификация Ser209, поскольку, как отмечалось выше, если Ser209 фосфорилирован, то это предотвращает переход YB-1 в ядро [229]. Возможно, разнообразие в модификации Ser209 лежит в основе регуляции транспорта YB-1 в ядро.

Кроме того, показано, что ядерная локализация YB-1 в клетках рака кишечника может быть связана с фосфорилированием YB-1 по Ser165 и Ser176 (казеинкиназой II и казеинкиназой I, соответственно) [231, 232]. В этом случае наблюдалась активация транскрипции генов, зависимых от фактора транскрипции NF-κB.

Вероятно, фосфорилирование Tyr188 и Tyr281 YB-1 также способствует ядерной локализации белка, но о функциональном значении этой модификации ничего не известно [233].

Недавно было показано, что фосфорилирование YB-1 по S30 и S34 киназами JAK2VF и MARK1 является критичным для перехода YB-1 в ядро, эффективного сплайсинга большого набора мРНК и регуляции транскрипции мРНК, вовлеченных в ERK-сигнальный каскад [234].

Среди других модификаций YB-1 можно отметить его ацетилирование. При обработке клеток ингибиторами деацетилаз (гистодеацетилазы HDAC1, в частности) наблюдалось повышение уровня ацетилирования YB-1 по Lys81. Это коррелировало с подавлением трансляции мРНК NRF2, HIF-1α и G3BP1, что уменьшало выживаемость и метастатическую активность раковых клеток [125]. Ацетилирование по другим остаткам, Lys303 и Lys304, необходимо для секреции YB-1 во внеклеточное пространство [210]. Также было показано, что убиквитинилирование YB-1 убиквитинлигазой HACE1 увеличивает секрецию YB-1 [221]. Однако наиболее часто убиквитинилирование YB-1 связано с деградацией этого белка. Подробно это будет описано в разделе «РЕГУЛЯЦИЯ КОЛИЧЕСТВА YB-1 В КЛЕТКЕ»

Наконец, еще одна модификация YB-1 - это поли-(АДФ-рибозил)илирование (PARIрование), о функциональном значении которого уже говорилось в разделе «Роль YB-1 в репарации ДНК».

## 2.2. Ядерно-цитоплазматический транспорт YB-1

YB-1 выполняет свои функции как в цитоплазме, так и в ядре клетки. Поэтому от того, какое количество YB-1 будет находиться в ядре или в цитоплазме зависит то, какие процессы он будет регулировать. Соответственно, регуляция ядерно-цитоплазматического распределения YB-1 является одним из важнейших способов контроля его активности.

Субклеточная локализация YB-1 определяется сигналом ядерной локализации (NLS, 186–205 а.о.) и сигналом цитоплазматического удержания (CRS, 267–293 а.о.) [56, 235] (Рис. 6). NLS YB-1 относится к неклассическим сигналам ядерной локализации PY-NLS, которые распознаются транспортинем 1 [236, 237]. Некоторые исследователи выделяют несколько других мотивов, таких как NLS-1 (149–156 а.о.), NLS-2 (185–194 а.о.) и NLS-3 (276–292 а.о.), которые также могут влиять на локализацию YB-1 [233].

Считается, что эффект сигнала цитоплазматического удержания преобладает над эффектом сигнала ядерной локализации, что и обуславливает цитоплазматическую, в целом, локализацию YB-1. Однако при определенных условиях YB-1 перемещается в ядро. Во-первых, переход YB-1 в ядро наблюдается при продвижении клетки по клеточному циклу на границе G1/S фаз [56]. Во-вторых, перемещение белка в ядро происходит после облучения клеток ультрафиолетом [185], при обработке ДНК-повреждающими химическими агентами [186, 238], при воздействии высоких температур [147] и при окислительном стрессе [184]. В-третьих, ядерная локализация YB-1 наблюдается после инфицирования клеток аденовирусами и вирусом гриппа [164, 239]. Также стоит отметить, что переход YB-1 в ядро можно стимулировать ростовыми факторами и цитокинами (эмбриональная телячья сыворотка, интерферон  $\gamma$ ) [240, 241].

Вероятно, при перечисленных воздействиях переход YB-1 в ядро возможен благодаря тому, что сигнал ядерной локализации становится доступен для транспортного фактора (транспортин 1) в результате модификации белка или изменения его взаимодействия с другими белками или нуклеиновыми кислотами.

Зачастую при многих указанных выше воздействиях перемещение в ядро YB-1 коррелирует с его фосфорилированием. Так, было отмечено, что фосфорилирование YB-1 по S102 наблюдается при его переходе в ядро в некоторых клеточных линиях [225, 242]. Кроме того, YB-1 с фосфомиметической заменой S102D локализуется в ядре [225]. В клетках HeLa при гипоксии наблюдается транслокация YB-1 в ядро, и при этом белок фосфорилирован по

серину 102 [243]. Было показано, что ингибиторы протеинкиназы С и киназы 1 рибосомного белка S6 (RSK1) препятствуют переходу YB-1 в ядро в условиях обработки клеток ультрафиолетом [185, 244]. Кроме того, При обработке клеток IL-1 $\beta$  для перехода YB-1 в клеточное ядро важно его фосфорилирование по серину 165 (предположительно казеинкиназой II) [231] и по серину 176 казеин-киназой I [232].

Однако, существует противоположное мнение – фосфорилирование YB-1 не является обязательным для его перехода в ядро. Так например, в клетках NIH3T3 фосфорилирование YB-1 по остатку Ser102 не вызывало его переход в ядро [72]. При обработке клеток ионизирующим излучением переход YB-1 зависит от степени фосфорилирования киназы RSK, но при этом само фосфорилирование YB-1 этой киназой происходит уже в ядре [245]. Более того, некоторые исследователи полагают, что для перехода YB-1 в ядро на стадии G2/M клеточного цикла необходимо, чтобы белок был дефосфорилирован по серинам 102, 165 и 176. Предполагается, что отсутствие посттрансляционных модификаций по этим аминокислотным остаткам увеличивает доступность NLS YB-1 для транспортных факторов [246].

Другой механизм регуляции ядерно-цитоплазматического транспорта YB-1 основан на наблюдении того, что YB-1 и его гомологи переходят в цитоплазму с вновь синтезированной мРНК. Таким образом, сама РНК при переходе из ядра переносит на себе YB-белки и удерживает их в цитоплазме. Такое перемещение, например, отмечено при инфицировании клеток вирусом гриппа, когда в течение вирусной инфекции наблюдалось изменение цитоплазматической локализации YB-1 на ядерную, связывание его в ядре с вирусной РНК, а затем детекция YB-1 в комплексе с РНК в цитоплазме [239]. Кроме того, давно известно, что в зрелых ооцитах *Xenopus laevis*, когда ядро транскрипционно малоактивно, а в цитоплазме много маскированной мРНК, подавляющее количество гомолога YB-1 FRGY2 находится в цитоплазме [247]. Эту гипотезу также подтверждают опыты по заменам тирозинового и фенилаланинового остатков в последовательности РНП-I-консенсуса YB-1 (Tyr72Ala/Phe74Ala), которые снижают связывание белка с мРНК в клеточных лизатах. При таких мутациях наблюдается переход белка в ядро [235, 248]. Замена фенилаланина 85, расположенного во втором РНП-консенсусе, на аланин также приводит к ядерной локализации белка [123]. Впрочем, неизвестно, как мутации в РНП-консенсусах влияют на структуру и стабильность CSD; следовательно, трудно сделать вывод, отвечает ли за удержание YB-1 в цитоплазме способность CSD связывать РНК или наблюдаемые эффекты связаны с разрушением структуры CSD и, как следствие, структурными перестройками в остальных доменах.

Существуют данные, что снижение количества мРНК (путем ингибирования РНК-полимеразы II) в цитоплазме способствует транслокации YB-1 в ядро [249-251]. При этом в

ядре его основным партнером также выступает РНК, вероятно пре-мРНК, а не ДНК [250]. Интересно, что при ингибировании транскрипции происходит фосфорилирование YB-1 по Ser102, и это фосфорилирование (возможно, не только по Ser102) необходимо для перехода YB-1 в ядро, поскольку его подавляют ингибиторы киназ кофеин и вортманнин [250].

Еще один механизм транспорта YB-1 в ядро основан на его взаимодействии с другими белками, которые переходят в ядро и, вероятно, таким образом перемещают туда и YB-1. Белком-партнером YB-1 в этом случае может выступать, например, фактор сплайсинга SRp30c [174]. На клетках линий HeLa и HEK293 показано, что при сверхэкспрессии SRp30c и YB-1 с плазмид наблюдается диффузное распределение обоих белков в ядре. Если клетки подвергнуть тепловому шоку, при котором SRp30c перемещается в стрессовые ядерные тельца Sam68, то нарушается связь между YB-1 с SRp30c, и YB-1 перемещается обратно в цитоплазму. Следовательно, SRp30c способствует переходу YB-1 в ядро и поддерживает его ядерную локализацию [174].

Оверхэкспрессия белка DACH1 (Dachshund Homolog 1, регулятор транскрипции) также вызывает накопление YB-1 в ядре. DACH1 взаимодействует с С-концевым доменом YB-1 и не только влияет на внутриклеточную локализацию белка, но и блокирует в ядре YB-1-опосредованную транскрипцию. Интересно, что фосфорилирование YB-1 по Ser102 не влияет на переход YB-1 в ядро, вызванный оверхэкспрессией DACH1 [252].

Другой пример основан на корреляции между ядерной локализацией YB-1 и количеством белка p53 в клетках [193, 253]. Было обнаружено, что переход YB-1 в клеточное ядро при обработке клеток ДНК-повреждающими агентами наблюдается только в клетках, экспрессирующих функционально-активный белок p53 [253]. Известно, что YB-1 и p53 взаимодействуют [191], однако для перехода YB-1 в ядро это взаимодействие не требуется [253]. Вероятно, p53 стимулирует транспорт YB-1 опосредованно. Интересно, что оверхэкспрессия гомолога p53 – белка  $\Delta Np63\alpha$  также приводит к ядерной локализации YB-1 [254].

Белки, взаимодействующие с сигналом ядерной локализации YB-1, потенциально могут влиять на его переход в ядро. Так, для белков DHX9, SAP115, hnRNPM и U5-200kDa была показана ко-локализация с YB-1 в нормальных условиях и при ингибировании транскрипции [249]. Другой белок, HSP60, взаимодействующий с NLS YB-1, способствует удержанию YB-1 в цитоплазме и, связываясь с YB-1, изменяет его ассоциацию с полисомами, что влияет на регуляцию трансляции [255]. Еще один белок, C1QBP (YBAP1), взаимодействующий с NLS-содержащей первой половиной С-концевого домена YB-1, также способствует удержанию YB-1 в цитоплазме. Было обнаружено, что C1QBP нарушает взаимодействие YB-1 с



транспортином 1 [248]. При этом C1QBP модулирует активность YB-1, по крайней мере, в регуляции стабильности мРНК.

Наконец, еще один способ регуляции ядерно-цитоплазматического распределения YB-1 основан на его процессинге. В результате обработки клеток ДНК-повреждающими агентами [208] или тромбином [256] 20S протеасома отщепляет С-концевую часть YB-1 (220–324 а.о.), тем самым запуская накопление укороченного белка в ядре [208]. Простейшее объяснение этого заключается в том, что вместе с С-концевой частью удаляется сигнал цитоплазматического удержания (Рис. 6), а сигнал ядерной локализации становится доступен для транспортного фактора. Как уже говорилось выше, N-концевой фрагмент YB-1 в ядре участвует в регуляции транскрипции и репарации ДНК. Любопытно, что, если экспрессировать в клетках С-концевой фрагмент, содержащий только CRS, он тем не менее локализуется в ядре [56, 61, 233], вероятно из-за наличия NLS-3 (276–292 а.о.) [233].

О ядерном экспорте YB-1 почти ничего не известно. Несмотря на предсказанный классический сигнал ядерного экспорта (NES), ядерный экспорт YB-1 является экспортин-1-независимым [233, 235]. Возможно, YB-1 связывает мРНК сразу после транскрипции или котранскрипционно, и его транслокация в цитоплазму происходит вместе с мРНК и опосредуется белками экспорта РНК. Эта гипотеза косвенно подтверждается двумя фактами: быстрым экспортом YB-1 после прекращения блокады транскрипции [250] и ассоциацией YB-1 с хроматином [82, 83], предполагающими котранскрипционное связывание YB-1 с формирующейся РНК.

### **2.3. Влияние некодирующих РНК на активность YB-1**

С открытием таких некодирующих РНК, как микроРНК (miRNA), длинных некодирующих РНК (lncRNA), циркулярных некодирующих РНК (circRNA) возрос поток публикаций, в которых тот или иной эффект YB-1 на экспрессию генов связывают с его взаимодействием с некодирующими РНК. Здесь нужно отметить следующее. Работы, связанные со взаимодействием YB-1 с lncRNA, не всегда заслуживают полного доверия. Некоторые авторы, исследуя какую-либо значимую с медицинской точки зрения некодирующую РНК, опираются лишь на факт взаимодействия YB-1 и lncRNA *in vitro* и на факт компенсации экспрессии некоторых генов при нокауте или нокадауне lncRNA повышенной экспрессией YB-1 (или наоборот), не приводя хоть сколько-нибудь весомых доказательств предлагаемых механизмов действия комплексов YB-1 и lncRNA. Тем не менее, не упомянуть об этой бурно развивающейся тематике исследований и не описать наиболее интересные факты было бы серьезным упущением.

### ***Влияние некодирующих РНК на транскрипционную активность YB-1***

Влияние длинных некодирующих РНК на транскрипционную функцию YB-1 в большинстве описанных случаев заключается в том, что lncRNA привлекает YB-1 к промотору того или иного гена. Например, lncRNA lincNMR опосредует взаимодействие YB-1 с промоторами генов *RRM2*, *TK1* и *TYMS* (кодируют ферменты метаболизма нуклеотидов) и активацию их экспрессии [257]. LncRNA DSCAM-AS1 способствует связыванию YB-1 с промоторами генов *FOXA1* и *ERα*, стимулируя тем самым их экспрессию [258]. Схожие результаты были получены в случае lncRNA BDLNR и AWPPH в отношении гена *PIK3CA* [259, 260], lncRNA BX111 в случае гена *ZEB1* в условиях гипоксии [261], lncRNA HUMT в случае гена *FOXK1* [262] и lncRNA HOXC-AS3 в случае гена *TK1* и многих других генов [263, 264]. Привлекаемый к промоторам длинными некодирующими РНК YB-1 может не только активировать, но и подавлять экспрессию генов, как например в случае гена цитокина *CCL5*. lncRNA TMEM92-AS1 рекрутирует YB-1 к промотору этого гена, что приводит к снижению количества соответствующих мРНК и белка [265]. В клеточном ядре lncRNA circFAT1(e2) может напрямую взаимодействовать с YB-1 и, вероятно, ингибировать его функции, связанные с пролиферацией и миграционной активностью клеток рака желудка [266].

Иногда lncRNA привлекает YB-1 в комплексе с другими белками. Например, lncRNA SCAT7 рекрутирует hnRNPК и YB-1 в области промоторов генов *FGFR2* и *FGFR3* (рецепторы фактора роста фибробластов) и активирует транскрипцию [267]. Образованию этого же комплекса YB-1 и hnRNPК в клетках аденокарциномы протоков поджелудочной железы способствует lncRNA circFOXK2. В этом случае наблюдалась стимуляция экспрессии генов *NUF2* и *PDXK* [268]. Комплекс YB-1 с другим белком гетерогенных ядерных РНП hnRNPД образуется с помощью lncRNA TCLlnc1 и активирует транскрипцию генов *TGFB2* и *TGFBRI* [269].

Впрочем, имеются примеры того, что lncRNA не привлекает, а, наоборот, препятствует связыванию YB-1 с промотором того или иного гена. Так, показано, что YB-1 регулирует экспрессию гена *COL1a1* в фибробластах сердца, действуя как супрессор его транскрипции. Однако в условиях гипоксии с YB-1 взаимодействует lncRNA H19, что препятствует привлечению YB-1 к промотору гена *COL1a1*. Это приводит к стимуляции синтеза коллагена 1a1 и развитию фиброза [270].

Другой механизм регуляции функций YB-1 длинными некодирующими РНК основан на их способности влиять на ядерно-цитоплазматическое распределение YB-1. Например, при повреждении ДНК p53 индуцирует синтез lncRNA TP53TG1, которая связывается с YB-1 и предотвращает его ядерную локализацию. Как следствие, подавляется YB-1-зависимая активация транскрипции гена *PI3K*, что необходимо для остановки клеточного роста и

пролиферации [271]. Предотвращает переход YB-1 в ядро и lncRNA MajSAT. Взаимодействуя с YB-1, она ингибирует его транслокацию в ядро при окислительном стрессе и снижает его вовлечение в процесс репарации ДНК [272]. Другая lncRNA HCP5, напротив, способствует переходу YB-1 в ядро, поскольку стабилизирует взаимодействие между YB-1 и белком PLF2 [273], который участвует в переносе YB-1 в ядро [274]. Снижение экспрессии HCP5 препятствует переходу YB-1 в ядро и его взаимодействию с промотором гена *MSH5*. Как следствие, подавляется экспрессия этого гена, играющего важную роль в репарации ошибочно спаренных нуклеотидов [273]. Было также показано, что для репарации ДНК при генотоксическом стрессе в клетках эндотелия важно взаимодействие lncRNA Aerrie с YB-1. Однако не известно, необходимо ли это взаимодействие для перехода YB-1 в ядро или его роль сводится к узнаванию мест повреждения ДНК [275].

### ***Влияние некодирующих РНК на функции YB-1 в регуляции трансляции и стабильности мРНК***

Имеется немало примеров того, что lncRNA участвуют в контроле трансляционной функции YB-1. Например, lnc-31, взаимодействуя с YB-1 и стабилизируя его, привлекается к мРНК *ROCK1*, и активирует её трансляцию, что необходимо для поддержания пролиферации миобластов и репрессии их дифференцировки [276]. lncRNA AWPPH в случае, если она находится в цитоплазме, взаимодействует с YB-1 и способствует YB-1-зависимой активации трансляции мРНК *Snail1* [260]. А вот lncRNA HITT, наоборот, связываясь с YB-1, препятствует его взаимодействию с 5'-НТО мРНК *HIF-1 $\alpha$* , поскольку HITT содержит YB-1-связывающую последовательность и конкурирует за YB-1 с 5'-НТО мРНК *HIF-1 $\alpha$*  [277]. Это приводит к снижению трансляции мРНК *HIF-1 $\alpha$* . Интересно, что в условиях гипоксии *HIF-1 $\alpha$*  индуцирует экспрессию микрорегуляторной РНК miR-205, которая связывается с HITT, что приводит к деградации последней и, как следствие, к активации трансляции мРНК *HIF-1 $\alpha$* . Другая lncRNA SNHG6, взаимодействуя с YB-1, способствует стимуляции трансляции *HIF1 $\alpha$*  [278].

Влияние lncRNA на YB-1-зависимую трансляцию может основываться на фосфорилировании YB-1. Так, lncRNA HULC связывается с YB-1 и способствует фосфорилированию белка YB-1 по S102. Это приводит к тому, что снижается взаимодействие YB-1 с целой группой мРНК (мРНК циклина D1, циклина E1 и MMP11) и, следовательно, возрастает их трансляция [279]. Впрочем, не вполне ясно, за счет чего происходит активация: либо за счет обычной конкуренции HULC с мРНК за YB-1, а фосфорилирование YB-1 – это следствие его диссоциации от мРНК, либо HULC привлекает киназу ERK к YB-1, и после фосфорилирования YB-1 перестает взаимодействовать с мРНК. Другой пример, связанный с фосфорилированием YB-1 – это lncRNA MIR31HG. Уровень этой РНК повышен при старении

клеток (senescence), вызванном экспрессией некоторых онкогенов, в частности BRAF. Взаимодействуя с YB-1, эта РНК облегчает его фосфорилирование по Ser102 киназой RSK. При этом фосфорилированный YB-1 индуцирует трансляцию мРНК *IL1A*, а синтезируемый интерлейкин 1A активирует транскрипцию мРНК факторов, которые выделяются стареющими клетками. Таким образом клетки проявляют секреторный фенотип, связанный со старением (SASP) [280].

В регуляции активности YB-1 могут иметь важное значение и микрорегуляторные РНК (миРНК), однако примеров такой регуляции еще мало. Например, в хондроцитах при аутосомно-доминантной костной дисплазии синтезируется мутантная miR-140-5p. Эта миРНК конкурирует с YB-1 за YB-1-специфические сайты связывания в 3'НТО большого набора мРНК, что изменяет их стабильность и транслируемость [281].

Примеров участия некодирующих РНК, особенно lncRNA, в функционировании YB-1 в последнее время появляется всё больше и больше, и перечислить их все довольно трудно. Однако некоторые из особо интересных примеров еще будут обсуждаться в разделах «ПРОЯВЛЕНИЕ СВОЙСТВ И ФУНКЦИЙ YB-1 НА КЛЕТОЧНОМ УРОВНЕ И УРОВНЕ ЦЕЛОГО ОРГАНИЗМА» и «РЕГУЛЯЦИЯ КОЛИЧЕСТВА YB-1».

### **3. ПРОЯВЛЕНИЕ СВОЙСТВ И ФУНКЦИЙ YB-1 НА КЛЕТОЧНОМ УРОВНЕ И УРОВНЕ ЦЕЛОГО ОРГАНИЗМА**

Очевидно, что YB-1 обладает обширным набором возможностей влиять на экспрессию генетической информации и её сохранение. Закономерен вопрос, каким образом на клеточном и организменном уровне проявляются многочисленные активности YB-1.

#### **3.1. Роль YB-1 в эмбриональном развитии**

Одним из способов показать, насколько тот или иной белок важен для клетки или организма в целом, является выключение (нокаут) соответствующего гена. Эта же методика применялась и к гену *YB-1*. Двумя группами исследователей были получены впечатляющие данные о том, что нокаут *YB-1* у мыши имеет серьезные последствия [96, 282]. Во-первых, в раннем эмбриональном развитии наблюдаются нарушения в формировании нервной трубки. Во-вторых, эмбрионы отличаются замедленным ростом (гипоплазия) и в большинстве случаев погибают до рождения. Интересно, что нокаут YB-1 в эмбриональных фибробластах не привел к глобальным изменениям ни в транскриптоме, ни в протеоме. Однако, без YB-1 клетки оказались более чувствительны к стрессовым воздействиям (гипоксия, обработка цисплатином). Необходимо отметить, что механизмы участия YB-1 в эмбриогенезе до сих пор полностью не раскрыты. Из имеющихся публикаций можно отметить работы, проведенные на

*Danio rerio*, в которых было показана важная роль zYB-1 в стабилизации мРНК при материнско-зиготическом переходе, что необходимо для смены генетических программ в раннем эмбриональном развитии. Но и здесь необходимо сделать оговорку: у *Danio rerio* всего один представитель семейства YB-белков, и, строго говоря, zYB-1 является эволюционным предшественником как YB-1, так и YB-3 и YB-2. Можно предположить, что zYB-1 выполняет функции всех YB-белков более эволюционно продвинутых организмов, в которых значительная часть функций в раннем эмбриогенезе и гаметогенезе реализуется уже белками YB-2 и YB-3 (см. немного подробнее в разделе «ФУНКЦИИ ДРУГИХ Y-БОКС-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ»). Кроме того, опубликованы данные, согласно которым YB-1 участвует в регуляции стабильности мРНК одного из факторов плюрипотентности POU5F3 в эмбриональном развитии *Xenopus laevis* [283]. Согласно модели, предложенной Паршиной и соавт., на ранних стадиях развития *Xenopus laevis* YB-1 связывается с мРНК *pou5f3* и стабилизирует её. После активации транскрипции собственного генома зародыша увеличивается количество белка фокальной адгезии Zyxin, который связывается с YB-1 и предотвращает его взаимодействие с мРНК *pou5f3*. В свою очередь, это приводит к деградации мРНК *pou5f3*, что является необходимым условием для дальнейшей дифференцировки клеток и успешного развития зародыша.

### 3.2. Влияние YB-1 на пролиферацию клеток

О связи пролиферативной активности клеток и YB-1 говорят многие факты. Во-первых, было замечено, что повышенный уровень YB-1 коррелирует с экспрессией маркеров пролиферации [284](7) и может вызывать гиперплазию [285]. Кроме того, выключение экспрессии *YB-1* с помощью siRNA или с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9 приводит к увеличению времени удвоения клеток [123, 286]. При этом в популяции возрастает доля клеток, находящихся в G1 фазе клеточного цикла [286]. Механизмы описанных явлений досконально не изучены и сводятся к корреляции количества YB-1 и некоторых связанных с делением событий. При подавлении синтеза YB-1 наблюдается снижение количества циклина D1 и повышение количества ингибиторов клеточного цикла p21 и p16 [96, 286]. Переход YB-1 в ядро клетки на границе G1/S фаз сопровождается активацией транскрипции циклинов A и B1 [56], а также других факторов, контролирующих митоз, например CDC6 [286]. Кроме того, YB-1 специфически связывается с промоторами других генов регуляторов клеточного цикла – факторов транскрипции семейства E2F, фосфатазы CDC25A, PI3KCA, генов MEK/ERK сигнального пути и т.п., и, как считается, контролирует их экспрессию на уровне транскрипции [83, 240, 287].

Чуть более детализован трансляционный механизм влияния YB-1 на пролиферацию. Было показано, что YB-1 селективно связывает и, видимо, подавляет трансляцию матриц,

многие из которых кодируют белки, так или иначе вовлеченные в клеточное деление и рост клеток: циклины, факторы роста, факторы трансляции и т.п. [72]. При фосфорилировании YB-1 за счет стимуляции PI3K/Akt-киназного сигнального пути, его способность ингибировать трансляцию таких мРНК снижается, что стимулирует клеточный рост и пролиферацию. Интересно, что дополнительный синтез YB-1 с плазмиды, предотвращает трансформацию клеток с гиперактивированным PI3K/Akt-сигнальным путем [235]. Предполагается, что это происходит благодаря более выраженной способности вновь синтезированного нефосфорилированного YB-1 ингибировать трансляцию путем вытеснения eIF4F с кэп-прилегающей области мРНК. Однако, такое предотвращение трансформации клеток и ингибирование пролиферации может иметь и обратную сторону. Клетки, переставая делиться, приобретают способность дедифференцироваться, приобретать свойства стволовых клеток, что может иметь негативные последствия.

Как следует из представленных примеров, повышенное содержание YB-1 может как подавлять пролиферацию, так и быть маркером высокого пролиферативного потенциала. Возможно, что то, как повлияет YB-1 на пролиферацию, зависит от типа клеток, от того, какие сигнальные каскады в них активированы, от того, на каком уровне (транскрипции или трансляции) YB-1 регулирует экспрессию генов-участников пролиферации, от модификаций самого YB-1.

Следует также отметить, что для пролиферативных процессов необходима энергия, и в этой связи способность YB-1 связывать и регулировать трансляцию мРНК, кодирующих белки, вовлеченные в окислительное фосфорилирование (OXPHOS mRNA), также может иметь большое значение [105].

### **3.3. Роль YB-1 в клеточном старении**

Участие YB-1 в репликативном старении впервые было показано в экспериментах на эмбриональных фибробластах из нокаутных по гену YB-1 мышей. Клетки без YB-1 помимо сниженной пролиферации демонстрировали при окислительном стрессе повышение уровня ассоциированной со старением бета-галактозидазы (SA- $\beta$ -Gal), а также маркеров клеточного старения p21 и p16 [96]. Позднее в экспериментах на кератиноцитах было показано, что нокаунт YB-1 приводит к увеличению трансляции мРНК *CXCL1* и *IL-8* и секреции соответствующих цитокинов, что характерно для секреторного фенотипа, ассоциированного со старением (Senescence-associated secretory phenotype, SASP) [108]. Кроме того, наблюдалось также увеличение числа гетерохроматиновых локусов, связанных со старением (senescence-associated heterochromatin foci, SAHF).

Клеточное старение может быть связано и с транскрипционной функцией YB-1. Было показано, что уменьшение его количества в нервных стволовых клетках гиппокампа мыши, вызванное снижением с возрастом количества lncRNA *Hnscr*, приводит к проявлению фенотипа стареющих клеток [288]. Механизм регуляции количества YB-1 с помощью lncRNA *Hnscr* заключается в том, что она, связываясь с YB-1, предотвращает его убиквитинилирование и деградацию [288]. Оверэкспрессия YB-1 с плазмиды в таких клетках предотвращает проявление этого фенотипа. Авторы исследования связывают данный эффект с тем, что YB-1 регулирует транскрипцию целого набора генов, вовлеченных в клеточное старение, апоптоз, метаболизм глюкозы. В частности, показано, что YB-1 необходим для транскрипционной репрессии одного из маркеров стареющих клеток – ингибитора клеточного цикла p16(INK4A) [288]. Этот же механизм, связанный с транскрипционным подавлением экспрессии p16, был предложен для YB-1 и при старении миофибробластов [289].

YB-1 может принимать участие еще в одном механизме регуляции экспрессии генов при клеточном старении. В стареющих клетках понижен уровень киназ SK2 $\alpha$  (казеинкиназа 2 $\alpha$ ) и GRK2 (киназа 2 рецепторов, связанных с G-белками; G protein-coupled receptor kinase 2), в том числе связанных с моносомами. Это приводит к понижению фосфорилирования рибосомного белка rpLP2 и его высвобождению из существенной доли рибосом. Оказалось, что рибосомы, не содержащие rpLP2 (более точно, комплекс rpLP1/rpLP2), предпочитают мРНК с более низким уровнем YB-1 [290]. Не вполне ясно, какие конкретно РНК содержатся в этих мРНК и действительно ли такая гетерогенность рибосом имеет функциональное значение при клеточном старении.

### 3.4. Влияние YB-1 на апоптоз

Кроме регуляции пролиферации, YB-1 может защищать некоторые линии раковых клеток от апоптоза [291, 292]. Возможны несколько механизмов такой защиты.

Первый заключается в том, что YB-1 может модулировать активность регулятора апоптоза p53 за счет прямого взаимодействия с этим белком. В свою очередь, p53 в зависимости от условий может активировать две группы генов: гены, отвечающие за остановку клеточного цикла, и проапоптотические гены. YB-1 препятствует p53-зависимой активации транскрипции проапоптотических генов (APAF1, NOXA, BAX) и, в меньшей степени, активации генов ингибиторов клеточного цикла [293]. Важно, что YB-1 может влиять на транскрипцию самого гена *TP53* [188] или стабильность p53 [179] и тем самым модулировать его проапоптотический эффект.

Другой механизм ингибирования апоптоза белком YB-1 заключается в репрессии транскрипции гена Fas-рецептора, с которого начинается проапоптотический сигнальный путь

[152], и гена *CASP7*, кодирующего одну из активируемых при апоптозе каспаз [83]. Кроме того, было замечено, что при подавлении экспрессии YB-1 в линии клеток рака молочной железы, гиперэкспрессирующих рецептор HER-2, инактивируется сигнальный путь PTEN/mTOR/STAT3, который обычно препятствует апоптозу [291].

Третий механизм может быть связан с тем, что в клетках миелоидного лейкоза YB-1 может вместе с другим РНК-связывающим белком, IGF2BP, стабилизировать мРНК *Myc* и *BCL2*, кодирующие анти-апоптотические факторы, и способствовать выживанию раковых клеток [294]. Интересно, что связывание YB-1 и IGF2BP с этими мРНК зависит от 6А-метилирования мРНК.

По всей вероятности, ингибирование апоптоза белком YB-1 не является универсальным и критическим механизмом, а проявляется, скорее всего, лишь в некоторых клеточных линиях, так как в большинстве случаев при снижении количества YB-1 происходит просто снижение уровня пролиферации клеток, а не их апоптотическая гибель в условиях стресса. Помимо прочего, раковые клетки могут "отключать" апоптотическую программу многими другими способами, не задействуя YB-1.

### **3.5. Участие YB-1 в адаптации клеток к стрессовым условиям**

Существуют два принципиально разных способа участия YB-1 в реакции клетки на стрессовые условия: в ядре и в цитоплазме. Реализация этих способов зависит, вероятно, от вида стрессового воздействия на клетку.

В обычных условиях YB-1 – цитоплазматический белок, но при воздействии на клетки различных ДНК-повреждающих ксенобиотиков и ультрафиолетового излучения часто наблюдается переход YB-1 в ядро (см. пункт «Ядерно-цитоплазматический транспорт YB-1» в разделе «РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИЙ YB-1»). Множество данных указывает на то, что YB-1 снижает чувствительность клеток к подобного рода агентам. Считается, что ядерный YB-1, выступая как транскрипционный фактор либо моделируя активность других транскрипционных факторов, способствует экспрессии генов, снижающих негативное действие стресса. Например, он может повышать уровень экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) или генов, участвующих в репарации ДНК. Однако в большинстве работ речь идет о корреляции между уровнем экспрессии генов МЛУ и ядерной локализацией YB-1. Такая корреляция может быть весьма полезна в клинической онкологии для определения агрессивности опухолей и разработке схем лечения, но природа этой корреляции до сих пор остается невыясненной.

Альтернативой транскрипционной функции YB-1 в ответе клеток на стресс может быть его непосредственное участие в репарационных процессах. Как уже отмечалось, это возможно



благодаря способности YB-1 взаимодействовать с поврежденными участками ДНК и множеством репарационных факторов (см пункт «Участие YB-1 в репарации ДНК» в разделе «СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ YB-1»). На данный момент это одно из перспективных направлений в исследовании функций YB-1.

Роль цитоплазматического YB-1 в клеточном ответе на стресс основана на его РНК-зависимых функциях. Такие воздействия, как обработка клеток арсенитом, тепловой шок, гипоксия и др., вызывают остановку трансляции большинства клеточных мРНК. Остановка трансляции происходит из-за стресс-индуцированного фосфорилирования  $\alpha$ -субъединицы фактора инициации eIF2, а мРНК, вышедшая из трансляции, накапливается в крупных немембранных цитоплазматических частицах, называемых стресс-гранулами (SG). Стресс-гранулы состоят из коровых белков, создающих ядро гранул, и динамической внешней оболочки [295]. Считается, что как специфические РНК-белковые, так и межбелковые взаимодействия, а также неспецифические взаимодействия между структурно-неупорядоченными областями (IDR) белков вовлечены в разделение фаз жидкость-жидкость, которое вызывает спонтанную сборку ядра SG [295, 296]. Кроме того, считается, что РНК-РНК взаимодействия играют важную роль в сборке стресс-гранул [297]. В состав стресс-гранул входит множество РНК-связывающих белков (факторы инициации трансляции, G3BP, PABP, TIAR и др.) и 40S рибосомальная субъединица. Принимая во внимание, что YB-1 – это РНК-связывающий белок, который может олигомеризоваться и взаимодействовать с множеством белковых партнеров, а более половины его молекулы не имеет упорядоченной структуры, неудивительно, что этот белок может влиять на сборку SG и является маркером SG. [89].

Следует отметить, что YB-1 детектируется также и в составе других РНК-гранул, так называемых, телец процессинга (processing bodies, P-bodies), являющихся местом деградации РНК [89]. И если стресс-гранулы образуются только при стрессе, то тельца процессинга существуют и при обычных условиях культивирования клеток. Было предположено, что в составе стресс-гранул YB-1 вместе с другими белками упаковывает мРНК и предохраняет их от деградации до наступления благоприятных условий. Роль же YB-1 в тельцах процессинга остается не вполне ясной. Возможно, он просто связан с поступающей на деградацию мРНК, либо связывается с участниками деградации мРНК.

О роли YB-1 в формировании SG накопилось немало данных, но иногда они противоречивы, что может быть связано с разными механизмами образования SG и разными клеточными линиями, использованными в экспериментах. Так, продемонстрировано, что нокаут или нокадаун YB-1 приводит к снижению количества SG-положительных клеток [123, 126], но при этом нокадаун YB-1 не предотвращает p-eIF2 $\alpha$ -зависимое образование SG при стрессе несвернутого белка (UPR, unfolded protein response) и при окислительном стрессе [123,

126, 298]. Кроме того сообщалось, что при нокдауне YB-1 отмечается не изменение количества SG-положительных клеток, а увеличение количества SG и уменьшение размера SG [298]. Уменьшение размера SG можно объяснить тубулин-связывающей способностью YB-1 [299]. Как было показано, интактные микротрубочки имеют решающее значение для быстрой агрегации малых SG в более крупные [300]. Соответственно, в отсутствие YB-1 SG не привлекаются к микротрубочкам, что препятствует их агрегации в более крупные образования.

С другой стороны, неканоническая (то есть р-eIF2 $\alpha$ -независимая) сборка SG, индуцированная tiRNA (фрагмент тРНК, образующийся при расщеплении ангиогенином при стрессе [301]), как сообщается, находится под сильным влиянием YB-1 [123]. tiRNA – это 5' концевой продукт расщепления tRNA по антикодоновой петле стресс-активируемой рибонуклеазой, ангиогенином. Следствием расщепления становится ингибирование трансляции и образование стресс-гранул, причем независимо от фосфорилирования eIF2 $\alpha$  [301, 302]. Эксперименты показали, что таким эффектом обладают только Ala- и Cys-tRNA, имеющие на 5' конце олигогуаниновые последовательности (terminal oligoguanine motif TOG). YB-1 был обнаружен среди белков, специфически взаимодействующих с tiRNA, и оказался единственным, необходимым для tiRNA-индуцированного ингибирования трансляции и образования стресс-гранул. Предполагалось, что после взаимодействия с ti-RNA YB-1 может ингибировать трансляцию, вытесняя eIF4F из комплекса с мРНК [303], однако позже авторы исследования пришли к выводу о том, что YB-1 необходим только для упаковки мРНК в стресс-гранулы, но не критичен для подавления трансляции при tiRNA-индуцируемом стрессе [123].

Согласно работе [126], оверэкспрессия YB-1 сама по себе не вызывает сборки SG; следовательно, YB-1 вряд ли действует как зародышеобразователь или находится в ядре SG. Более того, избыточная экспрессия YB-1, наоборот, предотвращает сборку SG [126, 298]. Кроме того, YB-1 может разбирать большие агрегаты мРНК, образованных коровыми белками стресс-гранул FUS и TDP-43 [304]. Предполагается, что повышенная концентрация YB-1 способствует плавлению вторичной структуры мРНК, что препятствует связыванию FUS и TDP-43, имеющих повышенное сродство к двухцепочечной РНК. Кроме того, снижение доли вторичной структуры в РНК и образование комплексов РНК-YB-1 препятствует РНК-РНК взаимодействиям, важным для образования стресс-гранул. Интересно, что YB-1 с аминокислотными заменами, уменьшающими РНК-плавающую активность белка, был не эффективен в растворении стресс-гранул в клетках, подвергшихся окислительному стрессу [305].

Возможно, YB-1 защищает от вовлечения в стресс-гранулы некоторые мРНК, необходимые для преодоления стресса, не только при увеличении его количества, но и при его

нормальном содержании в клетке. Например, YB-1 предотвращает рекрутирование мРНК Hsp70 в SG после обработки арсенитом, тогда как снижение уровня YB-1 вызывает локализацию мРНК Hsp70 в SG и ингибирование трансляции [298].

Таким образом, роль YB-1 в SG может быть самой разной в зависимости от количества этого белка, наличия белков партнеров и от типа стрессовых условий. Возможно также, что YB-1 может служить фактором сортировки мРНК в зависимости от конкретного комплекса мРНК.

Наконец, стоит упомянуть еще об одном механизме участия YB-1 в реакции клетки на стресс, предложенном относительно недавно [306]. Предполагается, что YB-1, взаимодействуя с микроРНК, с белком Ago2 (компонентом системы микроРНК-зависимой деградации мРНК), с некоторыми белками стресс гранул и транскрипционными факторами семейства Smad, образует комплекс SIRC (stress-induced response complex), который участвует в регуляции транскрипции, в том числе транскрипции генов, необходимых для адаптации клеток к стрессу.

### 3.6. Участие YB-1 в (де)дифференцировке клеток

Дифференцировка клеток тесно связана с пролиферацией. Как правило, активно пролиферирующие клетки не дифференцированы, а дифференцированные клетки практически не делятся. В этой связи важно отметить, что количество YB-1 при дифференцировке клеток значительно снижается. Так, количество YB-1 уменьшается при дифференцировке клеток-предшественников в мышечные клетки [307], клетки глии [308], кератиноциты [309], эритропоэтические клетки [310] и др. Уменьшение количества YB-1 в этих случаях связано с регуляцией транскрипции гена *YBX1* (см. раздел «Регуляция количества YB-1 в клетке»). Несколько особняком стоит случай с клетками-предшественниками нейронов (NPC). Оказалось, что YB-1 подавляет деление этих клеток и необходим именно для дифференцировки NPC в нейроны. Примечательно, что для этого YB-1 действует как котранскрипционный фактор, способствующий деметилированию гистона H3 (по K27) за счет ингибирования метилтрансферазной активности комплекса PRC2 (Polycomb repressive complex 2). Это приводит к ремоделингу хроматина и к усилению экспрессии генов, участвующих в развитии, пролиферации клеток и дифференцировке нейронов переднего мозга [311].

YB-1 необходим для поддержания пролиферации стволовых клеток и, что особенно интересно, снижение его количества может приводить к их спонтанной дифференцировке [308]. Повышение количества YB-1, наоборот, приводит к частичной дедифференцировке клеток и приобретению ими некоторых особенностей стволовых клеток. Наиболее показателен следующий пример. Повышение концентрации YB-1 при определенных условиях (активации N-Ras) в клетках рака молочной железы не только ингибирует трансляцию про-пролиферативных мРНК, но и активирует трансляцию группы мРНК, обеспечивающих

эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) [118]. ЭМП заключается в смене клетками фенотипа, характерного для эпителиальных клеток, на мезенхимальный. Они приобретают фибробластоподобную морфологию, утрачивают межклеточные контакты, повышают подвижность и способность мигрировать. Таким образом, YB-1, индуцируя ЭМП, может стимулировать приобретение опухолевыми клетками инвазивного фенотипа и провоцировать метастазирование.

С другой стороны, ЭМП также является одним из ключевых этапов в процессах, происходящих в раннем эмбриональном развитии [312], в том числе в формировании нервной трубки. Вероятно, нарушение этого процесса при нокауте гена *YBX1* также связано со способностью этого белка индуцировать ЭМП. Косвенно об этом говорит и то, что другой важный участник ЭМП, белок *TWIST1*, является транскрипционным регулятором экспрессии гена *YBX1* [313], и нокаут гена *TWIST1* также приводит к проблемам в формировании нервной трубки [314].

В связи с этим интересно также, что согласно данным ChIP-Seq [315] с промоторной областью *YBX1* взаимодействуют факторы «стволовости» или факторы Яманаки [316] (*KLF4*, *SOX2*, *OCT4*, *c-MYC*), а также белки *NANOG* и *TWIST1*. Все эти транскрипционные факторы регулируют транскрипционную программу стволовых клеток, и, вероятно, могут регулировать и транскрипцию мРНК *YB-1*. Интересно, что сам YB-1 играет не последнюю роль в регуляции количества факторов «стволовости». Так например, YB-1 стимулирует транскрипцию мРНК *KLF4* [317] и ингибирует транскрипцию мРНК *SOX2* [318]. Кроме того, YB-1 стимулирует трансляцию мРНК белков семейства *MYC* [116, 319, 320], связывается и, вероятно, стабилизирует мРНК *NANOG* [321]. В эмбриональных стволовых клетках мыши при нокауте YB-1 наблюдается снижение количества мРНК *NANOG*, а также мРНК *SOX2* и *POU5F1* (кодирует белок *Oct4*) [321].

Таким образом, YB-1 не только активно транскрибируется в стволовых клетках, но и поддерживает сохранение их идентичности, регулируя экспрессию соответствующих транскрипционных факторов.

### **3.7. YB-1 и воспалительные процессы**

Роль YB-1 в воспалительных процессах заключается в регуляции экспрессии довольно большого количества провоспалительных (в основном) цитокинов [322].

На модели острого воспаления у беременных мышей было показано, что бактериальные липополисахариды (ЛПС) вызывают повышение уровня YB-1 в мозге эмбрионов, а также повышенную экспрессию провоспалительных генов: моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (*MCP-1*), *IL-6* и *IL-1 $\beta$* , *VEGF* [323], некоторые из которых регулируются белком YB-1 (*IL-6* и

VEGF), а некоторые, наоборот, являются индукторами синтеза  $\text{YB-1}$  и стимуляторами его перехода в ядро при воспалении ( $\text{IL-1}\beta$ ) [324].

Известно также, что  $\text{YB-1}$  при мезангиопролиферативном гломерулонефрите является специфической и необходимой мишенью и, возможно, регулятором ключевого медиатора этого заболевания – тромбоцитарного фактора роста PDGF-B [325].

Исследование воспалительных процессов на мышинных моделях острого перитонита и воспалении почек показало, что после индукции воспаления (перитонеальная инъекция ЛПС) увеличивается экспрессия  $\text{YB-1}$  в клетках коры почек, он детектируется в моче и секретируется в брюшную полость у мышей. Повышенный уровень  $\text{YB-1}$  коррелировал с высоким уровнем провоспалительных цитокинов  $\text{CCL2}$  и  $\text{CCL5}$  и др. [222, 326]. Интересно, что у мышей, гетерозиготных по гену  $\text{YB-1}$  ( $\text{YB-1}(+/d)$ ) (и следовательно, со сниженным примерно в два раза количеством  $\text{YB-1}$  в клетках), развивалась менее выраженная воспалительная реакция на ЛПС – пониженное количество мРНК цитокинов  $\text{CCL2}$  и  $\text{CCL5}$ , сниженная миграционная способность иммунных клеток и уменьшение их количества в почках. При этом и смертность от ЛПС-индуцированного воспаления у мышей ( $\text{YB-1}(+/d)$ ) была заметно снижена (на 3 день после инъекции ЛПС - 20%, по сравнению с 80% в контрольной линии) [326]. Механизм повышения количества, по крайней мере, мРНК  $\text{CCL5}$  вероятно основан на регуляции транскрипции гена  $\text{CCL5}$  белком  $\text{YB-1}$ , который связывается в промоторной области этого гена вблизи старта транскрипции. Оверэкспрессия  $\text{YB-1}$  значительно увеличивает активность промотора гена  $\text{CCL5}$  в моноцитах. Предполагается, что  $\text{YB-1}$ , как регулятор экспрессии  $\text{CCL5}$ , может играть важную роль отторжения аллотрансплантата при пересадке почки [226].

Наконец, как уже говорилось выше, в ответ на ЛПС  $\text{YB-1}$  может секретироваться мезангиальными клетками, а также культивируемыми моноцитами, во внеклеточную среду и проявлять хемотаксическую и митогенную активность, что делает его похожим на цитокины. Примечательно, что и его секреция происходит по неклассическому пути, характерному для цитокинов, таких как интерлейкин- $1\beta$  [213].

Другие факты об участии  $\text{YB-1}$  в воспалительных процессах можно почерпнуть в недавнем обзоре Моисеевой и Рыбалкиной [327]

### **3.8. Роль $\text{YB-1}$ в онкогенезе**

С тех пор как в конце XX века были получены первые данные о количестве и локализации  $\text{YB-1}$  в клетках опухолей молочной железы и о связи этих показателей с прогнозом на выживание [145], количество публикаций о роли  $\text{YB-1}$  в онкогенезе постоянно растет. Подавляющее количество статей, выходящих в свет в последнее время, так или иначе связано с этой проблематикой.

Первоначальные исследования показали, что количество мРНК и белка YB-1 часто бывает повышено в опухолях различного происхождения, в том числе и злокачественных [328-337]. Зачастую появление YB-1 в ядрах клеток или его повышенное содержание в тканях, прилежащих к опухоли, являются признаками более агрессивных опухолей [328, 329, 333, 335, 337, 338]. В связи с этим предлагается рассматривать YB-1 как диагностический маркер в отношении агрессивности течения заболевания и устойчивости опухолей к химиотерапии при раке молочной железы [145, 329, 339, 340], немелкоклеточном раке легких [341], мезотелиоме [341], раке простаты [342] и др.

Раковые клетки, как известно, обладают рядом отличительных признаков [343]. К ним относятся: неконтролируемый и высокий уровень пролиферации клеток; потеря чувствительности к сигналам, сдерживающим процесс пролиферации; замедление процессов программируемой клеточной гибели; неограниченный репликативный потенциал; активация неоангиогенеза (формирование новых капилляров); инвазия и метастазирование; аэробный гликолиз и адаптация стромы опухоли к потребностям роста; выход из-под иммунного надзора; геномная нестабильность; индукция воспаления.

И, как может догадаться читатель, осиливший предыдущие десятки страниц главы «Обзор литературы», YB-1 вовлечен в реализацию практически всех вышеуказанных особенностей клеток, претерпевших раковую трансформацию.

1) Как транскрипционный фактор, YB-1 активирует экспрессию набора генов, способствующих пролиферации и, напротив, подавляет экспрессию анти-пролиферативных генов. Кроме того, на трансляционном уровне YB-1 стимулирует трансляцию про-пролиферативных матриц.

2) YB-1 способствует частичной дедифференцировке раковых клеток, ярким примером которой является эпителиально-мезенхимальный переход. ЭМП повышает миграционную и инвазивную способности раковых клеток, что значительно увеличивает шансы появления метастазов. Нокдаун YB-1 ингибирует миграцию клеток рака легких [344] и миграцию и инвазию клеток мезотелиомы. YB-1 также необходим для миграции и инвазии клеток рака молочной железы, меланомы, рака носоглотки, плоскоклеточного рака кожи и хордомы позвоночника (см. обзор [345]). В основе этого явления лежат несколько механизмов. Во-первых, это стимуляция трансляции мРНК ключевых факторов ЭМП - Snail1, Twist, Zeb2/Sip1, НохС6, Фохо3а, HIF1 $\alpha$ , Lef-1 [118]). Во-вторых, YB-1 стимулирует экспрессию некоторых лигандов Wnt- $\beta$ -катенин-сигнального пути, а также стимулирует переход  $\beta$ -катенина в ядро, что в совокупности также приводит к транскрипционной активации экспрессии генов, важных для ЭМП [346]. Кроме того, поскольку YB-1 регулирует экспрессию сразу нескольких факторов

«стволовости», вероятно, что это может способствовать приобретению раковыми клетками свойств стволовых клеток, в том числе инвазивность (напр., [347] и [318]).

3) YB-1 подавляет экспрессию про-апоптотических генов. Наиболее важный пример – это контроль активности p53, как за счет прямого взаимодействия YB-1-p53, так и за счет регуляции количества убиквитинлигазы p53 – белка MDM2, на уровне сплайсинга [179, 191].

4) Имеются данные, что при гиперэкспрессии YB-1 увеличивается транскрипция генов, важных для ангиогенеза (*ANGPT4*, *ANGPTL3* и *VEGFA*) [348], а также может усиливаться секреция (в составе экзосом) факторов ангиогенеза (TGF- $\beta$ , CSF-1, NGF, VGF, ADAM9 and ADAM17) [349]. Кроме того, установлено, что YB-1 является регулятором трансляции мРНК *HIF1 $\alpha$* , кодирующей ключевой фактор адаптации клеток к гипоксии [117].

5) Показано, что в клетках рака мочевого пузыря YB-1 необходим для проявления гликолитического фенотипа [350], а при трижды негативном раке груди гиперэкспрессия YB-1 коррелирует с повышенной экспрессией генов, участвующих в гликолизе [351]. Кроме того, YB-1 является ингибитором трансляции мРНК, участвующих в окислительном фосфорилировании [105], поэтому при его гиперэкспрессии, зачастую наблюдаемой в раковых клетках, этот метаболический путь может быть подавлен.

6) Гиперэкспрессия YB-1 может вызывать геномную нестабильность. Эта способность была обнаружена на модели трансгенных мышей, экспрессирующих дополнительный YB-1 с гемагглютининовым тэгом (НА-тэг) под контролем промотора гена бета-лактоглобулина, активного в период позднего этапа беременности и лактации. Оказалось, что гиперэкспрессированный YB-1 вызывал в клетках эпителия молочной железы лактирующих мышей хромосомную нестабильность, которая возникла из-за митотических нарушений и хромосомной амплификации. Интересно, что у повторнородящих мышей развивался инвазивный рак молочной железы различных гистологических типов [285]. Механизм наблюдаемой хромосомной нестабильности основан на том, что гиперэкспрессия YB-1 приводила к изменению экспрессии нескольких генов, связанных с клеточным циклом, особенно киназы LIMK1/2. Нарушенная экспрессия LIMK1/2 вызывала нарушение цитокinesis, что приводило к амплификации centrosom и, соответственно, вызывало проблемы с цитокinesis. Более того, было установлено, что фосфорилированный YB-1 локализуется в centrosome, образует комплексы с перичентрином и  $\gamma$ -тубулином и поддерживает структурную целостность этих органелл. Сочетание этих событий с экспрессией нескольких YB-1-контролируемых генов, важных для прохождения клеточного цикла, приводило к пролиферации и распространению генетически измененных клеток [352].

7) Воспаление предрасполагает к развитию рака. Клетки, вовлеченные в воспалительный процесс, способствуют созданию благоприятного микроокружения для раковых клеток,

вырабатывая макромолекулы и низкомолекулярные вещества, стимулирующие пролиферацию, ангиогенез, защищающие от гибели, преобразующие внеклеточный матрикс и повышающие миграцию и инвазивность ([343] и ссылки в обзоре). Как было сказано в пункте «YB-1 и воспалительные процессы» этой главы, YB-1 может действовать как провоспалительный фактор, в связи с чем нельзя исключать вклада и этой функции YB-1 в онкогенез.

К этому нужно добавить и то, что YB-1 может выступать как фактор, обеспечивающий выживание раковых клеток в стрессовых условиях. Таких как, например, обработка клеток ДНК-повреждающими веществами и другими ксенобиотиками. Эту роль YB-1 может выполнять как на уровне регуляции транскрипции (повышение экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости), так и на уровне репарации ДНК.

В норме контроль количества YB-1 необходим клеткам для поддержания на должном уровне в первую очередь процессов пролиферации и дифференцировки. Нарушение этого контроля, как ясно из изложенного выше, зачастую является большим подспорьем и, возможно, необходимостью для раковых клеток.

Можно утверждать, что увеличение количества YB-1 в раковых клетках, необходимое в первую очередь для увеличения их выживаемости, пролиферации и инвазивности, основано на использовании нескольких механизмов, которые будут описаны в главе «Регуляция количества YB-1» и в разделе «Результаты». Однако здесь можно перечислить их. Во-первых, это повышение транскрипции мРНК *YB-1* за счет увеличения количества определенного набора транскрипционных факторов. При этом зачастую сам YB-1 является позитивным регулятором экспрессии этих транскрипционных факторов. Во-вторых, увеличение стабильности мРНК *YB-1* за счет снижения синтеза разнообразных микроРНК или их инактивации путем увеличения синтеза длинных некодирующих РНК, связывающих микроРНК. В-третьих, увеличение трансляции мРНК *YB-1* за счет активации mTOR-сигнального каскада. Наконец, в-четвертых, увеличение стабильности белка YB-1 как за счет его деубиквитинирования, так и за счет взаимодействия с длинными некодирующими РНК или другими белками.

Что касается механизмов участия YB-1 процессах, используемых раковыми клетками для роста, развития и адаптации к неблагоприятным условиям, то это, в первую очередь, регуляция трансляции мРНК и транскрипции генов, важных для пролиферации, дифференцировки, устойчивости клеток к ксенобиотикам и пр. (см. выше). При этом в последнее время появляется множество публикаций, в которых показано, что действие YB-1 модулируется длинными некодирующими РНК. Так, lncRNA HOXC-AS3, по всей видимости, регулирует взаимодействие между YB-1 и промотором генов-мишеней, связанных с пролиферацией и миграцией в клетках рака желудка, таких как *MMP7*, *WNT10B* и *HDAC5* [263]. LINC00312, взаимодействуя с YB-1, индуцирует миграцию, инвазию клеток рака легких [353], а



в миофибробластах усиливает их активность и стимулирует их трансдифференцировку [354]. LINC00472 ингибирует процесс эпителиально-мезенхимального перехода, взаимодействуя с YB-1 [355]. Стоит отметить, впрочем, что ни в одном подобном исследовании механизм влияния lncRNA на функции YB-1 не изучен подробно. Логические выводы делаются на основе корреляции между количеством lncRNA и клеточными характеристиками (подвижность, маркеры ЭМП), а также фактом взаимодействия YB-1 с lncRNA. Поэтому не будем утруждать читателя перечислением длинных некодирующих РНК со сложными названиями, которые взаимодействуют с YB-1 и потенциально способны влиять на его функции.

Необходимо отметить еще одну активность YB-1, используемую раковыми клетками. YB-1 обнаружен в экзосомах, секретируемых злокачественными клетками, и участвует в сортинге некоторых микроРНК [90]. Количество YB-1 повышено в экзосомах из клеток, в которых индуцировали ЭМП [356]. Кроме того, экзосомы образующиеся в клетках, оверэкспрессирующих YB-1, содержат повышенное количество некоторых секретируемых факторов, усиливающих ангиогенез (TGF- $\beta$ , CSF-1, NGF, VGF, ADAM9 и ADAM17), а также факторов, необходимых для индукции ЭМП в клетках- реципиентах [349, 356, 357]. Кроме того, было показано, что YB-1 активно секретируется во внеклеточное пространство клетками меланомы, стимулирует миграцию клеток меланомы и повышает их инвазивность. Важно, что секреция YB-1 коррелировала со стадией прогрессирования меланомы, что может быть использовано в диагностических целях [358].

## 4. РЕГУЛЯЦИЯ КОЛИЧЕСТВА YB-1

### 4.1. Структура гена *YBX1* и его экспрессия

Принимая во внимание, что YB-1 осуществляет регуляцию многочисленных ДНК- и мРНК-зависимых процессов, следует ожидать, что его содержание и функциональная активность в клетке строго контролируются.

Первые исследования регуляции синтеза YB-1 начались с анализа структуры гена *YBX1* (*YBX1*) и его промотора. Ген *YBX1* человека локализован в первой хромосоме (1p34), состоит из 21388 тысяч пар оснований и включает в себя 8 экзонов. При этом мРНК *YB-1* в результате сплайсинга имеет длину около 1500 нуклеотидных остатков. В промоторе гена *YBX1* отсутствуют характерные для большинства генов регуляторные последовательности: ТАТА-бокс и ССААТ-элемент. Однако в нем имеется несколько E-боксов, GATA-мотивы, а в начале первого экзона содержится много CG-повторов, которые необходимы для транскрипции гена *YBX1* [359].

На основе данных энциклопедии ENCODE SCREEN [360] можно оценить локализацию ключевых регуляторных районов гена *YBX1* относительно старта трансляции: [-439;122] (промотор), [-3180;-530] и [127; 1887] (проксимальные энхансеры) (Рис.7).

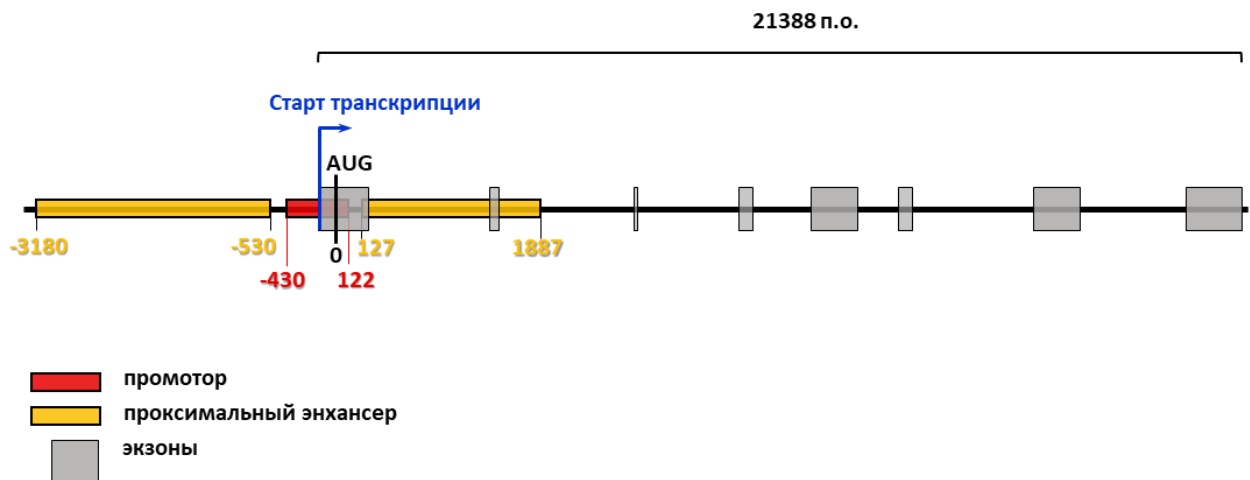


Рисунок 7. Схема гена *YB-1*(*YBX1*) человека.

Нозерн-блот анализ, проведенный еще в ранних работах, показал, что мРНК *YB-1* распределяется по разным тканям неравномерно. Больше всего её найдено в семенниках, скелетных мышцах и в селезенке, мало – в почках, печени и легких [361]. По другим данным, большое количество мРНК *YB-1* обнаруживается только в почках и семенниках [362]. Было также отмечено, что уровень мРНК *YB-1* в клетках печени эмбрионов гораздо выше, чем во взрослом организме [42, 361]. Количество мРНК *YB-1* может меняться при различных стрессовых воздействиях [363] и при стимуляции клеток к пролиферации [42, 361]. Данные об экспрессии *YB-1*, полученные на микрочипе Affymetrix U133 (<http://biogps.gnf.org/#goto=genereport&id=4904>), показали, что количество мРНК *YB-1* заметно выше в клетках семенников, клетках фетального мозга, ранних предшественниках клеток эритроидного и лимфоидного рядов и некоторых других. Количество белка *YB-1* в разных тканях также сильно варьирует. Наибольшее количество белка *YB-1* во взрослом организме содержится в семенниках, легких, лимфатических узлах и в органах пищеварительной системы (слизистой пищевода, тонком и толстом кишечнике, поджелудочной железе) [364-367]. Наименьшее количество содержится в мозге, скелетных мышцах, почках и коже [364-368]. Кроме того, было обнаружено, что количество *YB-1* в тканях мышцы может изменяться в зависимости от её возраста [369]. В мозге, сердце и мышцах мышцы содержание *YB-1* уменьшается в течение нескольких недель после рождения, а в семенниках, селезенке, почках и легких такое уменьшение наблюдается только в период старения животного. В печени же количество *YB-1* остается неизменным на протяжении всей жизни мышцы. Возможно,

наблюдаемая зависимость в распределении YB-1 по тканям связана с тем, насколько активно в них идут пролиферативные процессы.

В целом распределение количества YB-1 по тканям у мышей [369], крысы [370], кролика [368] и человека [364-367, 369] схожи.

В ходе взросления мышцей количество YB-1 быстро уменьшается в мышцах, сердце и мозге. Вероятно, это связано с особенностями клеточной дифференцировки в этих органах. Показано, что количество YB-1 снижается при дифференцировке в мышечные клетки [307], клетки глии [308], кератиноциты [309], эритропоэтические клетки [310] и клетки печени [371]. Однако, в некоторых типах клеток, в том числе в соматических стволовых клетках, YB-1 продолжает детектироваться и у взрослых млекопитающих. Так например, в мозге взрослого организма YB-1 ко-локализуется со стволовыми нейрональными клетками в субвентрикулярной зоне и субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа [308]. В костном мозге YB-1 наблюдается в гематопоэтических стволовых клетках и промиелоцитах [310], а в коже - в ранних пролиферирующих кератиноцитах [309]. Можно предположить, что эти тотипотентные клетки делятся и дифференцируются для устранения повреждений органов. Нельзя исключить, что повышение количества YB-1 в таких случаях в свою очередь приводит к стимуляции пролиферации клеток.

Эксперимент по параллельному анализу транскриптома и протеома разных тканей человека, выполненный с использованием высокопроизводительных методов секвенирования и масс-спектрометрии выявил, что количество мРНК и белка YB-1 коррелируют друг с другом, но довольно слабо (коэфф. корреляции Пирсона  $\sim 0.45$ ) [364]. Это свидетельствует о том, что количество YB-1 в большой степени зависит от регуляции трансляции, стабильности мРНК и белка. Примеры такой регуляции будут описаны в разделе «Результаты» данной работы.

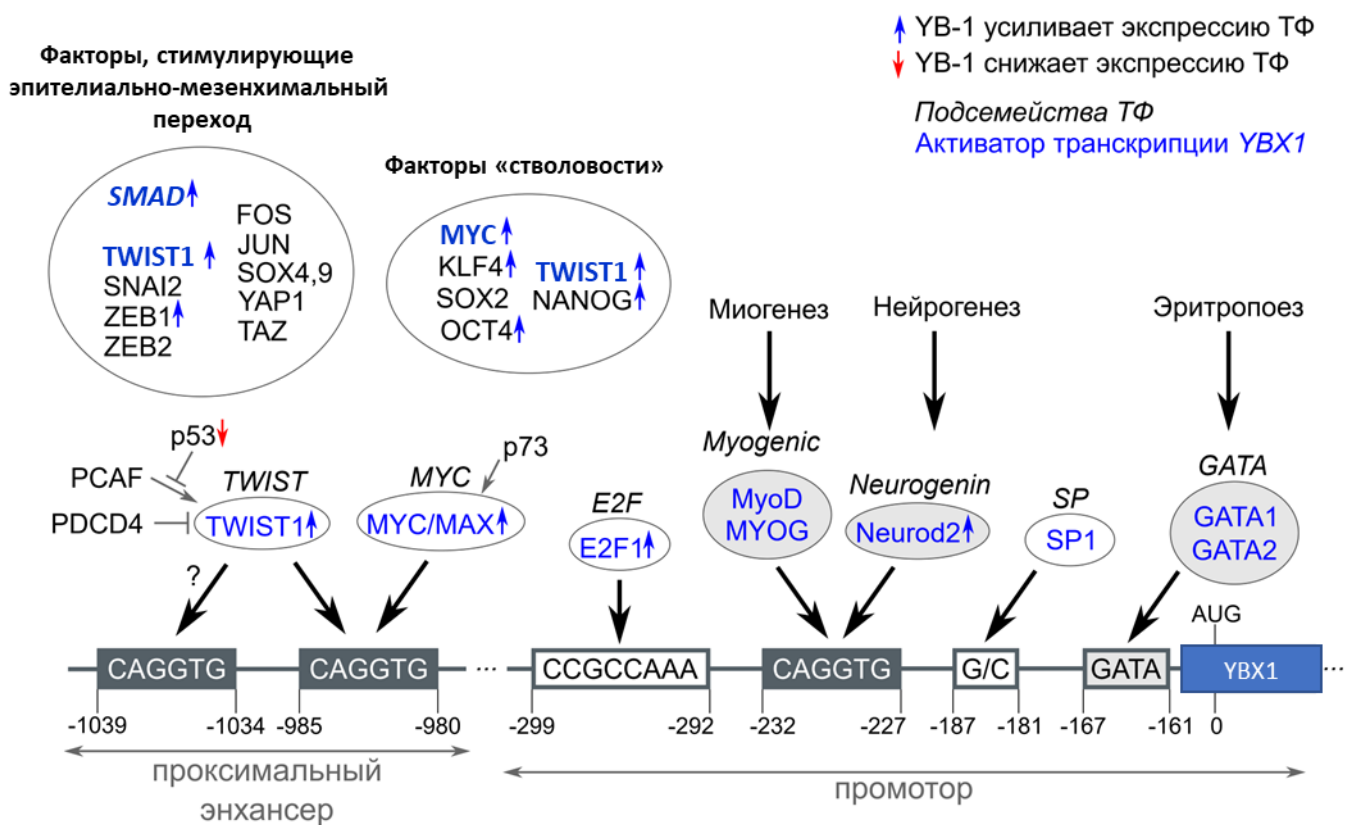
#### **4.2. Регуляция количества YB-1 на уровне транскрипции**

Сопоставление данных из экспериментов по иммунопреципитации хроматина с последующим высокопроизводительным секвенированием (ChIP-Seq) [315], показывает, что с промотором и проксимальным энхансером (далее эти области будут указываться как промотор) гена *YBX1* потенциально взаимодействуют более 300 различных факторов транскрипции, которые являются представителями более чем 70 белковых семейств.

Роль нескольких обнаруживаемых в ChIP-Seq-экспериментах белков в регуляции экспрессии гена *YBX1* изучалась ранее. В промоторе *YBX1*, как уже говорилось, имеются GC-богатые участки, с которыми могут взаимодействовать белки SP- и E2F-семейств (Рис.8). Известно, что белки семейства SP и сайты их связывания важны для инициации транскрипции на широких CG-промоторах, часто не содержащих ТАТА-боксов [372], к каковым относится

промотор *YBX1*. Участки связывания белков данного семейства располагаются вблизи основного старта транскрипции *YBX1*. С помощью репортерной конструкции с промотором *YBX1* было показано, что мутации в одном из участков связывания SP1 приводят к снижению транскрипции в клеточной линии миобластов [307]. Мутации в участке связывания белков семейства E2F также приводят к снижению транскрипции мРНК *YB-1* [307].

При дифференцировке миобластов в мышечные трубки, в транскрипции мРНК *YB-1* перестают участвовать E2F-факторы, а основную роль начинают играть белки миогенеза MyoD и MYOG (Myogenin), взаимодействующие с сайтом CAGGTC в промоторе *YBX1* [307] (Рис.8). Интересно, что в ходе дальнейшей дифференцировки (мышечные трубки – мышечные волокна) происходит снижение количества MyoD и MYOG, вызывающее уменьшение количества мРНК *YB-1*. Так, у мышей через несколько дней после рождения мРНК и белок YB-1 в скелетных мышцах практически исчезают [106] и их количество возрастает только при проведении денервации мышц [373], стимулирующей повышение количества MyoD и MYOG [307].



**Рисунок 8.** Схема, показывающая связывание основных регуляторов транскрипции *YBX1*. Положения участков связывания приведены относительно AUG – старта трансляции. Курсивом отмечены подсемейства факторов транскрипции (в овалах – конкретные представители, взаимодействующие с промотором или проксимальным энхансером *YBX1* по данным ChIP-Seq-анализа [315]), синим отмечены активаторы транскрипции, стрелками отмечены факторы транскрипции, которые сами регулируются белком YB-1. Серыми овалами отмечены факторы, активирующие транскрипцию *YBX1* при различных типах дифференцировок. Рисунок взят из [374].

В клетках мозга (кора головного мозга и гиппокамп) с последовательностью CAGGTC взаимодействует другой транскрипционный фактор – белок NeuroD2 (Math2) [375] (Рис.8), определяющий выбор пути дифференцировки и миграцию нервных клеток. NeuroD2 активно синтезируется в эмбриогенезе, но после рождения плода его количество уменьшается. В соответствии с уровнем NeuroD2 в клетках мозга изменяется и количество YB-1 [375].

Сходным образом контролируется уровень YB-1 при дифференцировке клеток эритроидного ряда [310]. Однако в этом случае транскрипция *YBX1* активируется транскрипционными факторами семейства GATA (GATA1 и GATA2), связывающимися с GATA-сайтом в промоторной области *YBX1* в области старта транскрипции (Рис.8). В ходе терминальной дифференцировки эритроцитов количество GATA1 и GATA2 снижается, и, как следствие, происходит снижение количества мРНК *YB-1* [376].

Выше уже упоминалось, что YB-1 является маркером пролиферирующих клеток [377, 378]. Он необходим для поддержания пролиферации стволовых клеток [308, 311, 378], и снижение его количества может приводить к их спонтанной дифференцировке [308], а повышение, наоборот, к частичной дедифференцировке клеток [378]. Согласно данным ChIP-Seq [315], с промотором *YBX1* взаимодействуют так называемые факторы «стволовости» (факторы Яманаки) [316] (KLF4, SOX2, OCT4, c-MYC), а также белки NANOG и TWIST1 (Рис.8). Эти транскрипционные факторы контролируют транскрипционную программу стволовых клеток, и, вероятно, участвуют в регуляции транскрипции мРНК *YB-1*. Однако пока это показано только для белков c-MYC и TWIST1 [313, 379, 380]. Оба фактора связываются с сайтом CACGTG в промоторной области и активируют транскрипцию гена *YBX1* [313, 379, 380].

TWIST1-опосредованная транскрипция *YBX1* может подавляться белками PDCD4 и p53 [380, 381]. PDCD4 взаимодействует с ДНК-связывающим доменом TWIST1 [381], а p53 конкурирует за связывание с ацетилтрансферазой PCAF (p300/CBP), которая ацетилирует TWIST1, что необходимо для его перехода в ядро [380]. Интересно, что гомолог p53, белок p73, наоборот, стимулирует транскрипцию *YBX1*. Связываясь с белком c-MYC, p73 способствует образованию активирующего транскрипцию *YBX1* комплекса MYC/MAX [379]. Кроме того, было показано, что экспрессия YB-1 негативно регулируется белком Foxo3a [382] и снижается при ингибировании интегрин-связанной киназы ILK [383]. В этих случаях также предполагается TWIST1-опосредованный механизм регуляции синтеза YB-1.

Согласно данным ChIP-Seq, с промотором *YBX1* взаимодействуют факторы SNAI2, ZEB1, ZEB2 и некоторые другие, стимулирующие эпителиально-мезенхимальный переход [315, 384]. Однако достоверных данных о влиянии этих факторов на транскрипцию *YBX1* нет. С другой стороны, наиболее изученным сигнальным каскадом, активация которого приводит к

ЭМП, является TGF $\beta$ /SMAD сигнальный путь. Известно, что при обработке клеток TGF $\beta$  происходит увеличение, а при нокдауне SMAD2 уменьшение количества мРНК и белка YB-1 [385]. Было предположено, что транскрипция *YBX1* регулируется белками семейства SMAD. В пользу этого свидетельствует наличие выраженного мотива связывания белков семейства SMAD в промоторной области гена *YBX1*, что было показано при ChIP-Seq-анализе для факторов SMAD1,2,3,4,5 [315]. Интересно, что сам белок YB-1 взаимодействует с белками семейства SMAD и влияет на их транскрипционную активность [241, 385-387].

Из сказанного выше можно сделать вывод, что в активно пролиферирующих клетках наблюдается высокий уровень YB-1, а при дифференцировке клеток его количество снижается. Это, вероятно, происходит как за счет регуляции транскрипции гена *YBX1* факторами «стволовости», так и тканеспецифичными факторами, например, факторами миогенеза при дифференцировке мышечных клеток [307], факторами нейрогенеза в ходе дифференцировки нервных клеток [375], GATA-факторами при дифференцировке клеток эритроидного ряда [376]. В плюрипотентных клетках, вероятно, транскрипция *YBX1* регулируется факторами «стволовости» и факторами семейства E2F, а в ходе дифференцировки транскрипция *YBX1* переходит под контроль специфичных факторов, поддерживающих на начальных этапах дифференцировки количество мРНК *YB-1* на высоком уровне. После снижения их количества на поздних этапах падает и уровень мРНК *YB-1*.

#### 4.3. Стабильность мРНК *YB-1*

Одним из способов контроля количества YB-1 в клетках может являться регуляция стабильности мРНК *YB-1*. Практически во всех описанных случаях такой регуляции основную роль играют малые некодирующие РНК (микроРНК, microRNA, miRNA). Как правило, на первом этапе исследования с помощью биоинформатических методов и баз данных ищутся мРНК, в 3'НТО которых обнаруживаются сайты связывания для микроРНК, имеющих какую-либо медицинскую значимость или чьё количество в клетках изменяется при том или ином онкологическом заболевании. Затем подтверждается влияние изменений количества микроРНК в клетках (оверэкспрессия или выключение экспрессии) на количество мРНК-мишени и на количество соответствующего белка. Если имеются данные по полногеномному секвенированию, то ищутся корреляции между экспрессией микроРНК и РНК-мишени. В наиболее качественных исследованиях проводятся эксперименты с репортерными конструкциями, несущими 3'НТО мРНК-мишени с исходным или мутированным сайтом связывания микроРНК. Нужно отметить, что вывод о влиянии микроРНК на стабильность мРНК *YB-1* делается только на основании факта связывания микроРНК с 3'НТО мРНК и

уменьшения количества мРНК при оверэкспрессии микроРНК. Прямого изучения стабильности мРНК *YB-1* ни в одном из исследований проведено не было.

Можно привести несколько примеров, касающихся регуляции стабильности мРНК *YB-1* при участии микроРНК. При высоком уровне микроРНК *miR-137* снижается количество мРНК *YB-1* и как следствие, количество белка *YB-1* в клетках меланомы [388]. Это коррелирует с тем, что у клеток меланомы снижается инвазивность. В клетках рака молочной железы MCF7/ADM *miR-137* [389] наряду с *miR-375* [390] негативно регулирует стабильность мРНК *YB-1*, что приводит к снижению *YB-1*-контролируемой транскрипции гена *MDR1*, кодирующего гликопротеин Р – ключевой белок, необходимый для установления множественной лекарственной устойчивости клеток.

Другая микроРНК, *miRNA-216a*, как показано, регулирует стабильность мРНК *YB-1* в мезангиальных клетках почки. Повышение экспрессии *miRNA-216a* индуцируется фактором TGF $\beta$  при диабете (на мышинной модели), что вызывает уменьшение количества *YB-1*. В свою очередь, это приводит к активации трансляции мРНК транскрипционного фактора *Tsc-22* и далее к накоплению белков экстраклеточного матрикса, таких как коллаген, и развитию фиброза [391]. Снижение экспрессии *miRNA-216a* в клетках аденокарциномы поджелудочной железы приводит к увеличению количества мРНК и белка *YB-1*, что увеличивает инвазивность раковых клеток [392].

Повышение экспрессии микроРНК *miR-190* в клетках аденокарциномы простаты LNCaP ингибирует экспрессию *YB-1*, тем самым снижая активацию *YB-1*-зависимой транскрипции андрогеновых рецепторов, что может препятствовать развитию ракового заболевания [393]. Оверэкспрессия *mir-382* в клетках остеосаркомы [394], *mir-382-5p* в клетках глиомы [395], *miR-148a* в клетках немелкоклеточный рака легких [396] и *miR-379-5p* в клетках назофарингеальной карциномы [397] снижает стабильность мРНК *YB-1* и её количество, а значит существенно снижает способность раковых клеток к эпителиально-мезенхимальному переходу.

С открытием длинных некодирующих РНК (lncRNA) появились работы, в которых показана роль таких РНК в регуляции стабильности мРНК *YB-1*. В большинстве задокументированных случаев механизм действия lncRNA основан на её способности связывать одну или несколько молекул микроРНК, которые, в свою очередь, являются регуляторами стабильности мРНК *YB-1*. Из этого следует, что эффект таких lncRNA прямо противоположен действию микроРНК – повышение их экспрессии в раковых клетках стабилизирует мРНК *YB-1* и увеличивает количество мРНК и белка *YB-1*, что способствует пролиферации клеток и повышению их способности к метастазированию. Как правило, количество lncRNA, действующих подобным образом, увеличивается при некоторых онкологических заболеваниях.

Таким образом действуют lncRNA *PRKCQ-AS1* (связывает *miR-1287-5p*)[398], lncRNA *PVT1* (связывает *miR-216a-5p*) [399] в клетках рака прямой кишки и *LINC00511* (связывает *miR-524-5p*) в клетках глиобластомы [400]. Интересно, что в случае повышения экспрессии *LINC00511* и последующего увеличения количества YB-1 наблюдается индукция экспрессии транскрипционного фактора ZEB1, который, в свою очередь, является активатором экспрессии *LINC00511* [400] и, вероятно, YB-1. Это позволяет говорить о наличии обратной положительной связи при экспрессии *LINC00511*.

#### 4.4. Стабильность белка YB-1

Рассмотрение проблемы регуляции стабильности или, более точно, времени жизни белка YB-1 в клетках, следует начать с данных о том, по какому механизму это белок деградирует в клетке. Первые исследования этого вопроса показали, что YB-1 может подвергаться ограниченному протеолизу (процессингу) 20S протеасомой. В этом случае YB-1 расщепляется АТФ- и убиквитин-независимо на два фрагмента после Glu219 [208]. Кроме того, YB-1 может полностью расщепляться 26S протеасомой после убиквитинилирования RING-домен-содержащими убиквитинлигазами SCF (SKP-Cullin-F-box) [401] и RBBP6 (Retinoblastoma binding protein 6) [402], убиквитинлигазой PRP19 (Pre-mRNA-processing factor 19) из U-боксов семейства [403] и убиквитинлигазой NEDD4 (Neural Precursor Cell Expressed Developmentally Down-Regulated Protein 4) из семейства HECT-домен-содержащих убиквитинлигаз [404]. Интересно отметить, что убиквитинилирование YB-1 убиквитинлигазой HACE1 из HECT-семейства приводит к секреции YB-1, а не к его протеолизу [221].

С другой стороны, такие деубиквитинлигазы как USP47 [405] и OTUB1 [406], наоборот, препятствуют расщеплению YB-1 26S протеасомой.

Очевидно, полный или ограниченный протеолиз белка запускается в разных условиях, когда необходимо предотвратить (полный протеолиз) или изменить (процессинг) какую-либо функцию YB-1. Так, процессинг под действием 20S протеасомы происходит при обработке клеток ксенобиотиками, повреждающими ДНК [208, 209], и необходим для выживания клеток в условиях такого стресса. Кроме того, YB-1 процессируется при обработке эндотелиальных клеток кровеносных сосудов тромбином [256, 407], что, как считается, приводит к изменениям в транскрипции некоторых генов.

Полный протеолиз может быть, например, связан с началом апоптоза, поскольку компонент SCF E3-убиквитинлигазы, узнающий YB-1 – белок FBX33 (F-box protein 33) активируется именно в это время [401]. Однако, согласно большинству описанных случаев, ингибирование полного протеолиза YB-1 в клетке способствует высокому пролиферативному



потенциалу, инвазивности или лекарственной устойчивости клеток (как правило раковых), что говорит о том, что полный протеолиз YB-1 важен при регуляции именно таких процессов.

Регуляция деградации YB-1 может осуществляться при участии длинных некодирующих РНК или белков. Показано, что взаимодействие с такими lncRNA как *CAR10* [408], *LNCAROD* [409], *MIR200CHG* [410], *Hnscr* [288], *MIR22HG* [411], *GAS5* [412, 413], *lnc-31* [276], *Linc00665* [348], *LINC00857* [414], *MNX1-AS1* [415], *PIK3CD-AS2* [416], *circRNA-SORE* [403] и *circRNA-Nfix* [404] предотвращает убиквитинилирование и протеасомную деградацию YB-1. Следует отметить, что в большинстве указанных исследований не показано прямое взаимодействие YB-1 с lncRNA. Как правило речь идет о РНК-белковых комплексах в состав которых помимо YB-1 могут входить другие белки. Кроме того, зачастую для проявления той или иной функции YB-1 важно не просто уменьшение деградации YB-1 и увеличение его содержания в клетке, а необходимо его взаимодействие с lncRNA. Так, например, *lnc-31* не просто стабилизирует белок YB-1, но и привлекает его к 5' концевой части мРНК *ROCK1*, что способствует трансляции этой мРНК [276]. Другая lncRNA, *LNCAROD*, в случае метилирования по остаткам аденина в положении 6 (m6A-модификация) связывает помимо YB-1 белок теплового шока HSPA1A, наличие которого обязательно для предотвращения деградации YB-1 и для выполнения им функций транскрипционного фактора [409].

Регуляция полного протеолиза YB-1 может быть опосредована и белками. Например, белок aPC (anticoagulant serine protease activated protein C) при ишемии-реперфузии почек способствует взаимодействию YB-1 с деубиквитинилирующим ферментом OTUB1 и, как следствие, предотвращает деградацию YB-1, необходимого для активации цитопротективных механизмов [406]. Интересен пример с белком  $\Delta Np63\alpha$  (из семейства белка p53). Оказалось, что в кератиноцитах  $\Delta Np63\alpha$  предотвращает деградацию YB-1 и способствует его переходу в ядро, но при этом убиквитинилирование YB-1 сохраняется [309]. В ядре же YB-1 активирует экспрессию самого  $\Delta Np63\alpha$ , что усиливает стабилизацию YB-1. При дифференцировке кератиноцитов, когда необходимости в про-пролиферативной функции YB-1 нет, экспрессия  $\Delta Np63\alpha$  снижается, а вместе с ней снижаются стабильность и количество YB-1 [309].

## 5. ПОПЫТКИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ YB-1 В ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ЦЕЛЯХ

Выяснение механизмов участия YB-1 в онкотрансформации клеток и в других патологиях позволило предложить несколько перспективных подходов не только к диагностике, но и к терапии рака и некоторых других заболеваний.

Если говорить о диагностике, то о применении YB-1 в качестве маркера злокачественных новообразований и агрессивности опухолей говорится уже довольно давно и много (см. обзоры [287, 417]). Однако в качестве иллюстрации к этому вопросу можно привести

недавний обзор, в котором приведены данные о взаимосвязи между уровнем экспрессии *YBX1* (на основе общедоступных данных RNAseq) и общей выживаемостью при некоторых типах рака [342]. Интересно, что как высокие, так и низкие уровни YB-1 могут коррелировать со снижением общей выживаемости в зависимости от органоспецифичности рака. Однако в большинстве случаев всё-таки именно высокий уровень мРНК *YB-1* коррелирует с низкой выживаемостью пациентов. Необходимо отметить, что и ядерная локализация YB-1 учитывается при его использовании в качестве биомаркера. Например, ядерная локализация YB-1 коррелирует с такими явлениями как множественная лекарственная устойчивость и рост опухолей. В то же время большое количество белка YB-1 в цитоплазме раковых клеток может коррелировать с их метастатической активностью. Впрочем, и ядерная локализация YB-1 может говорить о появлении у клеток фенотипа стволовых клеток и о их склонности к метастазированию.

Использование YB-1 как мишени в терапии прежде всего злокачественных новообразований также развивается. Так, Dunn с сотрудниками предлагают использовать для лечения рака молочной железы фрагмент YB-1, конъюгированный с пептидом, обеспечивающим его транспорт в клетку [418]. Данный фрагмент CSD содержит фосфорилируемый остаток Ser102 и, согласно молекулярному моделированию, является хорошим субстратом для киназ RSK, Akt и PKC. Как уже отмечалось, повышенное фосфорилирование YB-1 может приводить к неконтролируемому синтезу некоторых онкобелков [72, 83] и более агрессивному течению болезни. Можно ожидать, что проникший в клетку фрагмент YB-1 будет конкурировать с полноразмерным белком за связывание с киназами, предотвращать фосфорилирование YB-1 и, тем самым, снижать негативный эффект фосфорилированного YB-1. Эксперименты показали, что фрагмент YB-1 на 90% снижал скорость роста культивируемых раковых клеток молочной железы и простаты и повышал их чувствительность к трастузумабу, но при этом не подавлял рост нормальных клеток. Кроме того, было показано, что нокдаун RSK с помощью специфичной для RSK siRNA или с помощью низкомолекулярного ингибитора SL0101 блокирует активацию YB-1, что приводит к подавлению роста рака предстательной железы и повышению чувствительности раковых клеток к цитостатическому противораковому препарату таксолу [419].

В другом исследовании [420, 421] для терапии рака предлагается использовать свойство YB-1 поддерживать репликацию аденовируса, несущего мутацию в гене *E1A* [164]. Размножение такого мутантного аденовируса происходит только в клетках с высокой концентрацией и ядерной локализацией YB-1, которые в большей степени характерны для раковых клеток. Следовательно, литический эффект аденовируса избирательно направлен на

раковые клетки. Подобная стратегия была также опробована при аденовирусной терапии глиобластомы [422].

Другое низкомолекулярное вещество, физетин, блокирует фосфорилирование YB-1, связываясь со специфическими остатками в домене холодового шока, которые важны для взаимодействия между YB-1 и киназами AKT и RSK [423]. Физетин препятствует YB-1-опосредованному эпителиально-мезенхимальному переходу в клеточных линиях рака предстательной железы и способен индуцировать остановку клеточного цикла и апоптоз [424]. Кроме того, показано, что физетин повышает чувствительность клеток радиорезистентного рака предстательной железы к радиации [425], что также может быть связано с его действием на YB-1.

Опухоли с высоким уровнем YB-1 также могут быть восприимчивы к ингибиторам гистондеацетилаз HDAC класса I. Такие ингибиторы усиливают ацетилирование YB-1, что негативно сказывается на его способности стимулировать трансляцию мРНК антиоксидантов, таких как NFE2L2. В итоге повышается уровень внутриклеточных активных форм кислорода, что негативно сказывается на жизнедеятельности раковой клетки [125].

YB-1 используется как мишень не только при лечении раковых заболеваний. Hasegawa и Higashi с коллегами, изучая синтетическое низкомолекулярное вещество HSc025 как средство против фиброза печени, обнаружили взаимодействие этого соединения с YB-1 и стимуляцию им перехода YB-1 из цитоплазмы в клеточное ядро. Предполагается, что YB-1 служит молекулярной мишенью для HSc025. Перешедший в ядро YB-1 связывается с промоторами генов коллагенов COL1A1 и COL1A2 и подавляет их транскрипцию, что препятствует развитию фиброза [426, 427].

Имеются перспективы использования YB-1 при терапии вирусных заболеваний, основанные на его способности по-разному влиять на трансляцию клеточных и вирусных РНК. Как уже упоминалось выше, трансляция РНК вируса Денге сильнее подавляется YB-1, чем трансляция большинства клеточных мРНК, благодаря его повышенному сродству к специфической последовательности в 3'НТО (+)цепи вирусной РНК [64].

Наконец, в 2015 году были получены данные об использовании белка YB-1 как потенциального лекарственного средства для борьбы с болезнью Альцгеймера [428]. Оказалось, что интраназальное введение белка YB-1 предотвращает ухудшение пространственной памяти у модельных животных с болезнью Альцгеймера. Введение белка YB-1 таким животным оказывает позитивный эффект на морфофункциональное состояние нейронов, увеличивая плотность нервных клеток и число нормально функционирующих нейронов, а также снижает уровень  $\beta$ -амилоида (основного белкового компонента бляшек при болезни Альцгеймера) в коре головного мозга и гиппокампе [428].

## 6. ФУНКЦИИ ДРУГИХ Y-БОКС-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ

YB-2 и YB-3, как уже упоминалось выше, весьма сходны по структуре, содержанию аминокислот, РНК-, ДНК-связывающей способности с белком YB-1, но в то же время о функциональной значимости этих белков известно значительно меньше. Однако можно утверждать, что репертуар функций всех YB-белков частично схож. Несколько особняком стоит YB-2: этот белок синтезируется исключительно в половых клетках [429], является ингибитором трансляции и, вероятно, стабилизирует мРНК [74, 430-433]. При этом белок YB-3, считалось, присутствует во время эмбрионального развития и исчезает к моменту рождения и впоследствии также детектируется в половых клетках [97]. Однако, согласно более поздним работам, проведенным на тканях человека, во взрослом организме YB-3 в больших количествах содержится в сперматоцитах семенников, скелетных мышцах и кардиомиоцитах, но при этом детектируется и в других тканях, хотя и в меньших количествах [364, 434]. Кроме того, у белка YB-3 есть одна особенность, которая отличает его от других YB-белков: существует две изоформы YB-3, образующиеся в результате включения (длинная изоформа) или исключения (короткая изоформа) экзона 12 при сплайсинге пре-мРНК *YB-3*. В этом экзоне закодирована последовательность сигнала ядерной локализации (NLS, nuclear localization signal), аналогичная той, что имеется в белке YB-1. Вполне вероятно, что короткая изоформа YB-3 будет иметь цитоплазматическую локализацию, а длинная будет способна переходить в ядро или постоянно там находиться. Соотношение этих двух изоформ в разных тканях варьирует от 1:1 до 1:4 в пользу короткой, не содержащей NLS, изоформы [435].

Как и YB-1, YB-3 участвует в регуляции транскрипции, трансляции и стабильности мРНК – именно это будет рассмотрено в настоящей главе. Не исключено, что и в других ДНК- и РНК-зависимых процессах YB-3 также задействован, однако это еще предстоит выяснить. Следует также упомянуть, что полное выключение экспрессии гена *YBX3* или *YBX2(MSY2)* у мыши, в отличие от выключения гена *YBX1*, не приводит к гибели животного и серьезным аномалиям эмбрионального развития, кроме нарушения фертильности, вероятно, в результате нарушения сперматогенеза и/или оогенеза [97, 436].

### 6.1. Участие YB-2 и YB-3 в регуляции трансляции

Было показано, что YB-3 присутствует в большом количестве в сперматоцитах, а также в ранних и поздних сперматидеях, при этом в значительная доля мРНК *YB-3* детектируется в полисомной фракции, то есть транслируется [362]. На финальных этапах дифференцировки этих половых клеток для компактизации хроматина необходимы белки протамины P1 и P2, синтезирующиеся с мРНК *Prm1* и *Prm2*. В регуляции трансляции этих мРНК участвует ряд

белковых факторов, среди которых были обнаружены YB-3 и YB-2 [437]. Эти YB-белки преобладали в мРНК, содержащих трансляционно репрессированную мРНК *Prm1* [437]. В экспериментах *in vitro* было показано, что YB-3 и YB-2 способны взаимодействовать с YRS-элементом (Y-box protein recognition sequence, 5'-U<sub>AC</sub>C<sub>A</sub>CAU<sub>C</sub>CA<sub>CU</sub>-3') в 3'НТО мРНК протамина 1 [63], а также в других транскриптах [438]. Введение YRS-элемента из мРНК *Prm1* в репортерную мРНК приводит к ингибированию её трансляции *in vivo* [63]. Нарушение экспрессии YB-3 в ходе сперматогенеза у трансгенных мышей (оверэкспрессия YB-3) приводило к подавлению трансляции некоторых генов (в том числе мРНК *Prm1* и *Prm2*), и, как следствие, к стерильности [439]. С другой стороны, недавно было показано, что у мышей, несущих мутантный аллель как гена *YBX3*, так и *YBX2*, наблюдается, наоборот, отсутствие трансляционной репрессии довольно большого набора мРНК в сперматоцитах и, как следствие, также стерильность [74]. Таким образом, и YB-3, и YB-2, являясь трансляционными репрессорами, играют важную роль в дифференцировке половых клеток.

## 6.2. Участие YB-3 в регуляции транскрипции

Интересно, что YB-3 был обнаружен вместе с YB-1 как транскрипционный фактор, регулирующий экспрессию гена колониестимулирующего фактора роста гранулоцитов и макрофагов [40], что говорит о том, что эти белки могут иметь одинаковые гены-мишени, однако данные факты вовсе не означают, что эти белки всегда действуют совместно.

Было показано, что YB-3 действует в качестве репрессора транскрипции ряда генов, ответственных за миогенез. Так, в клетках поперечнополосатой мышечной ткани YB-3 подавляет транскрипцию гена фактора миогенеза *MYOG*, связываясь с последовательностью *myog*НСЕ вблизи промотора и, вероятно, препятствуя взаимодействию с *myog*НСЕ комплекса белков Pbx и MyoD, активирующих транскрипцию *MYOG* [440, 441]. Интересно, что и сам YB-3 наиболее сильно экспрессируется в скелетных мышцах [364] и, по-видимому, является регулятором дифференцировки миобластов в мышечные трубки. Механизм регуляции может быть основан на фосфорилировании YB-3 киназой Akt по Ser126 (аналогичен Ser102 YB-1), которое снижает сродство YB-3 к промоторной области гена *MYOG*, и как следствие, к потере ингибирующего влияния на транскрипцию *MYOG*. При этом YB-3 переходит из ядра в цитоплазму [442], что отличает YB-3 от YB-1, фосфорилирование которого Akt-киназой по Ser102, наоборот, способствует ядерной локализации белка [225].

YB-3 может контролировать транскрипцию не только в мышечных клетках. Так, на культуре фибробластов мышцы было показано, что YB-3 в комплексе с YB-1 ингибирует экспрессию гена фактора роста эндотелия сосудов (VEGF, vascular endothelial growth factor), связываясь с HR-элементом (hypoxia responsive) промотора гена *VEGF* [443]. При этом

связывание с этим элементом регулируется фосфорилированием белка YB-3 киназами ERK2 и GSK3 $\beta$  [444]. Другое исследование, на клетках кубического эпителия кишечника, показало, что YB-3 совместно с белком плотных контактов симплекином подавляет транскрипцию гена *RUNX1*, кодирующего активатор транскрипции фактора KLF4 (один из факторов «стволовости»). Результатом этого ингибирования является снижение экспрессии KLF4, что ведет к ингибированию пролиферации эпителиальных клеток [445].

Целая серия публикаций посвящена роли YB-3 в регуляции транскрипции генов, участвующих в пролиферации клеток. На линии MDCK, эпителиальных клетках, склонных к образованию так называемых плотных контактов, было показано, что локализация YB-3 в ядре коррелирует с активной пролиферацией, а его перемещение в область плотных контактов – с замедлением клеточного деления [446]. Было предположено, а затем показано, что в ядре YB-3 регулирует транскрипцию про-пролиферативных генов, в частности гена *PCNA* (proliferating cell nuclear antigen), участвующего в репликации и репарации ДНК у эукариот, и гена циклина D1 [447]. При этом предполагается, что YB-3 взаимодействует с последовательностью ССААТ (инвертированный Y-box элемент) в промоторах этих генов. Однако вероятно, что активирующая роль YB-3 может быть опосредована другими факторами. Так, исследование Nie et al. [448] предполагает, что активация транскрипции гена циклина D1 является результатом активации ГТФазы RhoA комплексом YB-3 и GEF-H1 (фактором обмена гуаниловых нуклеотидов для RhoA). Кроме того, взаимодействие YB-3 с CDK4 приводит к ядерной локализации, что, вероятно, также стимулирует экспрессию циклина D1 [446].

С последовательностью ССААТ YB-3 связывается и в промоторе гена *ErbB-2* (рецептор эпидермального фактора роста 2) [449], но в этом случае YB-3 является ингибитором транскрипции. Интересно, что этот эффект зависит от плотности клеточной культуры. Такое поведение YB-3 связано с тем, что регуляция транскрипционной функции YB-3 может осуществляться посредством взаимодействия с белком плотных контактов ZO-1 (zonula occludens 1), который закоривает YB-3 в плотных контактах. Собственно говоря, отсюда произошло другое название YB-3 – ZONAB (ZO-1-associated nucleic acid binding protein). При высокой плотности клеточной культуры YB-3 локализуется в плотных контактах и не способен регулировать транскрипцию генов в ядре, но при низкой плотности YB-3 переходит в ядро и выполняет свою транскрипционную функцию, что способствует пролиферации клеток [446]. Оверэкспрессия ZO-1 даже в клетках при низкой плотности культуры приводит переходу YB-3 из ядра в плотные контакты и, как следствие, к усилению транскрипции гена *ErbB-2* [449].

Впрочем, для такой зависимости активности YB-3 от плотности клеточной культуры, возможно, необходим не только ZO-1, но и другие белки, такие как GEF H1/Lfc [448] и RalA [450], реагирующие на факторы, стимулирующие клеточный рост и деление.

Наконец с помощью кДНК-микрочипов было показано, что оверэкспрессия YB-3 коррелирует с активацией генов, которые вовлечены в репликацию ДНК, ремоделинг хроматина и репарацию ДНК [447], что подтверждает роль YB-3 в регуляции прохождения клеточного цикла и, возможно, в клеточном ответе на стресс [451]. Вероятно, YB-3 при этом подавляет транскрипцию генов, необходимых для дифференцировки клеток. Помимо описанного выше примера с геном *MYOG*, в пользу этого свидетельствуют данные исследования Lima et al. [452], согласно которым YB-3 в клетках проксимальных канальцев почки ингибирует экспрессию генов LRP2 и CUBN, которые необходимы для дифференцировки эпителиальных клеток, что способствует клеточной пролиферации.

Таким образом, в эпителиальных клетках YB-3 вовлечен в регуляцию транскрипции генов, связанных с пролиферацией и дифференцировкой клеток. При этом он является активатором экспрессии генов пролиферации и ингибитором генов, участвующих в дифференцировке. Необходимо отметить, что такая активность YB-3 по отношению к генам, кодирующим регуляторы клеточного цикла и дифференцировки, аналогична активности YB-1.

### **6.3. Участие YB-3 в регуляции стабильности мРНК**

Как и YB-1, YB-3 участвует в регуляции стабильности мРНК, однако пока известно лишь о довольно ограниченном наборе мРНК, чью стабильность контролирует YB-3. Так, в первой работе, затрагивающей этот аспект функционирования YB-3, было показано, что в ответ на стрессовые условия наблюдается специфичное связывание YB-3 с 3'НТО мРНК *p21* [453]. Это взаимодействие приводит к стабилизации мРНК *p21* и повышению уровня белка p21 – важного ингибитора пролиферации, что особенно важно в условиях стресса, когда необходимо остановить клеточный рост и деление до наступления благоприятных условий.

В недавней работе [144] было показано, что нокдаун YB-3 в клетках HeLa приводил к снижению уровня мРНК *SLC7A5* и *SLC3A2*, кодирующих белки-транспортёры аминокислот, что вызывало дефицит гидрофобных и ароматических аминокислот. Оказалось, что YB-3 регулирует стабильность этих мРНК, специфически связываясь с 3'НТО мРНК.

## **7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Всё обилие вышеизложенных данных о YB-1 может вызвать закономерный вопрос у читателя: а оставались ли еще белые пятна в изучении этого белка на момент начала работы над диссертацией? Малоисследованные области действительно еще были и имеются до сих пор. В частности, был не разрешён вопрос о регуляции экспрессии YB-1 на посттранскрипционном уровне, а именно, на уровне трансляции мРНК *YB-1*. Ответу на этот вопрос будет посвящена первая часть главы «Результаты и обсуждение» данной диссертационной работы.

Кроме того, с развитием новых методов генетической инженерии и методов высокопроизводительного анализа экспрессии генов появилась возможность исследовать влияние YB-1 на экспрессию генов в масштабах всего генома и, в перспективе, обнаружить все регулируемые им мишени. Эти исследования привели к неожиданным результатам, позволяющим говорить о регуляции белком YB-1 синтеза своего гомолога YB-3 и о функциональной взаимозаменяемости YB-1 и YB-3. Эти данные будут приведены во второй части главы «Результаты и обсуждение».



## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 1. Трансформация *Escherichia coli* плазмидной ДНК

К 100 мкл суспензии компетентных клеток *E. coli* добавляли 20-50 нг плазмидной ДНК или 10 мкл лигазной смеси, инкубировали 40 минут на льду. Далее суспензию инкубировали 90 секунд при 42°C и вновь переносили на лёд. Добавляли 900 мкл LB, инкубировали 40 минут при 37 °С. Трансформированные клетки выращивали в 200 мл LB или на агаризованной среде LB на чашках Петри.

### 2. Препаративный вариант выделения плазмидной ДНК из *Escherichia coli*

Для получения плазмидной ДНК использовали метод щелочного лизиса с некоторыми модификациями. Клетки культуры *E. coli* с плазмидой выращивали 12-17 часов при 37°C в среде LB объемом 50 мл в присутствии антибиотика, резистентность к которому обеспечивалась геном плазмиды. Клетки собирали центрифугированием при 4000 об/мин в течение 15 мин при 4°C, ресуспендировали в 2 мл раствора следующего состава: 25 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 10 мМ ЭДТА, 15% сахарозы, 10 мг/мл лизоцима и инкубировали на льду в течение 20 мин. К лизату клеток добавляли 4 мл свежеприготовленного раствора: 0,2 М NaOH, 1% додецилсульфат натрия (ДСН), и инкубировали на льду в течение 10 мин, осторожно помешивая. К суспензии добавляли 2,5 мл охлажденного раствора 3 М ацетата натрия (рН 5,2), перемешивали и инкубировали на льду в течение 20 мин. Клеточный дебрис и хромосомную ДНК удаляли центрифугированием при 12000 об./мин в течение 15 мин при 4°C. Супернатант переносили в стеклянную пробирку, добавляли 2 объема этанола и оставляли на 2 часа при -70°C. Преципитат осаждали центрифугированием при 6000 об/мин в течение 15 мин и растворяли в 1 мл H<sub>2</sub>O. К раствору добавляли 20 мкл РНКазы А (10 мг/мл). Смесь инкубировали в течение 2 часов при 37°C. Депротенинизацию плазмидной ДНК проводили двукратной обработкой смесью фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (в соотношении 24/24/1). К водной фазе добавляли 2 объема этанола и оставляли на 2 часа при -70°C. ДНК осаждали центрифугированием при 12000 об./мин в течение 10 мин при 4°C и растворяли в 0,4 мл H<sub>2</sub>O. К раствору добавляли 0,1 мл 4 М NaCl и 0,5 мл 13% водного раствора полиэтиленгликоля 8000. После инкубации на льду в течение 30 мин образовавшийся преципитат плазмидной ДНК собирали центрифугированием при 12000 об/мин в течение 10 мин при 4°C и растворяли в требуемом объеме H<sub>2</sub>O. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически, принимая, что 1 о.е. A<sub>260</sub> соответствует 50 мкг ДНК в 1 мл.

### 3. Аналитический вариант выделения плазмидной ДНК из *Escherichia coli*

Клетки культуры *E. coli* с плазмидой выращивали 12-17 часов при 37°C в среде LB объемом 2 мл в присутствии антибиотика, резистентность к которому обеспечивалась геном плазмиды. Клетки собирали центрифугированием при 12000g в течение 1 мин. Далее выделяли плазмидную ДНК с помощью наборов GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, США) или ZymoPURE Plasmid Miniprep (Zymo Research, США) согласно рекомендациям фирм-производителей.

### 4. Обработка ДНК эндонуклеазами рестрикции

Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 100 мкг/мл плазмидной ДНК, 1x буфер для соответствующей рестриктазы, 100 ед/мл соответствующей рестриктазы. Смесь инкубировали в течение 2 часов при температурном оптимуме рестриктазы. При препаративном варианте рестрикции ДНК реакционную смесь подвергали фенольной депротенизации и осаждению порезанной ДНК этанолом. Для этого к инкубационной смеси добавляли равный объем смеси фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (в соотношении 25/24/1), перемешивали, центрифугировали при 12000 об./мин в течение 5 мин при 4°C и отбирали верхнюю водную фазу. Эту процедуру повторяли со смесью хлороформ/изоамиловый спирт (в соотношении 24/1). К водной фазе добавляли ацетат натрия (рН 5,2) до конечной концентрации 0,3 М и 2 объема 96% этанола и инкубировали в течение 2 часов при -70°C. Образовавшийся преципитат линеаризованной плазмидной ДНК собирали центрифугированием при 12000 об./мин в течение 15 мин при 4°C, промывали 3 раза 70% этанолом, а затем растворяли в требуемом объеме H<sub>2</sub>O. При аналитическом варианте рестрикции ДНК в реакционную смесь после инкубации добавляли 1/5 объема буфера для образцов для электрофореза ДНК DNA Loading dye 6x (Thermo Fisher Scientific, США) или аналогичную смесь (10 мМ Трис-НСl (рН 7,6), 60 мМ ЭДТА, 0,03% бромфеноловый синий, 0,03% ксиленцианол, 60% глицерин) и анализировали продукты рестрикции электрофорезом ДНК в агарозном геле.

### 5. Полимеразная цепная реакция

Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала стандартный (с 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>) буфер для ДНК полимеразы Phusion (NEB, США), Pfu (Promega, США), Taq (Евроген, Россия) или High Fidelity PCR enzyme mix (Thermo Fisher Scientific, США), 0,025 ед/мкл ДНК полимеразы, 5 нг плазмиды или 1 мкл реакционной смеси после проведения обратной транскрипции (суммарная кДНК клеток) в качестве матрицы, 0,5 мкМ праймеров, комплементарных началу и концу необходимой последовательности ДНК («Синтол», Россия или «Евроген», Россия) и смесь

дНТФ (по 200 мкМ каждого). В случае амплификации GC-богатых матриц в реакционную смесь добавляли ДМСО до 3% или бетаин до 0,5М.

Далее с помощью амплификатора Mastercycler gradient (Eppendorf, Германия) или «БИС» М111-02-48 (Россия) проводили 25-30 циклов ПЦР: плавление - 15 секунд при 95°C; отжиг праймеров - 15 секунд при температуре, в каждом конкретном случае определяемой с помощью программы GeneRunner; элонгация – при 72°C в течение времени, определяемом исходя из ожидаемой длины продукта амплификации и скорости элонгации для используемой ДНК – полимеразы (для High Fidelity PCR enzyme mix – 1000 оснований в минуту, для Pfu-полимеразы – 500 оснований в минуту, для Taq-полимеразы – 2000 оснований в минуту, для Phusion-полимеразы – 2000 оснований в минуту).

## **6. Электрофорез ДНК в геле агарозы**

В препараты нуклеиновых кислот добавляли 1/5 объема буфера для образцов ДНК: DNA Loading dye 6x (Thermo Fisher Scientific, США) или аналогичной смеси (10 мМ Трис-НСl (рН 7,6), 60 мМ ЭДТА, 0,03% бромфеноловый синий, 0,03% ксиленцианол, 60% глицерин). Использовали 1% агарозный гель (для продуктов более 500 п.н.) или 2% агарозный гель (для продуктов менее 500 п.н.), содержащий 1x буфер ТАЕ. Электрофорез проводили в 1x буфере ТАЕ при напряженности электрического поля 10 В/см.

## **7. Выделение фрагментов ДНК из геля**

При необходимости продукты рестрикции или продукты ПЦР необходимой длины вырезали из геля и выделяли с помощью наборов GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, США) или Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, США) согласно рекомендациям фирм-производителей.

## **8. Лигирование линейных фрагментов ДНК с помощью Т4-ДНК-лигазы**

Для лигирования плазмиды и вставки реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 50-100 нг плазмидной ДНК и пятикратный избыток по молям ДНК-вставки, 5 ед. Т4-ДНК-лигазы (Thermo Fisher Scientific, США), буфер для Т4-ДНК лигазы (40 мМ Трис-НСl (рН 7,6), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ ДТТ, 0,5 мМ АТФ) и 5% PEG-8000 (в случае лигирования по «тупым» концам).

Смесь инкубировали 15 минут при 22°C в случае «липких» концов ДНК-фрагментов или 1 час при 22°C в случае «тупых» концов. Инактивацию фермента проводили при 65°C 10 мин. Полученной смесью с инактивированной лигазой трансформировали клетки *E. coli*.

## 9. Лигирование ДНК-фрагментов методом SLIC (Sequence and Ligation Independent Cloning)

50 нг амплифицированного и обработанного эндонуклеазой рестрикции *DpnI* вектора смешивали с пятикратным молярным избытком вставки (также продукта ПЦР). Для получения перекрывающихся липких концов смесь обрабатывали ДНК-полимеразой Т4 (NEB, США) в 1x буфере NEBuffer2.1 (NEB, США) в течение 20 мин при 22°C. Реакцию останавливали добавлением дЦТФ до конечной концентрации 0,5 мМ и инкубацией на льду в течение 5 мин. Для улучшения отжига перекрывающихся липких концов смесь инкубировали при 75°C в течение 20 мин, затем при 50°C в течение 10 мин и трансформировали ею клетки *Escherichia coli*.

## 10. Получение тотальной РНК из культур эукариотических клеток

Клетки на чашке промывали 2 раза холодным буфером PBS (137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 8 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и 2 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), добавляли 700 мкл реагента TRIzol LS (Invitrogen, США) или Qiazol Lysis Reagent (Qiagen, США), тщательно ресуспендировали, переносили в пробирку объемом 1,5 мл и инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Затем добавляли 200 мкл хлороформа, тщательно перемешивали и после 2-минутной инкубации при комнатной температуре центрифугировали при 12000g на центрифуге MiniSpin Plus (Eppendorf, Германия). К отобранной в новую пробирку водной фазе добавляли равный объем (около 450 мкл) изопропилового спирта (осч), перемешивали и после инкубации при -20°C в течение 1 часа центрифугировали 30 минут при 12000-20000g при 4°C. Далее отбирали супернатант, а осадок РНК промывали 2 раза 70% этанолом (центрифугировали после каждой промывки и отбирали супернатант), подсушивали 5 минут при комнатной температуре, а затем растворяли в требуемом объеме H<sub>2</sub>O.

Альтернативно, выделение РНК из клеток и тканей проводилось с помощью набора Direct-zol RNA Miniprep Kits (Zymo Research, США).

Концентрацию РНК в растворе определяли спектрофотометрически, принимая, что 1 о.е. A<sub>260</sub> соответствует 40 мкг РНК в 1 мл.

## 11. Получение препарата тотальной кДНК

Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 0,5-1 мкг тотальной РНК клеток, 25 пмоль праймера олиго(dT)<sub>20</sub>, 25 пмоль смеси гексануклеотидных праймеров с рандомизированной последовательностью (random primer), 200 ед. обратной транскриптазы Maxima H Minus Reverse Transcriptase with dsDNase (Thermo Fisher Scientific, США) и соответствующий буфер. Инкубацию реакционной смеси проводили 10 минут при 25°C, 30

минут при 50°C и 5 минут при 85°C. При необходимости в реакционную смесь добавляли 1 нг мРНК *NlucP* или *Fluc* как внутренний контроль.

## 12. Плазмидные конструкции и их получение

1. Плаزمида pBluescript II SK YB-1 WT и pBluescript II SK YB-1 A+, содержащие кДНК YB-1 кролика, а также плазмиды pBluescript II SK 3'UTRA-, pSP732part 1subfr, pBluescript II SK субфрагмент II, содержащие фрагменты 3'НТО кДНК YB-1, были описаны ранее [65, 454]. Плазмида pSP36TLuc(A50), содержащая кДНК люциферазы была описана ранее [455]. Плазмида pUC18 AβG была любезно предоставлена И.Н. Шатским [456]. pGL3-5'UTRGADD45-Luc была любезно предоставлена Ильей Терениным (Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского). Плазмида pGEX-6p1-h4E-BP1 была любезно предоставлена Ю. Свиткиным и Н. Соненбергом (Университет Макгилла, Монреаль). Плазмиды pET(eIF4AHis<sub>6</sub>-R362Q) и pсDNA-3.1-puro были любезно предоставлена С.Е. Дмитриевым (Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского). Плазмиды pSpCas9(BB)-2A-Puro и pSpCas9n(BB)-2A-Puro предоставлены лабораторией Feng Zhang [457] (плазмиды Addgene #48139 и #48141), pсDNA3-NA-YB-1 и pсDNA3-NA описана в статье [92], pGFP-c3 в статье [458], pNL2.2 SLU7 -NlucP в статье [459]. Указанные плазмиды предоставлены авторами.

2. Плазмида pBluescript II SK 3' UTR (BspT\_end) была получена путем вырезания фрагмента кДНК YB-1 из плазмиды pBluescript II SK YB-1wt эндонуклеазами рестрикции *KpnI* и *BspTI*, последующего тупления концов и самолигирования плазмиды.

3. Для получения плазмиды pPAL7\_hnRNPQ1 кДНК hnRNP Q (≈1800 п.о.) получали ПЦР-амплификацией тотальной кДНК из клеток HeLa с использованием прямого праймера 5'-CGTCGCACTAGTATGGCTACAGAACATGTTAATGGAAA-3' (введенный сайт рестрикции *SpeI* выделен жирным шрифтом) и обратного праймера 5'-ATGCGGCCGCTTACTACTTCCACTGTTGCCCAAAG-3' (введенный сайт рестрикции *NotI* выделен жирным шрифтом). С помощью указанных праймеров получали кДНК для изоформы 1 белка hnRNP Q – самой длинной и имеющей все возможные домены этого белка. Полученный ПЦР-продукт обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *SpeI* и *NotI* и лигировали с экспрессионным вектором pPAL7 (BioRad, США), обработанным теми же эндонуклеазами рестрикции.

4. Плазмиды pSP36T-5'UTR rYB1-Fluc-3'UTR GAPDH A50, pSP36T-5'UTR hYB1-Fluc-3'UTR GAPDH A50, pSP36T-5'UTR rYB1-Fluc-3'UTR YB1 A50, pSP36T-5'UTR hYB1-Fluc-3'UTR YB1 A50, pSP36T-β-globin-Fluc-3'UTR YB1 A50 и pSP36T-5'UTR b-globin-Fluc-3'UTR GAPDH A50 получали следующим образом:

3'НТО мРНК *YB-1* получали ПЦР-амплификацией pBluescript II SK YB-1 WT с помощью прямого праймера 5'-AGCAGGGCGGGGAGATCTAAATGCCGGCTTAA-3', и обратного праймера 5'-GGGCTGCAGGAATTCGCGGCCGCCTTTATTA-3' (сайты рестрикции *BglIII* и *NotI* выделены жирным шрифтом, стоп-кодон подчеркнут). Продукт ПЦР лигировали с вектором pBluescript II KS (Thermo Fisher Scientific, США), обработанную эндонуклеазой рестрикции *EcoRV*. Использовали клон с (+) ориентацией. Конструкцию назвали pBluescript II KS #1.

кДНК *Fluc* была получена ПЦР-амплификацией pSP36TLuc(A50) (Wakiyama et al., 1997) с помощью прямого праймера 5' GTCCATATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG AAA 3', обратный праймер — 5' CATTTTAGATCTTGGACTTTCGCCCTT 3' (сайт рестрикции *BglIII* выделен жирным шрифтом, стоп-кодон подчеркнут). Продукт ПЦР лигировали в pBluescript II KS (Thermo Fisher Scientific, США), обработанную *EcoRV*. Использовали клон с (+) ориентацией. Конструкцию назвали pBluescript II KS #2.

кДНК 3'НТО мРНК *YB-1* вырезали из pBluescript II KS #1 эндонуклеазами рестрикции *BglIII* и *NotI* (была обработана ДНК-полимеразой T4 для тупления концов) и лигировали с плазмидой pBluescript II KS #2, обработанной *BglIII* и *SalI* (была обработана ДНК-полимеразой T4 для тупления концов). Полученная конструкция была названа pBluescript II KS #3.

кДНК *Fluc*-3'НТО мРНК *YB-1* была вырезана из pBluescript II KS #3 эндонуклеазами рестрикции *XbaI* и *KpnI* (была обработана ДНК-полимеразой T4 для тупления концов) и лигирована с плазмидой pSP36T-5'UTR б-глобин-*Fluc* A50, обработанной эндонуклеазами рестрикции *XbaI* и *BglIII* (была обработана ДНК-полимеразой T4 для тупления концов). Полученная конструкция была названа pSP36T #4.

Замена сайта рестрикции *SmaI* на *HpaI* (после последовательности, кодирующей полиА хвост) была получена ПЦР-амплификацией pSP36T #4 с помощью прямого праймера 5' GTCCATATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAA 3' и обратного праймера 5' CGACCTGCAGGTTAAC(T50)AGATCCG 3' (сайт рестрикции *HpaI* выделен жирным шрифтом, сайт рестрикции *PstI* подчеркнут). Продукт ПЦР обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *XbaI* (находится в кодирующей последовательности *Fluc*) и *PstI* и лигировали с плазмидой pSP36T #4, обработанной теми же эндонуклеазами рестрикции. Полученная конструкция была названа pSP36T #5 (pSP36T-β-глобин-*Fluc*-3'UTR YB1 A50).

кДНК 3'НТО мРНК *GAPDH* получали ПЦР-амплификацией кДНК из клеток HeLa с помощью прямого праймера 5'-ATGGCCTCCAGATCTAAGACCCCTG-3' и обратного праймера 5'-CTCGAGCTCGAGGGTTGAGCACAGGGT-3' (сайты рестрикции *BglIII* и *XhoI* выделены жирным шрифтом, стоп-кодон подчеркнут). Продукт ПЦР обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *BglIII* и *XhoI* и лигировали с плазмидой pSP36T #5, обработанной

теми же эндонуклеазами рестрикции. Полученная конструкция была названа pSP36T-5'UTR b-globin-Fluc-3'UTR GAPDH A50.

кДНК 5'НТО мРНК *YB-1* кролика получали ПЦР-амплификацией плазмиды pBluescript II SK *YB-1* WT с помощью прямого праймера 5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГГГ-3' и обратного праймера 5'-СТГССС**АТГ**ГТТГСГГТГАТГГТГАСТГ-3' (сайт рестрикции *NcoI* выделен жирным шрифтом, стартовый кодон подчеркнут, сайт *HindIII* содержался в ПЦР-продукте). 5'НТО мРНК *YB-1* человека получали ПЦР-амплификацией тотальной кДНК из клеток HeLa с помощью прямого праймера 5'-ТАСА**АГ**СТТГТСТСГАГГГСТТАТСССГССТГТС-3' и обратного праймера 5'-СТГССС**АТГ**ГТТГСГГТГАТГГТГАСТГ-3' (сайты рестрикции *HindIII* и *NcoI* выделены жирным шрифтом, стартовый кодон подчеркнут). Продукты ПЦР обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *HindIII* и *NcoI* и лигировали с плазмидой pSP36T-5'UTR b-globin-Fluc-3'UTR GAPDH A50 или pSP36T-β-глобин-Fluc-3'UTR *YB1* A50, обработанных теми же эндонуклеазами рестрикции. Полученные конструкции были названы pSP36T-5'UTR r*YB1*-Fluc-3'UTR GAPDH A50, pSP36T-5'UTR h*YB1*-Fluc-3'UTR GAPDH A50, pSP36T-5'UTR r*YB1*-Fluc-3'UTR *YB1* A50 и pSP36T-5'UTR h*YB1*-Fluc-3'UTR *YB1* A50.

5. Плазмиды pSP36T-5'UTR*YB1*\_140-Fluc-3'UTR*YB1*\_A50, pSP36T-5'UTR*YB1*\_72-Fluc-3'UTR*YB1*\_A50, pSP36T-5'UTR*YB1*\_36-Fluc-3'UTR*YB1*\_A50 получали следующим образом. 5'НТО мРНК *YB-1* длиной 140 н. получали с помощью ПЦР с использованием в качестве матрицы плазмиды pSP36T-5'UTR h*YB1*-Fluc-3'UTR *YB1* A50 и праймеров 5'-ТАСА**АГ**СТТАГТТСГАТСГГТАГСГГГАГСГГА-3' и 5'-СТГССС**АТГ**ГТТГСГГТГАТГГТГАСТГ-3'. 5'НТО мРНК *YB-1* длиной 72 н. получали с помощью ПЦР с использованием в качестве матрицы плазмиды pSP36T-5'UTR h*YB1*-Fluc-3'UTR *YB1* A50 и праймеров 5'-ТАСА**АГ**СТТССТАГТТТССАТСАСАССССГГГ-3' и 5'-СТГССС**АТГ**ГТТГСГГТГАТГГТГАСТГ-3'. 5'НТО мРНК *YB-1* длиной 36 н. получали с помощью ПЦР с использованием в качестве матрицы плазмиды pSP36T-5'UTR h*YB1*-Fluc-3'UTR *YB1* A50 и праймеров 5'-ТАСА**АГ**СТТСАГСТСГСГСГСГСГСГ-3' и 5'-СТГССС**АТГ**ГТТГСГГТГАТГГТГАСТГ-3'. Сайты рестрикции *HindIII* и *NcoI* выделены жирным шрифтом, стартовый кодон подчеркнут). Продукты ПЦР обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *HindIII* и *NcoI* и лигировали с плазмидой pSP36T-β-globin-Fluc-3'UTR *YB1*\_A50, обработанной теми же эндонуклеазами рестрикции.

Плазмида pSP36T-5'UTR*YB1*\_140Δ36-Fluc-3'UTR*YB1*\_A50 была получена методом инверсного ПЦР с использованием в качестве матрицы плазмиды pSP36T-5'UTR*YB1*\_140-Fluc-3'UTR*YB1*\_A50 и праймеров 5'-АГСАТГГААГАСГССАААААСАТАААГА-3' и 5'-СТГСГГСТССТСССГГ-3' с последующим самолигированием ПЦР-продукта.

Плазмида pSP36T-5'UTRYB1\_140\_Δ36ins-Fluc-3'UTR GAPDH A50 была получена лигированием вышеуказанного ПЦР-продукта с двухцепочечным фрагментом ДНК, полученным отжигом ДНК-олигонуклеотидов 5'-AGCATAATCAGAATCGAATTCAGCATAAGCAGT-3' и 5'-ACTGCTTATGCTGAATTCGATTCTGATTATGCT-3'.

6. Плазмида pJET1.2-5'-UTRYB-1\_truncated была получена путем лигирования вектора pJET 1.2 (Thermo Fisher Scientific, США) с продуктом ПЦР, амплифицированным с использованием тотальной кДНК HeLa в качестве матрицы и праймеров 5'-GACTCGAGAGCCCCTGAGCAGCCCCAC-3' и 5'-CTGCCCATGGTTGCGGTGATGG TGA CTG-3'.

7. Плазмида pJET1.2-5'-UTR YB-1\_full была получена путем лигирования вектора pJET 1.2 (Thermo Fisher Scientific, США) с продуктом ПЦР, амплифицированным с использованием тотальной кДНК HeLa в качестве матрицы и праймеров 5'-GTCTCGAGGGCTTATCCCGCCTGTC-3' и 5'-CTGCCCATGGTTGCGGTGATGGTGA CTG-3'.

8. Плазмида pJET1.2-coding regionYB-1 была получена путем лигирования вектора pJET 1.2 (Thermo Fisher Scientific, США) с продуктом ПЦР, амплифицированным с использованием конструкции pBluescript II SK YB-1 WT в качестве матрицы и праймеров 5'-ATGAGCAGCGAGGCCGAG-3' и 5'-TТАCTCAGCCCCGCCCTG-3'.

9. Плазмиды pBluescript II SK\_YB-1alter\_long и pBluescript II SK-YB-1alter\_short были получены лигированием плазмиды pBluescript II SK-YB-1WT, обработанной эндонуклеазами рестрикции *XhoI* и *XagI*, с фрагментами (обработаны теми же эндонуклеазами рестрикции), полученными ПЦР-амплификацией с использованием тотальной кДНК HeLa в качестве матрицы и прямых праймеров 5'-TCCCTCACGTGCTCTCCGTC-3 (для длинной формы) или 5'-TGGAGAGAAAGGGCT GTCAGGTG-3 (для короткой формы) и обратного праймера 5'-ССАAGСТТАТТТАAGАССТТТАТТААСAGG-3',

10. Для получения плазмиды pBluescript II SK\_(AUG→AGA)\_YB-1alter два фрагмента, перекрывающиеся в области замены AUG на AGA, были получены ПЦР-амплификацией с использованием плазмиды pBluescript II SK\_YB-1alter\_long в качестве матрицы и праймеров 1 и 2 (5'-TCCCTCACGTGCTTCCCGTC-3' и 5'-GGCTTGGGtcTCCGGTC-3') или праймеров 3 и 4 (5'-GACCGGAGaCCCAAGCC-3' и 5'-CCCATAGGGTCTCCGCATG-3'). Полученные фрагменты объединяли с использованием перекрывающихся областей и фланкирующих праймеров 1 и 4. Перекрывающиеся праймеры содержали замены (отмечены строчными буквами), приводящие к замене AUG на AGA в альтернативной форме кДНК YB-1. Полученный продукт ПЦР лигировали с вектором pJET 1.2. Фрагмент ДНК размером ≈700 п.н., полученный обработкой этой промежуточной конструкции эндонуклеазами рестрикции *XhoI* и *XagI*, лигировали с плазмидой pBluescript II SK YB-1 WT, обработанной теми же эндонуклеазами рестрикции.



11. Для получения плазмиды pBluescript II SK\_(UAG(stop) →CAG)\_YB-1alter два фрагмента, перекрывающиеся в области замены UAG на CAG, были получены ПЦР-амплификацией с использованием плазмиды pBluescript II SK\_YB-1alter\_long в качестве матрицы и праймеров 1 и 2 (5'-TCCCTCACGTGCTTCCCGTC-3' и 5'-CGATTACCAGCTgTCSTTTTCCA-3') или праймеров 3 и 4 (5'-TGGAAAAGGAcAGCTGGTAATCG-3' и 5'-CCCATAGGGTCTCCGCATG-3'). Полученные фрагменты объединяли с использованием перекрывающихся областей и фланкирующих праймеров 1 и 4. Перекрывающиеся праймеры содержали замены (отмечены строчными буквами), приводящие к замене UAG на CAG в альтернативной форме кДНК YB-1. Полученный продукт ПЦР лигировали с вектором pJET 1.2. Фрагмент ДНК размером ≈700 п.н., полученный обработкой этой промежуточной конструкции эндонуклеазами рестрикции *XhoI* и *XagI*, лигировали с плазмидой pBluescript II SK YB-1 WT, обработанной теми же эндонуклеазами рестрикции.

12. Для получения плазмиды pBluescript II SK\_(AUCGUG→AUUUUG)\_YB-1alter два фрагмента, перекрывающиеся в области замены AUCGUG на AUUUUG, были получены ПЦР-амплификацией с использованием плазмиды pBluescript II SK\_YB-1alter\_long в качестве матрицы и праймеров 1 и 2 (5'-TCCCTCACGTGCTTCCCGTC-3' и 5'-САААСАAGССАааАТТАССАGС-3') или праймеров 3 и 4 (5'-GCTGGTAATttGGCTTGTTTTG-3' и 5'-CCCATAGGGTCTCCGCATG-3'). Полученные фрагменты объединяли с использованием перекрывающихся областей и фланкирующих праймеров 1 и 4. Перекрывающиеся праймеры содержали замены (показаны строчными буквами), приводящие к замене AUCGUG на AUUUUG в альтернативной форме кДНК YB-1. Полученный продукт ПЦР лигировали с вектором pJET 1.2. Фрагмент ДНК размером ≈700 п.н., полученный обработкой этой промежуточной конструкции эндонуклеазами рестрикции *XhoI* и *XagI*, лигировали с плазмидой pBluescript II SK YB-1 WT, обработанной теми же эндонуклеазами рестрикции.

13. Для получения конструкций pSP36T-5'UTR $\alpha$ 1-FLuc-3'UTR GAPDH-A50 и pSP36T-5'UTR rps20-FLuc-3'UTR GAPDH-A50 были синтезированы фрагменты 5'-НТО мРНК  $\alpha$ 1 и 5'-НТО мРНК rps20 ПЦР-амплификацией тотальной кДНК клеток HeLa с помощью прямых праймеров 5'-ATAAGCTTAAGAAGGTAGCGAGTGG ACGT-3' (для 5'-НТО  $\alpha$ 1) и 5'-TGAAGCTTCSTTTCTTTTTGAGGAAGAC-3' (для 5'-НТО rps20) и обратных праймеров 5'-ATCCATGGTCCCTCAGATCTTTCTC-3' (для 5'-НТО  $\alpha$ 1) и 5'-TGCCATGGCTGTTGCGCGGGCTT-3' (для 5'-НТО rps20). Сайты рестрикции *HindIII* и *NcoI* выделены жирным шрифтом. Продукты ПЦР обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *HindIII* и *NcoI* и лигировали с плазмидой pSP36T-5'UTR  $\beta$ -глобин-FLuc-3'UTR GAPDH-A50, обработанной теми же эндонуклеазами рестрикции.

14. Для получения конструкции рSP36Т-5'UTR EEF1A-FLuc-3'UTR GAPDH-A50 кДНК 5'-НТО мРНК *EEF1A*, полученная путем отжига двух олигонуклеотидов (5'-AGCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTGTCGTGAAAАСТАССССТ AAAAGCCAAAC-3' и 5'-CATGGTTTGCTTTTAGGGGTAGTTTTTTCACGACACCTGTG TTCTGGCGGCAAACCCGTTGCGAAAA-3'); образующиеся концы двухцепочечной ДНК аналогичны тем, которые образуются после обработки эндонуклеазами рестрикции *HindIII* и *NcoI*), была лигирована с плазмидой рSP36Т-5'UTR β-глобин-FLuc-3'UTR GAPDHA50, обработанной эндонуклеазами рестрикции *NcoI* и *HindIII*.

15. В некоторых случаях матрицу для синтеза мРНК получали ПЦР-амплификацией соответствующих плазмид:

15.1. Матрицу для синтеза *in vitro* полноразмерной (140 н. 5'НТО) мРНК *YB-1* человека получали ПЦР-амплификацией тотальной кДНК HeLa в с помощью прямого праймера 5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГГГАГТТСГАТСГГТАГСГГГАГСГ-3' (содержал последовательность промотора Т7 - выделена жирным шрифтом) и обратного праймера 5'-ССААГСТТАТТТАААГАССТТТАТТАААСАГГ-3'.

15.2. Матрицы для синтеза *in vitro* укороченной мРНК *YB-1* человека с 5'НТО длиной 103 н., 72 н. и 36 н. получали ПЦР-амплификацией с использованием плазмиды рBluescript II SK YB-1 WT в качестве матрицы, прямых праймеров 5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГГГССССАГАГАССТТА-3', 5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГГГСССТАГТТАССАТСАСАССССГГГ-3' и 5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГГГСАСГТГСССГАССССГГСС-3', соответственно, и обратного праймера 5'-ССААГСТТАТТТАААГАССТТТАТТАААСАГГ-3'.

15.3. Матрица для синтеза *in vitro* мРНК АUC→GAC-(60–58) YB-1 была получена следующим образом. Два фрагмента, перекрывающиеся в области замены АТС на GAC, были получены ПЦР-амплификацией с использованием плазмиды рBluescript II SK YB-1 WT в качестве матрицы и праймеров 1 и 2 (5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГГГАГТТСГАТСГГТАГСГГГАГСГ-3' содержал последовательность промотора Т7 (выделена жирным шрифтом) и 5'-СГГГГТГТГtGGТААСТАГГ-3' и праймеров 3 и 4 (5'-ССТАГТТАССgaСАСАСССС СГ-3' и 5'-ССААГСТТАТТТАААГАССТТТАТТАААСАГГ-3')). Полученные фрагменты объединяли с использованием перекрывающихся областей и фланкирующих праймеров 1 и 4. Перекрывающиеся праймеры содержали нуклеотидные замены (показаны строчными буквами), приводящие к замене кодона АUC на GAC в мРНК *YB-1*.

15.4. Матрица для синтеза *in vitro* мРНК *RLuc* была получена ПЦР-амплификацией плазмиды рGL3-RLuc22 с использованием прямого праймера 5'-СГСССГААТАСГАСТС

АСТАТАГГГТАСААГСТТАССАТГАСТТССГАААГТТТАТГАТССАГ-3' и обратного праймера 5'-(Т50)ААСТТГТТТАТТГСАГСТТАТААТГГ-3'.

15.5. Матрицы ДНК для синтеза фрагментов РНК, содержащих 5'НТО различных мРНК и фрагмент люциферазы светлячка и используемых в экспериментах по очистке белков, получали ПЦР-амплификацией с плазмид рSP36Т-5'UTRYB1\_140-Fluc-3'UTRYB1\_A50, рSP36Т-5'UTRYB1\_72-Fluc-3'UTRYB1\_A50, рSP36Т-5'UTRYB1\_36-Fluc-3'UTRYB1\_A50, рSP36Т-5'UTR rYB1-Fluc-3'UTR YB1 A50, рSP36Т-5'-UTR rps20-FLuc-3'-UTR GAPDH\_A50, рSP36Т-5'-UTR Araf1-FLuc-3'-UTR\_GAPDH-A50, рSP36Т-5'-UTR EEF1A-FLuc-3'-UTR\_GAPDH-A50, рSP36Т-5'UTR b-globin-Fluc-3'UTR GAPDH-A50 с использованием прямого праймера 5'-АТТТАГГТГАСАСТАТАГ-3' (комплементарен SP6 промотору плазмид) и обратного праймера 5'-ССАГГГСГТАТСТТКАТАГССТ-3' (комплементарен последовательности кДНК люциферазы. (83–106 н.).

15.6. Матрицу ДНК для синтеза мРНК *NlucP* получали ПЦР-амплификацией плазмиды рNL2.2SLU7-NlucP с использованием прямого праймера 5'-**ТААТАСГАСТСАСТАТАГ**GGATTACGAGATTGGCTTGGATTС-3' (промотор T7 подчеркнут) и обратного праймера 5'-TGTTGTТААСТТГТТТАТТГСАГСТТАТААТГ-3'.

15.7. Матрицу ДНК для синтеза 3'НТО мРНК *YB-3* получали ПЦР-амплификацией плазмиды рSP36Т-5'UTR YB-3-FLuc-3'UTR YB-3-A50 с использованием прямого праймера 5'-СТГ**АТТТАГГТГАСАСТАТАГА**ААССАГГСТССТСАГГС АС-3' (подчеркнута последовательность SP6-промотора) и обратного праймера 5'-ААСТСГАГСАТТСТГТСССТТГААГГГТАААААТТ-3'.

15.8. Матрицу ДНК для синтеза 100-н. фрагмента 3'НТО мРНК *YB-3* получали ПЦР-амплификацией плазмиды рSP36Т-5'UTR YB-3-FLuc-3'UTR YB-3-A50 с использованием прямого праймера 5'-СТГ**АТТТАГГТГАСАСТАТАГА**ААССССАГГ СТССТСАГГСАС-3' (подчеркнута последовательность SP6-промотора) и обратного праймера 5'-СТТГГТТАГТСТТССАСТТТАТТГСТТГ-3'.

16. Для получения плазмид рSP36Т-5'UTR YB-3-FLuc-3'UTR YB-3-A50, рSP36Т-5'UTR BTF3-FLuc-3'UTR YB-3-A50, рSP36Т-5'UTR YB-3-FLuc-3'UTR BTF3-A50 и рSP36Т-5'UTR BTF3-FLuc-3'UTR BTF3-A50 кДНК 5' и 3'НТО мРНК *YB-3* и мРНК *BTF3* были получены ПЦР-амплификацией тотальной кДНК клеток НЕК293Т. Для 5'НТО мРНК *YB-3* прямым праймером был олигонуклеотид 5'-АГААГСТТГАГСССААГАГСГ АГСГС-3', обратным – 5'-СТССАТГГСССТССТССТСТГСТСТСГ-3' (сайты рестрикции *HindIII* и *NcoI* выделены жирным шрифтом). Для 3'НТО мРНК *YB-3* прямым праймером был олигонуклеотид 5'-АГАГАТСТААССАГГСТСС ТСАГГСАС-3', обратным – 5'-ААСТСГАГСАТТСТГТСССТТГААГГГТАААААТТ-3' (сайты рестрикции *BglIII* и *XhoI*

выделены жирным шрифтом). Для 5'НТО мРНК *BTF3* прямым праймером был олигонуклеотид 5'-TAGA**AAGCTTCCSTTTAGCTGCCATCTTGCG**-3', обратным – 5'-TAGCCATGGCGCSTTCCSTCTCCTCCTCTGC-3' (сайты рестрикции *HindIII* и *NcoI* выделены жирным шрифтом). Для 3'НТО мРНК *BTF3* прямым праймером был олигонуклеотид 5'-TAGGGATCCTATAAATTGAGTCAACTTCTGAAGATAAAACC TGAAG-3', обратным – 5'-TAGCTCGAGTGATTTTAAATCTTTAATCAAATCCAAAGG -3' (сайты рестрикции *BamHI* и *XhoI* выделены жирным шрифтом). ПЦР-продукты обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *HindIII* и *NcoI* (для фрагментов 5'НТО) и *BglII* или *BamHI* и *XhoI* (для фрагментов 3'НТО) и последовательно лигировали с плазмидой рSP36T-5'UTR β-глобин-FLuc-3'UTR GAPDH-A50 (описана выше), обработанной теми же эндонуклеазами рестрикции.

17. Плазмиды рсDNA3.1-puro-YB-1 и рсDNA3.1-puro-YB-3 были получены следующим образом. кДНК YB-1, содержащая 5' и 3'НТО получали рестрикцией плазмиды рBluescript II SK YB-1 A50 (описана выше) по сайтам *HindIII* и *XbaI*. кДНК YB-3 была получена ПЦР-амплификацией тотальной кДНК клеток НЕК293Т с использованием прямого праймера 5'-AGAAGCTT**GAGCCCAAGAGCGAGCGC**-3' и обратного праймера 5'-AATCTAGAAAACATTCTGTCCTCTGAAGGGTAAAAATT-3' (сайты рестрикции *HindIII* и *XbaI* выделены жирным шрифтом). ПЦР-продукт обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *HindIII* и *XbaI*. Далее кДНК YB-1 и кДНК YB-3 лигировали с плазмидой рсDNA3.1-puro (любезно предоставлена Дмитриевым С.Е.), обработанной эндонуклеазами рестрикции *HindIII* и *XbaI*.

18. Плазида рсDNA3.1-puro-YB-1-YB-3 была получена путем лигирования фрагмента плазмиды рсDNA3.1-puro-YB-3 (содержит CMV промотор, кДНК YB-1 и сигнал полиаденилирования), вырезанного из указанной плазмиды эндонуклеазами рестрикции *BglII* и *DraI* (затуплена с помощью Т4- ДНК-полимеразы), с плазмидой рсDNA3.1-puro-YB-1, обработанной эндонуклеазами рестрикции *BglII* и *NruI*.

19. Плазмиды рNL2.2 YB-3\_Nluc\_YB3, рNL2.2 BTF3\_Nluc\_YB3, рNL2.2 YB-3\_Nluc\_BTF3 и рNL2.2 BTF3\_Nluc\_BTF3 были получены на основе плазмиды рNL2.2 АСТВ-NlucP [459]. С использованием этой плазмиды и праймеров 5'-ATGGTCTCACAСТC GAAGATTTTCGTTGG-3' и 5'-TTAGACGTTGATGCGAGCTG AAGCAC-3' методом ПЦР был получен фрагмент, содержащий кДНК Nluc. Плазмиды рSP36T-5'UTR YB-3/BTF3-FLuc-3'UTR YB-3/BTF3-A50 использовали для амплификации 5'- и 3'НТО мРНК *YB-3* и мРНК *BTF3* со следующими праймерами:

для 5'НТО мРНК *YB-3*: 5'-CAGCGGCGCGACGCGCCACCAAGAAAACTTGTG CGGGGCC-3'(прямой) и 5'-ATTCTCGAGTGTGAAGACCATGCCTCCTCCTCCTCTGCTC TCGC-3'(обратный);

для 3'НТО мРНК *УВ-3*: 5'-TCAGCTCGCATCAACGTCTAACACCCAGGCTCCT CAGGCACCTTC-3' (прямой) и 5'-CAAACATCATCAATGTATCTTATCATGTCTGCTCGA AACATTCTGTCCTCTGAAGGGTAAAAATT-3' (обратный);

для 5'НТО мРНК *BTF3*: 5'-CAGCGGCGCGACGCGCCACCACCCTTTAGCTGC CATCTTGCG-3' (прямой) и 5'-ATTCTCGAGTGTGAAGACCATCGCCTTCCTCTCCTCCT CTGC-3' (обратный);

для 3'НТО мРНК *BTF3*: 5'-TCAGCTCGCATCAACGTCTAAATTGAGTCAAATTC TGAAGATAAAACCTGAAG-3' (прямой) и 5'-CAAACATCATCAATGTATCTTATCATGT CTGCTCGTGATTTTAAATCTTTAATCAAATTCSSAAAGG-3' (обратный).

Различные комбинации 5'НТО и 3'НТО вводили в кДНК NlucP с помощью ПЦР с использованием перекрывающихся последовательностей. Конечные продукты ПЦР получали с использованием прямого праймера к мРНК 5'НТО *УВ-3/BTF3* и обратного праймера к 3'НТО мРНК *УВ-3/BTF3*. Очищенные продукты ПЦР лигировали методом SLIC с фрагментом pNL2.2ACTB, который получали путем ПЦР-амплификации плазмиды pNL2.2 ACTB-NlucP с использованием праймеров 5'-TGGTGGCGCG TCGCGCCGCTG-3' и 5'-CGAGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTG-3'.

20. Для получения плазмиды pNL2.2 *BTF3\_Fluc\_ BTF3* был синтезирован фрагмент *BTF3\_Fluc\_ BTF3* путем ПЦР-амплификации с использованием плазмиды pSP36T-5'UTR *BTF3-Fluc-3'UTR BTF3-A50* в качестве матрицы, прямого праймера 5'-CAGCGGCGCGACGCGCCACCACCCTTTAGCTGCCATCTTGCG-3' и обратного праймера 5'-CAAACATCATCAATGTATCTTATTCATGTCTGCTCGTGATTTAAAAAAA-3'. ПЦР-продукты лигировали с фрагментом pNL2.2ACTB методом SLIC.

### 13. Синтез РНК *in vitro*

РНК получали транскрипцией *in vitro* T7 или SP6 РНК-полимеразой с линейаризованной плазмиды.

Транскрипцию проводили либо с использованием набора HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit (NEB), либо набора T7 mScript™ Standard mRNA Production System (CellScript), либо набора SP6-Scribe™ Standard RNA IVT Kit (CellScript) в соответствии с руководством производителей, либо стандартным методом (Pokrovskaya and Gurevich, 1994) с некоторыми модификациями. В последнем случае реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 0,1 мкг/мкл плазмидной ДНК, 0,5 ед./мкл РНКазина, 5 ед./мкл РНК-полимеразы, 5 мМ каждого НТФ, 2 мМ спермидина, 80 мМ Hepes-КОН (рН 7,6), 18 мМ MgCl<sub>2</sub> и 40 мМ ДТТ.

Смесь инкубировали в течение 2 часов при 37°C. Для избирательного осаждения РНК к смеси добавляли LiCl до конечной концентрации 3 М, инкубировали в течение 10 мин при 4°C

(в этих условиях плазмидная ДНК не осаждается) и центрифугировали при 12000 об./мин в течение 15 мин при 4°C. Осадок РНК трижды промывали 70% этанолом и растворяли в требуемом объеме H<sub>2</sub>O. Концентрацию РНК в растворе определяли спектрофотометрически, принимая, что 1 о.е. A<sub>260</sub> соответствует 40 мкг РНК в 1 мл.

По выше описанным методикам были получены следующие РНК:

1. мРНК *YB-1* поли(A)<sup>-</sup>, длиной ≈1500 нуклеотидов, содержащая полную кодирующую последовательность, 5' и 3'НТО, была транскрибирована с использованием Т7 полимеразы с плазмиды рBluescript II SK *YB-1*, линейаризованной по сайту *BamHI*.

2. мРНК *YB-1* поли(A)<sup>+</sup>, длиной ≈1550 нуклеотидов, содержащая полную кодирующую последовательность, 5' и 3'НТО, была транскрибирована с использованием Т7 полимеразы с плазмиды рBluescript II SK *YB-1* A(50), линейаризованной по сайту *PstI*.

3. мРНК люциферазы (Luc) поли(A)<sup>-</sup>, длиной ≈1700 нуклеотидов с 5'НТО β-глобиновой mRNA была транскрибирована с использованием SP6 полимеразы с плазмиды рSP36T-LucA50, линейаризованной по сайту *BglII*.

4. мРНК люциферазы (Luc) поли(A)<sup>+</sup>, длиной ≈1750 нуклеотидов с 5'НТО β-глобиновой mRNA была транскрибирована с использованием SP6 полимеразы с плазмиды рSP36T-LucA50, линейаризованной по сайту *SmaI*.

5. фрагмент мРНК *YB-1* (с 965 по 1504 н.), содержащий 3'НТО, транскрибировали Т7 РНК-полимеразой с плазмиды рBluescript II SK 3'UTR A-, линейаризованной по сайту *BamHI*;

6. фрагмент III 3'НТО мРНК *YB-1* (с 1205 по 1504 н.) транскрибировали Т7 РНК-полимеразой с плазмиды рBluescript II SK 3'-UTR (*BspT\_end*), линейаризованной по сайту *BamHI*;

7. фрагмент I 3'НТО мРНК *YB-1* (с 1127 по 1205 н.) транскрибировали Т7 РНК-полимеразой с плазмиды рSP73 2part 1subfr, линейаризованной по сайту *BspTI*;

8. фрагмент II 3'-НТО мРНК *YB-1* (с 1205 по 1328 н.) транскрибировали Т7 РНК-полимеразой с плазмиды рBluescript II SK субфрагмент II, линейаризованной по сайту *DraI*;

9. 120 н. фрагмент неспецифической РНК транскрибировали Т7 РНК-полимеразой с плазмиды рBluescript II SK линейаризованной по сайту *Ecl136II*;

10. РНК β-глобина с актиновым лидером и фрагментом гена GFP (AβG) длиной ≈1200 н. транскрибировали Т7 РНК-полимеразой с плазмиды рUC18 AβG, линейаризованной по сайту *HindIII*;

11. поли(A)<sup>+</sup> мРНК люциферазы светлячка (*FLuc*) с 5'НТО мРНК *YB-1* кролика (rYB-1) или 5'НТО мРНК *YB-1* человека (hYB-1), а также 3'НТО мРНК *YB-1* транскрибировали РНК-

полимеразой SP6 с плазмид рSP36T-5'UTR *rYB1-Fluc*-3'UTR *YB1 A50* и рSP36T-5'UTR *hYB1-Fluc*-3'UTR *YB1 A50*, линейризованных по сайту *HpaI*.

12. поли(A)+ мРНК люциферазы светлячка (FLuc) с 5'НТО мРНК *YB-1* кролика (*rYB-1*) или 5'НТО мРНК *YB-1* человека (*hYB-1*), а также 3'НТО мРНК *GAPDH* транскрибировали РНК-полимеразой SP6 с плазмид рSP36T-5'UTR *rYB1-Fluc*-3'UTR *GAPDHA50* и рSP36T-5'UTR *hYB1-Fluc*-3'UTR *GAPDH A50*, линейризованных по сайту *HpaI*.

13. поли(A)+ мРНК люциферазы светлячка (FLuc) с 5'НТО мРНК *YB-1* длиной 140 н., а также 3'НТО мРНК *YB-1* транскрибировали РНК-полимеразой SP6 с плазмиды рSP36T-5'UTR *YB1\_140-Fluc*-3'UTR *YB1\_A50*, линейризованной по сайту *HpaI*.

14. поли(A)+ мРНК люциферазы светлячка (FLuc) с 5'НТО мРНК *YB-1* длиной 72 н., а также 3'НТО мРНК *YB-1* транскрибировали РНК-полимеразой SP6 с плазмиды рSP36T-5'UTR *YB1\_72-Fluc*-3'UTR *YB1\_A50*, линейризованной по сайту *HpaI*.

15. поли(A)+ мРНК люциферазы светлячка (FLuc) с 5'НТО мРНК *YB-1* длиной 36 н., а также 3'НТО мРНК *YB-1* транскрибировали РНК-полимеразой SP6 с плазмиды рSP36T-5'UTR *YB1\_36-Fluc*-3'UTR *YB1\_A50*, линейризованной по сайту *HpaI*.

16. поли(A)+ мРНК люциферазы светлячка (FLuc) с 5'НТО мРНК *YB-1* длиной 140 н. с делецией фрагмента 36 н. перед стартовым кодоном (мРНК *140\_Δ36\_YB-1-Fluc-YB-1*), а также 3'НТО мРНК *YB-1* транскрибировали РНК-полимеразой SP6 с плазмиды рSP36T-5'UTR *YB1\_140Δ36-Fluc*-3'UTR *YB1\_A50*, линейризованной по сайту *HpaI*.

17. поли(A)+ мРНК люциферазы светлячка (FLuc) с 5'НТО мРНК *YB-1* длиной 140 н. с заменой фрагмента 36 н. перед стартовым кодоном на другую последовательность (мРНК *140\_Δ36ins\_YB-1-Fluc-YB-1*), а также 3'НТО мРНК *YB-1* транскрибировали РНК-полимеразой SP6 с плазмиды рSP36T-5'UTR *YB1\_140Δ36ins-Fluc*-3'UTR *YB1\_A50*, линейризованной по сайту *HpaI*.

18. поли(A)+ мРНК люциферазы светлячка с 5'-НТО мРНК бета-глобина и 3'-НТО мРНК *GAPDH* транскрибировали РНК-полимеразой SP6 с плазмиды рSP36T-5'UTR *b-globin-Fluc*-3'UTR *GAPDHA50*, линейризованной по сайту *HpaI*.

19. поли(A)+ мРНК люциферазы *Renilla reniformis* (RLuc) транскрибировали РНК-полимеразой T7 с матрицы, полученной с помощью ПЦР-амплификации плазмиды рGL3-RLuc (см. подпункта 15.4 раздела 12).

20. поли(A)+ мРНК люциферазы светлячка (FLuc) с 5'НТО мРНК *Araf1* и 3'НТО мРНК *GAPDH* транскрибировали РНК-полимеразой SP6 с плазмиды рSP36T-5'-UTR *Araf1-FLuc*-3'-UTR *GAPDH-A50*, линейризованной по сайту *HpaI*.

21. поли(А)+ мРНК люциферазы светлячка (FLuc) с 5'НТО мРНК EEF1A и 3'НТО мРНК *GAPDH* транскрибировали РНК-полимеразой SP6 с плазмиды pSP36T-5'-UTR EEF1A-FLuc-3'-UTR\_GAPDH-A50, линейаризованной по сайту *HpaI*.

22. поли(А)+ мРНК люциферазы светлячка (FLuc) с 5'НТО мРНК *gps20* и 3'НТО мРНК *GAPDH* была транскрибирована РНК-полимеразой SP6 с плазмиды pSP36T-5'-UTR *gps20*-FLuc-3'-UTR GAPDH\_A50, линейаризованной по сайту *HpaI*.

23. поли(А)+ мРНК люциферазы светлячка (FLuc) с 5'НТО мРНК GADD45 была транскрибирована РНК-полимеразой T7 с плазмиды pGL3-5'UTR\_GADD45-Luc, линейаризованной по *XbaI*.

24. фрагменты мРНК, содержащие 5'НТО мРНК *YB-1* или мРНК *gps20*, или мРНК *Araf1*, или мРНК *EF1A*, или мРНК *бета-глобина* и 100 н. фрагмент мРНК люциферазы светлячка были транскрибированы РНК-полимеразой SP6 с соответствующих ПЦР продуктов, содержащих SP6-промотор и полученных с использованием в качестве матриц плазмид pSP36T-5'UTR *rYB1-Fluc*-3'UTR *YB1* A50, pSP36T-5'-UTR *gps20*-FLuc-3'-UTR GAPDH\_A50, pSP36T-5'-UTR *Araf1*-FLuc-3'-UTR\_GAPDH-A50, pSP36T-5'-UTR EEF1A-FLuc-3'-UTR\_GAPDH-A50, pSP36T-5'UTR *b-globin*-FLuc-3'UTR GAPDH-A50 (см. пункт 15.5. раздела 12).

25. мРНК *YB-1* с 5'НТО длиной 103 нуклеотида и 171 нуклеотид были транскрибированы РНК-полимеразой T7 с плазмид pJET1.2-5'-UTRYB-1\_truncated и pJET1.2-5'-UTRYB-1\_full (соответственно), линаризованных по сайту *XbaI*.

26. мРНК *YB-1* с 5'НТО длиной 103, 72 и 36 нуклеотидов), а также мРНК *YB-1* с заменой AUC→GAC в положении -(60–58) относительно стартового кодона были транскрибированы РНК-полимеразой T7 с соответствующих ПЦР продуктов, содержащих T7-промотор и полученных с использованием в качестве матрицы плазмиды pBluescript II SK *YB-1* WT (см. пункты 15.1-15.3. раздела 12).

27. Длинная и короткая альтернативные формы мРНК *YB-1* были транскрибированы РНК-полимеразой T7 с плазмид pBluescript II SK-*YB-1*alter\_long и pBluescript II SK-*YB-1*alter\_short, соответственно, линейаризованных по сайту *BamHI*.

28. Мутированные формы длинной альтернативной формы мРНК *YB-1*: (AUG→AGA) мРНК *aYB-1*, (UAG(stop)→CAG) мРНК *aYB-1* и (AUCGUG→AUUUUG) мРНК *aYB-1* транскрибировали РНК-полимеразой T7 с плазмид pBluescript. II SK-(AUG→AGA)*YB-1*alter, pBluescript II SK-(UAG(стоп)→CAG)*YB-1*alter, и pBluescript II SK-(AUCGUG→AUUUUG)*YB-1*alter, соответственно, линейаризованных по сайту *BamHI*.

29. мРНК *NlucP* (внутренний контроль для анализа распределения мРНК между полисомами и свободными мРНК) была транскрибирована T7-полимеразой с фрагмента,



содержащего T7-промотор и полученного ПЦР-амплификацией с использованием в качестве матрицы плазмиды pNL2.2SLU7-NlucP (см. пункт 15.6. раздела 12).

30. Поли(А)+ мРНК *YB-3\_Fluc\_YB-3* была транскрибирована с плазмиды pSP36T-5'UTR\_YB-3-FLuc-3'UTR\_YB-3-A50, линейаризованной по сайту *HpaI*.

31. Поли(А)+ мРНК *YB-3\_Fluc\_BTF3* была транскрибирована с плазмиды pSP36T-5'UTR\_YB-3-FLuc-3'UTR\_BTF3-A50, линейаризованной по сайту *HpaI*.

32. Поли(А)+ мРНК *BTF3\_Fluc\_YB-3* была транскрибирована с плазмиды pSP36T-5'UTR\_BTF3-FLuc-3'UTR\_YB-3-A50, линейаризованной по сайту *HpaI*.

33. Поли(А)+ мРНК *BTF3\_Fluc\_BTF3* была транскрибирована с плазмиды pSP36T-5'UTR\_BTF3-FLuc-3'UTR\_BTF3-A50, линейаризованной по сайту *HpaI*.

34. 3'НТО мРНК *YB-3* была транскрибирована SP6-полимеразой с фрагмента, полученного ПЦР-амплификацией плазмиды pSP36T-5'UTR\_YB-3-FLuc-3'UTR\_YB-3-A50 (см. пункт 15.7. раздела 12).

35. 5'НТО мРНК *YB-3* была транскрибирована с плазмиды pSP36T-5'UTR\_YB-3-FLuc-3'UTR\_YB-3-A50, линейаризованной по сайту *NcoI*.

36. 5'НТО мРНК *BTF3* была транскрибирована с плазмиды pSP36T-5'UTR\_BTF3-FLuc-3'UTR\_BTF3-A50, линейаризованной по сайту *NcoI*.

37. 100-н. фрагмент 3'НТО мРНК *YB-3* была транскрибирован SP6-полимеразой с фрагмента, полученного ПЦР-амплификацией плазмиды pSP36T-5'UTR\_YB-3-FLuc-3'UTR\_YB-3-A50 (см. пункт 15.8. раздела 12).

Для получения радиоактивно меченной РНК в реакционную смесь для транскрипции добавляли [ $\alpha$ - $^{32}$ P]УТФ (400 МБк/мл, 148 ТБк/моль, ИБХ, г. Москва, Россия) с уменьшением до 0,05 мМ нерадиоактивного "холодного" УТФ, а остальных НТФ до 0,5 мМ.

Для получения меченной BrU мРНК Rluc к реакционной смеси добавляли Бромурин-УТФ (Sigma-Aldrich, США, В7166) и снижали концентрацию немеченой УТФ до 0,25 мМ.

Для получения кэпированных мРНК в реакционную смесь для транскрипции добавляли кэп-аналог  $m^7G(5')ppp(5')G$  (GE Healthcare, США) до конечной концентрации 2 мМ, содержание ГТФ уменьшали до 0,2 мМ, а остальных НТФ до 2 мМ. мРНК также кэпировали с использованием системы кэпирования ScriptCap  $m^7G$  и фермента 2'-О-метилтрансферазы ScriptCap (CellScript) в соответствии с руководством производителя.

#### 14. Электрофорез РНК в полиакриламидном геле в присутствии мочевины

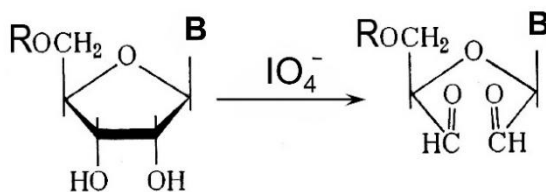
В препараты РНК добавляли мочевины (до 7 М), прогревали при 90°C в течение 1 минуты. Электрофорез проводили в 4% полиакриламидном геле (акриламид:метиленабисакриламид (АА:МБА) = 29:1) с мочевиной (7 М), приготовленном на

ТВЕ буфере (50 мМ трис-борат (pH 8,2), 5 мМ ЭДТА), на приборе фирмы Hoefer Scientific (США) при напряжённости электрического поля 10 В/см. В качестве электродного буфера использовали ТВЕ. Окраску геля осуществляли 0,05% раствором толуидинового синего в 7% уксусной кислоте.

### 15. Биотинилирование РНК

РНК биотинилировали как описано [460]. 50 мкг РНК окисляли в 50 мкл 66 мМ NaOAc-буфера (pH 4,5) с 5 мМ NaIO<sub>4</sub>. Реакцию проводили при 4°C в темноте в течение 45 мин. В результате реакции на 3' конце молекул РНК образуется диальдегидная группировка (Рис. 9А). Далее РНК осаждали изопропанолом и растворяли в 50 мкл H<sub>2</sub>O. К образцу окисленной РНК добавляли 5 мкл 1 М NaOAc (pH 6,1), 5 мкл 10% ДСН и 150 мкл 10 мМ биотин-гидразида (#203110, Sigma-Aldrich, США), свежерастворенного в ДМСО. Пробы инкубировали 5 часов при комнатной температуре (22–26°C) в темноте. В результате реакции гидразидной группы с альдегидной биотин оказывался ковалентно связан с РНК (Рис. 9Б).

#### Окисление 3' концевой цис-гликольной группировки РНК



#### Реакция с биотин-гидразидом

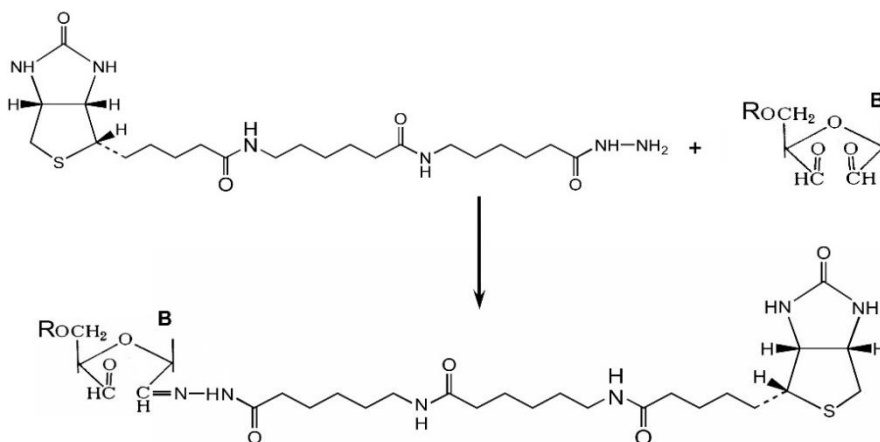


Рисунок 9. Схема реакции биотинилирования РНК по 3' концу

## 16. Выделение белков из лизата ретикулоцитов кролика и культивируемых клеток с использованием биотинилированной РНК

Подготовка смолы. Стрептавидин-сефарозу (GE Healthcare, США) промывали 5 раз 10 объёмами рабочего буфера: 20 мМ Нерес-КОН (рН 7,6), 100 мМ КСl, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ VRC (ванадил-рибонуклеозидный комплекс – ингибитор РНКаз). Центры неспецифической сорбции на смоле блокировали путём инкубации в течение ночи при 4°С в рабочем буфере, содержащем 0,2 мг/мл гликогена и 5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, при постоянном перемешивании. После инкубации смолу 5 раз промывали 10 объёмами рабочего буфера.

Подготовка лизата ретикулоцитов кролика или культивируемых клеток. Необработанный микрококковой нуклеазой лизат ретикулоцитов кролика или лизат культивируемых клеток доводили до солевого состава, аналогичного рабочему буферу, и инкубировали в течение 2,5 часов при 4°С с подготовленной смолой. После осаждения смолы лизат дополнительно центрифугировали 15 мин при 12000 g для осаждения агрегировавших белков.

Выделение белков. Биотинилированную РНК предынкубировали в рабочем буфере с 10 мкл подготовленной смолы и 100-кратным избытком суммарной РНК *E. coli* в течение 30 мин при комнатной температуре. К раствору добавляли подготовленный клеточный лизат (из расчета 1,5 мл лизата на 40 мкг РНК) и инкубировали 1 час при комнатной температуре. Смолу с РНК-белковыми комплексами промывали 6 раз 10 объёмами рабочего буфера и 2 раза 10 объёмами буфера с повышенной концентрацией соли: 50 мМ Нерес-КОН (рН 7,6), 250 мМ КСl, 4,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ VRC. Белки элюировали буферным раствором: 80 мМ Трис-НСl (рН 6,8), 2% ДСН, 200 мМ 2-меркаптоэтанол, 10% глицерина и 0,0012% бромфенолового синего) и разделяли электрофорезом в 12% ДСН-ПААГ. Гель окрашивали Кумасси СВВ G250, интересующие белки вырезали из геля и идентифицировали масс-спектрометрией (методом пептидного фингерпринта) в Институте биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича.

## 17. Электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия

Электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) проводили по методу Лэмли. В препараты белка добавляли буферный раствор для образцов (до конечной концентрации его компонентов: 80 мМ Трис-НСl (рН 6,8), 2% ДСН, 196 мМ 2-меркаптоэтанола, 10% глицерина и 0,0012% бромфенолового синего).

Гель состоял из нижнего - 15% разделяющего полиакриламидного геля (АА:МБА = 40:0,6), приготовленного на буфере: 380 мМ Трис-НСl (рН 8,7), 0,1% ДСН, и верхнего - 5% концентрирующего геля, приготовленного на буфере: 130 мМ Трис-НСl (рН 6,8), 0,1% ДСН. В

качестве электродного буферного раствора использовали трис-глициновый буфер с ДСН (до 1 %). Электрофорез проводили при напряженности электрического поля 10-15 В/см. Гели окрашивали 0,04% раствором Кумасси R-250 (Pierce, США) в 20% этаноле и 5% уксусной кислоте.

Для детекции радиоактивно меченных белков высушенный гель экспонировали с рентгеновской пленкой (GE Healthcare, США) в течение 16-18 часов при  $-70^{\circ}\text{C}$  с последующим проявлением, либо с интенсифицирующим экраном (тип MS) с последующей детекцией с помощью автордиографической электронной фосфорной системы «Циклон» (Cyclone®StoragePhosphorSystem, Packard Instrument Company Inc.). Относительное количество радиоактивности определяли с помощью программы OptiQuant (ver. 03.00).

## 18. Иммуноблоттинг

Белки переносили из геля на нитроцеллюлозную мембрану в камере для электрофоретического переноса в буфере для переноса (25 мМ Трис-НСl pH 8,7, 90 мМ глицин, 10% изопропанол, 0,1% ДСН). Для предотвращения неспецифической сорбции мембрану инкубировали в TBS (10 мМ Трис-НСl pH 7,6, 150 мМ NaCl) с 5% сухим обезжиренным молоком 1 час при комнатной температуре. Затем инкубировали мембрану в растворе, содержащем TBS-T (10 мМ Трис-НСl pH 7,6, 150 мМ NaCl, 0,05% Tween-20), 5% БСА и первичные антитела (титр от 1:1000 до 1:10000 в зависимости от антител), 16-20 часов при  $4^{\circ}\text{C}$ . Промыли мембрану 3 раза в TBS-T по 5 минут. Далее инкубировали мембрану в растворе, содержащем TBS-T с 5% сухим обезжиренным молоком и вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (титр от 1:2000 до 1:10000), 1 час при комнатной температуре. Промывали мембрану 3 раза в TBS-T по 5 минут. Детектировали белки с помощью набора Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare, США) и плёнки Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare, США) согласно инструкциям фирмы-производителя. Используемые в работе антитела приведены в таблице 1

**Таблица 1. Список использованных антител**

Первичные антитела			
Антитела	Используемое разведение (титр)	Фирма-производитель	Каталожный номер
Анти-УВ-1	1:10 000	ИМТЭК	MSH P32
Анти-УВ-1	1:10 000	Sigma-Aldrich	Y0396
Анти-УВ-1	1:2 000	Cell Signaling Technology	4202S
Анти-УВ-1	1:2 000	Bethyl Laboratories	A303-231A

Анти- $\alpha$ -тубулин	1:10 000	Sigma-Aldrich	
Анти- фосфо-АКТ <sup>S473</sup>	1:1 000	Cell Signaling Technology	9271S
Анти-АКТ	1:1 000	Cell Signaling Technology	9272S
Анти- фосфо-p70S6K <sup>T389</sup>	1:1 000	Cell Signaling Technology	9234S
Анти- фосфо- rpS6 <sup>S240/244</sup>	1:1 000	Cell Signaling Technology	4858S
Анти- 4EBP1	1:1 000	Cell Signaling Technology	9644S
Анти- фосфо-4EBP1 <sup>T37/46</sup>	1:1 000	Cell Signaling Technology	2855S
Анти- 4E-BP1 (нефосфорилированный)	1:1 000	Cell Signaling Technology	4923S
Анти- фосфо- eIF4E <sup>S209</sup>	1:1 000	Cell Signaling Technology	9741S
Анти-eIF4E	1:1 000	Cell Signaling Technology	2067S
Анти- фосфо-eIF2 $\alpha$ <sup>S51</sup>	1:1 000	Cell Signaling Technology	3398S
Анти- фосфо-p44/42 МАРК(Erk1/2) <sup>Thr202/Tyr204</sup>	1:1 000	Cell Signaling Technology	9101S
Анти- фосфо -mTOR <sup>S2448</sup>	1:1 000	Cell Signaling Technology	2971S
Анти-mTOR		Cell Signaling Technology	2972S
Анти-eIF4G	1:1 000	Cell Signaling Technology	2469S
Анти-фосфо-eIF4G <sup>S1108</sup>	1:1 000	Cell Signaling Technology	2441S
Анти-eIF4A	1:1 000	Cell Signaling Technology	2013S
Анти-eIF4B	1:1 000	Cell Signaling Technology	3592S
Анти-rpL7	1:10 000	Sigma-Aldrich	SAB4502656
Анти-rps16		Abcam	ab26159
Анти- $\gamma$ B-3	1:2 000	Bethyl Laboratories	A303-070A
Анти-фибриларин	1:1 000	Cell Signaling Technology	2639S
Анти-NUP98	1:1 000	Cell Signaling Technology	2598S
Анти-Smad1	1:1 000	Cell Signaling Technology	6944
Анти-Smad2	1:1 000	Cell Signaling Technology	5339
Анти-Smad3	1:1 000	Cell Signaling Technology	9523
Анти-Smad4	1:1 000	Cell Signaling Technology	9515
Анти-циклин A2	1:1 000	Cell Signaling Technology	4656
Анти-циклин B1	1:1 000	Cell Signaling Technology	4138
Анти-циклин D1	1:1 000	Cell Signaling Technology	2978
Анти-циклин D2	1:1 000	Cell Signaling Technology	3741
Анти-циклин D3	1:1 000	Cell Signaling Technology	2936
Анти-циклин E1	1:1 000	Cell Signaling Technology	4129
Анти-циклин E2	1:1 000	Cell Signaling Technology	4132
Анти-p15/INK4B	1:1 000	Cell Signaling Technology	4822

Анти-p18/INK4C	1:1 000	Cell Signaling Technology	2896
Анти-p21 Waf1/Cip1	1:1 000	Cell Signaling Technology	2947
Анти-p27 Kip1	1:1 000	Cell Signaling Technology	2552
Анти-CDK4	1:1 000	Cell Signaling Technology	2906
Анти-CDK6	1:1 000	Cell Signaling Technology	3136
Анти-кальнексин	1:1 000	Cell Signaling Technology	2679
Анти-Rab5	1:1 000	Cell Signaling Technology	3547
Анти-β-тубулин	1:1 000	Cell Signaling Technology	2128,
<b>Вторичные антитела</b>			
<b>Антитела</b>	<b>Используемое разведение (титр)</b>	<b>Фирма-производитель</b>	<b>Каталожный номер</b>
Анти-IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP)	1:10 000	Sigma-Aldrich	A9169
Анти-IgG крысы, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP)	1:10 000	Sigma-Aldrich	A9037
Анти-IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP)	1:2 000	Cell Signaling Technology	7074
Анти-IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP)	1:2 000	Cell Signaling Technology	7076
Анти-IgG кролика, конъюгированные с Alexa Fluor 488	1:1 000	Invitrogen	A-11008

### 19. Выделение белков hnRNP Q, 4E-BP1 и eIF4A(R362Q), синтезированных в *Escherichia coli*.

Для экспрессии hnRNP Q бактериальные клетки *E. coli* (штамм BL21(DE3)) трансформировали плазмидой pPAL7/hnRNP Q и выращивали до оптической плотности  $A_{600} = 0,8$ . После индукции синтеза hnRNP Q (IPTG, конечная концентрация 0,5 мМ) клетки продолжали культивировать в течение 2 ч. Клетки собирали центрифугированием, осадок суспендировали в буфере: 20 мМ Hepes-KOH, pH 7,6, 300 мМ NaOAc, 5 мМ ЭДТА, 1 мг/мл лизоцима. Суспензию инкубировали 40 мин при 4° при слабом покачивании. Затем добавляли Triton X-100 до 1%, и продолжали инкубацию 10 мин. К полученному гомогенату добавляли по

10 мкл 5 мг/мл ДНКазы I и 5 мг/мл РНКазы А и инкубировали 15 мин при 30° для разрушения ДНК и РНК. Далее гомогенат центрифугировали 20 мин для осаждения клеточного дебриса. Полученный супернатант наносили на колонку со смолой eXact Profinity (Bio-Rad, США) и проводили процедуры согласно рекомендациям фирмы-производителя. Белки элюата анализировали электрофорезом в 12%-ном ПААГ в присутствии ДСН. Элюаты от нескольких хроматографий на колонке со смолой eXact Profinity объединяли и концентрировали. Полученный раствор наносили на колонку monoS HR 5/5 (GE Healthcare, США), уравновешенную стартовым низкосолевым буфером (20 мМ Hepes-КОН, рН 7,6, 100 мМ КСl, 5% глицерин, 0,5 мМ ФМСФ (Фенилметилсульфонил фторид), 0,5 мМ ДТТ). Колонку промывали 5 объемами стартового буфера, белки элюировали буфером с линейно возрастающей концентрацией КСl (от 100 мМ до 1 М). Белки собранных фракций анализировали электрофорезом в 12%-ном ПААГ в присутствии ДСН. Фракции, содержащие наибольшее количество чистого hnRNP Q, объединяли и концентрировали. Полученный препарат далее очищали методом гель-фильтрации на колонке Superose 12 (GE Healthcare, США), уравновешенной буфером: 20 мМ Hepes-КОН, рН 7,6, 200 мМ КСl, 1 мМ ДТТ, 5%-ный глицерин. Наиболее чистые фракции белка hnRNP Q объединяли и концентрировали. Чистоту полученного препарата hnRNP Q оценивали электрофорезом в 12%-ном ПААГ в присутствии ДСН. Концентрацию белка определяли, используя набор Micro BCA (Pierce, США), согласно протоколу фирмы.

Для экспрессии h4E-VP1 бактериальные клетки *E. coli* (штамм BL21(DE3)) трансформировали плазмидой pGEX-6p1-h4E-VP1 и выращивали до оптической плотности  $A_{600}=0,8$ . После индукции синтеза 4E-VP1-GST (IPTG, конечная концентрация 0,5 мМ) клетки продолжали культивировать в течение 3 ч. Клетки собирали центрифугированием, осадок суспендировали в буфере: 20 мМ Hepes-КОН, рН 7,6, 300 мМ NaCl, 5 мМ ДТТ, 1 мг/мл лизоцима и 0,5 мМ ФМСФ. Суспензию инкубировали 40 мин при 4° при слабом покачивании. Затем добавляли Triton X-100 до 1%, и продолжали инкубацию 10 мин. К полученному гомогенату добавляли по 10 мкл 5 мг/мл ДНКазы I и 5 мг/мл РНКазы А и инкубировали 15 мин при 30°С для разрушения ДНК и РНК. Далее гомогенат центрифугировали 20 мин для осаждения клеточного дебриса. Полученный супернатант наносили на колонку со смолой глутатион-сефарозой 4В, уравновешенной буфером PBS, и проводили промывку 10 объемами (по отношению к объему колонки) буфера 50 мМ Трис-НСl (рН 7,0), 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ. Затем к смоле добавляли 1 объем того же буфера, но с PreScission Protease (GE Healthcare, США) в концентрации 80 ед./мл для протеолитического отщепления 4E-VP1 по сайту, находящемуся между 4E-VP1 и GST. Далее проводили инкубацию в течение 4 часов при 4°С. Элюцию проводили путем добавления к смоле 2 объемов буфера для промывки. Затем

элюат подвергали диализу против буфера 20 мМ Непес-КОН, рН 7,6, 100 мМ КСl, 1 мМ ДТТ, 5% глицерин. При необходимости препарат концентрировали с помощью концентратора Centricon (Millipore, США). В экспериментах по трансляции *in vitro* к трансляционной смеси добавляли очищенный белок 4E-ВР1 в объеме менее 1,5 мкл и инкубировали в течение 5 мин перед добавлением репортерных мРНК. В контроле добавляли равное количество буфера для диализа. Концентрацию белка определяли, используя набор Micro BCA (Pierce, США), согласно протоколу фирмы.

Для экспрессии eIF4A(R362Q) бактериальные клетки *E. coli* (штамм BL21(DE3)) трансформировали плазмидой рЕТ(His6-R362Q), кодирующей eIF4A(R362Q) человека, и выращивали до оптической плотности  $A_{600} = 0,8$ . После индукции синтеза eIF4A(R362Q)<sub>His6</sub> (IPTG, конечная концентрация 0,5 мМ) клетки продолжали культивировать в течение 3 ч. Клетки собирали центрифугированием, осадок суспендировали в буфере: 20 мМ Непес-КОН, рН 7,6, 500 мМ NaCl, 5 мМ ДТТ, 1 мг/мл лизоцима и 0,5 мМ ФМСФ. Суспензию инкубировали 40 мин при 4° при слабом покачивании. Затем добавляли Triton X-100 до 1%, и продолжали инкубацию 10 мин. К полученному гомогенату добавляли по 10 мкл 5 мг/мл ДНКазы I и 5 мг/мл РНКазы А и инкубировали 15 мин при 30° для разрушения ДНК и РНК. Далее гомогенат центрифугировали 20 мин для осаждения клеточного дебриса. Полученный супернатант наносили на колонку со смолой TALON® Metal Affinity Resin (Clontech) объемом 2 мл, уравновешенную буфером 20 мМ Непес-КОН (рН 7,6), 500 мМ NaCl. Далее колонку промывали 10 объемами буфера для промывок (20 мМ Непес-КОН (рН 7,6), 500 мМ NaCl, 10 мМ имидазола) и элюировали 2 объемами буфера 20 мМ Непес-КОН (рН 7,6), 500 мМ NaCl, 200 мМ имидазола), собирая фракции по 250 мкл. Фракции, содержащие наибольшее количество белка объединяли и подвергали диализу против буфера 20 мМ Непес-КОН, рН 7,6, 100 мМ КСl, 1 мМ ДТТ, 5% глицерин. При необходимости препарат концентрировали с помощью концентратора Centricon (Millipore, США). Концентрацию белка определяли, используя набор Micro BCA (Pierce, США), согласно протоколу фирмы.

## 20. Дефосфорилирование РНК

Фрагмент РНК (10 мкг) инкубировали в буфере: 50 мМ Трис-НСl (рН 8,5), 0,1 мМ ЭДТА, в присутствии 4 ед. щелочной фосфатазы (Thermo Fisher Scientific, США) при 37°С в течение 30 мин. Реакцию останавливали прогреванием при 65°С в течение 10 мин. Затем добавляли равный объем смеси фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (25/24/1), перемешивали и центрифугировали при 12000 г в течение 5 мин, после чего отбирали верхнюю водную фазу. Эту процедуру повторяли со смесью хлороформ/изоамиловый спирт (24/1). К водной фазе добавляли ацетат натрия (рН 5,2) до конечной концентрации 0,3 М и 3 объема 96% этанола и



инкубировали в течение 2 часов при  $-70^{\circ}\text{C}$ . РНК осаждали центрифугированием при 12000 g в течение 15 мин, промывали 3 раза 70% этанолом и растворяли в требуемом объеме  $\text{H}_2\text{O}$ .

### **21. Мечение фрагмента РНК по 5'-концу и очистка**

Дефосфорилированный фрагмент РНК инкубировали в присутствии  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ АТФ (400 МБк/мл, 148 ТБк/моль, ИБХ, г. Москва, Россия) и Т4-полинуклеотидкиназы (Thermo Fisher Scientific, США) 30 мин при  $37^{\circ}\text{C}$  согласно рекомендациям фирмы. В реакционную смесь добавляли мочевины до концентрации 8 М, наносили на 3,8 % ПААГ гель с 8 М мочевиной и проводили электрофорез. Затем вырезали кусочек геля с фрагментом РНК нужной длины и экстрагировали РНК из геля буфером: 100 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 500 мМ NaCl, 10 мМ ЭДТА, 0,1% додецилсульфат лития. Затем добавляли равный объем смеси фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (25/24/1), перемешивали и центрифугировали при 12000 g в течение 5 мин, после чего отбирали верхнюю водную фазу. РНК осаждали 3 объемами 96% этанола в течение 2 часов при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Осадок РНК собирали центрифугированием при 12000 g в течение 15 мин, промывали 3 раза 70% этанолом и растворяли в требуемом объеме  $\text{H}_2\text{O}$ .

### **22. Связывание комплексов hnRNP Q и РНК на нитроцеллюлозных фильтрах**

Увеличивающиеся количества hnRNP Q инкубировали с 0,02 пмоль  $^{32}\text{P}$ -меченного фрагмента РНК в течение 15 мин при  $30^{\circ}\text{C}$  в 50 мкл буфера для связывания: 20 мМ HEPES-KOH (рН 7,6), 100 мМ KCl, 2 мМ  $\text{MgCl}_2$ . Реакционную смесь фильтровали через нитроцеллюлозную (Hybond ECL, GE Healthcare, США) и нейлоновую (Hybond N+, GE Healthcare, США) мембраны, используя прибор Bio-dot (Bio-Rad, США).  $^{32}\text{P}$ -метка, задержавшаяся на нитроцеллюлозной и нейлоновой мембранах была детектирована, а её количество оцифровано, с помощью электронной фосфорной системы Cyclone®StoragePhosphorSystem (Packard Instrument Company Inc.). Кажущаяся константа диссоциации ( $K_{\text{Dapp}}$ ) принималась равной концентрации белка, при которой на нитроцеллюлозной мембране задержалось 50%  $^{32}\text{P}$ -меченной РНК, и была вычислена из графика зависимости доли связанной  $^{32}\text{P}$ -меченной РНК от концентрации белка. Доля связанной  $^{32}\text{P}$ -меченной РНК определялась как отношение количества метки, задержавшейся на нитроцеллюлозной мембране к количеству метки, задержавшейся на нитроцеллюлозной и на нейлоновой мембранах.

### **23. Бесклеточная система трансляции (БСТ) из ретикулоцитов кролика**

Стандартная бесклеточная система трансляции из ретикулоцитов кролика была приготовлена на основе методики Пелхэма и Джексона.

Бесклеточная система трансляции объемом 15 мкл содержала: 50% безмитохондриального лизата ретикулоцитов кролика, 100 мкг/мл креатинфосфокиназы, 20 mM Нерес-КОН (pH 7,6), 1 mM ДТТ, 8 mM креатинфосфат, 0,5 mM спермидин, 1 mM АТР, 0,2 mM ГТФ, 0,025 mM каждой аминокислоты (в случае использования [<sup>35</sup>S]-метионина – без метионина), 30-120 mM CH<sub>3</sub>COOK, 0,5-1 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 0,3 мкл [<sup>35</sup>S]-метионина (560 МБк/мл; 37 ТБк/моль, GE Healthcare, США).

Для анализа активности экзогенных мРНК использовали безмитохондриальный лизат ретикулоцитов кролика, обработанный микрококковой нуклеазой. мРНК добавляли в систему до конечной концентрации 5,3-6,6 мкг/мл. Систему инкубировали 1,5 часа при 30°C.

При использовании [<sup>35</sup>S]-метионина после окончания инкубации 5 мкл реакционной смеси разделяли ДСН-гель электрофорезом. Гели окрашивали Кумасси R-250 (Pierce, США), высушивали и экспонировали либо с рентгеновской пленкой (GE Healthcare, США) в течение ночи при -70°C, либо с интенсифицирующим экраном (тип MS) и детектировали с помощью автордиографической электронной фосфорной системы «Циклон» (Cyclone®StoragePhosphorSystem, Packard Instrument Company Inc.). Относительное количество радиоактивности определяли с помощью программы OptiQuant (ver. 03.00).

#### 24. Поддержание клеточных культур

Клетки NIH3T3, Hela, CHO, Vero и HEK293 были любезно предоставлены д-ром Еленой Надеждиной (Институт белка РАН). Клетки PC-3, MCF7 и Ms были любезно предоставлены профессором Ставровской А.А. (Российский научный онкологический центр им. Н.Н.Блохина). Клетки NIH3T3, HEK293, Vero, CHO культивировали на пластиковых чашках (Corning, США) в среде DMEM (Панэко, Россия или Corning, США), с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (Hyclone, США), 4 mM глутамин (Панэко, Россия), 100 ед. мл пенициллина и 100 мкг стрептомицина (ПанЭко, Россия). Клетки HeLa, MCF7, Ms культивировали на пластиковых чашках (Corning, США) в среде DMEM/F12 (Панэко, Россия или Corning, США) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (Hyclone, США), 2 mM глутамин (Панэко, Россия), 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг стрептомицина (Панэко, Россия). Клетки PC-3 культивировали на пластиковых чашках (Corning, США) в среде RPMI-1640 (Панэко, Россия) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (Hyclone, США), 2 mM глутамин (Панэко, Россия), 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг стрептомицина (ПанЭко, Россия). Клетки инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. По мере роста клетки периодически пересеивали, предварительно обработав раствором трипсина и ЭДТА (ПанЭко, Россия) для отсоединения от пластика.

Количество клеток в эксперименте, если это было необходимо, определяли с помощью автоматического счетчика клеток Countess (Invitrogen, США).

## **25. Получение экстрактов органов кролика и экстрактов культивируемых клеток для иммуноблоттинга и анализа распределения мРНК между фракциями полисом и свободных мРНК**

Образцы тканей кроликов были получены из ИТЭБ РАН (Пушино, Россия). Перед использованием в эксперименте кролики содержались в стандартных условиях барьерной зоны с соблюдением Программы содержания и использования животных и всех манипуляций с ними. Эксперименты выполняли в соответствии с этическими стандартами в исследованиях на животных, утвержденными Комиссией Института по биологической безопасности и этике, созданной 3 октября 2011 г. (№ 173/к). Ткани кролика (мозг, сердце, селезенка, легкое, почка, семенник, печень и мышца) гомогенизировали с использованием гомогенизатора Даунса в буфере для образцов ДСН-электрофореза или в буфере, содержащий 20 мМ HEPES-KOH (pH 7,6), 100 KCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ ДТТ, 0,25% Nonidet P-40, 0,2% ДСН и смесь ингибиторов протеазы (Roche, Швейцария). Лизат центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин для осаждения клеточного дебриса.

Культивируемые клетки промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и лизировали на чашке в буфере для образцов ДСН-электрофореза или дважды промывали ледяным PBS, содержащим 0,1 мг/мл циклогексимида, и лизировали непосредственно на чашке 400 мкл буфера для экстракции полисом (15 мМ Трис-HCl, pH 7,4, 15 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,3 М NaCl, 1% Triton X-100, 0,1 мг/мл циклогексимида, 1 мг/мл гепарина и 0,2 мМ VRC (ванадилрибонуклеозидный комплекс)). Лизат центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин для осаждения клеточного дебриса.

## **26. Нозерн-блоттинг**

Суммарную РНК из клеток или полисомные и постполисомные фракции лизатов выделяли с помощью TRIzol как описано в пункте 2.10. Тотальную РНК из тканей кролика экстрагировали путем гомогенизации с TRIzol с использованием гомогенизатора Даунса. Для денатурации к образцу объемом 10 мкл, содержащему 10-15 мкг РНК, добавляли равный объем 2х буфера для образцов (95% формамид, 1 мМ ЭДТА, 0,025% бромфеноловый синий, 0,025% бромистый этидий), прогревали в течение 15 минут при 65°C, а затем сразу переносили на лёд. Образцы разделяли электрофорезом в денатурирующем 1,5% агарозном геле, содержащем 2,2 М формальдегида и 1х MOPS буфер (40 мМ MOPS, 10 мМ ацетат натрия, 1 мМ ЭДТА (pH 7,0)). Далее РНК переносили на нейлоновую мембрану (Hybond-N, GE Healthcare, США) методом

капиллярного переноса в буфере 20x SSC (3M NaCl, 0,3M цитрат натрия (pH 7,0)) и сшивали с использованием трансиллюминатора-сшивателя (Vilber-Lourmat, Франция) при 0,15 Дж/см<sup>2</sup>. Связанную с мембраной РНК гибридизовали с фрагментом зонда кДНК YB-1 длиной 1055 нуклеотидов (нуклеотиды 1–1055, GeneBank U16821.1) или фрагментом зонда кДНК GAPDH длиной 466 нуклеотидов (нуклеотиды 870–1336, NM\_001256799.1), меченными [<sup>32</sup>P]дАТФ (2000 Ки/мМ; ИБХ, г.Москва, Россия) с использованием набора для мечения ДНК DecaLabel (Thermo Fisher Scientific, США), в гибридизационном буфере (0,5 М КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>/К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>, pH 7,4, 7% ДСН, 10 мМ ЭДТА) при 65°C в течение 16 ч. Мембрану дважды промывали 2x SSC, 0,1% ДСН в течение 5 мин при комнатной температуре, дважды 0,2x SSC, 0,1% ДСН в течение 5 мин при комнатной температуре, дважды 0,2x SSC, 0,1% ДСН в течение 15 мин при 42°C, и дважды с 0,1x SSC, 0,1% ДСН в течение 15 минут при 68°C, и анализировали автордиографией с использованием прибора Packard Cyclone Storage Phosphor System (Packard Instrument Company, Inc.).

## **27. Анализ распределения мРНК между фракциями полисом и свободных мРНК**

В пробирках для ротора TLA-100 (Beckman, США) 150 мкл экстрактов культивируемых клеток или тканей кролика наслаивали на 50 мкл 50% раствора сахарозы, приготовленного на буфере: 15 мМ Трис-НСl (pH 7,4), 15 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,3 М NaCl, 0,1 мг/мл циклогексимида, 1 мг/мл гепарина и 0,2 мМ VRC (ванадилрибонуклеозидный комплекс). Затем образцы центрифугировали при 90000 об/мин в течение 13 минут на центрифуге TL-100 (Beckman, США) при 4°C. РНК из супернатанта (свободные мРНК) и осадка (полисомные мРНК) выделяли с помощью TRIzol и анализировали с помощью Нозерн-блоттинга либо ОТ-ПЦР, либо ОТ-ПЦР в реальном времени.

## **28. Анализ уровня синтеза YB-1 в культивируемых клетках методом метаболического мечения**

Для мечения [<sup>35</sup>S]-метионином клетки культивировали на чашках диаметром 35 мм в среде DMEM без L-метионина, но содержащей 0,1 мКи/мл L-[<sup>35</sup>S]-метионина (Perkin Elmer, США, 1000 Ки/ммоль) в течение 1–2 ч. Клетки промывали PBS и лизировали 400 мкл буфера, содержащего 20 мМ Нерес-КОН (pH 7,6), 100 KCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ ДТТ, 0,25% Nonidet P-40, 0,2% ДСН и смесь ингибиторов протеаз (Pierce, Швейцария). Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 10000g в течение 15 мин, после чего экстракты непосредственно использовали для иммунопреципитации за антитела против YB-1. Для этого клеточные экстракты инкубировали с соответствующими антителами (поликлональными антителами крысы против 14-аминокислотного С-концевого пептида YB-1 (ИМТЭК, Россия) или

преиммунными антителами крыс (по 100 мкг)), и 20 мкл белок-G-сефарозы (GE Healthcare, США), уравновешенным буфером для лизиса в течение 2 ч при 4°C. После тщательной промывки PBS белки элюировали кислотнo-мочевинным раствором для образцов (8 М мочевины, 5% уксусная кислота, 0,025% метиленового синего) и анализировали с помощью электрофореза в кислотнo-мочевинном 10% полиакриламидном геле. Для детекции радиоактивно меченных белков высушенный гель экспонировали с интенсифицирующим экраном с последующей детекцией с помощью автордиографической электронной фосфорной системы «Циклон» (Cyclone®StoragePhosphorSystem, Packard Instrument Company Inc.). Относительное количество радиоактивности определяли с помощью программы OptiQuant (ver. 03.00).

### **29. Кислотно-мочевинный электрофорез белков**

В препараты белка добавляли раствор для образцов (до конечной концентрации его компонентов: 8 М мочевины, 5% уксусная кислота, 0,025% метиленового синего).

Гель состоял из нижнего - 10% разделяющего полиакриламидного геля (AA:МБА = 40:0,6), приготовленного на растворе 1М уксусной кислоты, 50 мМ гидроксида аммония и 8 М мочевины и верхнего - 5% концентрирующего геля, приготовленного из тех же компонентов. Для полимеризации геля использовали рибофлавин (до 0,0004%) и ТЕМЕД (до 0,5%). В качестве электродного буферного раствора использовали раствор 1М уксусной кислоты с глицином (0,1 М). Электрофорез проводили при напряженности электрического поля 20-25 В/см. При этом к верхней камере подключали «+» электрод, а к нижней «-» электрод. Гели окрашивали 0,04% раствором Кумасси R-250 в 20% этаноле и 5% уксусной кислоте.

### **30. Обработка клеток ксенобиотиками и стрессовые воздействия на клетки**

В экспериментах по анализу синтеза YB-1 методом метаболического мечения [<sup>35</sup>S]-метионином клетки обрабатывали PP242 (Sigma-Aldrich, США), конечная концентрация 1 мкМ), или Торином 2 (Tocris, США; конечная концентрация 0,25 мкМ), или рапамицином (Santa Cruz, США; конечная концентрация 0,1 мкМ), или вортманнином (Santa Cruz, США; конечная концентрация 0,5 мкМ), или U0126 (Santa Cruz, США; конечная концентрация 10 мкМ), или гиппуристанола (предоставлен Джерри Пелеттье (Jerry Pelletier, McGill University, Montreal, Canada)), конечная концентрация 0,2 и 0,4 мкМ) в течение 1 часа в среде без метионина, а затем еще 2 часа в среде, содержащей L-[<sup>35</sup>S]-метионин. В случае экспериментов с трансфекцией мРНК клетки обрабатывали указанными веществами в течение 1 часа, затем проводили трансфекцию репортерными мРНК люцифераз Fluc и Rluc и детектировали активность люцифераз через 2 часа.

Голодание клеток по сыворотке достигалось культивированием клеток в течение 48 часов на среде, в которую не добавляли эмбриональную телячью сыворотку.

Для гипоксического стресса клетки культивировали при уровне кислорода 1% в CO<sub>2</sub>-инкубаторе с возможностью контроля уровня кислорода Galaxy® 14 S (New Brunswick, США) в течение 16 часов.

### **31. Трансфекция клеток генетическими мРНК и конструкциями**

Временную трансфекцию клеток генетическими конструкциями и мРНК проводили с использованием Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США) или Lipofectamine 3000 (Invitrogen, США) согласно протоколу фирмы-производителя.

### **32. Измерение активности люциферазы в клетках**

Для каждой конкретной репортерной мРНК трансфекцию проводили в одной лунке планшета, а затем пересеивали трансфицированные клетки на чашки меньшего размера, которые затем использовали для технических повторений тестовых и контрольных условий. Трансфекцию разными репортерными мРНК проводили одновременно.

При трансфекции клеток плазидами, кодирующими люциферазы, на следующий день после трансфекции клетки пересеивали на чашки меньшего размера, которые через сутки использовали для технических повторений тестовых и контрольных условий. Половину чашек использовали для анализа активности люцифераз, а другую для анализа уровня мРНК люцифераз методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Активность NlucP и Fluc измеряли с использованием системы анализа люциферазы Nano-Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega, США). Активность Rluc и Fluc измеряли с использованием системы анализа люциферазы Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega, США). Культивируемые клетки лизировали буфером для пассивного лизиса (PLB, Promega, США) в течение 10 мин при комнатной температуре. Ферментативную активность люцифераз определяли на люминометре GloMax 20/20 (Promega).

### **33. Анализ последовательности 5'-концов мРНК (5'RACE, 5' Rapid Amplification of cDNA Ends)**

Анализ проводили с использованием набора для амплификации кДНК Mint RACE («Евроген», Россия) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Использовали два ген-специфичных праймера 5'-AGGCGCCGCCGATGTGAGG-3' и 5'-CTGCCCATGGTTGCGGTGATGGTGACTG-3'.

### 34. Анализ длины 5'НТО мРНК *YB-1* с помощью РНКазы Н

10 мкл раствора, содержащего 20 пмоль праймера 5'-GTTGCGATGACCTTCTTGTCC-3', комплементарного последовательности мРНК *YB-1* на расстоянии 150 нуклеотидов от стартового кодона, и 30 мкг тотальной РНК клеток линий HeLa или HEK293T, или NIH3T3, или лизата ретикулоцитов кролика, инкубировали 5 минут при 70 °С. Далее растворы медленно охлаждали до комнатной температуры. К растворам добавляли по 2,5 мкл 5х буфера для РНКазы Н (200 мМ Hepes-КОН (рН 7,6), 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, 300 мМ KCl, 5 мМ ДТТ) и по 1 ед. РНКазы Н (Thermo Fisher Scientific, США) в 1х буфере для РНКазы Н. Реакционную смесь инкубировали 30 минут при 37°С и добавляли к ней равный объем 2х буфера для образцов (95% формамид, 1 мМ ЭДТА, 0,025% бромфеноловый синий, 0,025% бромистый этидий), прогревали в течение 15 минут при 65°С, а затем сразу переносили на лёд. Образцы разделяли электрофорезом в денатурирующем 6% полиакриламидном геле (АА:МБА – 19:1), содержащем мочевины (7М) в буфере TBE. РНК из геля переносили на нейлоновую мембрану с помощью камеры для электрофоретического переноса в буфере TAE в течение 1 часа. Мембрану высушивали и обрабатывали ультрафиолетом (254 нм) 0,1 J/см<sup>2</sup> для сшивки РНК с мембраной. Далее проводили гибридизацию с [<sup>32</sup>P]-меченным ДНК-зондом к 5'НТО мРНК *YB-1* как описано в разделе 2.26.

### 35. Количественная ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР в реальном времени)

Суммарную РНК получали из клеток, фракций полисомной и свободной мРНК или иммунопреципитатов с использованием реагента TRIzol LS (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с рекомендациями производителя. 0,5 или 1 мкг тотальной РНК использовали в реакции обратной транскрипции с обратной транскриптазой Maxima H Minus (Thermo Fisher Scientific, США) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Количественную ПЦР в реальном времени проводили на системе DTLite Real-Time PCR System (ДНК-Технология, Россия) с использованием реакционной смеси qPCRMix-HS SYBR+LowROX (Евроген, Россия). Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 0,5 мкл смеси реакции обратной транскрипции и по 0,2 мкМ праймеров (Таблица 2). Использовали следующие условия амплификации: 5 мин при 95°С, затем 50 циклов: 95°С – 10 с, 57°С – 20 с, 72°С – 10 с. В экспериментах по измерению относительного количества мРНК расчет значения представленности транскриптов проводился с помощью программы REST2009 (<https://www.gene-quantification.de/rest-2009.html>) относительно мРНК *BTF3* и 18S рРНК. В экспериментах по измерению относительного количества мРНК люцифераз в клетках после трансфекции значения представленности транскриптов были нормализованы к таковой для мРНК *NlucP* или *RLuc*, использованных в качестве внутреннего контроля на стадии обратной транскрипции. Для РНК из

иммунопреципитата за антитела против BrU значения распространенности транскриптов нормализовали к таковым для BrU-меченной мРНК Rluc, использованной в качестве внутреннего контроля на стадии иммунопреципитации.)

**Таблица 2. Праймеры, использованные в ОТ-ПЦР в реальном времени**

<b>РНК-мишень</b>	<b>Последовательности праймеров</b>	
<b>18S рРНК</b>	<b>For_18S</b>	CAGTAAGTGCGGGTCATAAG
	<b>Rev_18S</b>	CTAAACCATCCAATCGGTAGTAG
<b>BTF3</b>	<b>For_BTF3</b>	CAGAAAGAAGAAGGTGGTTCATAGA
	<b>Rev_BTF3</b>	ATGCCTGAACTTTAGGGTTGTT
<b>YB-1</b>	<b>For_YBX1</b>	AGGCGAAGGTTCCACCTTA
	<b>Rev_YBX1</b>	GTTGTCAGCACCTCCATCA
<b>YB-3 (обе изоформы)</b>	<b>For_YBX3</b>	TGGCCCGGATGGAGTTCCTG
	<b>Rev_YBX3</b>	GGCAGGTCGTGGGCGA
<b>FLuc</b>	<b>For_FLuc</b>	GGATTACCAGGGATTTTCAGTCGATG
	<b>Rev_FLuc</b>	GTTTTGTCACGATCAAAGGACTCTGGTAC
<b>Nluc</b>	<b>For_Nluc</b>	GCTGTTCCGAGTAACCATCAAC
	<b>Rev_Nluc</b>	GGTCCATACCGCTTTCTTGTG
<b>RLuc</b>	<b>For_RLuc</b>	TCCAGAACAAAGGAAACGGATG
	<b>Rev_RLuc</b>	CAGCATTTTCTGCATGTTTTTCTGA
<b>GAPDH</b>	<b>For_GAPDH</b>	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG
	<b>Rev_GAPDH</b>	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA
<b>ACTB</b>	<b>For_ACTB</b>	ACACCCTTTCTTGACAAAACCT
	<b>Rev_ACTB</b>	CGCATCTCATATTTGGAATGACT
<b>eIF4G2</b>	<b>For_eIF4G2</b>	AGCCAAGTCCTTAATGGATCAG
	<b>Rev_eIF4G2</b>	GTTCTCGCAACTCTACGGTATC
<b>ALDH16A1</b>	<b>For_ALDH16A1</b>	GCCATGTGGTATTTCCGGATCA
	<b>Rev_ALDH16A1</b>	TGAGGTGTCCAAAATGCAGTAG
<b>eIF1</b>	<b>For_eIF1</b>	GTGAAGGCGTTTAAGAAAAAGTTTG
	<b>Rev_eIF1</b>	GGTCACCCTGTAGCTGAATTAC
<b>GARS</b>	<b>For_GARS</b>	TCCATGTACGAGAAGGAGATGA
	<b>Rev_GARS</b>	GTCAGGGCTTCCGATAATTCC
<b>RLIM</b>	<b>For_RLIM</b>	GAGTGAAGAAGATTATAGGCTTATGAGAGA
	<b>Rev_RLIM</b>	AGAGTCTCCTCCTCTATTTTCATCTG
<b>NDUFA1</b>	<b>For_NDUFA1</b>	GTACATCCACAGGTTCACTAACG
	<b>Rev_NDUFA1</b>	TTCTCCAAACCCTTTGACACATAG



<b>FSTL1</b>	<b>For_FSTL1</b>	CAGATGGCTGGTTCTCTAAAGG
	<b>Rev_FSTL1</b>	ATGGCAGTTTCATTCTGTTCCA
<b>RHOB</b>	<b>For_RHOB</b>	CTGCTGATCGTGTTTCAGTAAGG
	<b>Rev_RHOB</b>	CCGAGAAGCACATGAGAATGAC
<b>PTBP2</b>	<b>For_PTBP2</b>	ACTACTCTCAGGCAGTGTTCTC
	<b>Rev_PTBP2</b>	GAAGGAGCACCATCCATTTTATCT
<b>QARS</b>	<b>For_QARS</b>	GCCTCTATGAGCGACTATTCCA
	<b>Rev_QARS</b>	CACAGAGCAGTCCACTAATGC
<b>RPS9</b>	<b>For_RPS9</b>	AAGCTGATCGGGCAGTATGG
	<b>Rev_RPS9</b>	CCGTGGGTCCTTCTCATCAAG
<b>EEF2</b>	<b>For_EEF2</b>	AAGCAGTTTGCCGAGATGTATG
	<b>Rev_EEF2</b>	GCTGGGTCAAAGTACCTGTCA
<b>RPS2</b>	<b>For_RPS2</b>	CTCCCTGCCTATTAAGGAATCAG
	<b>Rev_RPS2</b>	AGTCCCCGATAGCAACAAATG
<b>RPL35</b>	<b>For_RPL35</b>	AAATCCATTGCCCGTGTTCTC
	<b>Rev_RPL35</b>	GTTCTCCTCGTGCTTGTTGAG
<b>RPL18A</b>	<b>For_RPL18A</b>	CGACAGAGGACACTTCCTTTTG
	<b>Rev_RPL18A</b>	CCCACTACCTTGTA CTCTCGTA
<b>LTN1</b>	<b>For_LTN1</b>	CTCAGTGACCCGCAA ACTGTTC
	<b>Rev_LTN1</b>	TTTCTCCTCCAGAGAATCAAGCTCA
<b>RPS28</b>	<b>For_RPS28</b>	GCCGTGTGCAGCCTATCAAG
	<b>Rev_RPS28</b>	ACATTGCGGATGATGGATCGG
<b>CCND1</b>	<b>For_CCND1</b>	GTGAACAAGCTCAAGTGGAACCT
	<b>Rev_CCND1</b>	CATGGAGGGCGGATTGGAAATG
<b>CCND2</b>	<b>For_CCND2</b>	CATTTACACCGACA ACTCCATCAA
	<b>Rev_CCND2</b>	AATGAAGTCATGAGGAGTGACAGC
<b>E2F2</b>	<b>For_E2F2</b>	TTCATTTACCTCCTGAGCGAGT
	<b>Rev_E2F2</b>	TCTTCAAACATCCCCTGCCTAC
<b>CCNE2</b>	<b>For_CCNE2</b>	TCAGTCCTTGCATTATCATTGAAAC
	<b>Rev_CCNE2</b>	TAGCCAGACTTCTTTTGAACATCC
<b>CDK4</b>	<b>For_CDK4</b>	TGGGCAAATCTTTGACCTGATTGG
	<b>Rev_CDK4</b>	AAAGGCAGAGATTCGCTTGTTGTG
<b>CDK6</b>	<b>For_CDK6</b>	GATGGCTCTAACCTCAGTGGTC
	<b>Rev_CDK6</b>	AACTTCCACGAAAAGAGGCTTTC
<b>Smad3</b>	<b>For_Smad3</b>	CCCAGAGCAATATTCCAGAGAC
	<b>Rev_Smad3</b>	GCTGGTTCAGCTCGTAGTAGG
<b>Smad2</b>	<b>For_Smad2</b>	TTATATTCCAGAAACGCCACCTC

	<b>Rev_Smad2</b>	AACAGGGGAAAGAGTAGTAGGAG
<b>CCNA2</b>	<b>For_CCNA2</b>	TGGATGGTAGTTTTGAGTCACCA
	<b>Rev_CCNA2</b>	ATTTAACCTCCATTTCCCTAAGGTATGT
<b>OBSCN</b>	<b>For_OBSCN</b>	CAGCTCCATTGTCAGGGTGCAT
	<b>Rev_OBSCN</b>	GGACGTTGTTCCATAGCACCAC
<b>RPS2</b>	<b>For_RPS2</b>	CGATGACTGCTACACCTCAGCC
	<b>Rev_RPS2</b>	CTCCTGATAGGGAGACTTGGTG
<b>EIF5B</b>	<b>For{EIF5B</b>	AACGGAGGATTGAGAAACGGCG
	<b>Rev{EIF5B</b>	TTCCCTGTGTCCACATGCCCAA
<b>BCLAF1</b>	<b>For_BCLAF1</b>	CCTAAACGAGCGGTTCACTTCG
	<b>Rev_BCLAF1</b>	GCTAAACGGGTATGCTTCCTCAG
<b>LYSMD4</b>	<b>For_LYSMD4</b>	GACCTAATGGGGCTGGAGATAC
	<b>Rev_LYSMD4</b>	GTCTTGTCTCTGATGAAGTTGTTG
<b>MT-CYB</b>	<b>For_MT-CYB</b>	GTGATCTGAGTTCAGACCGGAGTA
	<b>Rev_MT-CYB</b>	ATTTACGGGGGAAGGCGCT
<b>FTL</b>	<b>For_FTL</b>	TACGAGCGTCTCCTGAAGATGC
	<b>Rev_FTL</b>	GGTTCAGCTTTTTCTCCAGGGC
<b>BCL2</b>	<b>For_BCL2</b>	ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT
	<b>Rev_BCL2</b>	GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC
<b>TWIST1</b>	<b>For_TWIST1</b>	GCCAGGTACATCGACTTCCTCT
	<b>Rev_TWIST1</b>	TCCATCCTCCAGACCGAGAAGG
<b>EVL</b>	<b>For_EVL</b>	GGACCTCAAAGTCCGATGCCAA
	<b>Rev_EVL</b>	TGTCTGACTGGGAGGCTGCTTT
<b>ADGRB1</b>	<b>For_ADGRB1</b>	ACCTGTTGGCAGAGGAGAATCG
	<b>Rev_ADGRB1</b>	GGTTGTCTGTCACCTGGTATGC
<b>HOXB2</b>	<b>For_HOXB2</b>	GAAATCCGCCAAGAAACCCAGC
	<b>Rev_HOXB2</b>	CTGCGTGTTGGTGTAAGCCGTG
<b>AGO4</b>	<b>For_AGO4</b>	ACAAGGTGCAGACAGTGTGGAG
	<b>Rev_AGO4</b>	TCTCCAACACGTTTCACCTCCG
<b>TOMM7</b>	<b>For_TOMM7</b>	TTGCTGTAAGGGGTCCTCCC
	<b>Rev_TOMM7</b>	GCAAACCTGGCTCCCCTTGAA
<b>EIF4EBP2</b>	<b>For{EIF4EBP2</b>	AGTCACTAGCCCTGGCACCTTA
	<b>Rev{EIF4EBP2</b>	CTTGCAGGAGAGTCAGATGTCC
<b>ANKRD1</b>	<b>For_ANKRD1</b>	CGACTCCTGATTATGTATGGCGC
	<b>Rev_ANKRD1</b>	GCTTTGGTTCATTCTGCCAGTG
<b>FOXF2</b>	<b>For_FOXF2</b>	CACTCCAGCATGTCCTCCTACT
	<b>Rev_FOXF2</b>	CACTGGAGTAGAGTGATGCTGG

<b>FLT1</b>	<b>For_FLT1</b>	CCTGCAAGATTCAGGCACCTATG
	<b>Rev_FLT1</b>	GTTTCGCAGGAGGTATGGTGCT
<b>MOXD1</b>	<b>For_MOXD1</b>	GCACTTTGGAGTGCCTGGAAGA
	<b>Rev_MOXD1</b>	AATGACGCAGCCTGATGCCTCT
<b>JUNB</b>	<b>For_JUNB</b>	CGATCTGCACAAGATGAACCACG
	<b>Rev_JUNB</b>	CTGCTGAGGTTGGTGTAAACGG
<b>CDKN1A</b>	<b>For_CDKN1A</b>	AGGTGGACCTGGAGACTCTCAG
	<b>Rev_CDKN1A</b>	TCCTCTTGGAGAAGATCAGCCG
<b>DDR2</b>	<b>For_DDR2</b>	AACGAGAGTGCCACCAATGGCT
	<b>Rev_DDR2</b>	ACTCACTGGCTTCAGAGCGGAA
<b>CRABP2</b>	<b>For_CRABP2</b>	TTGAGGAGCAGACTGTGGATGG
	<b>Rev_CRABP2</b>	GTCTCTGGTCCACGAGGTCTT
<b>LGR5</b>	<b>For_LGR5</b>	CCTGCTTGACTTTGAGGAAGACC
	<b>Rev_LGR5</b>	CCAGCCATCAAGCAGGTGTTCA
<b>ADGRB1</b>	<b>For_ADGRB1</b>	ACCTGTTGGCAGAGGAGAATCG
	<b>Rev_ADGRB1</b>	GGTTGTCTGTACCTGGTATGC
<b>COLEC12</b>	<b>For_COLEC12</b>	AGACTCCAAGCATGGTCAGCTC
	<b>Rev_COLEC12</b>	CCTTTCTGTCCCTTGTTGCCAG
<b>SPON1</b>	<b>For_SPON1</b>	TGTAGCTGACCTGGCTCCAGAA
	<b>Rev_SPON1</b>	CGCATCCTCTTGCCTTTGTAC

### 36. Анализ стабильности белка

К клеткам в среду добавляли циклогексимид до концентрации 100 мкг/мл для блокирования синтеза белка. Клетки собирали через разные промежутки времени после добавления циклогексимида, добавляли к ним буфер для ДСН-электрофореза и определяли уровень изучаемого белка методом иммуноблоттинга.

### 37. Определение стабильности мРНК

Для сравнения уровня стабильности мРНК в клетках HEK293T и HEK293TΔYB-1 использовали метод метаболического мечения клеточных мРНК бромуридином (Sigma-Aldrich, США; конечная концентрация в среде 150 мкМ). После инкубации в среде с бромуридином в течение 24 ч клетки переносили в среду без бромуридина и собирали через промежутки времени 0, 4, 8 и 12 ч. Суммарную РНК, выделенную из этих клеток и дополненную 1 нг мРНК Rluc, меченной BrU (в качестве внутреннего контроля), подвергали иммунопреципитации за бромуридин-специфические антитела (MBL, # MI-11-3), как описано в [461]. мРНК детектировали с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием соответствующих

праймеров (Таблица 2). Очевидно, что с течением времени содержание бромуридина в той или иной мРНК (а значит, и эффективность иммунопреципитации) менялось в зависимости от стабильности этой мРНК. Относительное количество мРНК нормализовали к внутреннему контролю (мРНК Rluc). Для каждой клеточной линии количество мРНК в точке 0 ч принимали за 100%.

Для оценки синтеза мРНК анализировали количество мРНК в иммунопреципитатах из лизатов контрольных клеток, меченных бромуридином и не подвергавшихся дополнительной инкубации на среде без бромуридина (инкубация 0 ч). В клетках HEK293T количество мРНК в точке 0 ч принимали за 100%.

### 38. Сшивки под действием ультрафиолета (УФ-сшивки)

5 мкл клеточного экстракта (см. раздел 2.25) инкубировали с радиоактивно меченной РНК (0,57 пмоль, ~100 000 импульсов в минуту) и конкурентной РНК (при необходимости) в конечном объеме 18 мкл (10 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 1 mM ДТТ, 0,5 mM спермидина, 30 mM KOAc, 0,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>) при 30°C в течение 15 мин.

Реакционную смесь облучали ультрафиолетом (265 нм) при 1,5 Дж/см<sup>2</sup> в трансиллюминаторе-сшивателе (Vilber-Lourmat, Франция), а затем инкубировали в течение 45 мин при 37°C с 0,05 ед/мкл микрококковой нуклеазы (Thermo Fisher Scientific, США) и 0,5 мкг/мкл РНКазы А (Thermo Fisher Scientific, США) и анализировали с помощью 12% ДСН-электрофореза с последующей автордиографией. Относительную радиоактивность полос определяли с использованием Packard Cyclone Storage Phosphor System (Packard Instrument Company, Inc.).

### 39. Получение клеточных культур с нокаутом по генам *YBX1* и/или *YBX3*

Нокаут генов *YB-1* и *YBX3* проводился методом редактирования генома CRISPR-Cas9 [457].

Гидовая РНК, комплементарная последовательности 5'-ACACCAAGCCCGGCACTACG-3' в первом экзоне *YB-1*, была подобрана с использованием программного обеспечения CRISPR Design из лаборатории F. Zhang (crispr.mit.edu). Пару олигонуклеотидов (5'-CACCGACACCAAGCCCGGCACTACG-3' и 5'-AAACGTAGTGCCGGGCTTGGTGT-3'), соответствующих гидовой РНК, отжигали (жирным шрифтом выделены образующиеся при отжиге олигонуклеотидов выступающие концы) и лигировали с плазмидой pSpCas9(BB)-2A-Puro [457], линейаризованной по сайту для эндонуклеазы рестрикции *BsII*. Полученной плазмидой pSpCas9(BB)-2A-Puro-gRNA*YBX1* трансфицировали в клетки HEK293T с использованием липофектамина 3000 (Invitrogen, США). После обработки пурамицином (1

мкг/мл) в течение трех дней клеткам давали возможность восстановиться в течение двух дней, а затем пул выживших клеток клонировали методом разведения клеточной культуры и подвергали скринингу методом иммуноблоттинга. Геномную ДНК клеток НЕК293ТΔYB-1 получали с использованием набора для очистки геномной ДНК (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Для генотипирования фрагмент гена *YBX1* амплифицировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров 5'-CAGTCACCATCACCGCAACCATG-3' и 5'-AGCTCCGGCTAACGGTTCCG CT-3' (амплифицируется фрагмент в пределах первого экзона и части первого интрона гена *YBX1*) и полимеразы Pfu (Promega, США). Ампликоны были клонированы в плазмиду pJet1.2 (Thermo Fisher Scientific, США) и секвенированы.

Клетки НЕК293ТΔYB-3 были получены с использованием системы редактирования генома CRISPR/Cas9n (Cas9n – мутантная форма Cas9 – никаза)[457]. Гидовые РНК, комплементарные последовательностям 5'-CAGGCTCCGACGGAGGCGGC-3' и 5'-CCCCGCGCCCAAGAGCCCGG-3' в кодирующей и антисмысловой цепи первого экзона гена *YBX3*, были подобраны с использованием программного обеспечения CRISPR Design лаборатории F. Zhang (crispr.mit.edu). Пары олигонуклеотидов (5'-CACCGGCCGCCTCCGTCGGAGCCTG-3' и 5'-AAACCAGGCTCC GACGGAGGCGGCC-3'; 5'-CACCGCCCCGCGCCCAAGAGCCCGG-3' и 5'-AAACCCGG GCTCTTGGGCGCGGGGC-3'), соответствующих гидовым РНК, отжигали (жирным шрифтом выделены образующиеся при отжиге олигонуклеотидов выступающие концы) и лигировали с плазмидой pSpCas9n(BB)-2A-Puro, линейаризованной по сайту для эндонуклеазы рестрикции *BsII*. Полученными плазмидами pSpCas9n(BB)-2A-Puro-nic1*YBX3* и pSpCas9n(BB)-2A-Puro-nic2*YBX3* с клонированными гРНК трансфицировали в клетки НЕК293Т с использованием липофектамина 3000 (Invitrogen, США). После обработки пурамицином (1 мкг/мл) в течение трех дней клеткам давали возможность восстановиться в течение двух дней, а затем пул выживших клеток клонировали методом разведения клеточной культуры и подвергали скринингу методом иммуноблоттинга.

Клетки НЕК293ТΔYB-1ΔYB-3 были получены из клеток НЕК293ТΔYB-1 с использованием системы редактирования генома CRISPR/Cas9n по схеме аналогичной той, что использовалась для получения клеток НЕК293ТΔYB-3.

Клеточная линия НЕК293ТΔYB-1+YB-1 была получена из клеточной линии НЕК293ТΔYB-1. Для достижения стабильной экспрессии YB-1 клетки НЕК293ТΔYB-1 трансфицировали линейаризованной по сайту *BglIII* плазмидой pcDNA3.1-Puro-YB-1. Через 24 ч после трансфекции клетки переносили на среду с пурамицином (устойчивость к которому обеспечивала плазида) и культивировали в течение двух недель с периодической заменой

среды на свежую. Затем культивирование продолжали еще 2 недели без пуромицина и подтверждали факт экспрессии YB-1 с помощью вестерн-блоттинга.

Аналогичным способом получали клетки НЕК293ТΔYB-1ΔYB-3+YB-1, НЕК293ТΔYB-1ΔYB-3+YB-3 и НЕК293ТΔYB-1ΔYB-3+YB-1+YB-3, трансфицируя клетки НЕК293ТΔYB-1ΔYB-3 соответственно линейаризованными по сайту *BglIII* плазмидами pсDNA3.1-puro-YB-1, pсDNA3.1-puro-YB-3 и pсDNA3.1-puro-YB-1-YB-3, соответственно.

#### **40. Сборка и тоу-принт анализ 48S и 80S комплексов инициации трансляции в лизате ретикулоцитов кролика (RRL) с альтернативной мРНК YB-1**

Анализ проводили, как описано ранее [462]. Для сборки комплексов инициации трансляции использовали RRL, обработанный микрококковой нуклеазой. Сначала готовили 10 мкл реакционной смеси, содержащей 7 мкл RRL, 10 ед. ингибитора рибонуклеазы RiboLock (Thermo Fisher Scientific, США) и 10 мМ Mg(АсО)<sub>2</sub>. Для сборки иницирующих комплексов 48S и 80S добавляли 0,4 мкл 50 мМ водного раствора гуанилимидодифосфата (GMP-PNP), 0,4 мкл 50 мМ MgАс<sub>2</sub> и 1,2 мкл воды или 1 мкл водного раствора циклогексимида (10 мг/мл) и 1 мкл воды. В контрольном эксперименте добавляли 1 мкл водного раствора 20 мМ аналога кэпа (<sup>7m</sup>GpppG, который ингибирует связывание 40S с мРНК) и 0,4 мкл 50 мМ MgАс<sub>2</sub>. Реакционные смеси инкубировали в течение 5 мин при 30°C, после чего добавляли 0,5 мкл препарата альтернативной формы мРНК YB-1 (1 пмоль/мкл), отожденной с 1 мкл [<sup>32</sup>P]-меченного праймера 5'-GGTGTACAAATACATCTTCCCTTGGTGTC-3', комплементарного экзону 3 мРНК, (5 пмоль/мкл), 8 мкл смеси для обратной транскрипции (25 мМ MgАс<sub>2</sub>, 1,25 мМ дНТФ, 25 мМ Трис-НСl, рН7,5, 125 мМ КCl, 1,25 мМ дитиотреитола), 4,4 мкл воды и 0,1 мкл обратной транскриптазы RevertAid Premium (Thermo Fisher Scientific, США; 200 ЕД/мкл). Образцы инкубировали 15 мин при 30°C, а затем проводили фенольную депротенизацию, осаждение продуктов реакции этанолом и их электрофоретический анализ в 6% секвенирующем геле. Продукты кДНК сравнивали с сиквенсом дидезоксинуклеотидной последовательности, полученным с использованием того же праймера и соответствующей плазмидной ДНК с помощью набора Sequenase™ 7-deaza-dGTP Sequencing Kit (USB, США).

#### **41. Иммунофлуоресцентная микроскопия**

Клетки выращивали в культуральных чашках на покровными стеклах 18x18 мм, отбирали среду и промывали 3 раза буфером PBS. Затем клетки фиксировали 4% раствором формальдегида (на PBS) в течение 30 минут при комнатной температуре и промывали 3 раза PBS. Для пермеабилзации клетки обрабатывали 0,5% раствором Triton X-100 (на PBS) в течение 30 минут на комнатной температуре при постоянном покачивании. Для

предотвращения неспецифической сорбции антител клетки 30 минут инкубировали при постоянном покачивании с 5% раствором эмбриональной телячьей сыворотки (на буфере TBS-T). Инкубацию с первыми антителами, приготовленными на 0,5% растворе эмбриональной телячьей сыворотки в TBS-T, проводили при постоянном покачивании в течение ночи в холодной комнате ( $\approx +4^{\circ}\text{C}$ ). Несвязавшиеся антитела отмывали трижды раствором TBS-T. Инкубацию со вторыми антителами, приготовленными на 0,5% растворе эмбриональной телячьей сыворотки на буфере TBS-T, проводили при постоянном покачивании в течение 1 часа при комнатной температуре. Используемые в работе вторые антитела были конъюгированы с флуорофором Alexa Fluor 488 (Invitrogen, США; см. таблицу 1). После трехкратной промывки раствором TBS-T покровные стекла с клетками перекладывали на предметное стекло, используя в качестве монтирующей среды реагент ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen, США), который также содержал краситель DAPI для окрашивания ядер. Препараты анализировали на конфокальном микроскопе Leica SPE.

#### **42. Измерение общего уровня трансляции по включению азидогомоаланина**

Общий уровень трансляции на клетку определяли по включению азидогомоаланина во вновь синтезированные белки с последующим его сшиванием с алкиновым производным флуоресцентного красителя Alexa Fluor 488 согласно статье Presolski et al.[463]. Клетки культивировали на 6-луночной планшете до плотности 60-70%. Затем среду заменяли на среду DMEM без метионина (без FBS) и инкубировали клетки в течение 45 мин в стандартных условиях. Затем среду заменяли свежей DMEM без метионина, содержащей азидогомоаланин (50 мкМ). Через 2 часа инкубации клетки промывали холодным буфером PBS и в каждую лунку добавляли по 200 мкл лизирующего буфера (1% ДСН в 50 мМ Трис-НСl (pH 8,0) и бензоназа (250 ЕД/мл)). плита. Образец лизата (около 200 мкг) разбавляли водой до объема 77 мкл и смешивали со 100 мкл буфера PBS, содержащего алкинпроизводное Alexa Fluor 488 (Invitrogen, США). Затем к раствору добавляли 3 мкл свежеприготовленной смеси  $\text{CuSO}_4$ -ТНРТА (трис(3-гидроксипропилтриазолил-метил)амин) (1 мкл  $\text{CuSO}_4$  (20 мМ) и 2 мкл ТНРТА (50 мМ)), 10 мкл аминокуанидина (100 мМ) и 10 мкл свежеприготовленного аскорбата натрия (100 мМ). После перемешивания реакцию инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа в темноте. После инкубации к реакционной смеси добавляли 600 мкл метанола, 150 мкл хлороформа и 400 мкл воды, хорошо перемешивали и центрифугировали при 13000 g в течение 5 мин. Затем водную фазу удаляли, добавляли 450 мкл метанола и центрифугировали при 13000 g в течение 5 мин. Осадок дважды промывали 450 мкл метанола, после чего ему давали высохнуть в течение 1 ч, а затем растворяли в 200 мкл 2X буфера для образцов для ДСН-гель-электрофореза.

Для всех образцов одинаковые общие количества белка разделяли с помощью ДСН-гель-электрофореза и белки, меченные Alexa Fluor 488, определяли с помощью системы визуализации ChemiDoc MP (Bio-Rad, США) и обсчитывали изображения с использованием прилагающегося к прибору программного обеспечения ImageReady. Для оценки уровня трансляции на клетку равное количество клеток лизировали в буфере для образцов и разделяли с помощью ДСН-гель-электрофореза. Общее количество белка оценивали окрашиванием Кумасси синим G-250 с использованием программного обеспечения OptiQuant. Общий уровень трансляции на клетку оценивали как флуоресценцию Alexa Fluor 488, нормированную на общее количество белка на клетку.

#### **43. Анализ распределения мРНК между полисомами и свободными мРНК методом центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы**

Клетки дважды промывали холодным PBS, содержащим 0,1 мг/мл циклогексимида, и лизировали непосредственно на чашке в 400 мкл буфера для экстракции полисом: 15 мМ Нерес-КОН (pH 7,6), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,3М NaCl, 1% Triton X-100, 0,1 мг/мл циклогексимида и 0,2 мМ VRC (ванадилрибонуклеозидный комплекс), 1 мМ ДТТ. Экстракты переносили в пробирки объемом 1,5 мл и инкубировали на льду в течение 10 минут. Ядра и дебрис удаляли центрифугированием при 12000g в течение 10 мин на микроцентрифуге. Аликвоты супернатантов по 45 мкл наслаивали на 4,5 мл 15-45% градиента сахарозы, приготовленном на буфере (15 мМ Нерес-КОН (pH 7,6), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мМ KCl, 0,1 мМ ЭДТА и 0,01 мг/мл циклогексимида), и центрифугировали на ультрацентрифуге Beckman L-75 в роторе SW-60 (Beckman Coulter, США) при 45000 об/мин в течение 55 мин при 4°C. Фракционирование градиента проводили отбором алиquot (по 375 мкл) со дна пробирки при помощи перистальтического насоса. Поглощение ультрафиолета во фракциях измеряли при 254 нм с помощью УФ-ячейки Monitor UV-M (Pharmacia, Швеция). К каждой фракции добавляли 0,1 нг транскрибированной *in vitro* мРНК люциферазы NlucP (как внутренний контроль), выделяли РНК и детектировали интересующую мРНК методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

#### **44. Рибосомный профайлинг (Ribo-Seq) и RNASeq**

Клетки НЕК293Т, НЕК293ТΔУВ-1 и НЕК293Т с оверэкспрессией НА-УВ-1 культивировали до плотности 70-80%, охлаждали на льду и промывали холодным раствором PBS с циклогексимидом (100 мкг/мл). Предварительную обработку клеток циклогексимидом не проводили, чтобы избежать искусственного накопления инициаторных комплексов в начале инициации трансляции [464]. Затем клетки лизировали непосредственно на чашках буфером, содержащим 20 мМ Трис-НСl (pH 7,4), 150 мМ NaCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ ДТТ, 1% Тритон X-



100, 100 мкг/мл циклогексимида (Sigma-Aldrich, США), 25 ед./мл Turbo DNase (Ambion, США). Лизаты клеток инкубировали на льду в течение 10 мин, пятикратно пропускали через шприц с иглой 26G и центрифугировали при 20000g при 4°C в течение 10 мин. Супернатант разделяли на две части: для приготовления библиотеки Ribo-Seq и библиотеки RNA-Seq. Нуклеазный футпринтинг и выделение рибосом для подготовки библиотеки Ribo-Seq проводили согласно методической статье [465]. Тотальную РНК для приготовления библиотеки RNA-Seq выделяли с использованием реагента TRIzol LS (Thermo Fisher Scientific, США). Библиотеки RNaseq получали с использованием набора для подготовки библиотеки NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB, США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Удаление рРНК из образцов выполняли с использованием набора Ribo-Zero (человек/мышь/крыса) (Illumina, США) или RiboMinus™ Eukaryote Kit v2 (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

Последующие процедуры RiboSeq выполнялись с использованием набора TruSeqRibo Profile Kit (Illumina, США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя либо согласно статье [465]. Удаление рРНК из образцов выполняли с использованием набора Ribo-Zero (человек/мышь/крыса) (Illumina, США) или RiboMinus™ Eukaryote Kit v2 (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

#### **45. Иммунопреципитация и секвенирование РНК (RIP-Seq)**

Иммунопреципитацию РНК проводили, как описано в статье Tenenbaum et al. [466] с некоторыми модификациями. Клетки дважды промывали холодным PBS и снимали с культуральных планшетов скребком. Затем клетки ресуспендировали примерно в двух объемах осадка буфером для лизиса, содержащим 10 мМ Hepes-KOH (pH 7,6), 100 мМ KCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5% Nonidet P-40, 1 мМ ДТТ, 100 ед./мл ингибитора РНКазы (Thermo Fisher Scientific, США), 0,2% ванадилрибонуклеозидного комплекса (Fluka, США) и смесь белковых ингибиторов (Roche, Швейцария). Лизированные клетки замораживали и хранили при -80°C. Перед использованием клеточный лизат размораживали и центрифугировали при 16000g в микроцентрифуге в течение 10 мин при 4°C. Для иммунопреципитации смолу протеин-G-сефарозу (GE Healthcare, США) смешивали в пропорции 1:5 по объему с буфером NT2 (50 мМ Трис-HCl (pH 7,6), 150 мМ NaCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,05% Nonidet P-40), в который добавляли до 5% БСА. 300 мкл суспензии протеин-G-сефарозы (для одной реакции иммунопреципитации) инкубировали в течение ночи при 4°C с антителами против YB-1 или YB-3 (5–10 мкг). Смолу со связавшимися антителами промывали холодным буфером NT2 и ресуспендировали в 900 мкл буфера NT2, дополненного 100 ЕД/мл ингибитора РНКазы, 0,2% ванадилрибонуклеозидного комплекса, 1 мМ ДТТ и 20 мМ ЭДТА. Затем добавляли 100 мкл

клеточного лизата, немедленно перемешивали и отбирали аликвоту 100 мкл для выделения тотальной клеточной РНК для RNASeq. Остальную часть смеси инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. Смолу промывали 4 раза холодным буфером NT2, а затем 2 раза буфером NT2 с добавлением 1 М мочевины. Смолу ресуспендировали в 100 мкл буфера NT2. Иммунопреципитированную и тотальную РНК выделяли с использованием реагента TRIzol LS (Invitrogen, США) согласно протоколу фирмы-производителя.

Библиотеки для секвенирования получали с использованием набора для подготовки библиотеки NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB, США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Удаление рРНК выполняли с использованием набора NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (NEB, США) или набора NEBNext® rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) (NEB, США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя.

Для образцов (polyA RIP-Seq YB-3 и polyA RNA-Seq в HEK293T и HEK293TΔYB-1) добавляли spike-in (7 нг мРНК GFP и 0,12 нг мРНК *Fluc*) на 0,5 мкг РНК в начале подготовки библиотеки.

#### **46. PAR-CLIP (photoactivatable ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation, фотоактивируемые рибонуклеозид-опосредованные сшивки с последующей иммунопреципитацией)**

Метод PAR-CLIP был использован согласно статье Danan et al. [467] с модификациями. Сущность метода заключается в сшивках под действием ультрафиолета клеточных белков с клеточной РНК, которая метаболически мечена фотоактивируемыми рибонуклеозидами (в данном случае 4S-тиоурин). После иммунопреципитации РНК-белковых комплексов антителами против YB-1 РНК-фрагменты, связанные с YB-1, выделяют и создают библиотеку для секвенирования.

Клетки HEK293T выращивали до плотности около 80% и облучали клетки прямо на чашке (без крышки) в системе УФ-дозированного облучения Bio-link BLX-365 (Vilber, Франция)  $0.15 \text{ J/cm}^2$  (длина волны 365 нм). Затем клетки дважды промывали холодным PBS, осаждали центрифугированием (500g), лизировали 3 объемами NP40-буфера 50 мМ Neres-KOH (рН 7,5), 150 мМ KCl, 2 мМ ЭДТА, 0.5 % NP40, 0.5 мМ ДТТ и смесь ингибиторов протеаз (Roche, Швейцария) и осаждали клеточный дебрис при 13000g в течение 10 мин при 4°C.

К супернатанту добавляли РНКазу T1 до 1 ед./мкл и инкубировали при 22°C в течение 15 минут. Далее проводили иммунопреципитацию с помощью антител против С-концевого пептида YB-1. Связывание антител с протеин G-сефарозой проводили как описано в разделе 2.46. После этого к смоле добавляли супернатант обработанный РНКазой T1, инкубировали на ротационном смесителе при 4°C в течение 1 часа, дважды промывали NP40-буфером (объем

промывок здесь и далее 1 мл), а затем дополнительно инкубировали смолу с РНКазой T1 (1 ед./мкл) в NP40-буфере при 22°C в течение 15 минут. После этого дважды промывали смолу NP40-буфером, дважды буфером для дефосфорилирования (50 mM Трис-НСl (рН 7,9), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ДТТ) и ресуспендировали её в 400 мкл буфера для дефосфорилирования. Далее добавляли щелочную фосфатазу CIAP (Thermo Fisher Scientific, США) до 0,5 ед./мкл, инкубировали при 37°C в течение 10 минут, дважды промывали NP40-буфером и один раз буфером для Т4-полинуклеотидкиназы без ДТТ (50 mM Трис-НСl (рН 7,5), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>), а затем ресуспендировали смолу в буфере для Т4-полинуклеотидкиназы с ДТТ (50 mM Трис-НСl (рН 7,5), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ДТТ). К смеси добавляли Т4-полинуклеотидкиназу (1 ед./мкл),  $\gamma$ [<sup>32</sup>P]-АТФ (0,5 мкКю/мкл) и инкубировали при 37°C в течение 30 минут для мечения фрагментов РНК, сшитых с белком (YB-1), а затем еще 5 минут в присутствии 100 мкМ АТФ для фосфорилирования 5' концов всех фрагментов РНК, не профосфорилированных в присутствии  $\gamma$ [<sup>32</sup>P]-АТФ. Далее смолу промывали пять раз буфером для Т4-полинуклеотидкиназы без ДТТ, белки, связавшиеся со смолой элюировали 30 мкл кислотно-мочевинного буфера, разделяли с помощью электрофореза в кислотно-мочевинном 10% полиакриламидном геле и детектировали меченный фрагментом РНК белок YB-1 методом радиоавтографии. Фрагмент геля, соответствующий YB-1, вырезали и проводили электроэлюцию белка из геля с помощью диализных пробирок D-Tube Dialysers Midi (Novagen, США) в 400 мкл буфера для ДСН-гель-электрофореза. После электроэлюции к образцу добавляли равный объем 2X буфер для протеиназы К (100 mM Трис-НСl (рН 7.5), 150 mM NaCl, 12.5 mM EDTA, 2% ДСН), протеиназу К (1,2 мг/мл) и инкубировали при 55°C в течение 30 минут. Далее из смеси выделяли РНК методом фенольной депротенинизации и переосаждали РНК этанолом. Осадок РНК ресуспендировали в 5 мкл воды.

На следующем этапе на основе выделенных фрагментов РНК проводили подготовку библиотеки для высокопроизводительного секвенирования с помощью набора для создания библиотек RiboSeq (ARTseq™ Ribosome Profiling Kit, Epicentre, США), начиная с этапа лигирования 3' адаптера и далее следуя протоколу.

#### **47. Высокопроизводительное секвенирование и обработка данных**

Библиотеки были секвенированы на приборах Illumina HiSeq 2000 (Лаборатория эволюционной геномики ФББ МГУ) и Illumina NextSeq 500 (Центр геномики Сколтеха).

Контроль качества прочтений проводили с помощью FastQC v0.11.5 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Прочтения обрабатывали следующим образом: выполняли обрезку с помощью cutadapt v1.18 [468] для удаления адаптерных последовательностей; картирование сборки генома hg38 [469] с аннотацией генома GENCODE v29 [470] было выполнено с помощью STAR v2.6.1d [471], которая также обеспечивала подсчет

генов для полных транскриптов. Подсчеты чтений для кодирующих сегментов были получены с помощью *plastid v.0.4.8* [472].

По образцам от 10 до 99 миллионов прочтений прошли обрезку (медиана 38 миллионов), от 9 до 31 миллиона (медиана 17 миллионов) прочтений были однозначно сопоставлены. Результирующие количества чтений из нескольких циклов секвенирования одного и того же образца суммировали. Анализ основных компонентов образцов показывал разумное разделение типов экспериментов и соответствие между повторами.

Данные Ribo-Seq имеют четкую триплетную периодичность, метагенные профили окон, окружающих стартовые кодоны генов, были получены с помощью *plastid v.0.4.8* [472].

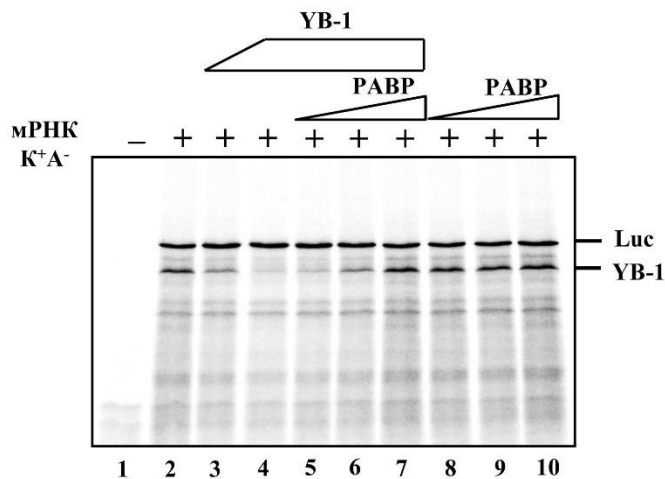
Анализ дифференциальной экспрессии генов и анализ обогащения набора генов проводили в среде R. Подсчет генов для рРНК и мт-рРНК был исключен. Гены, проходящие 1 чтение на миллион (*count per million*) во всех образцах, были использованы в дальнейшем анализе. Количество прочтений на ген нормализовали методом *edgeR TMM* [473].

Анализ дифференциальной экспрессии генов (изменения в RNA-Seq и Ribo-Seq), занятости рибосомами (Ribo-Seq по сравнению с RNA-Seq соответствующего размера, значения RO для определенных типов клеток и дифференциальная занятость рибосомами между типами клеток) и эффективности иммунопреципитации (RIP-Seq относительно стандартной RNA-Seq) проводили с помощью *edgeR (glmQLFit, glmQLFTest)*. P-значения были скорректированы с использованием поправки Бенджамина-Хохберга на множественное тестирование (FDR).

Анализ обогащения набора генов (GSEA) был выполнен с использованием пакета *fgsea bioconductor* [474]. Термины GO были получены из *MSIGdb v6.2* [475]. Ранжирование генов было получено с использованием знакового P-значения (знак взят из кратности изменения, более значимые гены с повышающей и понижающей регуляцией появляются вверху и внизу списка соответственно).

Анализ PAR-CLIP проводился следующим образом. Качество чтений секвенирования оценивали с помощью программы *FastQC*. Базовую обработку (тримминг адаптеров) чтений производили с помощью программы *CutAdapt*. Все чтения предварительно картировались на рибосомные РНК и тРНК с помощью программы *Bowtie*, не картированные на рРНК и тРНК чтения участвовали в дальнейшем анализе. Анализ замен и кластеризацию чтений проводили с помощью пакета *wavCluster*. Аннотацию кластеров проводили с помощью пакетов *biomart* и *VariantAnnotation*. Для определения сайта специфического связывания YB-1 была использована программа для поиска мотивов в нуклеотидных последовательностях *ChIPMunk* (<http://autosome.ru/ChIPMunk/>). Для определения локального нуклеотидного состава к последовательностям кластеров были добавлены 20 нт фланки. Мотив искали для всех последовательностей и отдельно для кластеров, локализованных в кодирующих областях и 3'НТО мРНК.





**Рисунок 11. PABP восстанавливает трансляцию мРНК *YB-1*, подавленную белком *YB-1*.** К<sup>+</sup>А<sup>-</sup> мРНК *YB-1* и К<sup>+</sup>А<sup>-</sup> мРНК люциферазы (по 0,075 пмоль каждой) инкубировали 10 мин при 30°C в присутствии 5,6 пмоль (дорожка 3) или 11,2 пмоль (дорожки 4-7) белка *YB-1* или без него (дорожки 2, 8-10), а затем дополнительно инкубировали 10 мин в присутствии PABP: 0,7 пмоль (дорожки 5 и 8), 1,4 пмоль (дорожки 6 и 9), 2,8 пмоль (дорожки 7 и 10). мРНК транслировали в течение 1 часа при 30°C в присутствии [<sup>35</sup>S]-метионина. [<sup>35</sup>S]-меченые продукты трансляции разделяли SDS-гель электрофорезом и детектировали автордиографией.

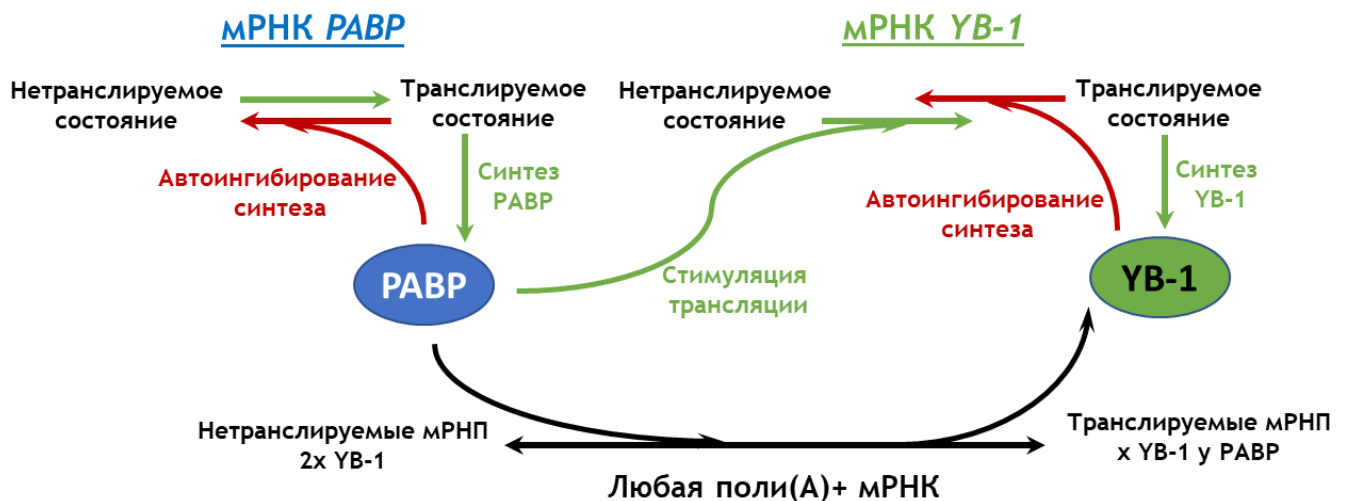
Оказалось, что белки конкурируют за связывание с регуляторной последовательностью и способны вытеснять друг друга с нее. Было предположено, что трансляционная активность мРНК *YB-1* напрямую зависит от того, какой из двух белков, *YB-1* или PABP, взаимодействует с регуляторной последовательностью в 3'НТО мРНК *YB-1*. Ожидалось, что при увеличении соотношения *YB-1*/PABP в пользу *YB-1* происходит подавление трансляции мРНК *YB-1*, а при последующем увеличении количества PABP произойдет восстановление трансляционной активности мРНК *YB-1* за счёт вытеснения *YB-1* с регуляторной последовательности мРНК *YB-1*. Для проверки этого предположения мРНК *YB-1* (К<sup>+</sup>А<sup>-</sup>) предынкубировали с белком *YB-1*, затем добавляли в увеличивающихся количествах PABP и транслировали мРНК в БСТ. В качестве внутреннего контроля использовали мРНК люциферазы (К<sup>+</sup>А<sup>-</sup>). На рисунке 11 видно, что при увеличении количества белка *YB-1* в системе трансляция мРНК *YB-1* избирательно подавлялась (Рис. 11, дорожки 2-4). Однако по мере возрастания количества PABP в такой заингибированной системе синтез белка *YB-1* восстанавливался до исходного уровня (Рис. 11, дорожки 5-7). Наблюдаемое восстановление синтеза *YB-1* не является простой стимуляцией белкового синтеза под действием PABP, поскольку в отсутствие экзогенного *YB-1*, PABP (в количествах, использованных в эксперименте) не стимулировал трансляцию ни мРНК *YB-1*, ни мРНК люциферазы (Рис. 11, дорожки 8-10).

Таким образом, трансляционная активность мРНК *YB-1* зависит от того, какой из двух белков – *YB-1* или PABP – взаимодействует с регуляторной областью в 3'НТО мРНК *YB-1*.

С другой стороны, известно, что трансляция мРНК PABP авторегулируется за счёт специфического связывания PABP с 60-нуклеотидным А-богатым элементом в 5'НТО своей мРНК [476]. В совокупности, обнаруженные системы контроля синтеза *YB-1* и PABP позволяют поддерживать концентрацию и соотношение эти двух белков на определённом уровне. Известно, что все клеточные мРНК находятся в комплексе с белками в составе мРПП

[477]. При этом трансляционный статус всех или большинства мРНК зависит от содержания и соотношения двух мажорных белков цитоплазматических мРНП – YB-1 и PABP. Для активно транслируемых полисомных мРНП характерно одновременное присутствие на мРНК этих двух белков, в то время как свободные нетранслируемые мРНП содержат в два раза больше YB-1 и лишены PABP [48]. Здесь нужно оговориться, что такая схема глобального контроля трансляции при участии YB-1 адекватно описывает происходящее в ретикулоцитах кролика, однако неизвестно, характерна ли она для культур эукариотических клеток.

Тем не менее, описанная выше система регуляции синтеза YB-1 и PABP способна поддерживать концентрацию этих белков и соотношение YB-1 и PABP на уровне, оптимальном для общего белкового синтеза в ретикулоцитах, который в основном сводится к синтезу глобинов (Рис. 12).



**Рисунок 12.** Схема перехода мРНП частиц из активного состояния в неактивное. Связь с регуляцией трансляции мРНК YB-1 и мРНК PABP. В цитоплазме подавляющая часть YB-1 находится в ассоциации с транслируемыми и нетранслируемыми мРНК, формируя мРНП частицы. Два мажорных белка мРНП, YB-1 и PABP, определяют физико-химические свойства и функциональную активность мРНП. Переход мРНК из неактивного состояния в активное сопровождается уменьшением количества YB-1, связанного с мРНК, и появлением поли(А)-связывающего белка PABP; и наоборот, инактивация мРНК сопряжена с увеличением количества YB-1 и вытеснением PABP из состава мРНП. Изменение количества связанных с мРНК двух мажорных белков мРНП является ключевым фактором общей регуляции трансляции мРНК. Синтез PABP и YB-1 авторегулируется. В то же время, PABP, связываясь с 3' нетранслируемой областью мРНК YB-1, избирательно стимулирует синтез YB-1. Данная регуляторная система поддерживает концентрацию YB-1 и его соотношение с PABP в клетке на уровне, обеспечивающем оптимальный белковый синтез.

Следует отметить, что PABP имеет большее сродство к поли(А)-хвосту мРНК, чем к регуляторным последовательностям в 5'НТО своей мРНК и в 3'НТО мРНК YB-1. Поэтому существенное связывание PABP с регуляторными последовательностями своей мРНК и мРНК YB-1 должно происходить лишь после насыщения этим белком поли(А)-хвостов всех активных

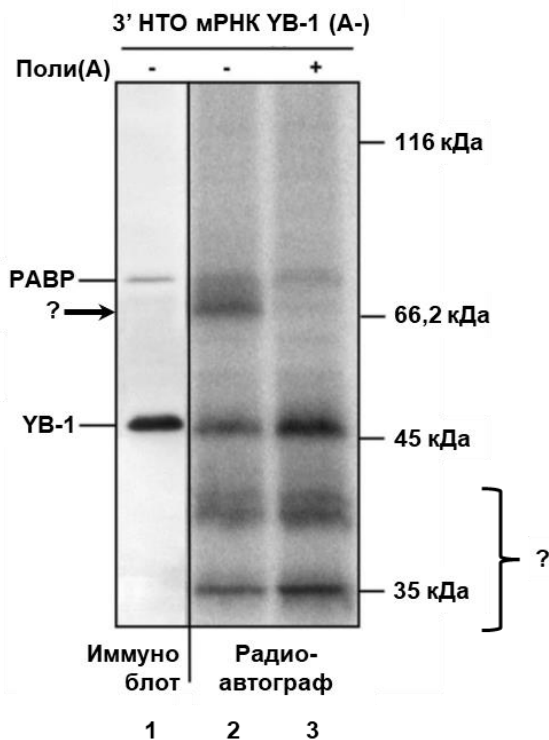
в трансляции клеточных мРНК. Более поздние исследования показали, что во взаимоотношения YB-1 и PABP может вмешиваться другой белок – hnRNPQ.

## 2. hnRNPQ – новый игрок в регуляции трансляции мРНК YB-1

### 2.1 Обнаружение hnRNP Q как белка, взаимодействующего с мРНК YB-1

Белок hnRNP Q (Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein Q, белок Q гетерогенных ядерных мРНК) был обнаружен как белок, взаимодействующий с 3'-НТО мРНК YB-1 в экспериментах по выделению белков лизата ретикулоцитов кролика с помощью биотинилированных фрагментов 3'-НТО мРНК YB-1.

Сам поиск белков проводился по нескольким причинам. Во-первых, согласно УФ-сшивкам радиоактивно меченой 3'-НТО мРНК YB-1 с белками лизата ретикулоцитов кролика, с этим фрагментом сшиваются, помимо YB-1 и PABP, еще как минимум 2 белка (Рис. 13, взят из статьи [478], с изменениями). И пусть они не проявляли специфичности связывания к 3'-НТО мРНК YB-1, как было показано ранее [454], они могли бы, тем не менее, каким-то образом участвовать в регуляции трансляции мРНК YB-1. Во-вторых, согласно этим же УФ-сшивкам, с 3'-НТО мРНК YB-1 взаимодействует белок молекулярной массой близкой к PABP и проявляющий повышенное сродство к поли(А) (Рис. 13). Возможно, этот белок может влиять на действие PABP на трансляцию мРНК YB-1.



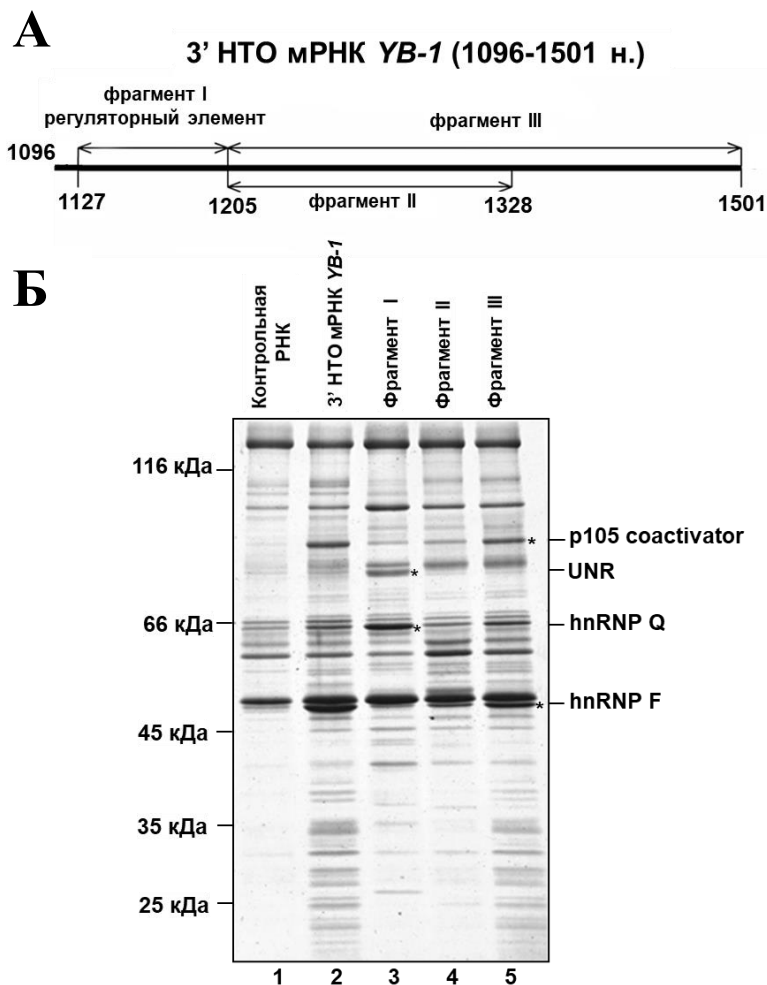
**Рисунок 13.** [<sup>32</sup>P]-УТФ-меченую (100000 имп/мин) 3'-НТО мРНК YB-1 без поли(А)-хвоста инкубировали с 7,5 мкл необработанного лизата ретикулоцитов кролика при 30°C в течение 15 мин в присутствии 180 нг немеченого поли(А) фрагмента (дорожка 3) или без него (дорожки 1, 2). Реакционную смесь облучали УФ-излучением (265 нм) при 1,5 Дж/см<sup>2</sup> и обрабатывали смесью РНКазы А и микрококковой нуклеазы. После ДСН-гель-электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану и анализировали методом иммуноблоттинга (использовали антитела против YB-1 и PABP) (дорожка 1) или автордиографией (дорожки 2, 3).

Для того, чтобы выяснить, какие именно белки взаимодействуют с 3'-НТО мРНК YB-1 помимо PABP и YB-1, было проведено выделение белков лизата ретикулоцитов кролика с



помощью биотинилированных фрагментов 3'НТО мРНК *YB-1*. Для этого лизат ретикулоцитов кролика инкубировали с биотинилированным фрагментом мРНК *YB-1*, содержащим полноразмерную 3'НТО (550 н.), с фрагментами 3'НТО мРНК *YB-1*: фрагментом I (регуляторный элемент, 1127-1204 н. в последовательности мРНК *YB-1* кролика), фрагментом II (1205-1328 н.) и фрагментом III (1205-1501 н.) (Рис. 14А), либо с биотинилированной контрольной неспецифической РНК  $\beta$ G (1200 н.), иммобилизованными на стрептавидин-сефарозе. Белки, связавшиеся с мРНК, были элюированы со смолы и разделены ДСН-гель-электрофорезом. Белки, обнаруженные только в опытном образце и отсутствующие в контроле, были вырезаны из геля и идентифицированы методом масс-спектрометрии.

Как видно на рисунке 14Б, белок p105 имеет повышенное сродство к фрагменту III, белки hnRNP Q и UNR предпочтительно связываются с регуляторным элементом мРНК *YB-1*, а hnRNP F – с фрагментами II и III. Среди белков, специфично связывающихся с 3'НТО мРНК *YB-1*, можно отметить белки hnRNP Q и UNR, участвующие в регуляции трансляции мРНК *c-fos*. Для остальных определенных белков участие в регуляции трансляции или стабильности специфических мРНК достоверно не показано.



**Рисунок 14. А.** Схема 3'НТО мРНК *YB-1*. **Б.** Электрофореграмма препарата белков лизата ретикулоцитов кролика, связавшихся либо с контрольной мРНК  $\beta$ G (дорожка 1), либо с полной 3'НТО мРНК *YB-1*, либо с фрагментами 3'НТО мРНК *YB-1*: регуляторным элементом (фрагмент I, 1136-1204 н. в последовательности мРНК *YB-1* кролика), фрагментом II (1205-1328 н.) и фрагментом III (1205-1501 н.) - дорожки 2-5 соответственно. Окрашка Кумасси G-250. Знаком \* обозначены белки, идентифицированные методом масс-спектрометрии.

Белок hnRNP Q был выбран для дальнейшей работы по нескольким причинам. Во-первых, он специфически связывается с регуляторным элементом мРНК *YB-1*, с которым, как уже было сказано, взаимодействуют белки YB-1 и PABP, которые регулируют трансляцию этой мРНК. Во-вторых, hnRNP Q по электрофоретической подвижности схож с белком, который, как было показано ранее в экспериментах по УФ-сшивкам, перешивается с 3'НТО мРНК *YB-1* и, также как и PABP, вытесняется с неё поли(А)-РНК-ой, то есть имеет повышенное сродство к А-богатым последовательностям [478]. Наконец, в-третьих, сообщалось, что hnRNP Q может взаимодействовать с YB-1 [140, 479]. Исходя из этого, было предположено, что hnRNP Q также оказывает влияние на трансляцию мРНК *YB-1*, возможно за счет изменения связывания YB-1 и PABP с регуляторным элементом мРНК *YB-1*.

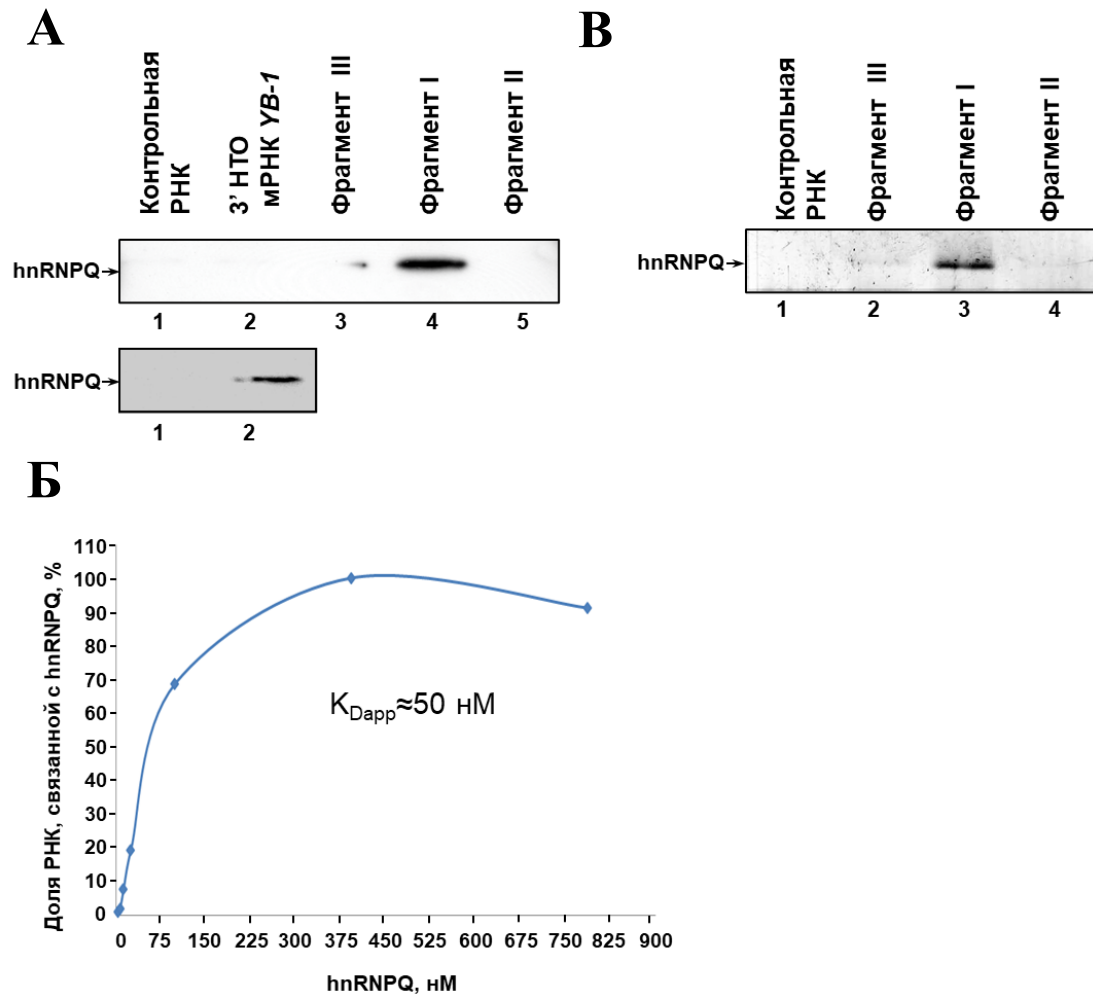
## **2.2 Подтверждение специфичности связывания hnRNP Q с регуляторным элементом в 3'НТО мРНК *YB-1***

Для подтверждения специфичности связывания hnRNP Q с 3'НТО мРНК *YB-1* лизаты ретикулоцитов кролика инкубировали с биотинилированной контрольной РНК *AβG*, либо с биотинилированными фрагментами мРНК *YB-1*, содержащими либо полную размерную 3'НТО, либо фрагмент I (регуляторный элемент), либо фрагмент II, либо фрагмент III (Рис. 14А), иммобилизованными на стрептавидин-сефарозе. Белки, связавшиеся с РНК, разделяли ДСН-гель-электрофорезом, а затем проводили иммуноблоттинг с использованием антител против hnRNP Q. Согласно рисунку 15А, hnRNP Q связывается с фрагментом I (регуляторным элементом) в 3'НТО мРНК *YB-1* и при этом не взаимодействует с контрольной РНК, фрагментами II и III 3'НТО мРНК *YB-1* (ср. дорожки 4 и 1, 3, 5, верхняя панель). Используемые антитела позволили детектировать hnRNP Q в препарате белков, связавшихся с полной размерной 3'НТО только после длительной экспозиции (Рис. 15А, нижняя панель). Не столь сильное взаимодействие hnRNP Q с полной размерной 3'НТО по сравнению с регуляторным элементом, можно объяснить тем, что регуляторный элемент частично экранирован в составе более протяженного фрагмента 3'НТО за счет образования дополнительной вторичной структуры

## **2.3 Определение сродства и специфичности связывания выделенного рекомбинантного hnRNP Q с РНК**

Для исследования влияния hnRNP Q на трансляцию мРНК *YB-1* был получен рекомбинантный белок hnRNP Q. Чтобы убедиться в том, что выделенный белок hnRNP Q является функционально активным, было решено проверить, обладает ли он способностью

связывать РНК. Для этого были использованы метод связывания РНК-белковых комплексов на нитроцеллюлозных фильтрах (мембране).



**Рисунок. 15. Подтверждение специфичности связывания hnRNP Q с фрагментами мРНК YB-1. А.** – По 15 пмоль фрагментов РНК, иммобилизованных на стрептавидин-сефарозе, инкубировали с 300 мкл лизата ретикулоцитов кролика. Белки, связавшиеся с РНК, элюировали, разделяли ДСН-гель-электрофорезом, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и окрашивали антителами против hnRNP Q. Верхняя панель – экспозиция 5 мин, нижняя – 30 мин. **Б.** Приблизительная оценка константы диссоциации комплекса рекомбинантного белка hnRNPQ и фрагмента РНК методом связывания РНК-белковых комплексов на нитроцеллюлозных фильтрах. **В.** по 15 пмоль фрагментов РНК, иммобилизованных на стрептавидин-сефарозе, инкубировали с 1 мкг рекомбинантного белка hnRNP Q в буфере PBS, содержащем суммарную РНК *E. coli* (30 мкг/мл) и БСА (1 мг/мл). Белки, связавшиеся с РНК, элюировали, разделяли ДСН-гель-электрофорезом, гель окрашивали Кумасси G250.

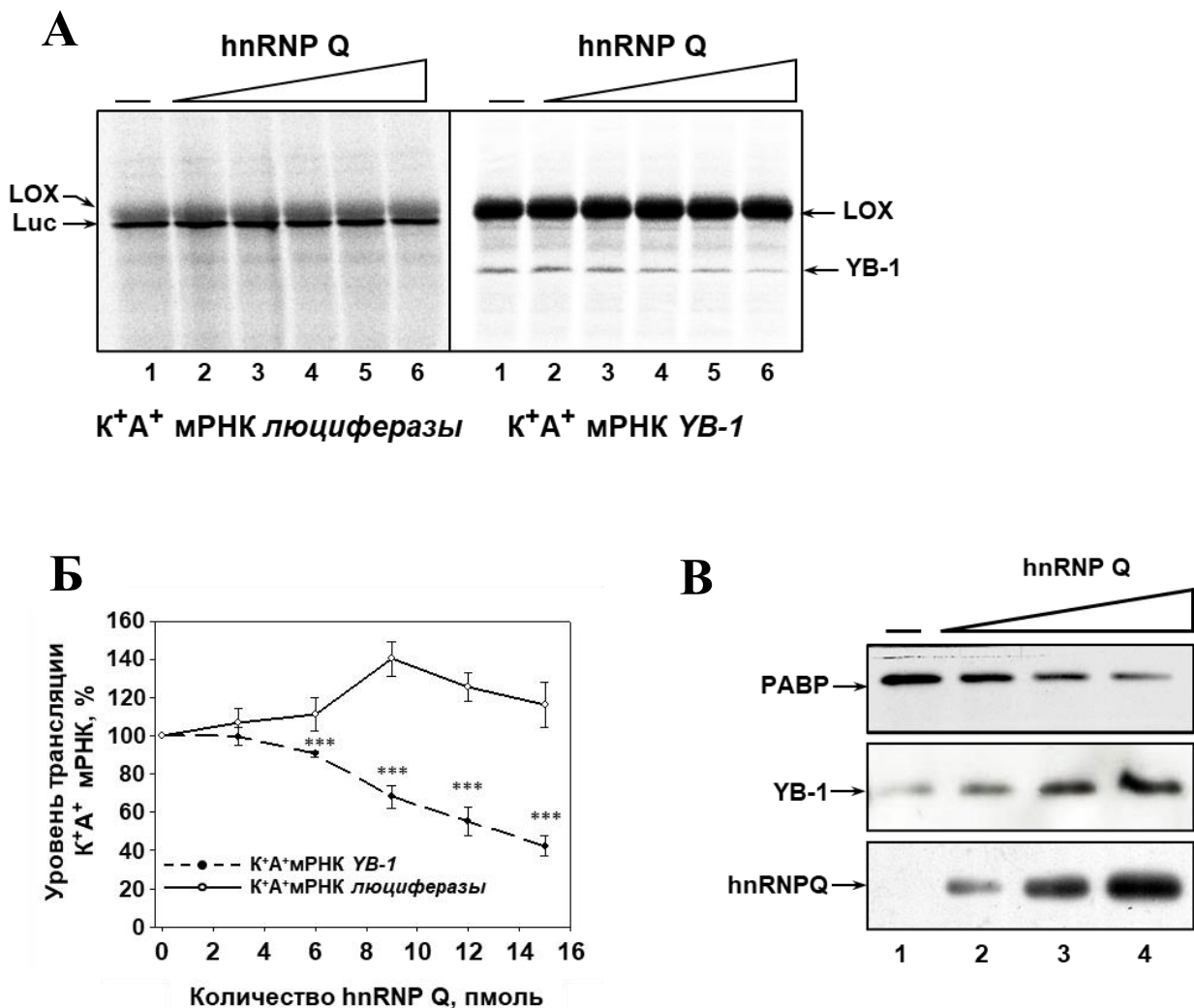
На рисунке 15Б представлен график зависимости доли связанной с белком [<sup>32</sup>P]-меченой РНК от концентрации белка в реакционной смеси. Используя этот график, можно оценить кажущуюся константу диссоциации комплекса ( $K_{Dapp}$ ) регуляторного фрагмента 3'НТО мРНК YB-1 с белком hnRNP Q.  $K_{Dapp}$  принимали равной концентрации белка, при которой на нитроцеллюлозной мембране задержалось 50% [<sup>32</sup>P]-меченой РНК. Она составила около 50 нМ.

Полученная величина соответствует литературным данным по связыванию hnRNP Q со специфическими последовательностями [480].

Кроме того, было решено проверить, обладает ли выделенный hnRNP Q способностью специфично связываться с фрагментом I 3'НТО мРНК *YB-1*. Для этого исследовали связывание рекомбинантного белка hnRNP Q с биотинилированными фрагментами 3'НТО мРНК *YB-1*. Как видно на рисунке 15В, рекомбинантный белок специфично связывается с фрагментом I (дорожка 3), но не с контрольной РНК (дорожка 1) и фрагментами II и III 3'НТО мРНК *YB-1* (дорожки 2 и 4 соответственно). Таким образом, рекомбинантный белок hnRNP Q способен специфически взаимодействовать с фрагментом I (регуляторным элементом) 3'НТО мРНК *YB-1*.

#### 2.4 Исследование влияния hnRNP Q на трансляцию мРНК *YB-1* в бесклеточной системе трансляции

Далее в бесклеточной системе трансляции (БСТ) на основе лизата ретикулоцитов кролика было исследовано влияние рекомбинантного белка hnRNP Q на трансляцию мРНК *YB-1* и мРНК люциферазы *Fluc* (в качестве контроля).



**Рисунок 16. А-Б.** Влияние hnRNP Q на трансляцию экспированных полиаденилированных мРНК *YB-1* и мРНК *люциферазы Fluc*. 100 нг мРНК транслировали в БСТ на основе ретикулоцитов кролика в течение 45 мин при 30°C в присутствии [<sup>35</sup>S]-метионина и увеличивающихся количеств рекомбинантного hnRNP Q (дорожки 2–6 – 200, 400, 600, 800 и 1000 нг соответственно) или без белка (дорожка 1). Продукты трансляции разделяли ДСН-гель-электрофорезом и детектировали автордиографией. LOX – 15-липоксигеназа, синтезируемая с эндогенной матрицы ретикулоцитов кролика. Интенсивность полос, соответствующих синтезируемым белкам, определяли с помощью автордиографической электронной системы OptiQuant. (А – радиоавтограф, Б – обсчет данных радиоавтографов). За 100% принимали уровень синтеза белка без добавления hnRNP Q. Эксперимент выполняли в трех повторностях. Ошибки – 2 стандартных отклонения. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний t-критерий Стьюдента; \*\*\*p < 0,001. **В.** Влияние hnRNP Q на связывание белков PABP и YB-1 с фрагментом I (РЭ) 3'НТО мРНК *YB-1*. 25 пмоль фрагмента I 3'НТО мРНК *YB-1*, иммобилизованного на стрептавидин-сефарозе, инкубировали с 100 мкл лизата ретикулоцитов кролика в присутствии hnRNP Q (дорожка 2 – 500 нг, дорожка 3 – 1000 нг, дорожка 4 – 3000 нг) или без него (дорожка 1). Белки, связавшиеся с РНК, были элюированы, разделены ДСН-гель-электрофорезом и перенесены на нитроцеллюлозную мембрану. YB-1, PABP и hnRNPQ детектировали соответствующими антителами.

В экспериментах использовали экспированные и полиаденилированные (K<sup>+</sup>A<sup>+</sup>) мРНК. Эти мРНК транслировали в БСТ в присутствии [<sup>35</sup>S]-метионина и экзогенного hnRNP Q в увеличивающихся количествах. Белки разделяли ДСН-гель-электрофорезом, а [<sup>35</sup>S]-меченные продукты трансляции детектировали автордиографией (Рис. 16А-Б). На рисунках видно, что при увеличении количества белка hnRNP Q трансляция мРНК *YB-1* значительно подавляется. В то же время трансляция контрольной мРНК *люциферазы* в этих условиях стимулируется.

Таким образом, hnRNP Q, специфично связывающийся с 3'НТО мРНК *YB-1*, может быть негативным регулятором трансляции этой мРНК.

## 2.5 Влияние hnRNP Q на связывание белков PABP и YB-1 с регуляторным элементом 3'НТО мРНК *YB-1*

Как ранее было показано, основными регуляторами трансляции мРНК *YB-1* являются PABP и YB-1, которые связываются с регуляторным элементом в 3'НТО. Соотношение этих белков определяет уровень трансляции мРНК *YB-1* [67].

Для того, чтобы проверить, изменяется ли эффективность связывания PABP и YB-1 при добавлении hnRNP Q, был проведен следующий эксперимент. Биотинилированный регуляторный элемент 3'НТО мРНК *YB-1* иммобилизовали на смоле, инкубировали с лизатом ретикулоцитов кролика в присутствии рекомбинантного hnRNP Q и элюировали связавшиеся белки. PABP, YB-1 и hnRNP Q в элюате детектировали с помощью соответствующих антител. Как видно на рисунке 16В, при добавлении hnRNP Q наблюдается постепенное уменьшение связывания PABP с регуляторным элементом 3'НТО мРНК *YB-1* и одновременное увеличение связывания белка YB-1.

Можно предположить, что hnRNP Q непосредственно привлекает YB-1 на регуляторный элемент. В пользу этого свидетельствует тот факт, что hnRNP Q может взаимодействовать с

УВ-1 [140, 479]. Привлекая УВ-1 к регуляторной последовательности, hnRNP Q способствует вытеснению РАВР. С другой стороны, известно, что hnRNP Q, как и РАВР, предпочитает связываться с А-богатыми последовательностями [481, 482]. Поэтому hnRNP Q может препятствовать связыванию РАВР с А-богатым участком регуляторного элемента. В этом случае снижение связывания РАВР также приводит к повышению связывания УВ-1 и, следовательно, к ингибированию трансляции мРНК *УВ-1*. В любом случае ингибирующее влияние белка hnRNP Q на трансляцию мРНК *УВ-1* может объясняться тем, что он способствует повышенному связыванию белка УВ-1 с регуляторным элементом в 3'НТО.

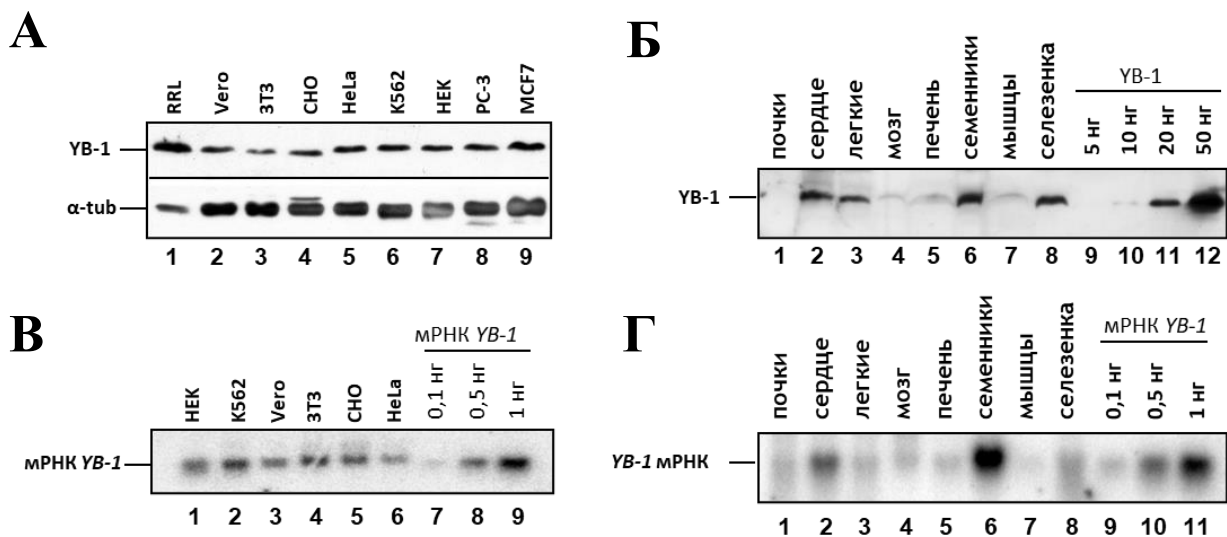
### 3. Регуляция синтеза YB-1 в клетках

Исследование регуляции синтеза YB-1 в бесклеточной системе трансляции на основе ретикулоцитов кролика внесло большой вклад в понимание возможного механизма авторегуляции синтеза YB-1. Однако доказательств авторегуляции синтеза YB-1 в культуре клеток или в живых организмах не было, а между тем в этих системах всё может происходить иначе. Кроме того, ничего не было известно о других возможных способах контроля синтеза YB-1 в клетках. Поэтому постепенно исследования регуляции синтеза YB-1 сдвинулись в сторону экспериментов с живыми клетками.

#### 3.1 Исследование количества белка YB-1, количества мРНК YB-1 и уровня её трансляции в культивируемых клетках высших эукариот и тканях кролика

##### 3.1.1 Анализ уровня мРНК YB-1 и белка YB-1 в культивируемых клетках и тканях животных

Прежде чем исследовать регуляцию трансляции мРНК YB-1 в культивируемых клетках или тканях животных, необходимо было предварительно провести работу по поиску методических подходов, позволяющих оценить уровень синтеза белка YB-1. К простейшим таким подходам относится сопоставление количества мРНК YB-1 и количества белка YB-1.



**Рисунок 17.** Анализ количества мРНК YB-1 и белка YB-1 в культивируемых клетках. **А** и **Б**, 15 мкг общего белка из лизатов различных клеточных линий (**А**) или 50 мкг общего белка из лизатов тканей (**Б**) анализировали методом иммуноблоттинга. Приблизительная оценка количества белка YB-1 проводилась с использованием препарата рекомбинантного белка YB-1 (дорожки 9-12 на панели Б). **В** и **Г**, 10 мкг тотальной РНК из лизатов различных клеточных линий (**В**) или лизатов тканей (**Г**) анализировали методом Нозерн-блоттинга. Приблизительная оценка количества мРНК YB-1 проводилась с использованием синтезированной *in vitro* мРНК YB-1 (дорожки 7-9 на панели В; дорожки 9-11 на панели Г).

Содержание белка YB-1 и мРНК *YB-1* в лизатах различных органов кролика и нескольких культур эукариотических клеток было оценено методами Нозерн-блоттинга и иммуноблоттинга. На рисунке 17А видно, что в тотальных лизатах эукариотических клеток количество белка YB-1 не сильно варьирует и составляет примерно 15-20 нг на 10 мкг тотального белка. Не отличается большой вариативностью и количество мРНК *YB-1* в этих клетках (Рис. 17Б) - примерно 0.4-0.6 нг на 10 мкг тотальной РНК. Можно отметить, лишь небольшое несоответствие количества мРНК *YB-1* и белка YB-1 в клетках NIH3T3: мРНК *YB-1* в них больше чем в остальных клеточных линиях, но при этом белка YB-1 заметно меньше.

В лизатах из органов кролика наблюдается большее разнообразие в содержании мРНК *YB-1* и белка YB-1 (Рис. 17Б). Так, наиболее обогащены белком YB-1 семенники, селезенка, легкие и сердце – 6-8 нг на 10 мкг тотального белка. В остальных органах (печени, почках, мозге, мышечной ткани) количество YB-1 составляет примерно 1-2 нг на 10 мкг тотального белка. Наибольшее количество мРНК *YB-1* детектируется в семенниках (1 нг на 10 мкг тотальной РНК), а также в сердце (0,4 нг на 10 мкг тотальной РНК). В остальных органах количество мРНК *YB-1* варьирует от 0,07 до 0,15 нг на 10 мкг тотальной РНК (Рис. 17Г). Необходимо отметить, что в легких и селезенке, несмотря на низкое количество мРНК *YB-1*, количество белка YB-1 находится на высоком уровне, сопоставимым с количеством белка YB-1 в семенниках. Такой результат предполагает, что в этих органах мРНК *YB-1* хорошо транслируется.

### **3.1.2. Анализ уровня трансляции мРНК *YB-1* в клетках.**

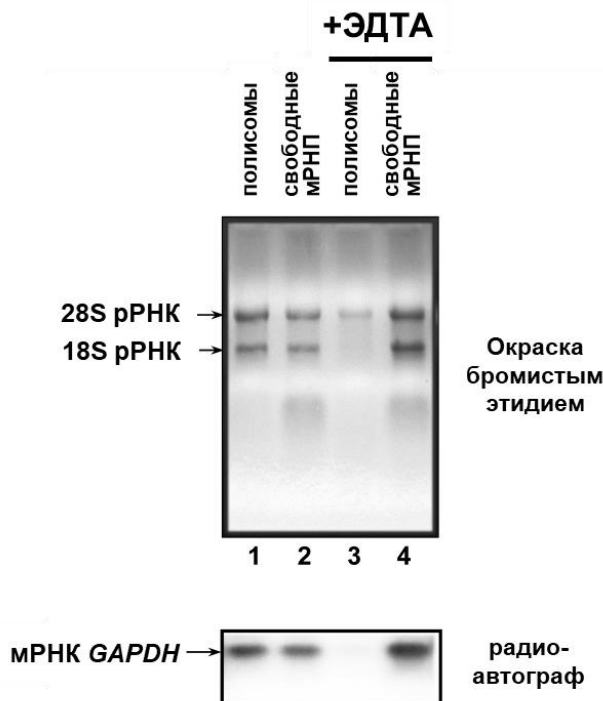
С точки зрения исследования регуляции трансляции важно знать, насколько эффективно транслируется мРНК, в нашем случае мРНК *YB-1*. Для анализа уровня трансляции мРНК *YB-1* можно определить содержание мРНК *YB-1* во фракциях полисом и свободных мРНК из лизатов эукариотических клеток и органов кролика. Разделение клеточных лизатов на фракции полисом и свободных мРНК обычно проводят путем их ультрацентрифугирования в градиенте концентрации сахарозы с последующим сбором фракций градиента (12-16) и анализом содержания во фракциях исследуемой мРНК. Этот способ технически весьма трудоемкий и для анализа большого количества образцов не удобен. Поэтому был разработан экспресс-метод анализа распределения мРНК между полисомами и свободными мРНК. Он заключается в следующем. Лизаты клеток центрифугируют через 50% сахарозную подушку и считают, что супернатант содержит свободные мРНК, а осадок - полисомные мРНК. После выделения тотальной РНК из этих фракций, исследуемые мРНК детектируют методом Нозерн-блоттинга. Разумеется, многое зависит от времени и скорости центрифугирования. Экспериментально было подобрано, что 13 минут центрифугирования 100 мкл клеточного лизата через 900 мкл



сахарозной подушки в роторе TLA100.3 при скорости 90000 об/мин достаточно для разделения полисомных и свободных мРНК.

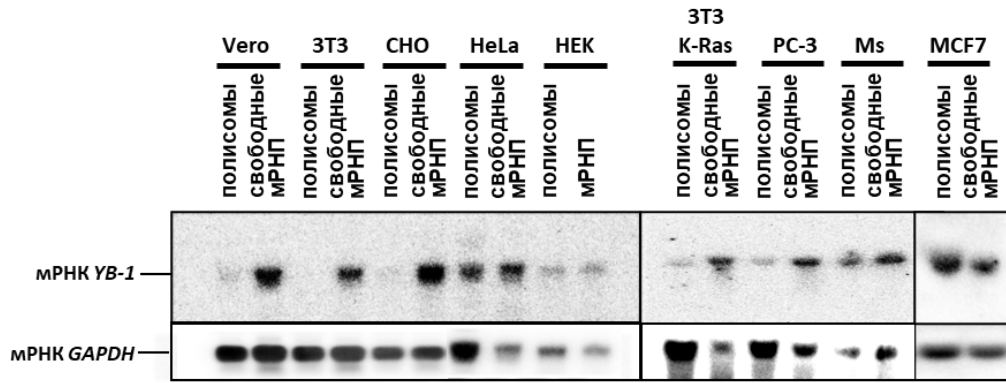
Чтобы продемонстрировать это был проведен следующий эксперимент. В лизат клеток перед центрифугированием добавляли ЭДТА до концентрации 30 мМ. ЭДТА, способствуя диссоциации рибосомных субчастиц (разрушая, соответственно, и полисомы) должен переводить мРНК в свободные мРНК. Следовательно вся мРНК должна детектироваться после центрифугирования в супернатанте. Как видно на рисунке 18, в эксперименте без добавления ЭДТА мРНК *GAPDH* (мРНК глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы) присутствует в значительном количестве (около 60%) в осадке (полисомная фракция). После добавления ЭДТА в лизат клеток НЕК293Т вся мРНК *GAPDH* детектируется в супернатанте. При этом важно также отметить, что 18S рибосомная РНК детектируется только в супернатанте, а небольшое количество 28S рибосомной РНК детектируется в осадке. Это говорит о том, что за время центрифугирования осаждаются частицы с коэффициентом седиментации около 60S и более. Таким образом, можно уверенно говорить о том, что мРНК, которая детектируется в осадке, ассоциирована с полисомами и одиночными рибосомами (80S), то есть транслируется. А та, что детектируется в супернатанте, либо представлена в виде свободных мРНК, либо ассоциирована с малой рибосомной субчастицей, то есть не транслируется.

С помощью вышеописанного экспресс-метода анализа распределения мРНК между полисомами и свободными мРНК был определен трансляционный статус мРНК *YB-1* и контрольной мРНК *GAPDH* в нескольких клеточных линиях и органах кролика. мРНК *GAPDH* была выбрана в качестве контроля, поскольку принадлежит к так называемым мРНК домашнего хозяйства и, как известно, хорошо транслируется.

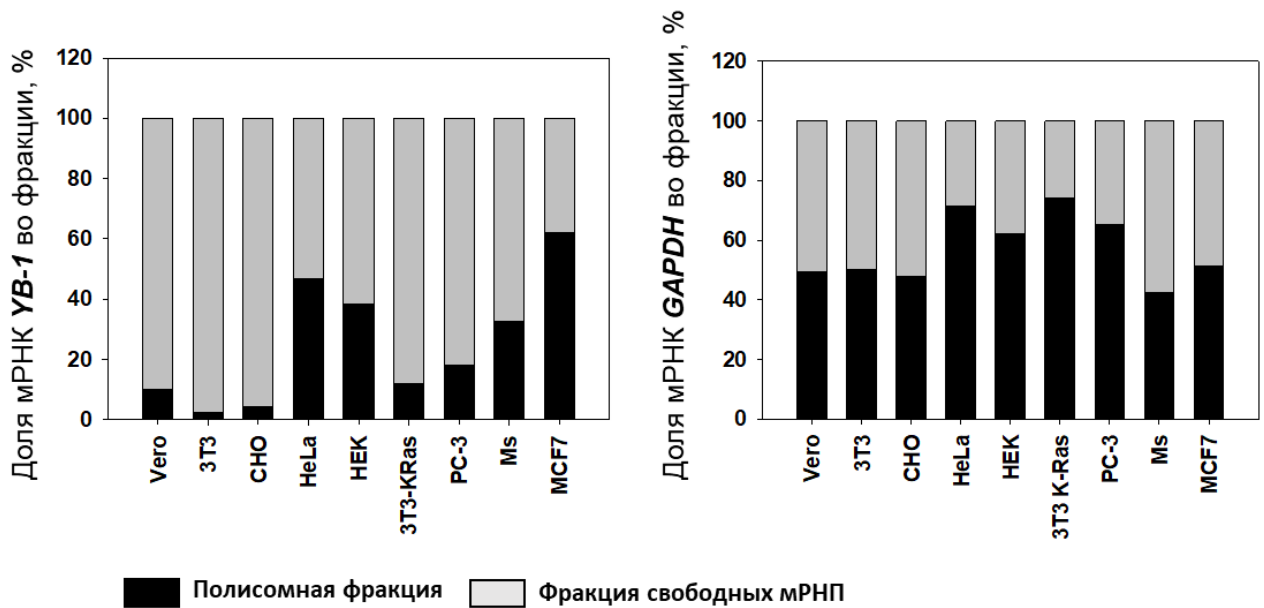


**Рисунок 18. Анализ распределения мРНК между полисомными и свободными фракциями мРНК в клетке.** Цитоплазматический лизат клеток НЕК293 без (дорожки 1 и 2) или с 30 мМ ЭДТА (дорожки 3 и 4) центрифугировали через подушку из 50% сахарозы при 90 000 об/мин в роторе TLA-100 на центрифуге TL-100 (Beckman) в течение 13 мин для осаждения полисом. Тотальную РНК из супернатанта (свободные мРНК) и полисомной фракции (ресуспендированный осадок) выделяли с помощью реагента TRIzol, подвергали электрофорезу в агарозном геле (верхняя панель, окраска бромистым этидием) и Нозерн-блот-гибридизации с [<sup>32</sup>P]-меченым фрагментом кДНК *GAPDH* (нижняя панель).

А



Б



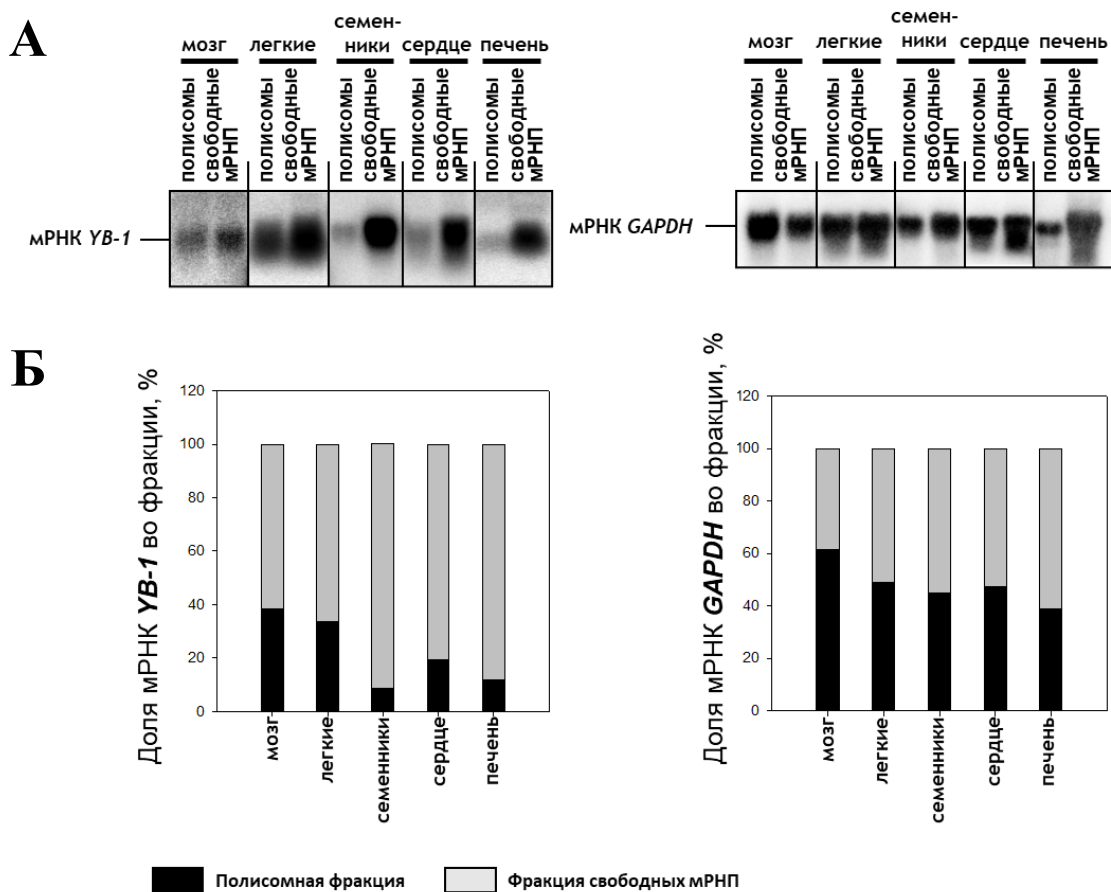
**Рисунок 19.** Анализ распределения мРНК *YB-1* и мРНК *GAPDH* между полисомными и свободными фракциями мРНК в различных клеточных линиях. А. Цитозольные клеточные экстракты центрифугировали через подушку из 50% сахарозы для отделения. Тотальную РНК из супернатанта (свободные мРНК) и полисомной фракции (ресуспендированный осадок) экстрагировали с помощью TRIzol, подвергали электрофорезу в агарозном геле и Нозерн-блот-гибридизации с [<sup>32</sup>P]-меченным фрагментом кДНК *YB-1* или *GAPDH*. Б. Относительную радиоактивность детектируемого сигнала определяли с использованием Packard Cyclone Storage Phosphor System (Packard Instrument Company, Inc.). Сумма значений относительной радиоактивности во фракциях свободных и полисомных мРНК принималась за 100%.

На рисунке 19 видно, что большая доля (50-70%) контрольной мРНК *GAPDH* во всех исследованных клеточных линиях, как и ожидалось, находится в транслируемых полисомных мРНК. Высокая доля мРНК *YB-1* во фракции полисом характерна для клеток HeLa, MCF-7 и HEK293T, в которых около 50% мРНК *YB-1* находится в составе полисомных мРНК.

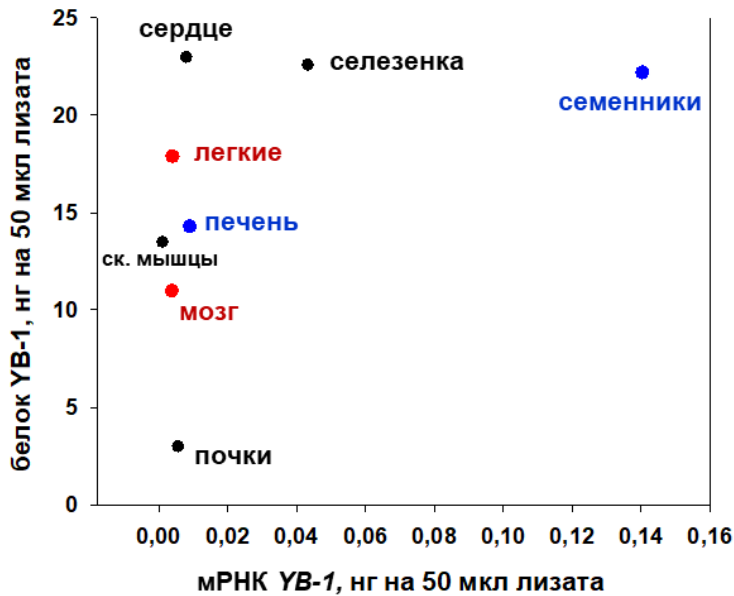
В остальных исследованных клеточных линиях, в том числе и раковых, значительная доля мРНК *YB-1* находится в форме свободных мРНК и, видимо, слабо транслируется или вовсе не транслируется. В некоторых случаях (клетки NIH3T3) более 90% мРНК *YB-1* седиментирует как

свободные мРНК. Таким образом, мРНК *YB-1* в большинстве исследованных клеточных линий является слабо транслируемой матрицей.

Анализ распределения мРНК *YB-1* в лизатах некоторых органов кролика (Рис. 20) также показал, что мРНК *YB-1* транслируется хуже, чем контрольная мРНК *GAPDH*. Однако стоит отметить некоторые особенности. В легких довольно низкое содержание мРНК *YB-1*, но при этом уровень её трансляции довольно высок, что, по-видимому, обеспечивает высокое содержание белка в этом органе по сравнению с остальными. В мозге уровень трансляции мРНК *YB-1* также высок, но при этом содержание белка довольно низкое. Это может означать, что в этом органе регуляции может быть подвержена деградация белка *YB-1*. В семенниках, где много и белка, и мРНК *YB-1*, около 90% мРНК *YB-1* находится в составе свободных нетранслируемых мРНК. Другими словами, мРНК *YB-1* хранится в составе маскированных мРНК.



**Рисунок 20.** Анализ распределения мРНК *YB-1* и мРНК *GAPDH* между полисомными и свободными фракциями мРНК в органах кролика. А. Тканевые цитозольные экстракты центрифугировали через подушку из 50% сахарозы. Тотальную РНК из супернатанта (свободные мРНК) и полисомной фракции (ресуспендированный осадок) выделяли с помощью реагента TRIzol, подвергали электрофорезу в агарозном геле и Нозерн-блот-гибридизации с [<sup>32</sup>P]-меченным фрагментом кДНК *YB-1* или *GAPDH*. Б. Относительную радиоактивность полос определяли с использованием Packard Cyclone Storage Phosphor System (Packard Instrument Company, Inc.). Сумма значений относительной радиоактивности в свободной и полисомной фракциях мРНК принималась за 100%.



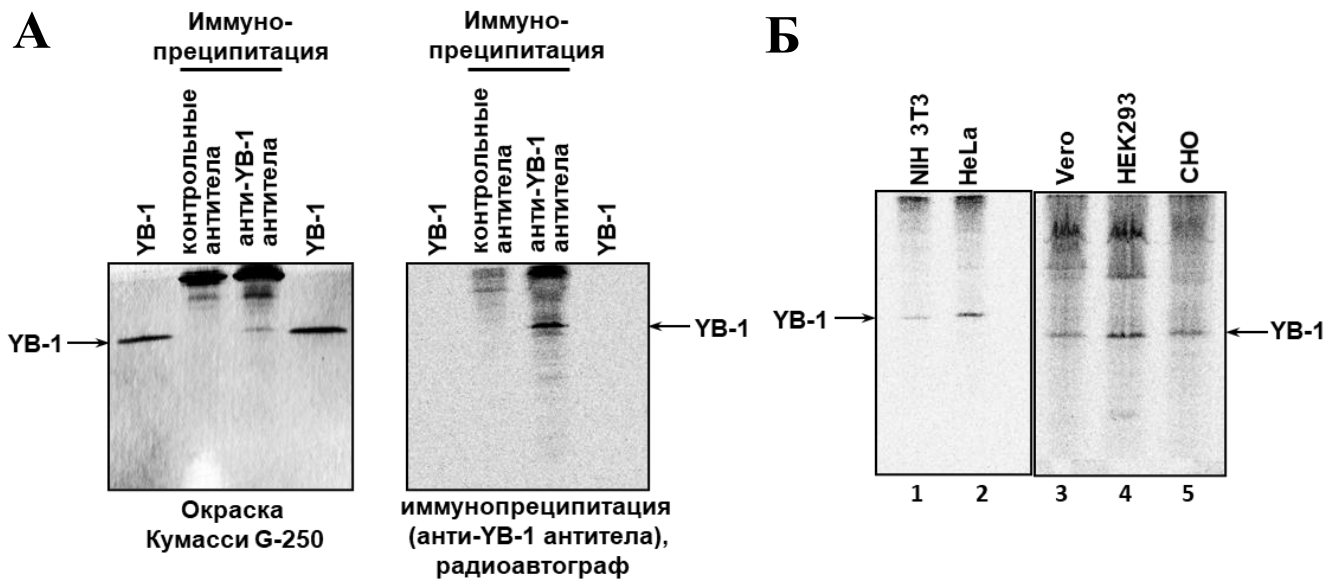
**Рисунок 21. Сопоставление количеств мРНК YB-1 и белка YB-1 в лизатах различных органов кролика.** Количества мРНК YB-1 и белка YB-1 были рассчитаны на основании обсчетов иммуноблота и Нозерн-блота, представленных на рисунках 8Б и 8Г. Красным отмечены органы с высоким содержанием мРНК YB-1 в полисомной фракции, а синим – с низким.

Согласно предлагаемой модели регуляции синтеза YB-1 [454], сам белок YB-1 ингибирует собственный синтез. Такая модель предполагает, что количество белка YB-1 будет зависеть от количества мРНК YB-1. Это утверждение трудно применить к исследованным культивируемым клеточным линиям, поскольку и количество мРНК, и количество белка YB-1 в них варьирует слабо. С другой стороны, данное утверждение не всегда применимо в случае «настоящих» (нативных) клеток и тканей. Анализ содержания мРНК YB-1 и белка YB-1 в лизатах органов кролика показал, что содержание мРНК YB-1 и белка YB-1 часто не коррелируют (Рис. 21). Возможно, в этих случаях задействованы другие способы пост-транскрипционной регуляции синтеза YB-1. В частности, высокий уровень трансляции мРНК YB-1 в легких объясняет, что при низком количестве мРНК YB-1 количество белка YB-1 в этом органе велико. В лизатах семенников содержание мРНК YB-1 чрезвычайно высоко, поэтому можно было ожидать и более высокого уровня белка YB-1. Однако этого не наблюдается, и возможно большая часть мРНК YB-1 маскирована для будущих событий. В мозге уровень трансляции мРНК YB-1 также высок, но при этом содержание белка довольно низкое. Это может означать, что в этом органе регуляции может быть подвержена деградация белка YB-1.

### 3.1.3. Анализ уровня синтеза YB-1 в культивируемых клетках методом метаболического мечения

Вышеописанные эксперименты позволяют оценить уровень синтеза белка YB-1 по доле мРНК, ассоциированной с полисомами. Однако и такой метод недостаточно информативен и

удобен, когда необходимо узнать об изменениях в синтезе YB-1 при изменениях условий культивирования клеток (при стрессовых воздействиях). Изменения в доле мРНК, связанной с полисомами, могут быть небольшими и статистически незначимыми, но на самом деле могут свидетельствовать об изменении в синтезе белка. Следует учесть и тот факт, что, когда мРНК имеет значительную длину, она образует мРНК-частицы, седиментирующие в зоне полисом, и её присутствие в полисомной фракции может не означать трансляцию. Поэтому необходимо было разработать метод, который бы позволил детектировать именно вновь синтезированный белок YB-1. Для этого был применен метод метаболического мечения белков в клетках [<sup>35</sup>S]-метионином с последующей иммунопреципитацией меченого YB-1 из лизатов клеток за соответствующие антитела, электрофоретическим анализом преципитата и автордиографией.



**Рисунок 22. Метод анализа синтеза YB-1 в клетке.** **А.** Клетки HeLa инкубировали в среде с [<sup>35</sup>S]-метионином в течение 2 ч, собирали и лизировали. Лизат клеток использовали для иммунопреципитации с преиммунными антителами или антителами против YB-1. Белки, связанные с антителами, разделяли с помощью кислотно-мочевинного электрофореза в ПААГ, окрашивали Кумасси-G250, а [<sup>35</sup>S]-меченные белки выявляли с помощью автордиографии. Белок с электрофоретической подвижностью, соответствующей рекомбинантному YB-1, вырезали из геля и идентифицировали как YB-1 с помощью масс-спектрометрии. **Б.** Анализ синтеза YB-1 в клетках различных линий. Клетки инкубировали в среде с [<sup>35</sup>S]-метионином в течение 2 ч, собирали и лизировали. Лизаты клеток уравнивали по общей радиоактивности и использовали для иммунопреципитации с антителами против YB-1. Белки, связанные с антителами, разделяли с помощью кислотно-мочевинного электрофореза в ПААГ, а [<sup>35</sup>S]-меченные белки выявляли с помощью автордиографии.

Однако в случае использования обычного SDS-гель-электрофореза для разделения белков возникает трудность. Опыт нашей лаборатории показал, что при таком электрофорезе YB-1 трудно отличить от белков, ко-иммунопреципитирующих с YB-1. К тому же, тяжелые цепи иммуноглобулинов, присутствующие в большом количестве и движущиеся примерно в той же области, несколько «подавливают» остальные белки, меняя их положение в геле и/или

сближая их друг с другом. В совокупности, это не позволяет среди нескольких полос обнаружить ту, что действительно принадлежит YB-1. Чтобы решить эту проблему, вместо ДСН-гель-электрофореза был использован кислотнo-мочевинный электрофорез (см. раздел «Материалы и методы» пункт 29).

Благодаря высокому положительному заряду в кислых условиях, YB-1 обладает значительной электрофоретической подвижностью по сравнению с большинством белков соочистившихся с YB-1 при иммунопреципитации (в том числе с иммуноглобулинами). На рисунке 22А представлена типичная электрофореграмма и радиоавтограф, получаемые в этих экспериментах. Белок, соответствующий по подвижности рекомбинантному белку YB-1, был вырезан из геля, проанализирован методом пептидного фингерпринтинга и идентифицирован как YB-1. Таким образом, разработанная методика подходит для экспериментов по изучению уровня синтеза YB-1 в культурах эукариотических клеток. Здесь нужно оговориться, что за «уровнем синтеза YB-1» следует понимать скорость синтеза YB-1 (сколько метки включилось в YB-1 за время инкубации с [<sup>35</sup>S]-метионином).

С помощью описанного подхода был проанализирован синтез YB-1 в клетках HeLa, HEK293T (с высокой долей мРНК YB-1 во фракции полисом) и клетках NIH 3T3, CHO, Vero (с высокой долей мРНК YB-1 в свободных мРНК). В экспериментах использовались лизаты клеток, уравновешенные по включенной радиоактивной метке ([<sup>35</sup>S]-метионину). Оказалось, что в клетках NIH3T3, CHO и Vero с высоким содержанием мРНК YB-1 во фракции свободных мРНК синтез YB-1, тем не менее, осуществляется (Рис. 22Б, дорожки 1, 3 и 5). Уровень этого синтеза ниже (в 2-3 раза) по сравнению с таковым в клетках HeLa и HEK293T с высоким содержанием мРНК YB-1 в полисомной фракции (Рис. 22Б, дорожки 2 и 4). Таким образом, доля синтеза YB-1 в тотальном белковом синтезе в клетках NIH3T3, Vero и CHO ниже, чем в клетках HeLa и HEK, что подтверждает данные по анализу содержания мРНК YB-1 во фракциях полисом и свободных мРНК (Рис. 19). Кроме того, можно утверждать, что мРНК YB-1 в большинстве исследованных клеточных линий действительно плохо транслируется, а не находится в полностью нетранслируемой маскированной форме.

Разработанный метод детекции синтеза YB-1 в живых клетках прост в исполнении, достаточно чувствителен и позволяет выяснить некоторые аспекты регуляции количества YB-1 в клетке, которые до этого были слабо или лишь косвенно изучены. Первоочередная задача состояла в проверке гипотезы об авторегуляции синтеза YB-1 в живых клетках.

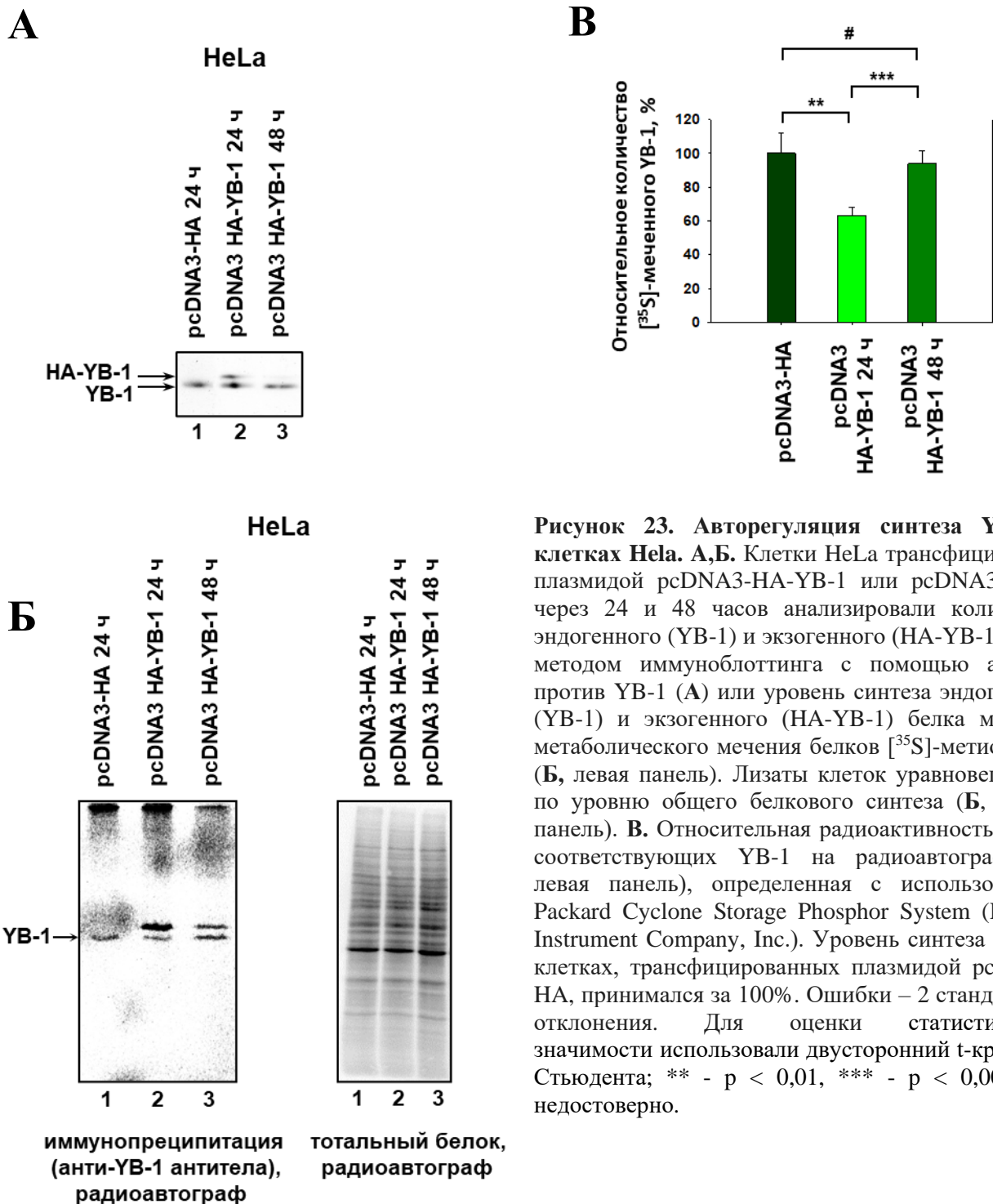
### 3.2. Авторегуляция синтеза YB-1 в клетках HeLa

Одной из особенностей синтеза YB-1 в бесклеточной системе трансляции является способность YB-1, взаимодействуя с регуляторной последовательностью в 3'НТО,

контролировать трансляцию собственной мРНК. Однако существует ли такая негативная регуляция в живых клетках, было неизвестно. Необходимо было показать, что повышение в клетке количества YB-1, например за счет синтеза экзогенного белка с плазмиды, приводит к уменьшению трансляции мРНК *YB-1* и, соответственно, к уменьшению количества эндогенного белка YB-1. Эксперимент проводился на клетках HeLa, поскольку в этих клетках большая доля мРНК *YB-1* была ассоциирована с полисомами (Рис. 19), а именно в такой ситуации можно ожидать заметного падения синтеза белка в случае наличия авторегуляции. Клетки HeLa трансфицировали плазмидой pcDNA3-NA-YB-1, кодирующей белок YB-1 с гемагглютининным довеском на N-конце (чтобы отличать экзогенный YB-1 от эндогенного), и культивировали в присутствии [<sup>35</sup>S]-метионина через 24 или 48 часов после трансфекции. Необходимо подчеркнуть, что плазида pcDNA3-NA-YB-1 не кодирует нетранслируемые области мРНК *YB-1*, поэтому трансляция синтезируемой с плазмиды мРНК *NA-YB-1* не должна регулироваться ни эндогенным белком YB-1, ни экзогенным NA-YB-1. Ожидалось, что синтез NA-YB-1 в клетке и, как следствие, повышение общего количества YB-1, негативно повлияет на количество эндогенного YB-1. Стоит отметить, что через 24 часа после трансфекции клеток плазмидой экспрессия экзогенного NA-YB-1 достигала максимума и не увеличивалась при дальнейшем культивировании клеток (Рис. 23А). При этом количество экзогенного NA-YB-1 было приблизительно равно количеству эндогенного белка YB-1, а видимого изменения количества эндогенного YB-1 не наблюдалось.

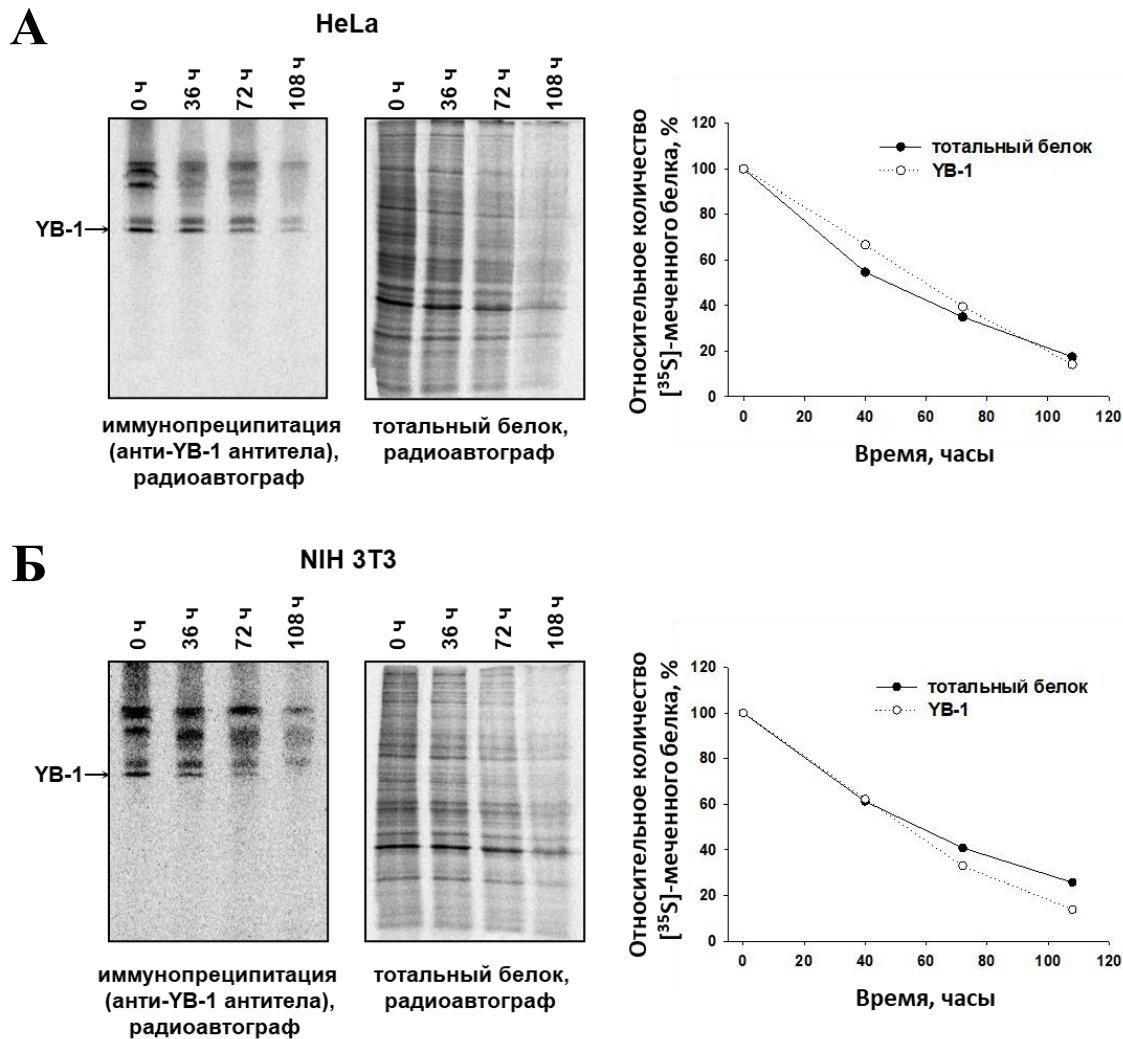
Что при этом происходит с синтезом белка YB-1? Как видно на рисунке 23Б,В, через 24 часа после трансфекции синтез эндогенного YB-1 снижается в клетках, экспрессирующих NA-YB-1, при том что общий белковый синтез в этих клетках не изменяется. Интересно, что через 48 часов после трансфекции синтез экзогенного NA-YB-1 снижается до уровня синтеза эндогенного, при этом последний восстанавливается до уровня синтеза в клетках, не экспрессирующих NA-YB-1. Это означает, что через 48 часов после трансфекции количество экзогенного белка NA-YB-1 уменьшилось, и его количества уже недостаточно для ингибирования синтеза эндогенного YB-1. Уменьшение количества экзогенного белка NA-YB-1 через 48 часов после трансфекции клеток HeLa плазмидой pcDNA3-NA-YB-1 также видно на рисунке 23А.

Эти результаты позволяют предположить, что эндогенный белок YB-1 весьма стабилен и период его полураспада в клетке заметно превышает 24 часа. Поэтому и нельзя за этот промежуток времени видеть уменьшение количества YB-1, даже если его синтез подавляется. Чтобы проверить стабильность белка YB-1, клетки HeLa и NIH3T3 культивировали в среде с [<sup>35</sup>S]-метионином в течение 2 часов, а затем меняли среду на среду без радиоактивной метки. Далее отбирали все клетки из одной чашки сразу после смены среды (контрольная точка, 0 часов), а из остальных через каждые 36 часов (36, 72, 108 часов). Очевидно, что с течением времени [<sup>35</sup>S]-меченные белки будут деградировать, что позволит оценить период полураспада белков в клетках.



**Рисунок 23. Авторегуляция синтеза YB-1 в клетках HeLa.** А,Б. Клетки HeLa трансфицировали плазмидой pcDNA3-HA-YB-1 или pcDNA3-HA и через 24 и 48 часов анализировали количество эндогенного (YB-1) и экзогенного (HA-YB-1) белка методом иммуноблоттинга с помощью антител против YB-1 (А) или уровень синтеза эндогенного (YB-1) и экзогенного (HA-YB-1) белка методом метаболического мечения белков [<sup>35</sup>S]-метионином (Б, левая панель). Лизаты клеток уравнивали по уровню общего белкового синтеза (Б, правая панель). В. Относительная радиоактивность полос, соответствующих YB-1 на радиоавтографе (Б, левая панель), определенная с использованием Packard Cyclone Storage Phosphor System (Packard Instrument Company, Inc.). Уровень синтеза YB-1 в клетках, трансфицированных плазмидой pcDNA3-HA, принимался за 100%. Ошибки – 2 стандартных отклонения. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний t-критерий Стьюдента; \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,005$ , # - недостоверно.





**Рисунок 24.** Стабильность эндогенного белка YB-1 в клетках HeLa и NIH3T3. Клетки HeLa (А) или NIH3T3 (Б) инкубировали в среде с  $[^{35}\text{S}]$ -метионином в течение 2 ч, меняли на среду без  $[^{35}\text{S}]$ -метионина и инкубировали в течение 0, 36, 72 или 108 часов. Далее клетки собирали и лизировали. Лизаты клеток уравнивали по общему белку (радиоавтограф на средней панели) и использовали для иммунопреципитации с антителами против YB-1. Белки, связанные с антителами, разделяли с помощью кислотно-мочевинного электрофореза в ПААГ, а  $[^{35}\text{S}]$ -меченные белки выявляли с помощью автордиографии (левая панель). Относительную радиоактивность полос определяли с использованием Packard Cyclone Storage Phosphor System (правая панель). Радиоактивность YB-1 в точке 0 часов принималась за 100%.

Большую часть лизатов (19/20) клеток использовали для иммунопреципитации за антитела против YB-1, а иммунопреципитат анализировали кислотно-мочевинным электрофорезом с последующей автордиографией. Меньшую часть лизатов (1/20) клеток анализировали ДНС-гель-электрофорезом с последующей автордиографией для оценки стабильности тотального белка. Как видно на рисунке 24, YB-1 в исследованных клеточных линиях действительно обладает довольно высокой стабильностью (период полураспада – около 60 часов), сравнимой со стабильностью большинства клеточных белков.

Значительно позже, после освоения новых методов (в первую очередь, метода редактирования генома и клеточных методов), был выполнен другой, ранее технически недоступный эксперимент по изучению авторегуляции синтеза белка YB-1 в клетках.

Для этого исследовалась трансляция репортерной мРНК *люциферазы NlucP* с 5'- и 3'-нетранслируемыми областями мРНК *YB-1* в клетках НЕК293ТΔYB-1 (см. подробнее в разделе «Влияние изменения количества белка Yb-1 на транскриптом и транслятом клеток» в главе «Результаты и обсуждение»), клетках НЕК293ТΔYB-1+YB-1 (стабильно экспрессирующих YB-1 на уровне, сопоставимом с уровнем эндогенного белка) и в этих же клетках НЕК293ТΔYB-1+YB-1, но дополнительно экспрессирующих YB-1 с плазмиды (Рис. 25А). Использование такого набора клеток позволило смоделировать ситуацию, когда репортерная мРНК транслируется в клетках с различным уровнем YB-1: от полного его отсутствия, до оверэкспрессии.

Плазмидой pNL2.2, кодирующей мРНК *NlucP* с 5' и 3'НТО мРНК *YB-1* под контролем промотора *YB-1*, трансфицировали указанные клетки. При трансфекции в клетки вводилась не только плаزمида pNL2.2, но и плазмида, кодирующая мРНК *люциферазы сверчка (Fluc)* с 5' и 3'НТО мРНК *BTF3* (мРНК фактора транскрипции *BTF3*), в качестве внутреннего контроля. После 24 часов культивирования из части клеток выделяли РНК для измерения количества синтезированных мРНК *NlucP* и *Fluc*, а другую часть использовали для измерения активности люцифераз *NlucP* и *Fluc*. Активность люциферазы *NlucP* нормализовали по активности внутреннего контроля *Fluc*, а количество мРНК *NlucP* – по количеству мРНК *BTF3\_Fluc\_BTF3*. На рисунке 25Б видно, что активность люциферазы *NlucP* значительно снижается при увеличении количества YB-1 в клетке.

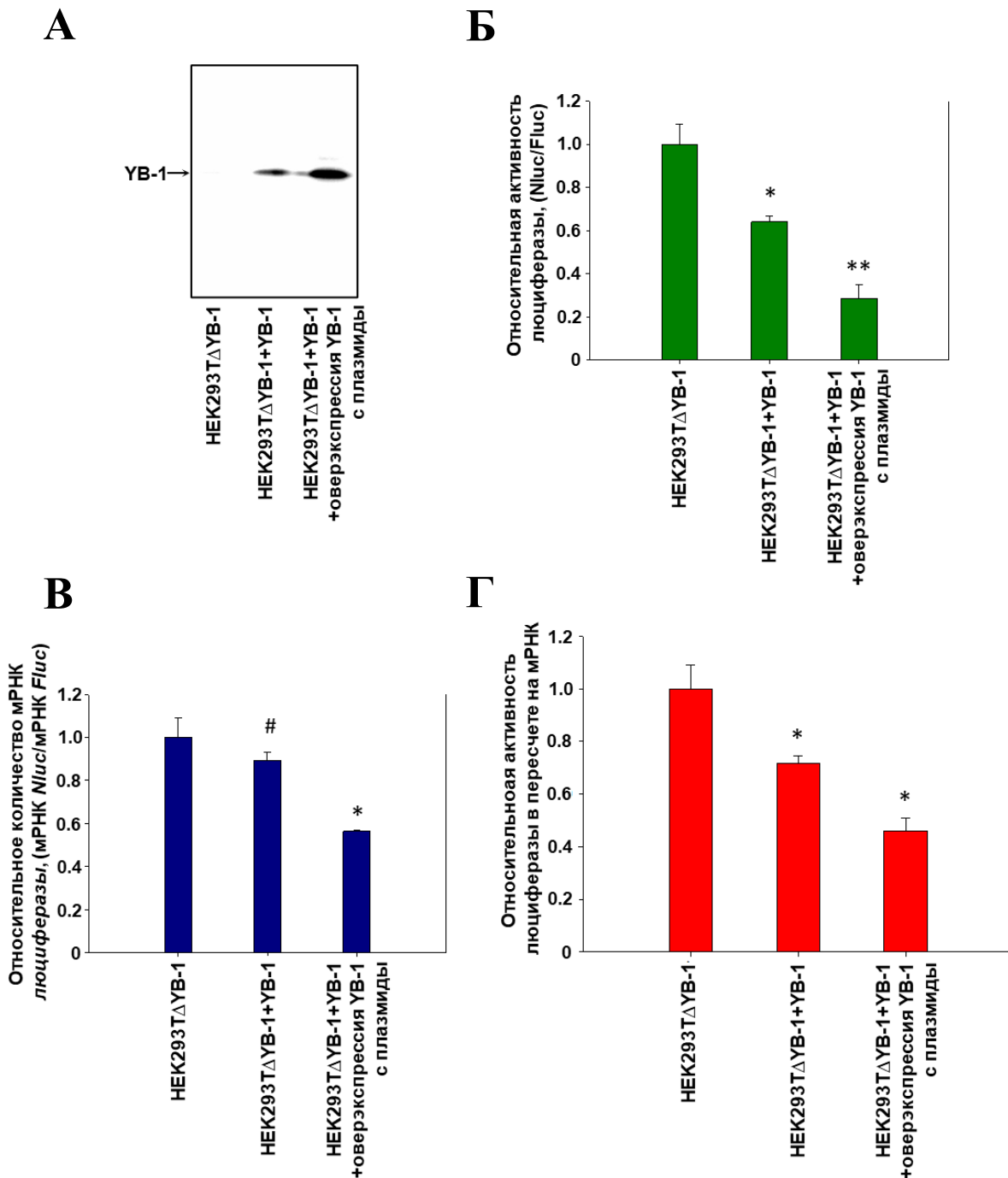
Количество мРНК *NlucP* с НТО мРНК *YB-1* практически не меняется при восстановлении уровня количества YB-1 до исходного, но падает примерно в 2 раза при оверэкспрессии (Рис. 25В).

Тем не менее, на рисунке 25Г можно видеть, что в перерасчете на мРНК, трансляция репортерной мРНК с НТО мРНК *YB-1* снижается с повышением количества YB-1 в клетке. Учитывая, что расчеты проведены относительно контрольной мРНК *Fluc* с НТО мРНК *BTF3*, можно говорить о том что наблюдаемое ингибирование специфично.

Кроме того, можно отметить, что НТО мРНК *YB-1* достаточно для ингибирования трансляции этой мРНК белком YB-1 в культивируемых клетках.

В совокупности все вышеизложенные факты свидетельствуют о существовании авторегуляции синтеза YB-1 в культивируемых клетках млекопитающих. На данный момент можно говорить, что ингибирующее действие YB-1 на трансляцию собственной мРНК опосредовано нетранслируемыми областями. Однако какая из НТО вносит в это решающий

вклад, сказать до сих пор трудно. С одной стороны, эксперименты *in vitro* говорят о том, что регуляторного элемента в 3'НТО мРНК *YB-1* достаточно для ингибирующего влияния *YB-1*, но в экспериментах на культурах эукариотических клеток ситуация может быть сложнее, поскольку имеются данные, что в авторегуляцию синтеза *YB-1* вовлечена 5'НТО мРНК *YB-1* [483], и более того, в недавней работе Wang et al. [484] приводится и вовсе удивительный факт участия 5'НТО мРНК *YB-1* в регуляции её трансляции. Оказалось, что в клетках глиобластомы оверэкспрессия с плазмиды Flag-*YB-1* приводит к стимуляции синтеза эндогенного белка *YB-1*, а также к стимуляции репортерной мРНК с 5'НТО мРНК *YB-1*. Из этого следует, что в зависимости от клеточного контекста и, вероятно, от дополнительных белков, взаимодействующих с НТО мРНК *YB-1*, эффект *YB-1* на трансляцию собственной мРНК может меняться. Этими дополнительными белками, в частности, являются РАВР и hnRNP Q. В этой связи изучение механизма регуляции трансляции мРНК *YB-1* белком *YB-1* всё еще требует внимательного изучения.

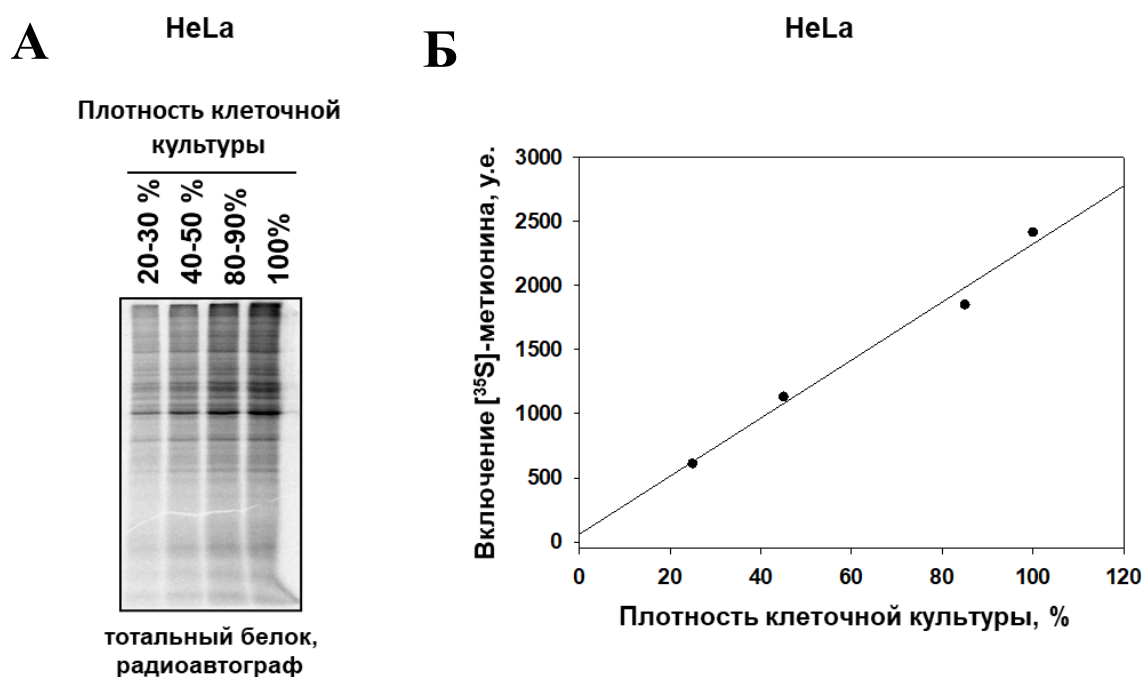


**Рисунок 25.** НТО мРНК *YB-1* обуславливают специфическую регуляцию трансляции белком *YB-1*. Клетки HEK293TΔYB-1, HEK293TΔYB-1+YB-1 и клетки HEK293TΔYB-1+YB-1, трансфицированные плазмидой pcDNA3YB-1-риго, трансфицировали плазмидами pNL2.2YB-1\_Nluc\_YB-1 и pNL2.2BTF3\_Fluc\_BTF3 (в качестве внутреннего контроля) и через 24 часа собирали, делили на три части и использовали: для иммуноблоттинга (А); для выделения тотальной РНК для измерения количества мРНК *Nluc*- и *Fluc* методом ОТ-ПЦР в реальном времени (В); для определения активности *Nluc* и *Fluc* (Б). Активность люциферазы *Nluc*, синтезированной с плазмиды pNL2.2YB-1\_Nluc\_YB-1 (нормализованная по активности *Fluc*, синтезированной с плазмиды pNL2.2BTF3\_Fluc\_BTF3). Количество мРНК *Nluc*, синтезированной с плазмиды pNL2.2YB-1\_Nluc\_YB-1 (нормированное по количеству мРНК *Fluc*, синтезированной с плазмиды pNL2.2BTF3\_Fluc\_BTF3). Г. Активность *Nluc* в пересчете на количество мРНК, полученная из данных, приведенных на панелях Б и В. Ошибки – два стандартных отклонения. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний *t*-критерий Стьюдента. \*\**p* < 0,01, \**p* < 0,05..

### 3.3. Синтез YB-1 и деление клеток

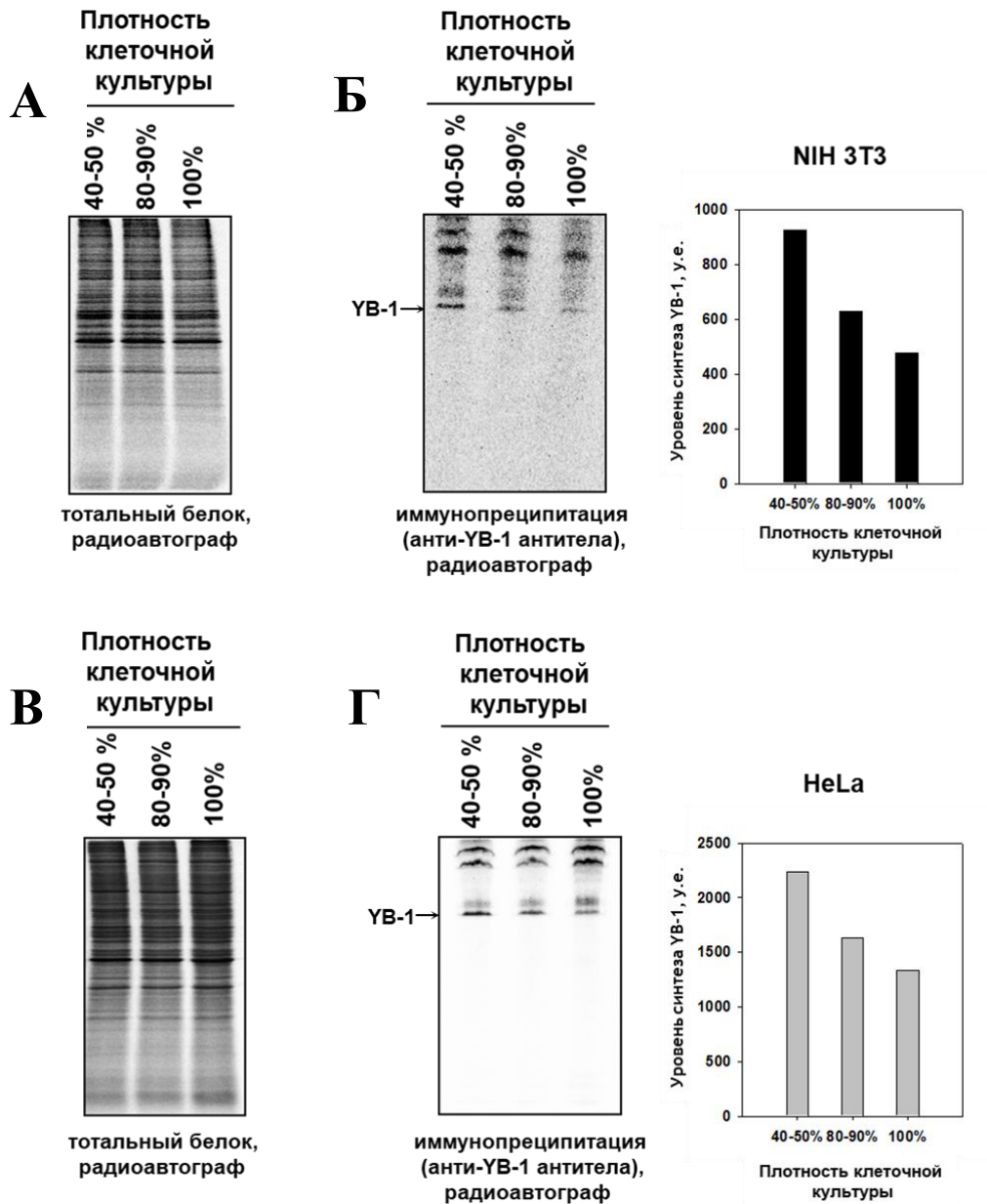
В большинстве исследованных клеточных линий мРНК *YB-1* находится преимущественно в форме свободных мРНК и, следовательно, плохо транслируется, в отличие от контрольной мРНК *GAPDH*. И только в некоторых клеточных линиях (раковых клетках HeLa и MCF7 и эмбриональных HEK293T) имеются условия, при которых трансляция мРНК *YB-1* находится на высоком уровне.

Известно, что количество YB-1 в клетке коррелирует с пролиферативной способностью клеток. Так, повышенное содержание YB-1 коррелирует с экспрессией маркеров пролиферации, гиперэкспрессия YB-1 приводит к гиперплазии, а время удвоения клеток увеличивается при подавлении экспрессии YB-1 микрорегуляторными РНК [284-286]. Однако можно предположить и обратное – замедление деления клеток может вызвать снижение уровня синтеза YB-1. Простым способом замедлить скорость деления клеток является изменение плотности клеток. Это так называемое торможение пролиферации, зависимое от плотности [485-487]



**Рисунок 26.** А. В клетках HeLa, выращенных до различной плотности, анализировали уровень тотального белкового синтеза методом метаболического мечения белков [<sup>35</sup>S]-метионином. Относительную радиоактивность дорожки определяли с использованием Packard Cyclone Storage Phosphor System (Packard Instrument Company, Inc.) (Б).

Предварительно необходимо было выяснить, как повлияет повышение плотности клеток и, как следствие, торможение пролиферации на глобальный белковый синтез. Для этого клетки HeLa выращивали до плотностей 40-50%, 80-90% и 100%. Затем их культивировали в среде с [<sup>35</sup>S]-метионином в течение часа. За это время включение метки прямо пропорционально количеству клеток при соответствующей плотности (Рис. 26). Поэтому можно утверждать, что глобальный белковый синтез не зависит в целом от плотности клеточной культуры в исследованном диапазоне за время мечения.



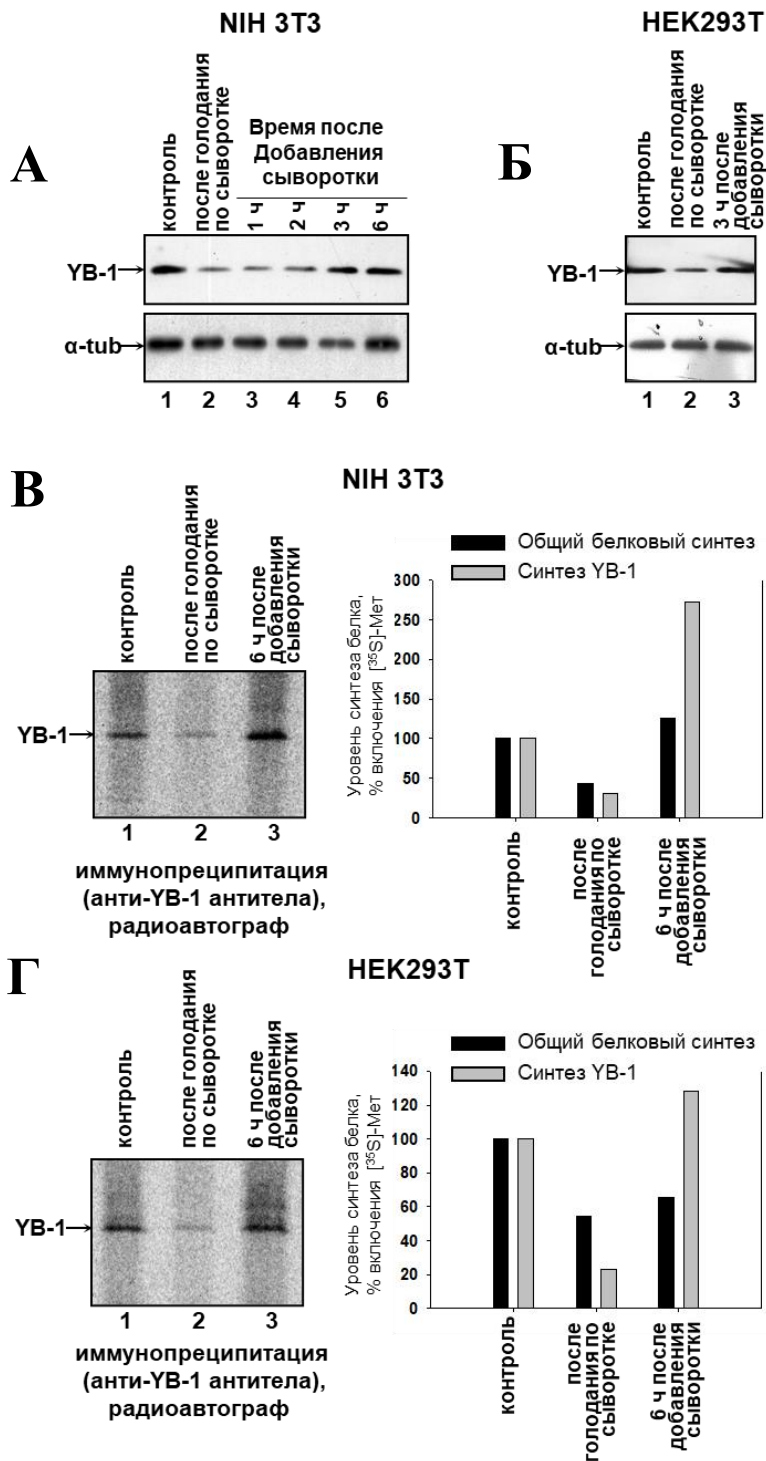
**Рисунок 27. Зависимость синтеза YB-1 от плотности клеточной культуры.** В клетках NIH3T3 (А, Б) и HeLa (В, Г) различной плотности анализировали уровень синтеза YB-1 методом метаболического мечения белков [<sup>35</sup>S]-метионином с последующей иммунопреципитацией с антителами против YB-1, разделением белков электрофорезом в кислотном-мочевинном ПААГ и автордиографией (Б, Г). Лизаты клеток уравнивали по уровню общего белкового синтеза (А, В). Относительную радиоактивность полос определяли с использованием Packard Cyclone Storage Phosphor System (Packard Instrument Company, Inc.) (Б, Г, правая панель).

Далее было проверено, как при таких условиях изменяется синтез YB-1. В этом случае лизаты клеток NIH3T3 и HeLa с чашек различной плотности уравнивали по включенной радиоактивной метке ( $[^{35}\text{S}]$ -метионину), что, согласно рисунку 26, будет соответствовать примерно одинаковому количеству клеток (Рис. 27А и 27В). Анализ синтеза YB-1 показал, что при увеличении конfluenceности клеток NIH3T3 и HeLa синтез YB-1 падает примерно в 2 раза (Рис. 27Б и 27Г).

Второй способ замедления клеточной пролиферации – это голодание клеток по сыворотке (отсутствие факторов роста в среде). Чтобы выяснить, как отсутствие сыворотки повлияет на синтез и количество YB-1 в клетках NIH3T3 или HEK293T, эти клетки подвергали длительному (2 суток) культивированию в бессывороточной среде и анализировали количество YB-1 и скорость его синтеза. В клетках, подвергшихся такому воздействию, можно наблюдать уменьшение количества белка YB-1 (ср дорожки 1 и 2 Рис. 28А и 28Б), а после добавления сыворотки к голодавшим клеткам NIH3T3 или HEK293T количество YB-1 восстанавливается довольно быстро (за 3-6 часов) (Рис. 28А, дорожки 3-6; Рис. 28Б, дорожка 3). Эти данные хорошо соотносятся с результатами экспериментов по измерению уровня синтеза YB-1. В случае голодания клеток синтез YB-1 падает значительно сильнее (в 4-5 раз) (Рис. 28В и Г, ср дорожки 1 и 2) по сравнению со снижением тотального белкового синтеза (примерно в 2 раза, гистограммы на рисунке 28, панели В и Г), что, вероятно, и приводит к снижению количества белка YB-1. Еще одной причиной быстрого снижения белка YB-1 может являться снижение его стабильности, но этот вопрос в данной работе не изучался. Добавление сыворотки к голодавшим клеткам приводит к возрастанию синтеза YB-1 (в 5-6 раз) до уровня синтеза YB-1 даже несколько выше, чем в контрольных клетках (Рис. 28В и Г, ср. дорожки 2 и 3), что позволяет клеткам восстановить количество YB-1 до изначального уровня. Тотальный белковый синтез восстанавливается при этом до исходного уровня в случае клеток NIH3T3 или слабо увеличивается в случае клеток HEK293T (гистограммы на рисунке 28, панели В и Г).

Таким образом, полученные данные говорят о сильной зависимости синтеза YB-1 от скорости клеточного деления и ставят вопрос о том, что может обеспечивать такую чувствительность синтеза YB-1 к факторам роста и другим сигналам пролиферации клеток.





**Рисунок 28. Восстановление количества YB-1 и синтеза YB-1 после отмены голодания по сыворотке.** Клетки НИН3Т3 (А) и НЕК293Т (Б) культивировали в среде без сыворотки в течение 48 часов. Клетки собирали через указанные промежутки времени после добавления сыворотки, лизировали и анализировали лизаты методом иммуноблоттинга. Клетки НИН3Т3(В) и НЕК293Т(Г) культивировали в среде без сыворотки в течение 48 часов. В контрольных клетках, лишенных сыворотки клетках и стимулированных сывороткой клетках (6 часов) анализировали уровень синтеза YB-1 методом метаболического мечения белков  $^{35}\text{S}$ -метионином с последующей иммунопреципитацией антителами против YB-1, разделением белков электрофорезом в кислотномочевинном ПААГ и автордиографией (левые панели). Относительную радиоактивность полос определяли с использованием Packard Cyclone Storage Phosphor System (Packard Instrument Company, Inc.). Уровень синтеза YB-1 в клетках без сывороточного голодания принимали за 100% (правые панели).

### 3.4 Синтез YB-1 и mTOR-сигнальный путь

#### 3.4.1. Синтез YB-1 зависит от активности mTOR сигнального каскада

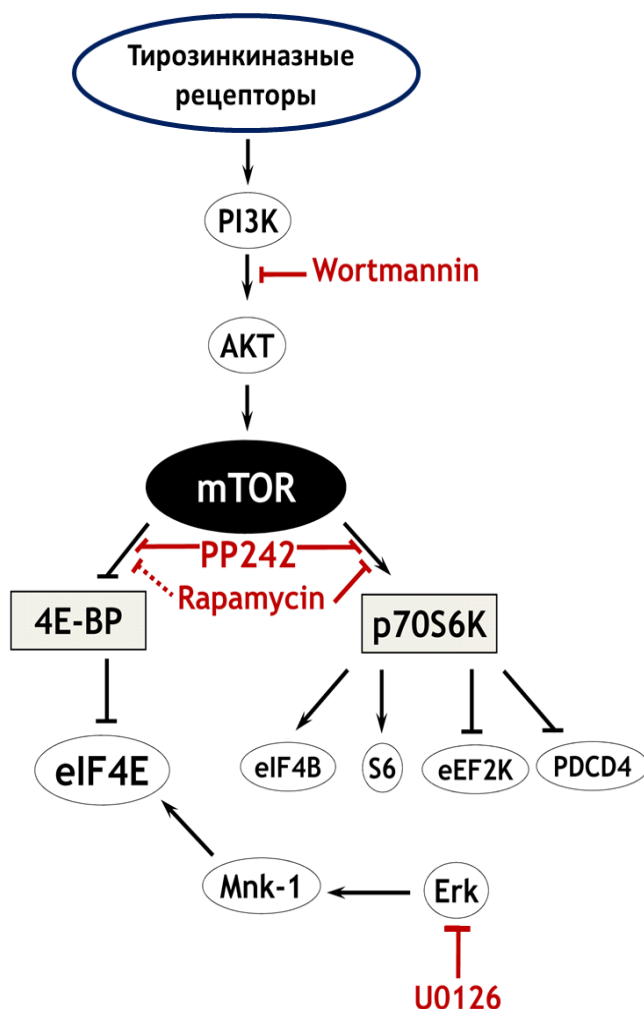
Вопрос, заданный в конце предыдущего раздела, можно переформулировать в другой: какой клеточный сигнальный путь обеспечивает такую чувствительность синтеза YB-1 к факторам роста?

Наиболее подходящим кандидатом является mTOR-сигнальный каскад. Ключевым белком этого сигнального пути является белок mTOR-протеинкиназа. Она действует как своеобразный

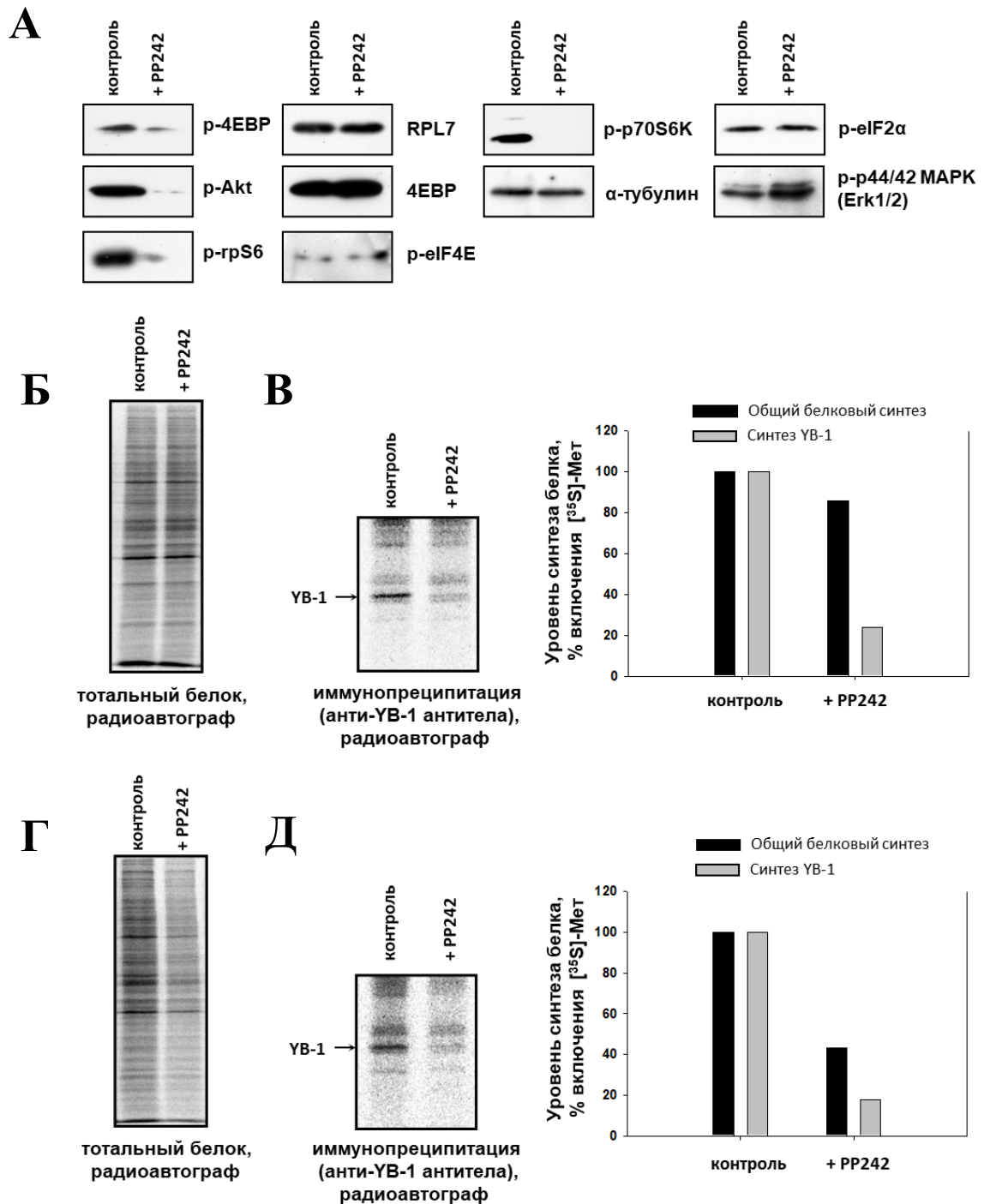


сенсор на питательные вещества, факторы роста, стрессовые воздействия. При достаточности ресурсов и в отсутствие стрессов киназа mTOR активирована и фосфорилирует некоторые субстраты, такие как S6-киназа и 4EBP [488]. В итоге это приводит к повышению уровня белкового синтеза, росту и делению клеток (Рис. 29). Интересно также, что mTOR-сигнальный каскад ингибируется при контактном торможении пролиферации [487].

Возникло предположение, не относится ли мРНК *УВ-1* к набору мРНК, чья трансляция сильно зависит от активности mTOR-сигнального пути. Чтобы это проверить, клетки обрабатывали специфическим ингибитором mTOR-киназы – веществом PP242 - и исследовали, как это отразится на синтезе УВ-1 (время обработки 2-3 часа - за это время, как показывают исследования, еще не происходят изменений в количестве мРНК [489]). На рисунке 30А показаны результаты иммуноблоттинга лизатов клеток до и после обработки ингибитором mTOR-киназы PP242, которые демонстрируют, что этот ингибитор действительно активен и снижает уровень фосфорилирования как 4EBP, так и p70S6-киназы.

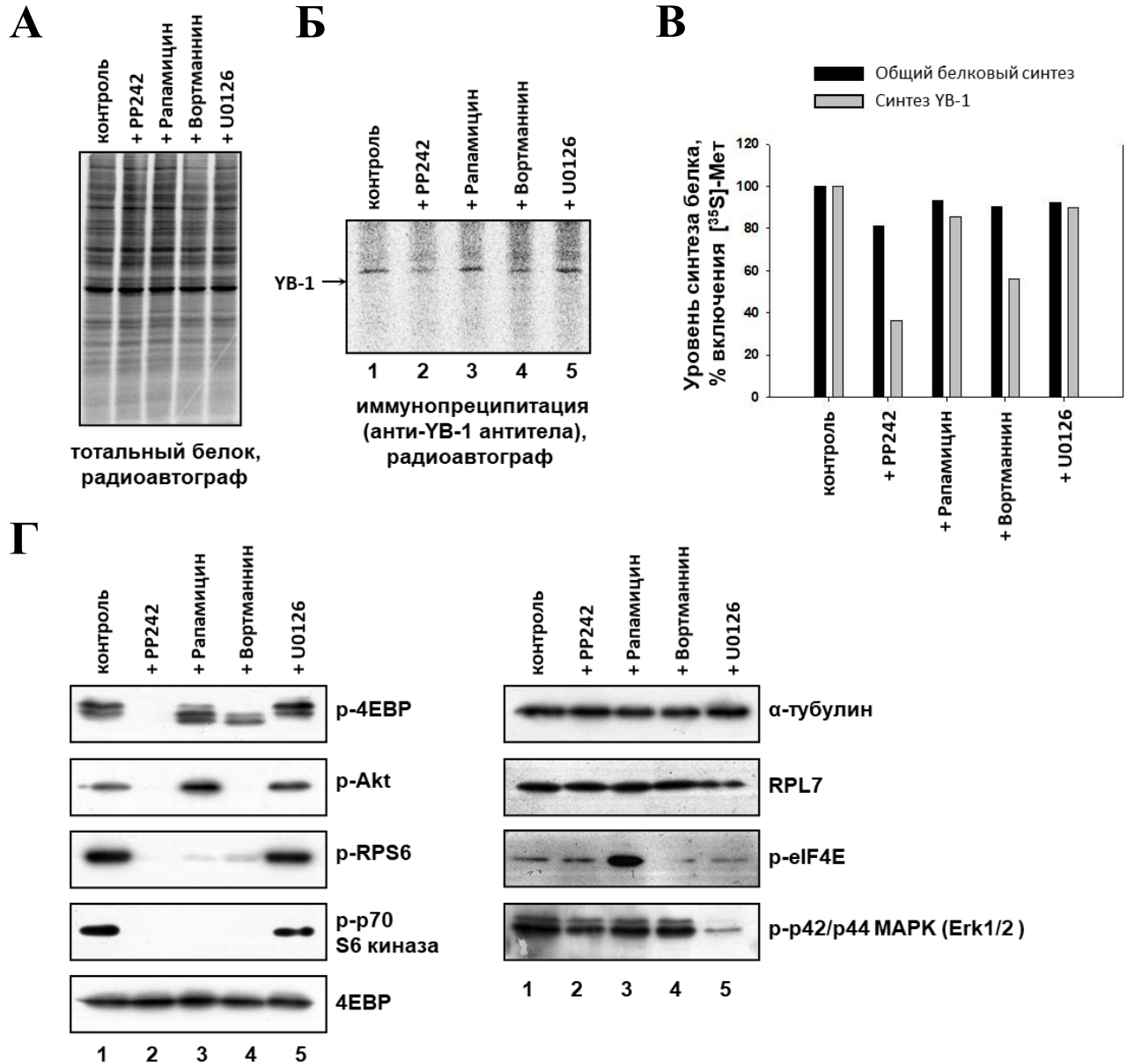


**Рисунок 29. Упрощенная схема сигнального пути mTOR.** Основными субстратами mTOR являются 4EBP (белок, связывающий эукариотический фактор инициации 4E) и киназа S6 (p70S6K). Фосфорилирование 4EBP приводит к снижению его аффинности к eIF4E, что делает последний доступным для инициации трансляции. Активированная киназа S6 фосфорилирует ряд субстратов (эукариотический фактор инициации трансляции 4B (eIF4B); рибосомный белок S6; белок PDCD4 (programmed cell death 4) - супрессор опухоли, который связывается с eIF4A; киназу эукариотического фактора элонгации трансляции 2 (eEF2K) и др.), тем самым способствуя активации как инициации, так и элонгации трансляции. Ингибиторами киназы mTOR являются рапамицин и PP242, причем первый ингибирует преимущественно фосфорилирование p70S6K. Основным путем активации mTOR является киназный каскад PI3K/Akt. Его ингибирование вортманнином влияет, среди прочего, на киназу mTOR. Ингибирование киназы Erk с помощью вещества U0126 вызывает ингибирование киназы Mnk1 и, следовательно, подавление фосфорилирования eIF4E, что уменьшает трансляцию некоторых eIF4E-чувствительных мРНК (здесь используются в качестве контроля).



**Рисунок 30. Влияние ингибитора mTOR PP242 на синтез YB-1 в клетке.** Лизаты необработанных или обработанных PP242 (1 мкМ) клеток HeLa (А-В) или HEK293Т (Г, Д) уравнивали по общему белку и использовали для иммуноблоттинга (А) и автордиографии (Б, Г – уровень синтеза тотального белка клеток). Лизаты также использовали для анализа уровня синтеза YB-1 методом метаболического мечения белков [<sup>35</sup>S]-метионином с последующей иммунопреципитацией антителами против YB-1, разделением белков электрофорезом в кислотном-мочевинном ПААГ и автордиографией (В и Д, левые панели). Относительную радиоактивность полос определяли с использованием системы Packard Cyclone Storage Phosphor System (Packard Instrument Company, Inc.) (В и Д, правые панели). Уровень синтеза YB-1 в клетках без обработки PP242 принимали за 100%.

На рисунках 30Б и 30Г видно, что PP242 слабо повлиял на включение [ $^{35}$ S]-метионина в тотальный белок в клетках HeLa и в 2 раза уменьшил включение [ $^{35}$ S]-метионина в тотальный белок в клетках HEK293Т. Синтез YB-1 при этом заметно снизился, примерно в 5 раз, и в случае клеток HeLa (Рис. 30В), и клеток HEK293Т (Рис. 30Д).



**Рисунок 31. Влияние ингибиторов различных клеточных сигнальных путей на синтез YB-1 в клетках.** Лизаты клеток HeLa, необработанных (дорожка 1) или обработанных 1 мкМ PP242 (дорожка 2), или 0,1 мкМ рапамицина (дорожка 3), или 0,5 мкМ вортманнина (дорожка 4), или 10 мкМ U0126 (дорожка 5) уравнивали по общему белку и использовали для иммуноблоттинга (Г) и авторадиографии (А – уровень синтеза тотального белка клеток) или для анализа уровня синтеза YB-1 методом метаболического мечения белков [ $^{35}$ S]-метионином с последующей иммунопреципитацией антителами против YB-1, разделением белков электрофорезом в кислотном мочевином ПААГ и авторадиографией (Б). Относительную радиоактивность определяли с использованием Packard Cyclone Storage Phosphor System (Packard Instrument Company, Inc.) (В). Уровень синтеза YB-1 в клетках без обработки ингибиторами принимали за 100%.

Более того, если использовать другие ингибиторы mTOR сигнального каскада, то можно увидеть, что вортманнин (ингибитор PI3K, находящееся «наверху» сигнального каскада), как и PP242, ингибирует синтез YB-1 (Рис. 31Б (ср. дорожку 1 с дорожками 2 и 4) и 31В). U0126, ингибитор другого сигнального пути (Erk1/2), одним из последствий активации которого является фосфорилирование eIF4E, eIF4G и последующая стимуляция трансляции, не повлиял на синтез YB-1 (Рис. 31Б (ср. дорожку 1 с дорожкой 5) и 31В).

Но что особенно интересно, рапамицин, препятствующий фосфорилированию S6 киназы, но слабо действующий на активность 4EBP, не повлиял на синтез YB-1 (Рис. 31Б (ср. дорожку 1 с дорожкой 3) и 31В). Следует также отметить, что на тотальный белковый синтез использованные ингибиторы оказывали незначительное действие (Рис. 31А и 31В).

В совокупности эти данные показывают, что регуляция синтеза YB-1 зависит от активности mTOR-сигнального каскада, и, вероятно, той его части, что обуславливает фосфорилирование 4EBP.

### **3.4.2. 5'НТО мРНК YB-1 обуславливает чувствительность её трансляции к ингибиторам mTORC**

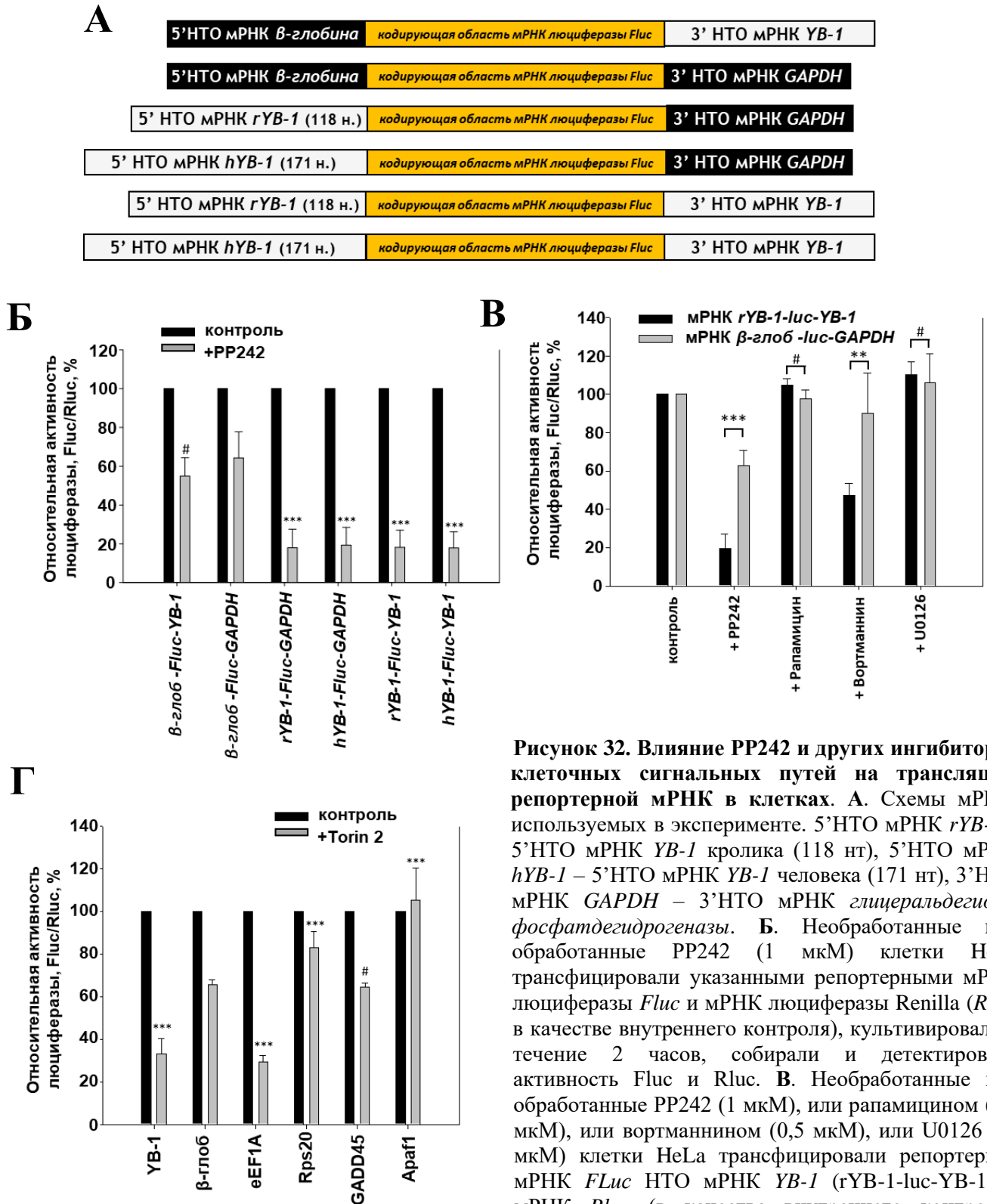
При снижении активности mTOR-сигнального пути снижается общий уровень белкового синтеза, однако трансляция довольно большого набора мРНК ингибируется при этом значительно сильнее [490]. Это в первую очередь 5'ТОР мРНК (5' terminal oligopyrimidine tract мРНК). К этим мРНК относятся мРНК рибосомных белков и некоторых факторов трансляции, т.е белков, синтез которых занимает значительную долю в общем белковом синтезе и должен строго контролироваться в ответ на изменение условий роста клеток. 5'ТОР мРНК содержат на самом 5' конце олигопиримидиновую последовательность, которая взаимодействует со специфическими белками, обуславливающими ингибирование трансляции 5'ТОР мРНК при снижении активности mTOR. В последнее время этим самым специфическим белком многими исследователями признается белок LARP1 [491]. Кроме того, некоторыми авторами (Hsieh и соавт [489]) ранее выделялась группа мРНК, чувствительных к ингибиторам mTOR-киназы, но несущих не ТОР-последовательность, а ТОР-подобную последовательность, которая необязательно должна находиться на самом 5' конце мРНК. Однако на настоящий момент считается, что такой последовательности не существует, и чем вызвана чувствительность некоторых не-ТОР-мРНК к ингибированию mTOR-киназы неизвестно, но, вероятно, она связана с 5'НТО.

В случае мРНК YB-1 зависимость её трансляции от активности mTOR-киназы, по-видимому, также должна обуславливаться 5'НТО. Это было решено проверить с помощью репортерной мРНК, кодирующей люциферазу светлячка (Firefly luciferase, Fluc) и обладающей

5'НТО и/или 3'НТО из мРНК *YB-1*. Согласно базе данных NCBI, 5'НТО мРНК *YB-1* может содержать от 118 до 171 нуклеотидов. Было использовано 2 варианта этого 5'НТО: один минимальной длины - от мРНК кролика (118 н., (NM\_001082785.1)) и другой максимальной длины - от мРНК человека (171 н., (NM\_004559.3)). Этими мРНК или контрольной мРНК люциферазы *Fluc* с другими 5' и 3' нетранслируемыми областями (Рис. 32А) трансфицировали клетки HeLa, предварительно обработанные ингибитором mTOR – PP242. Через 1,5 часа по ферментативной активности люциферазы *Fluc* оценивали эффективность трансляции репортерных мРНК.

Как видно на рисунке 32Б, ингибитор mTOR селективно ингибировал трансляцию репортерных мРНК, содержащих 5'НТО кроличьей или человеческой мРНК *YB-1*, но не контрольные репортерные мРНК, содержащие либо оба контрольных НТО (из мРНК  $\beta$ -глобина и мРНК *GAPDH*), либо 3'НТО мРНК *YB-1*. Вортманнин, также как и PP242, сильно и селективно ингибировал трансляцию репортерной мРНК *Fluc* с 5'- и 3'НТО кроличьей мРНК *YB-1* (Рис. 32В). Этот результат полностью согласуется с результатами, полученными при исследовании синтеза эндогенного *YB-1* (Рис. 31).

Кроме того, было проверено, воспроизводятся ли полученные с ингибитором PP242 результаты с другим ингибитором mTOR-сигнального каскада – Тогин 2. Помимо репортерной мРНК с НТО мРНК *YB-1* исследовались и некоторые другие репортерные матрицы. Эти репортерные матрицы содержали 5'НТО от мРНК, чувствительных (мРНК *Rps20* и *eEF1A*) или нечувствительных (мРНК  $\beta$ -глобина, *Araf1* и *GADD45*) к ингибированию mTOR-киназы. Оказалось, что трансляция репортерных мРНК с mTOR-чувствительными лидерами *YB-1* и *eEF1A* в клетках HeLa, обработанных ингибитором mTOR-киназы Тогин-2, сильно подавляется, в отличие от контрольных, mTOR- независимых мРНК с лидерами  $\beta$ -глобин, *Araf1* и *GADD45* (Рис. 32Г). Следует отметить, что в этих экспериментах мРНК *Renilla люциферазы* (мРНК *Rluc*), несущая короткую 5'НТО длиной 15 нуклеотидов, использовалась в качестве контроля. Как и любая кэпированная мРНК, эта была несколько чувствительна к ингибированию mTOR и демонстрировала подавление примерно в 1,6 раза (данные не приводятся). Таким образом, соотношение *FLuc/RLuc* показывает, насколько увеличивалась или снижалась устойчивость к ингибированию mTOR того или иного 5'-лидера тестируемой мРНК по сравнению с контрольной безлидерной мРНК *RLuc*.



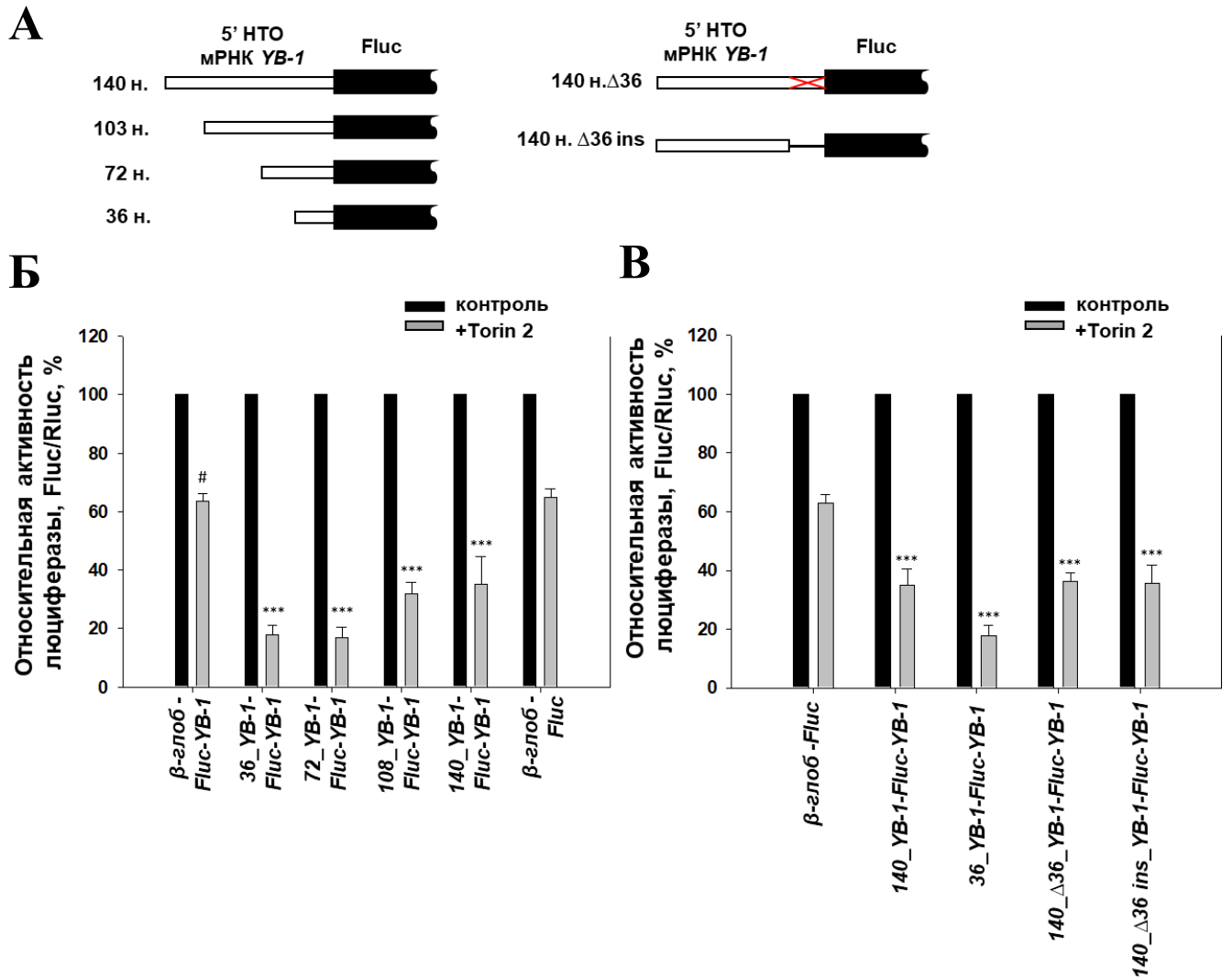
**Рисунок 32. Влияние PP242 и других ингибиторов клеточных сигнальных путей на трансляцию репортерной мРНК в клетках. А.** Схемы мРНК, используемых в эксперименте. 5'НТО мРНК *rYB-1* – 5'НТО мРНК *YB-1* кролика (118 нт), 5'НТО мРНК *hYB-1* – 5'НТО мРНК *YB-1* человека (171 нт), 3'НТО мРНК *GAPDH* – 3'НТО мРНК *глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы*. **Б.** Необработанные или обработанные PP242 (1 мкМ) клетки HeLa трансфицировали указанными репортерными мРНК люциферазы *Fluc* и мРНК люциферазы Renilla (*Rluc*, в качестве внутреннего контроля), культивировали в течение 2 часов, собирали и детектировали активность *Fluc* и *Rluc*. **В.** Необработанные или обработанные PP242 (1 мкМ), или рапамицином (0,1 мкМ), или вортманнином (0,5 мкМ), или U0126 (10 мкМ) клетки HeLa трансфицировали репортерной мРНК *FLuc* НТО мРНК *YB-1* (*rYB-1-luc-YB-1*) и мРНК *Rluc* (в качестве внутреннего контроля),

культивировали в течение 2 часов, собирали и детектировали активность *Fluc* и *Rluc*. **Г.** Необработанные или обработанные Torin2 (0,25 мкМ, 1 час) клетки HeLa трансфицировали репортерными мРНК люциферазы *Fluc* с указанными 5'НТО и мРНК *Rluc* (в качестве внутреннего контроля), культивировали в течение 2 часов, собирали и детектировали активность *Fluc* и *Rluc*. На панелях **Б-Г** представлено отношение *Fluc/Rluc*. Соотношение *Fluc/Rluc* для контроля (необработанные клетки) принимали за 100%. Значения получены на основании по крайней мере трех независимых экспериментов. Ошибки – 2 стандартных отклонения. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний *t*-критерий Стьюдента; \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ , # - недостоверно.

Ожидалось, что трансляция мРНК с 5'НТО *Rps20* также будет сильно подавляться при ингибировании mTOR [492], однако в эксперименте этого не наблюдалось. Это можно было бы объяснить тем, что все использованные в наших экспериментах репортерные мРНК имеют одинаковую дополнительную 12-нуклеотидную последовательность перед последовательностью 5'НТО. Поскольку для ингибирования TOP мРНК, к которым относится мРНК *Rps20*, как считается [493], необходимо 5'-концевое положение TOP-последовательности, введение 12-нуклеотидного довеска на 5' конец мРНК могло бы повлиять на трансляцию с мРНК с лидером *Rps20*. Однако следует отметить наличие такого же довеска у репортерной мРНК с 5'НТО другой TOP мРНК, мРНК *eEF1A*, не повлияло на чувствительность её трансляции при ингибировании mTOR-киназы.

Таким образом, регуляция трансляции мРНК *YB-1* сигнальным путем mTOR определяется 5'НТО мРНК *YB-1*. Однако, какая именно последовательность в 5'НТО участвует в такой регуляции? Чтобы ответить на этот вопрос, были получены репортерные мРНК люциферазы с фрагментами 5'НТО мРНК *YB-1* длиной 36, 72, 103 и 140 нуклеотидов (Рис. 33А). Оказалось, что укорочение 5'НТО мРНК *YB-1* до 36 нуклеотидов не привело к снижению чувствительности трансляции этой мРНК к ингибированию mTOR (Рис. 33Б). Но можно отметить, что трансляция репортерных мРНК с 5'НТО мРНК *YB-1* длиной 36 и 72 нуклеотида более чувствительна к Torin-2, чем мРНК с более длинными 5'НТО мРНК *YB-1*. Интересно отметить, что если удалить ближайшую к стартовому кодону 36-нуклеотидную последовательность или заменить её на аналогичную по длине, но другую по составу (АТ – 64%, GC – 36%) (Рис. 33В), то это никоим образом не сказывается на зависимости трансляции репортерной мРНК от активности mTOR. Возможно, это связано с тем, что чувствительность мРНК *YB-1* к активности mTOR-сигнального каскада обусловлена нуклеотидным составом 5'НТО мРНК *YB-1*, а не конкретной последовательностью. Содержание G и C и в 36-, и в 72-, и в 108-нуклеотидной 5'НТО достигает 70%, а содержание цитозина доходит до 50%.

Вероятно, именно нуклеотидный состав последовательности 5'НТО мРНК *YB-1* обуславливает связывание (или несвязывание) белка (белков), опосредующего влияние активности mTOR-сигнального каскада на трансляцию мРНК *YB-1*.



**Рисунок 33. Влияние ингибитора mTOR-киназы Torin2 на трансляцию репортерных мРНК в клетках HeLa. А.** Схемы мРНК, используемых в эксперименте. **Б.** Необработанные или обработанные Torin 2 (0,25 мкМ, 1 час) клетки HeLa трансфицировали репортерными мРНК *Fluc* с указанными 5'НТО и мРНК *Rluc* (в качестве внутреннего контроля), культивировали в течение 2 часов, собирали и детектировали активность *Fluc* и *Rluc*. Представлено отношение *FLuc/RLuc*. Соотношение *FLuc/RLuc* для контроля (необработанные клетки) принимали за 100%. Значения получены на основании по крайней мере трех независимых экспериментов. Ошибки – 2 стандартных отклонения. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний t-критерий Стьюдента; \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ , # - недостоверно.

### 3.4.3. Связывание группы факторов инициации eIF4 с 5'НТО различных мРНК при ингибировании mTOR

Считается, что при ингибировании mTOR-киназы подавляется в первую очередь кэп-зависимая трансляция [490]. При этом трансляция TOP-мРНК и TOP-like мРНК, к которым можно отнести мРНК *YB-1*, более чувствительна к ингибиторам mTOR-киназы. Это означает, что трансляция мРНК *YB-1* и подобных ей мРНК будет более чувствительна к ингибированию кэп-зависимой трансляции, то есть более зависима от факторов инициации группы 4F. В этой связи важно было исследовать, как изменяется при подавлении активности mTOR-киназы

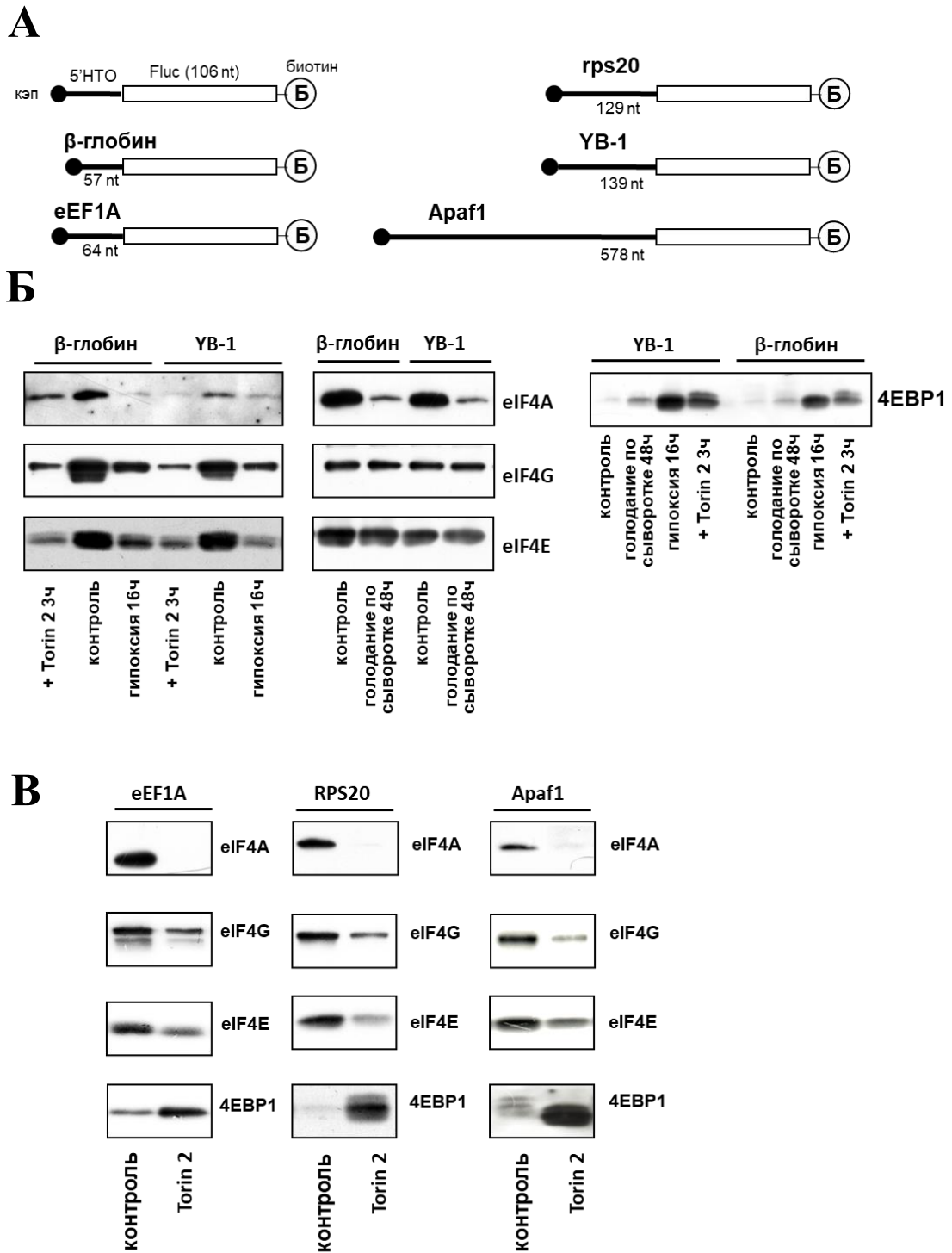


связывание канонических факторов инициации трансляции (4E, 4A и 4G) с кэпированными мРНК, обладающих различной чувствительностью к ингибиторам mTOR.

Для этого фрагменты мРНК *Fluc* с различными 5'НТО (Рис. 34А) были биотинилированы, кэпированы и инкубированы с лизатами клеток HeLa, выращенных в нормальных условиях, в условиях голодания по сыворотке (48 часов), в условиях гипоксии (1% O<sub>2</sub>, 16 часов) или обработанных Torin 2. Все эти обработки напрямую или косвенно влияют на активность mTOR-киназы. Инкубация проводилась в буфере для бесклеточной системы трансляции, то есть в условиях, благоприятных для инициации трансляции. После иммобилизации биотинилированных фрагментов РНК на стрептавидин-сефарозе, белки, связавшиеся с РНК, элюировали и анализировали методом иммуноблоттинга на присутствие факторов инициации трансляции 4E, 4G, 4A и белка 4EBP1.

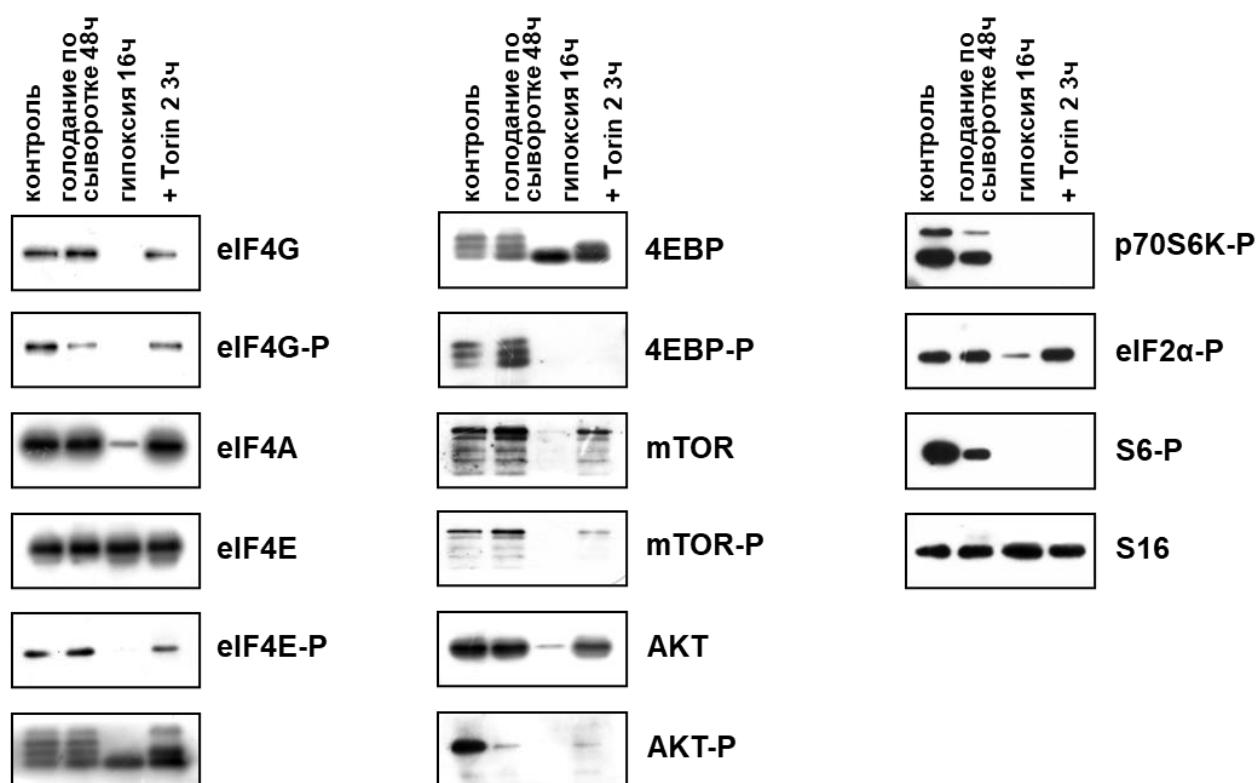
Как видно на рисунках 34Б и 34В, eIF4A, eIF4E и eIF4G связываются со всеми использованными кэпированными фрагментами с 5'НТО в экспериментах с контрольным лизатом. В то же время 4EBP1, как и ожидалось, практически не взаимодействует с РНК. В лизатах, обработанных ингибитором mTOR Torin 2, связывание факторов инициации трансляции снижалось, а связывание 4E-связывающего белка заметно возрастало. Таким образом, при ингибировании mTOR наблюдается снижение связывания eIF4E с кэпированной матрицей, а также возрастание связывания 4EBP1 с оставшимся на кэп-структуре eIF4E, который, вероятно, препятствует связыванию eIF4G. Связывание eIF4A может падать как за счет уменьшения связывания eIF4G, так и по PDCD4-опосредованному механизму [494, 495]. Белок PDCD4 (Programmed Cell Death 4) является ингибитором eIF4A (предотвращает связывание с РНК), но при активации mTOR-киназы он фосфорилируется и перестает связываться с eIF4A. Нужно отметить, что eIF4A может действовать не только в составе комплекса eIF4F, но и отдельно от него, как многие РНК-хеликазы, и соответственно влиять на трансляцию определенного набора мРНК.

Изменения в связывании этих же белков с кэпированными фрагментами мРНК *УВ-1* и мРНК *β-глобина* в лизате клеток, испытавших гипоксию, оказались такими же, как и в случае ингибирования mTOR ингибитором Torin 2. Однако в этом случае отсутствие связывания факторов eIF4A и eIF4G можно объяснить не уменьшением их сродства к РНК, а значительным уменьшением их количества после 16 часов гипоксии (Рис. 35).



**Рисунок 34.** Связывание факторов инициации трансляции 4 группы с 5'НТО различных мРНК в лизатах клеток HeLa, обработанных ингибиторами mTOR или подвергшихся сывороточному голоданию или гипоксии. **А.** Схема фрагментов, использованных в эксперименте. Фрагменты РНК, содержащие указанные 5'НТО и 106-нуклеотидную последовательность кодирующей области мРНК *Fluc*, были 3'-биотинилированы и 5'-кэпированы. **Б-В.** Биотинилированные, кэпированные фрагменты РНК (по 2 пмоль) иммобилизовали на стрептавидин-сефарозе и инкубировали со 150 мкл лизатов клеток HeLa, выращенных в различных условиях (нормальные условия, голодание по сыворотке, гипоксия и обработка Torin 2). Связавшиеся с РНК белки элюировали, разделяли с помощью ДСН-гель электрофореза, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и детектировали с использованием соответствующих антител.

В случае экспериментов с лизатами клеток, подвергшихся голоданию по сыворотке, можно было ожидать картины, схожей с ингибированием Torin 2, поскольку считается, что отсутствие факторов роста в конечном итоге отражается на mTOR-сигнальном каскаде. Однако, как видно на рисунке 34Б, драматических изменений в связывании eIF4E, eIF4G и 4EBP1 не происходило, а значительно упало лишь связывание фактора eIF4A. Это, по-видимому, означает, что сывороточное голодание влияет на трансляцию не только, а может и не столько через mTOR-сигнальный каскад. В пользу этого также говорит и то, что при голодании по сыворотке не наблюдается снижение уровня фосфорилирования mTOR-киназы и уровня фосфорилирования 4EBP (Рис. 35).



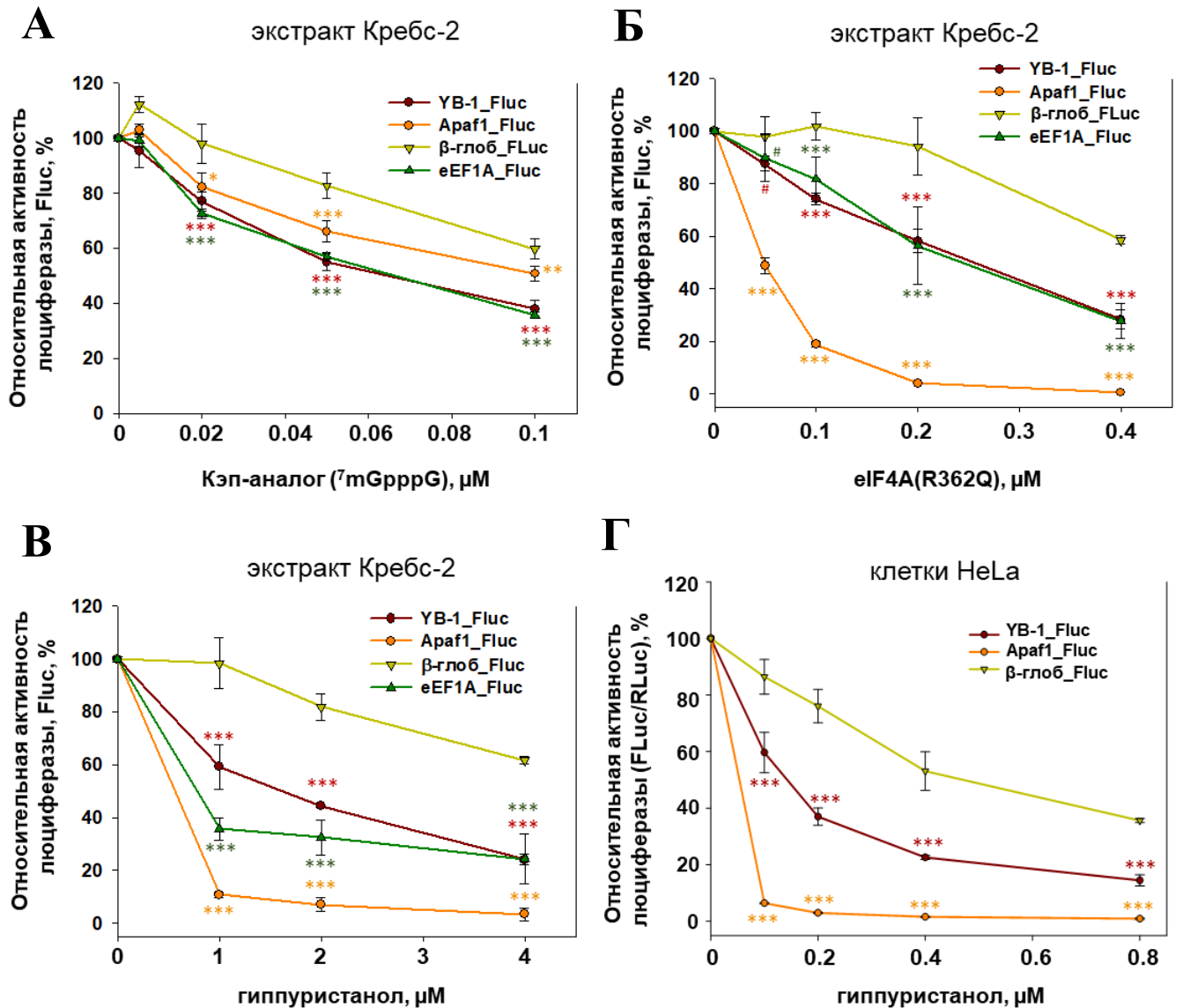
**Рисунок 35.** Влияние различных стрессов на количество и фосфорилирование ключевых белков, участвующих в регуляции трансляции, опосредованной mTOR. Необработанные, обработанные Torin2, лишенные сыворотки или подвергшиеся гипоксии клетки HeLa собирали, лизировали и анализировали методом иммуноблоттинга.

Но особенно важно отметить, что изменения в связывании факторов группы eIF4 и 4EBP1 были одинаковы как для мРНК, трансляция которых подавляется при ингибировании mTOR (мРНК с лидерами мРНК *YB-1*, *eEF1A*), так и тех мРНК, трансляция которых слабо реагирует на ингибирование mTOR (мРНК с лидерами мРНК  $\beta$ -глобина, *Rps20*, *Araf1*). Это может означать, что ингибирование активности mTOR одинаково снижает связывание канонических факторов инициации трансляции с любой мРНК, однако для некоторой группы мРНК это снижение драматически влияет на трансляцию, а для другой нет. Возможно, менее

чувствительные к ингибиторам mTOR мРНК способны использовать альтернативные механизмы инициации, при которых достаточно низких количеств канонических факторов трансляции, или эти факторы заменяются иными участниками инициации, недоступными для мРНК, чувствительных к ингибиторам mTOR.

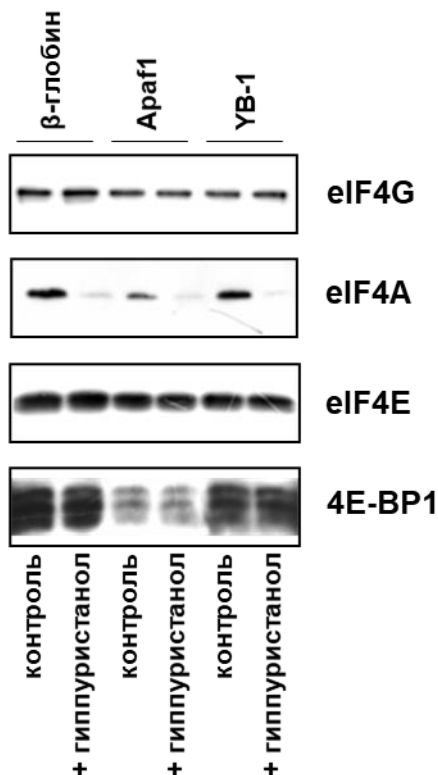
#### **3.4.4. Эффект ингибиторов кэп-зависимой трансляции на трансляцию репортерных мРНК с различными лидерами**

Другим способом убедиться в большей зависимости мРНК *УВ-1* и подобных ей мРНК от факторов кэп-зависимой инициации трансляции является исследование эффекта таких ингибиторов как кэп-аналог ( $m^7GpppG$ ), гиппуристанол и доминантно-негативная форма eIF4A - eIF4A-R362Q - на трансляцию репортерных мРНК с различными 5'НТО. Кэп-аналог, связываясь с eIF4E (и вероятно с иными кэп-связывающими белками), делает его недоступным для взаимодействия с кэп-структурой мРНК, тем самым подавляя инициацию. Кроме того, в комплексе с eIF4E уводятся из трансляции и часть факторов eIF4G и eIF4A. Подавление активности eIF4A гиппуристанолом и доминантно-негативной формой eIF4A - eIF4A-R362Q - представлялось весьма интересным, поскольку только связывание eIF4A с фрагментами мРНК изменялось при всех использованных нами обработках клеток HeLa (Togin 2, сывороточное голодание, гипоксия). Кроме того, гиппуристанол, вероятно, действует не только на активность eIF4A, но и на активность подобных РНК-хеликаз (так называемых DEAD-box хеликаз), что должно иметь более широкое воздействие на инициацию трансляции. Действие eIF4AR362Q, вероятно, не ограничивается только замещением eIF4A. Дело в том, что эта мутантная форма eIF4A сохраняет способность связываться с eIF4G, что ведет к образованию неактивного eIF4F комплекса и изъятию из трансляции eIF4G, который может быть нужен и для 4E-независимой инициации трансляции. Можно ожидать, что матрицы, чья трансляция подавлялась при ингибировании mTOR (мРНК *УВ-1*, в частности), будут более чувствительны к ингибированию факторов кэп-зависимой инициации трансляции.



**Рисунок 36.** Влияние кэп-аналога, eIF4A(R362Q) и гиппуристанола на трансляцию репортерных мРНК *in vitro* и в клетках HeLa. А–В. 0,1 пмоль K<sup>+</sup>A<sup>+</sup> репортерной мРНК люциферазы светлячка с указанными 5'НТО транслировали в экстракте клеток Krebs-2 в присутствии возрастающих концентраций кэп-аналога (0,005, 0,02, 0,05 и 0,1 мМ) или без него (А), либо рекомбинантного eIF4A(R362Q) (0,05, 0,1, 0,2 и 0,4 нмоль/мл) или без него (Б), либо гиппуристанола (1, 2 и 4 мкМ) или без него (В). В реакционных смесях измеряли активность Fluc после 45 мин инкубации при 30 °С. Активность FLuc без добавления кэп-аналога (А), eIF4A(R362Q) (Б) или гиппуристанола (В) принимали за 100%. Значения получены на основании по крайней мере трех независимых экспериментов. Ошибки – 2 стандартных отклонения. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний t-критерий Стьюдента; \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ , # - недостоверно. Г. Необработанные или обработанные гиппуристанолом (0,1, 0,2, 0,4 и 0,8 мкМ) в течение 1 часа клетки HeLa трансфицировали репортерной мРНК *Fluc* с указанными 5'НТО и мРНК *Rluc* (в качестве внутреннего контроля), культивировали в течение 2 ч, собирали и измеряли активность Fluc и Rluc. Соотношение FLuc/RLuc для контроля (необработанные клетки) принимали за 100%. Значения получены на основании по крайней мере трех независимых экспериментов. Ошибки – 2 стандартных отклонения. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний t-критерий Стьюдента; \*\*\* -  $p < 0,001$ . Сравнение проводилось с активностью люциферазы, синтезируемой с мРНК  $\beta$ -глоб\_*Fluc*.

Для проверки этого предположения была исследована трансляция ранее использованных репортерных мРНК в системе трансляции на основе экстракта клеток асцитной опухоли Кребс-2 в присутствии кэп-аналога  $m^7GpppG$ . Как видно на рисунке 36А, в использованном диапазоне концентраций  $m^7GpppG$  репортерные мРНК с лидерами мРНК *YB-1* и *eEF1A* мРНК, чья трансляция сильно ингибируется Torin 2, более чувствительны к кэп-аналогу, в то время как трансляция мРНК *люциферазы* с лидерами от мРНК  $\beta$ -глобина и *Araf1* достоверно ингибируется слабее. Ингибирование трансляции в экстракте клеток Кребс-2 мутантной формой eIF4A (R362Q) и гиппуристанолом показало, что трансляция репортерных мРНК с лидерами мРНК *YB-1* и *eEF1A* мРНК ингибировалась сильнее, чем трансляция мРНК *люциферазы* с лидером мРНК *бета-глобина* (Рис. 36Б и 36В). Аналогичные результаты были получены при трансляции репортерных мРНК в клетках HeLa в присутствии гиппуристанаола (Рис. 36Г). Необходимо отметить, что в случае обработки клеток HeLa гиппуристанолом, единственным из исследованных канонических факторов трансляции, чье связывание с 5' концевой последовательностью мРНК падает, является eIF4A (Рис. 37).



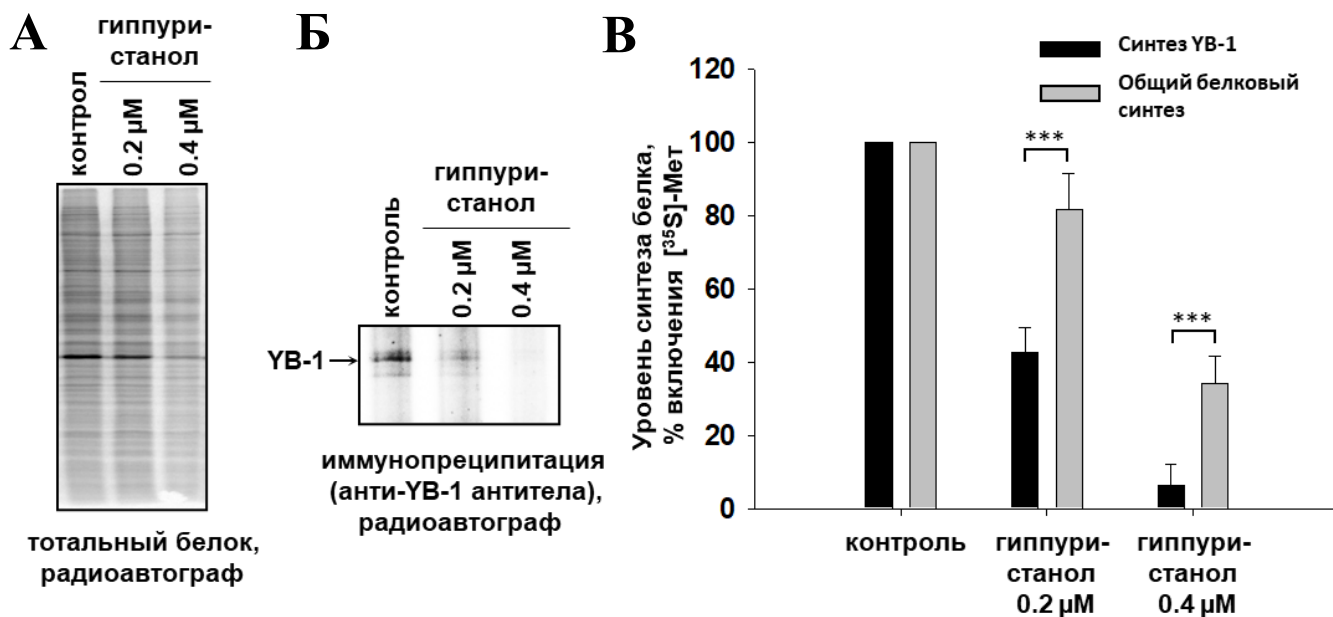
**Рисунок 37. Связывание факторов инициации трансляции 4 группы с 5'НТО различных мРНК в клетках, обработанных гиппуристанолом.** Биотинилированные кэпированные фрагменты РНК (по 2 пмоль) инкубировали со 150 мкл лизата клеток HeLa, обработанного или необработанного гиппуристанолом, и иммобилизовали на стрептавидин-сефарозе. Белки, связавшиеся с РНК, разделяли с помощью ДСН-гель-электрофореза, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и детектировали с использованием соответствующих антител.

Интересно, что мРНК с 5'НТО *Apafl*, чья трансляция не подавлялась ингибитором mTOR-киназы, оказалась чрезвычайно чувствительной к добавлению eIF4A(R362Q) и гиппуристанола как в систему трансляции, так и к его добавлению к клеткам HeLa. Впрочем, это не удивительно, поскольку показано, что эта мРНК обладает длинным структурированным 5'НТО и транслируется по 5'-конец-зависимому сканирующему механизму [496], и следовательно, должна остро нуждаться в РНК-хеликазах, такой как eIF4A или подобных ей. Однако интересно, что, несмотря на уменьшение связывания eIF4A с 5'НТО *Apafl* (Рис. 37), трансляция репортерной мРНК *Fluc* с этим лидером не была чувствительна к ингибированию mTOR в клетках HeLa (Рис. 32Г). Это можно объяснить тем, что при подавлении mTOR в первую очередь выключается сканирующий механизм с участием eIF4A, но, возможно, не ингибируются другие РНК-хеликазы, заменяющие eIF4A при сканировании 5'НТО *Apafl*, которая, как известно, является весьма протяженной и структурированной. В совокупности с меньшей чувствительностью мРНК *Apafl* к снижению доступного eIF4E, это позволяет мРНК *Apafl* транслироваться в условиях ингибирования mTOR. Однако при инкубации клеток с гиппуристанолом, который, вероятно, ингибирует, помимо eIF4A, и активность других хеликаз, необходимых для сканирования 5'НТО мРНК *Apafl*, трансляция репортерной мРНК с 5'НТО мРНК *Apafl* сильно подавляется. То, что в экстракте клеток Кребс-2 репортерная мРНК с лидером *Apafl* ингибируется при добавлении в систему трансляции eIF4A(R362Q), можно объяснить тем, что этот мутант, сохраняя сродство к eIF4G, препятствует работе этого белка с другими хеликазами.

### 3.4.5. Эффект гиппуристанола на синтез YB-1 *in vivo*.

Интересно, что в статье Rubio et al. [497] мРНК *YB-1* не была обнаружена среди матриц, чья трансляция чувствительна к другому ингибитору eIF4A – сальвестролу. Чтобы дополнительно удостовериться, что синтез YB-1 чувствителен к ингибированию активности eIF4A, было исследовано влияние гиппуристанола на синтез эндогенного белка YB-1. На рисунке 38 видно, что синтез белка YB-1 в клетках HeLa ингибируется существенно сильнее, чем глобальный белковый синтез.

В целом, можно говорить, что трансляция мРНК *YB-1* более чувствительна к ингибированию кэп-зависимого сканирующего механизма инициации белкового синтеза. Вероятно, эта чувствительность и обуславливает большую зависимость трансляции некоторых мРНК, включая мРНК *YB-1*, от активности mTOR- сигнального пути.



**Рисунок 38. Влияние гиппуристанола на синтез общего белка и синтез YB-1 в клетках HeLa.** Клетки HeLa обрабатывали гиппуристанолом (0,2 и 0,4 мкМ) в течение 1 часа. Лизаты необработанных и обработанных гиппуристанолом клеток уравнивали по общему белку и использовали для анализа уровня общей трансляции методом ДСН-гель-электрофореза и авторадиографии (А) или анализа уровня синтеза YB-1 методом метаболического мечения белков [ $^{35}\text{S}$ ]-метионином с последующей иммунопреципитацией антителами против YB-1, разделением белков электрофорезом в кислотномочевинном ПААГ и авторадиографией (Б). Относительную радиоактивность полос или дорожек определяли с использованием Packard Cyclone Storage Phosphor System (Packard Instrument Company, Inc.). Уровень синтеза общего белка или синтеза YB-1 в клетках, не обработанных гиппуристанолом, принимали за 100% (В). Ошибки – 2 стандартных отклонения. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний t-критерий Стьюдента; \*\*\* -  $p < 0,001$ .

### 3.4.6. Эффект 4EBP1 на трансляцию репортерной мРНК с 5'НТО мРНК YB-1

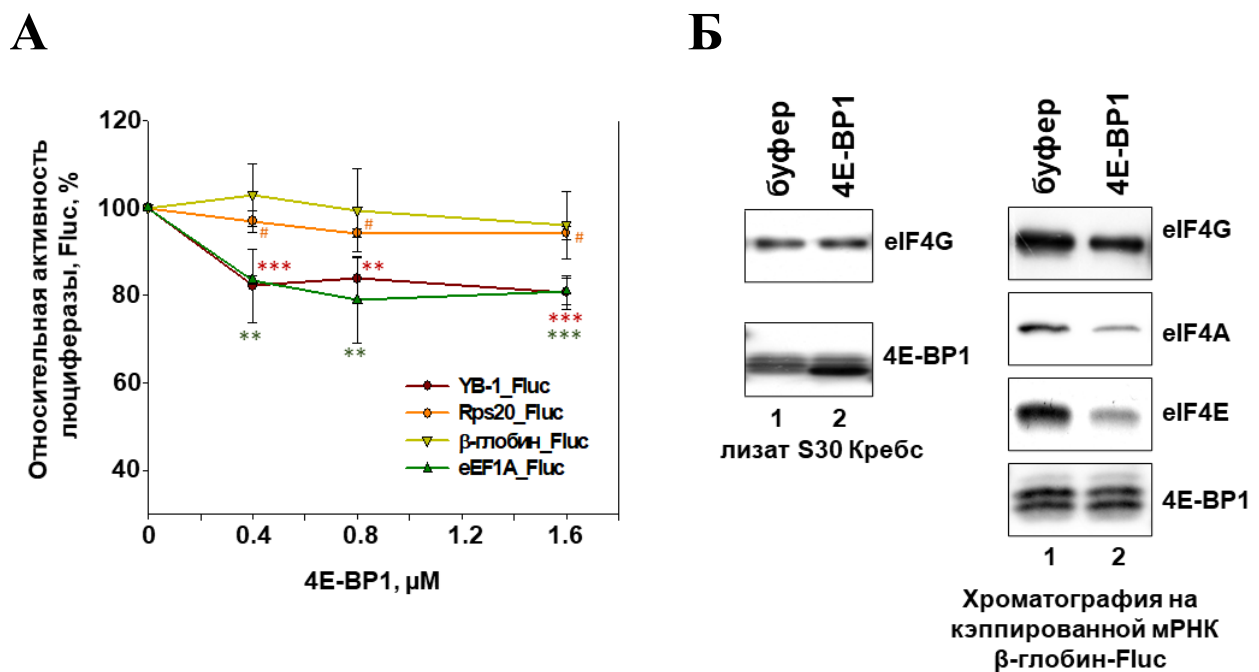
Согласно литературным данным, чувствительность мРНК к ингибированию mTOR, опосредована 4EBP [492]. В частности, в клетках с выключенной экспрессией 4EBP1 и 4EBP2 ингибиторы mTOR-киназы не подавляют ни глобальный белковый синтез, ни трансляцию TOP мРНК. Возникает вопрос, достаточно ли одного 4EBP1 для ингибирования трансляции мРНК YB-1. Это было выяснено в экспериментах на бесклеточной системе трансляции на основе клеток асцитной карциномы Кребс-2.

Как видно на рисунке 39А, добавление 4EBP1 (синтезированного в *E.coli* и следовательно нефосфорилированного) в систему трансляции на основе экстракта клеток Кребс-2 приводило к несколько большему снижению трансляции репортерной мРНК с лидерами мРНК YB-1 и *eEF1A* по сравнению с контрольными mTOR- нечувствительными мРНК. Однако ингибиторный эффект 4EBP1 был весьма скромным и достигал лишь 20% даже в случае mTOR-чувствительных мРНК, что резко отличается от картины ингибирования трансляции репортерных мРНК в клетках HeLa при подавлении mTOR и в БСТ при добавлении



ингибиторов кэп-зависимой инициации трансляции. При этом добавление 4ЕВР в концентрации выше 0,4 мкМ уже не приводило к дальнейшему ингибированию трансляции.

Кроме того, на рисунке 39Б видно, что 4ЕВР1, синтезированный в *E. coli* и следовательно нефосфорилированный, в наибольшей концентрации (39Б, левая панель) добавленный к системе трансляции, вызывал значительное снижение связывания факторов инициации 4F-группы даже в случае мРНК люциферазы, содержащей 5'НТО из мРНК  $\beta$ -глобина (Рис. 39Б, правая панель). Тем не менее, трансляция этой мРНК фактически не подавлялась. Возможно, причина незначительного эффекта 4ЕВР1 заключалась в том, что изначально в экстракте клеток асцитной опухоли Кребс-2 была высока доля гипофосфорилированного 4ЕВР (преобладание нижних полос на иммуноблоте на рисунке 39Б, левая панель, дорожка 1) и инициация трансляции уже была несколько подавлена.



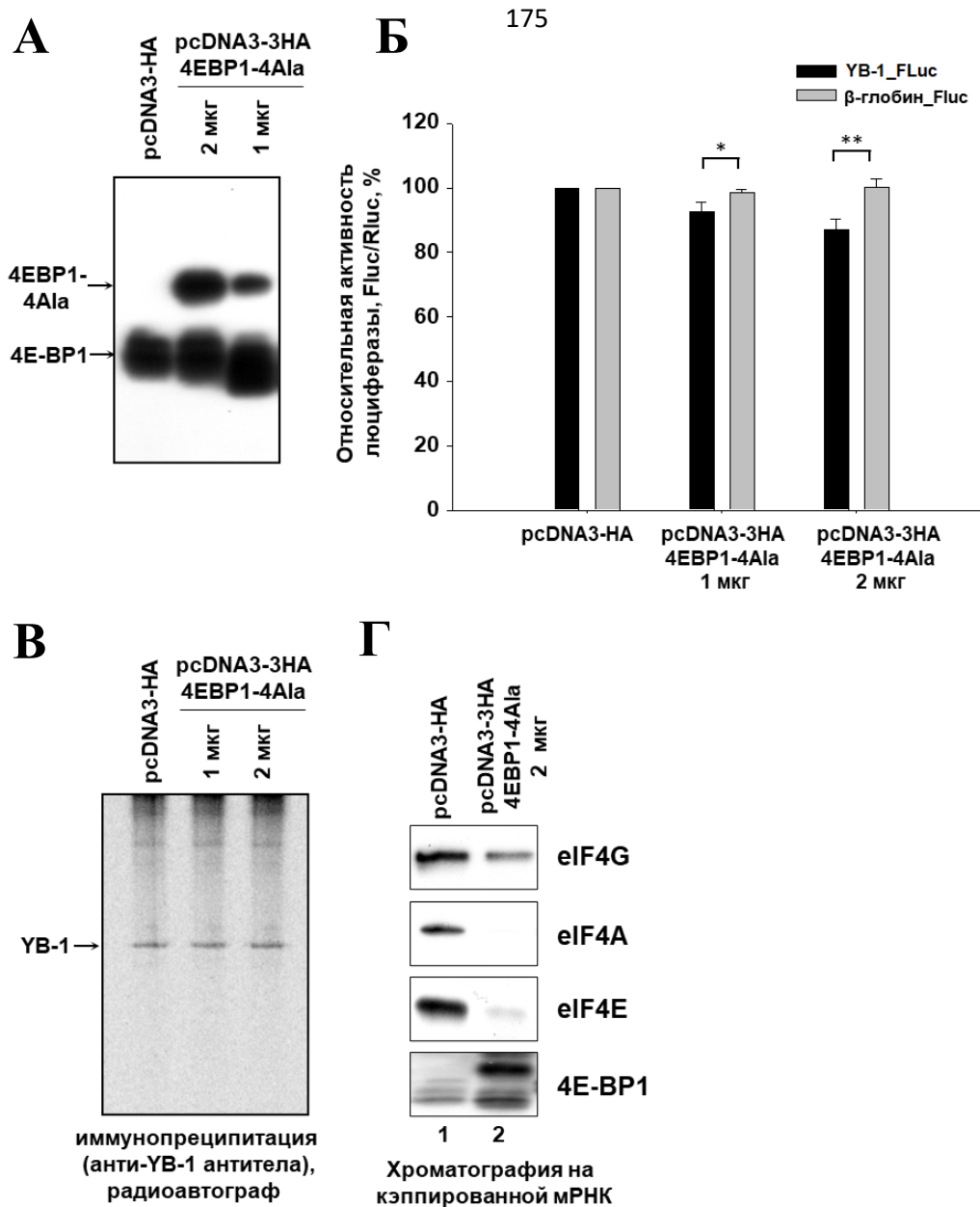
**Рисунок 39. Влияние 4ЕВР1 на трансляцию репортерных мРНК в бесклеточной системе трансляции.** А. 0,1 пмоль  $\text{K}^+\text{A}^+$  репортерной мРНК *Fluc* с указанными 5'НТО транслировали в экстракте клеток асцитной опухоли Кребс-2 в присутствии возрастающих количеств рекомбинантного 4ЕВР1 (0,4, 0,8 и 1,6 пмоль) или без него. Активность Fluc в реакционной смеси анализировали после 45 мин инкубации при 30 °С. Активность FLuc без добавления 4ЕВР1 принимали за 100%. Значения получены на основании по крайней мере трех независимых экспериментов. Ошибки – 2 стандартных отклонения. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний t-критерий Стьюдента; \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ , # - недостоверно. Б. Левая панель – трансляционную смесь с добавлением 1,6 пмоль 4ЕВР1 или без него анализировали методом иммуноблоттинга; правая панель – биотинилированную, кэпированную мРНК *Fluc* с 5'НТО мРНК  $\beta$ -глобина (0,1 пмоль) инкубировали в 10 мкл реакционной смеси для трансляции (экстракт клеток Кребс-2) с 1,6 пмоль 4ЕВР1 или без него и иммобилизовали на стрептавидин-сефарозе. Связанные с мРНК белки элюировали, разделяли с помощью ДСН-гель-электрофореза и анализировали методом иммуноблоттинга с помощью антител против указанных факторов инициации трансляции. Сравнение проводилось с активностью люциферазы, синтезируемой с мРНК  $\beta$ -глоб\_*Fluc*.

Если сравнить этот результат с данными на рисунке 3б (добавление кэп-аналога в бесклеточную систему трансляции), то можно заметить, что трансляция контрольных мРНК более чувствительна к кэп-аналогу, чем к 4ЕВР. Это косвенно указывает на то, что  $m^7GpppG$  связывает не только eIF4Е (как 4ЕВР), но и какие-то иные факторы, влияющие на инициацию трансляции.

Далее были проведены эксперименты на клетках HeLa как на более приближенной к реальности системе для изучения влияния 4ЕВР1 на трансляцию репортерных мРНК. Экспрессия в клетках HeLa нефосфорилируемого варианта 4ЕВР1 (4ЕВР1-4Ala) на уровне, сопоставимом с уровнем эндогенного 4ЕВР1 (Рис. 40А), не привела ни к сколько-нибудь значительному ингибированию трансляции репортерной мРНК *Fluc* с 5' лидером мРНК *УВ-1* (Рис. 40Б), ни к ингибированию синтеза эндогенного белка УВ-1 (Рис. 40В).

Данные результаты поставили вопрос об ингибиторной активности экспрессируемого клетками белка 4ЕВР1-4Ala. мРНК *люциферазы*, несущая 5'НТО мРНК *УВ-1*, была биотинилирована, кэпирована и инкубирована с лизатом контрольных клеток HeLa или лизатом клеток HeLa, экспрессирующих 4ЕВР1-4Ala, в буфере для системы бесклеточной трансляции. После иммобилизации биотинилированной РНК на стрептавидин-сефарозе РНК-связанные белки элюировали и анализировали иммуноблоттингом для обнаружения факторов инициации трансляции 4Е, 4G, 4А и 4ЕВР1.

Видно, что 4ЕВР1-4Ala эффективно связывается с кэпированной биотинилированной репортерной мРНК, несущей 5'НТО мРНК *УВ-1* (Рис. 40Г). Это связывание, вероятно, вызвано взаимодействием 4ЕВР1-4Ala с eIF4Е, связанным с кэп-структурой мРНК. Но самое важное, это связывание предотвращает взаимодействие между eIF4Е и eIF4G-eIF4А (Рис. 40Г), что говорит о том, что экспрессированный 4ЕВР1-4Ala действительно действует как ингибитор трансляции. Интересно отметить, что в присутствии 4ЕВР1-4Ala связывание eIF4Е с кэпированной мРНК уменьшилось. Это можно объяснить тем, что снижение связывания eIF4Е с eIF4G уменьшает сродство eIF4Е к кэп-структуре мРНК [498]. Выяснить это стало возможным благодаря использованию в экспериментах кэпированной РНК, иммобилизованной на смоле, а не обычно применяемой кэп-сефарозы (только  $m^7G$  связанный со смолой).



**Рисунок 40. Влияние 4EBP-4Ala на трансляцию репортерных мРНК и на синтез YB-1 в клетках HeLa.** **А.** Клетки HeLa трансфицировали 1 или 2 мкг плазмиды pcDNA3-3HA-4EBP1-4Ala или 2 мкг pcDNA3-HA (в качестве контроля), культивировали в течение 36 ч. Лизаты клеток анализировали методом иммуноблоттинга с антителами против 4EBP1. **Б.** Клетки HeLa, экспрессирующие или не экспрессирующие 4EBP1-4Ala, трансфицировали репортерными мРНК *Fluc* с 5'НТО мРНК *YB-1* или мРНК  $\beta$ -глобина и мРНК *Rluc* (в качестве внутреннего контроля), культивировали 2 часа, собирали и детектировали активность Fluc и Rluc. Соотношение FLuc/RLuc для контроля (трансфекция pcDNA3-HA) принимали за 100%. Значения получены на основании по крайней мере трех независимых экспериментов. Ошибки – 2 стандартных отклонения. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний t-критерий Стьюдента; \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ . **В.** Лизаты клеток HeLa, экспрессирующих или не экспрессирующих 4EBP1-4Ala, уравнивали по общему белку и использовали для анализа уровня синтеза YB-1 методом метаболического мечения белков [ $^{35}\text{S}$ ]-метионином с последующей иммунопреципитацией антителами против YB-1, разделением белков электрофорезом в кислотном мочевином ПААГ и автордиографией. **Г.** Биотинилированную, кэпированную мРНК *Fluc* с 5'НТО мРНК *YB-1* (0,32 пмоль) инкубировали со 150 мкл лизата клеток HeLa, экспрессирующих или не экспрессирующих 4EBP-4Ala, и иммобилизовали на стрептавидин-сефарозе. Белки, связавшиеся с РНК, элюировали, разделяли с помощью ДСН-гель-электрофореза и анализировали методом иммуноблоттинга.

Возникает противоречие: ингибиторы mTOR-сигнального каскада подавляют трансляцию мРНК *YB-1* и репортерной мРНК с лидерами мРНК *YB-1*, но при этом основная мишень этого каскада – 4EВР - не играет в этом существенной роли. Впрочем, подобное противоречие имеет место и в литературе. В одной из работ показано, что нокаут гена 4EВР1 и 4EВР2 приводит к устойчивости трансляции 5'ТОР мРНК к ингибиторам mTOR [492], однако в другой публикации [499] аналогичный нокаут не препятствовал ингибированию трансляции ТОР мРНК при голодании по сыворотке и при гипоксии (стрессах, затрагивающих mTOR). Более того, замена эндогенных 4EВР1 и 4EВР2 на мутантный нефосфорилируемый 4EВР-4A1a не привела к стойкой репрессии трансляции 5'ТОР мРНК при указанных стрессах.

Простейшее объяснение этого противоречия заключается в том, что ингибиторы mTOR-киназы оказывают более широкое воздействие на аппарат трансляции, которое затрагивает не только канонические факторы инициации трансляции, входящие в состав комплекса eIF4F.

Ингибирование связывания 4E с мРНК при оверэкспрессии 4EВР-4A1a оказывает слабое воздействие на общую трансляцию и на трансляцию мРНК *YB-1* в частности, поскольку действует только на этот фактор трансляции и на соответствующий ему путь инициации трансляции. Это может говорить о том, что eIF4E не является лимитирующим фактором инициации трансляции. В этой связи интересны данные по нокауту гена eIF4E. Было показано, что в клетках, в которых экспрессия eIF4E снижена вдвое (получены из мышей *eIF4E<sup>+/-</sup>*), общий уровень трансляции не изменяется, что несколько удивительно, поскольку, согласно доминирующей на сегодня гипотезе, eIF4E - ключевой фактор инициации трансляции, лимитирующий её уровень. Полное выключение *eIF4E* у мышей и у дрожжей летально, однако по крайней мере некоторые клеточные культуры (K562, KBM7, Raji) жизнеспособны после выключения экспрессии гена eIF4E [500].

В совокупности это говорит о том, что и в случае снижения активности eIF4E клетки способны поддерживать нормальный уровень инициации трансляции. По какому механизму это происходит, сказать трудно. Это может быть кэп-зависимый механизм, для которого необходимы другие кэп-связывающие белки, хотя сказать, что это за белки, сложно. В основном белки, связывающие кэп (4E-H, LARP1), участвуют в подавлении трансляции. Впрочем, существуют данные о том, что субъединица фактора инициации трансляции eIF3 (3d) способна связывать кэп и участвовать в инициации трансляции некоторых мРНК без привлечения eIF4F [501]. Не стоит сбрасывать со счетов и гомологи eIF4E - eIF4E2 и eIF4E3, которые не связывают фактор eIF4G и, вероятно, иначе участвуют в инициации трансляции.

Возможен механизм 5'-конец-мРНК-зависимый, но вовсе не зависящий от кэп-структуры, для которого могут быть необходимы РНК-хеликазы, в том числе свободный фактор eIF4A (не в комплексе eIF4F), или требоваться не eIF4G1, а его гомолог eIF4G2 (DAP5).

Однако в любом случае важно, что ингибиторы mTOR-киназы способны подавлять и эти механизмы. И поэтому Torin 2 или PP242 ингибируют трансляцию мРНК *YB-1* и TOR-like мРНК, а 4EBP-4A1a нет. При этом другие (большинство) мРНК менее чувствительны и к ингибиторам mTOR, и к ингибиторам кэп-зависимой трансляции, поскольку могут нуждаться в меньшем количестве канонических факторов инициации трансляции или использовать другие механизмы инициации трансляции, менее зависящие от активности mTOR.

Подведем некоторые итоги данной части диссертационной работы. Применяв разработанный нами метод детекции синтеза *YB-1* в клетках, впервые удалось получить данные об особенностях синтеза эндогенного *YB-1* в клетках.

Во-первых, были получены первые доказательства возможности авторегуляции синтеза *YB-1* в культивируемых клетках.

Во-вторых, было установлено, как скорость синтеза *YB-1* зависит от скорости деления клеток. При торможении клеточной пролиферации, зависящем от плотности, скорость синтеза *YB-1* значительно снижается. Более сильные воздействия на клеточное деление, такие как голодание, приводят к снижению количества *YB-1* в клетке. При этом синтез *YB-1* снижается в случае голодания клеток в большей степени, чем тотальный белковый синтез. Освобождение от ареста клеточного деления, вызванного голоданием, сопровождается быстрым и значительным увеличением скорости синтеза *YB-1* с последующим восстановлением количества *YB-1* в клетке.

Роль *YB-1* в пролиферации клеток отмечается во многих исследованиях [284-286]. Главный вывод, который делается в подобных работах, состоит в том, что от количества *YB-1* в клетке зависит, как быстро клетки делятся. Проведенные эксперименты позволяют утверждать и обратное, что от того, как быстро клетки делятся, зависит синтез *YB-1*. Интересно, что недавно на клетках глиобластомы было показано участие *YB-1* в контроле активности mTOR-киназного комплекса за счет регуляции трансляции мРНК *CC14*, кодирующей шаперон, который играет ключевую роль в фолдинге субъединицы mTOR-киназного комплекса mLST8 [484]. Таким образом, можно проследить положительную обратную связь между активностью mTORC и количеством *YB-1*, а сам *YB-1* можно рассматривать не только как мишень сигнальных каскадов, регулирующих клеточный рост и деление, но и как компонент этих каскадов, контролирующей их активность.

В-третьих, было показано, что одним из сигнальных каскадов, регулирующих синтез *YB-1*, является mTOR сигнальный путь. Подавление активности mTOR киназы ингибитором PP242 и вышележащей киназы PI3K (вортманнином) специфично снижало уровень синтеза как эндогенного белка, так и трансляцию репортерных конструкций. Кроме того,

невосприимчивость синтеза  $\gamma$ B-1 к рапамицину, ингибитору mTOR, в основном воздействующему на фосфорилирование S6-киназы, и в меньшей степени на фосфорилирование 4EВР, позволило утверждать, что именно фосфорилирование 4EВР, и следовательно, его eIF4E-связывающая активность играет важную роль в регуляции трансляции мРНК  $\gamma$ B-1. Интересно, что ингибитор Erk1/2 киназы - U0126 - не повлиял на синтез  $\gamma$ B-1. Известно, что одним из следствий активации Erk является фосфорилирование eIF4E киназой Mnk1, и следовательно, повышение уровня трансляции некоторых eIF4E-зависимых матриц (например, ODC). То, что ингибирование Erk и, следовательно, ингибирование фосфорилирования eIF4E никак не повлияло на синтез  $\gamma$ B-1, может говорить о том, что уровень трансляции мРНК  $\gamma$ B-1 не зависит от фосфорилирования eIF4E.

Роль mTOR в регуляции трансляции мРНК  $\gamma$ B-1 подтверждается данными Hseih et al [489] и Thoreen et al.[492]. В этих работах методом рибосомного профайлинга было показано, что мРНК  $\gamma$ B-1 обнаруживается в пуле мРНК, трансляция которых подавляется при ингибировании mTOR. Авторы одной из этих работ предположили, что ингибирование трансляции мРНК  $\gamma$ B-1 обусловлено PRTE (Pyrimidine Rich Translational Element) или TOP-like элементами в 5'НТО мРНК  $\gamma$ B-1. Однако этот элемент находится в начале 5'НТО (длиной 171 н) мРНК  $\gamma$ B-1 человека (NM\_004559.3), а в нашей репортерной конструкции присутствовала 5'НТО мРНК кролика (NM\_001082785.1), более короткая и не имеющая PRTE-последовательности. Тем не менее, мРНК *люциферазы* с такой укороченной 5'НТО была чувствительна к ингибированию mTOR сигнального пути. Вероятно, последовательность, ответственная за чувствительность к ингибированию mTOR, действительно находится в 5'НТО. Однако эксперименты с укорочением 5'НТО мРНК  $\gamma$ B-1 или делецией прилегающей к стартовому кодону последовательности 5'НТО показали, что эту чувствительность определяет практически вся CG-богатая последовательность 5'НТО, а не конкретный её участок. Кроме того, на настоящий момент использование термина «TOP-like последовательность» сходит на нет, поскольку оказалось, что обработка данных в работах Hseih et al [489] и Thoreen et al.[492] была выполнена не достаточно тщательно. Определенного мотива, характерного для чувствительных к mTOR-киназе мРНК, но не являющихся TOP мРНК, при правильном биоинформатическом подходе не обнаруживается.

В-четвертых, полученные данные о механизмах mTOR-зависимой регуляции трансляции мРНК  $\gamma$ B-1 позволяют сделать некоторые выводы, которые можно распространить и на другие мРНК. В частности, было выяснено, что одного 4EВР, который рассматривается как главная мишень при регуляции трансляции при участии mTOR-сигнального каскада, не достаточно для сильного, специфического подавления трансляции мРНК  $\gamma$ B-1. Далее было установлено, что в случае как мРНК  $\gamma$ B-1, так и других мРНК, чувствительных и нечувствительных к

ингибированию mTOR, существенно и в равной степени снижается связывание факторов eIF4G, eIF4E и особенно eIF4A, а связывание 4EВР возрастает. Таким образом, можно предположить, что специфическое ингибирование трансляции мРНК при подавлении mTOR-сигнального каскада обусловлено не специфическим изменением связывания факторов инициации, а, по-видимому, большей зависимостью трансляции таких мРНК от факторов инициации трансляции, входящих в состав комплекса eIF4F, другими словами, от факторов, необходимых для классической кэп-зависимой трансляции. Однако эксперименты с мутантной формой белка 4EВР-4EВР-4A1a, кэп-аналогом, белком eIF4A(R362Q) и гиппуристанолом предполагают, что более правильно говорить о том, что трансляция мРНК *YB-1* и подобных ей мРНК более чувствительна к ингибиторам mTOR-киназы из-за высокой чувствительности к активности не только и не столько канонических факторов инициации трансляции, но других факторов, опосредующих кэп-зависимый сканирующий механизм инициации трансляции.

Чем обусловлена такая зависимость, сказать трудно, и, видимо, в случае каждой мРНК (или небольшой группы мРНК) может быть своя причина: особенности вторичной структуры, либо связывание специфических белков с определенной последовательностью в 5'НТО. Возможно, именно этим можно объяснить разнообразие белков, взаимодействующих с TOP-мотивом: La, LARP7, LARP1, CNBP/ZNF9, AUF1, TIAR/TIA1 и участвующих (хоть это и не всегда строго доказано) в регуляции трансляции [502]. Однако работы по нокауту этих белков не всегда подтверждают их ключевую роль в регуляции трансляции мРНК через mTOR-сигнальный путь [502, 503]. На сегодня основным кандидатом на ключевую роль в регуляции трансляции TOP мРНК является белок LARP1[504], который при неактивированном mTOR-сигнальном пути способен взаимодействовать с 5' TOP-последовательностью и вытеснять eIF4E с кэп-структуры, и при этом же связываться с PABP, находящемся на поли(А)-хвосте мРНК. В случае активации mTOR LARP1 фосфорилируется и перестает взаимодействовать с 5' TOP-последовательностью, не препятствуя работе eIF4E, но остается связанным с PABP. Впрочем, предполагается, что LARP1 необходим не только для регуляции инициации трансляции, но для регуляции стабильности мРНК, в том числе и не-5'TOP мРНК (см. обзор [491]). Возможно, именно для этого необходимо взаимодействие LARP1 с PABP.

Вполне вероятно, что среди не-5'TOP мРНК, чувствительных к ингибированию mTOR, найдутся те, что более чувствительны к подавлению кэп-связывающих факторов (вероятно, наиболее многочисленная группа), либо более чувствительны к ингибированию хеликазной активности (eIF4A и другие хеликазы), и наконец, те мРНК, что зависят от обеих активностей. Возможно, таким разделением можно объяснить довольно четкое распределение на группы мРНК, чья трансляция подавляется либо ингибитором mTOR (INK128) либо ингибитором активности eIF4A (сильвестрол) [497]. Однако среди мРНК, чувствительных к сильвестролу,

имеется небольшая, в процентном отношении, группа TOP и TOP-like мРНК, которые могут быть чувствительны к ингибированию mTOR [497]. К мРНК, чувствительным и к кэп-связывающей, и к хеликазной активности, можно отнести и мРНК *YB-1*.

Можно также предположить, что те матрицы, которые могут использовать альтернативные механизмы инициации трансляции с участием аналогов канонических факторов инициации трансляции, будут хорошо транслироваться в условиях ингибирования mTOR. При условии, что эти аналоги не изменяют своей активности в этих условиях. Следовательно, вопрос о mTOR-зависимой регуляции, возможно, следует ставить несколько иначе, чем принято сейчас. Нужно искать и изучать механизмы не только специфического ингибирования трансляции TOP- и TOP-like мРНК, но и механизмы, с помощью которых некоторые матрицы продолжают транслироваться в условиях ингибирования mTOR. Такими механизмами могут быть как меньшая зависимость некоторых мРНК от факторов инициации трансляции, так и использование в инициации трансляции белков, которые функционально могут заменять канонические eIF4s. В первую очередь это относится к РНК-хеликазам, способным выполнять роль, аналогичную eIF4A - DDX29, Ded1/DDX3, Vasa/DDX4, RNA helicase A (RHA/DDX9) и Dhh1/RCK/DDX6 [505]. Во-вторых, можно назвать eIF4G-подобные белки, например, eIF4G2(p97/DAP5/NAT-1) [506] и Mex1 (Mxt) у беспозвоночных [507] или другие кэп-связывающие белки, такие как 4EHP [508]. Это могут быть и модификации мРНК, такие как метилирование аденозина ( $m^6A$ ). Недавно было показано, что нокаут метилазы METTL3 приводит к тому, что практически все мРНК становятся чувствительными к ингибированию mTOR Torin 2, а избирательное ингибирование TOP мРНК обусловлено их слабым метилированием в нормальных условиях [509, 510].

Интересно также отметить, что хеликаза eIF4A оказалась единственным белком из комплекса eIF4F, чье связывание с кэпированной мРНК падало в условиях голодания клеток по сыворотке (факторам роста). Это говорит не только о важности активности eIF4A в регуляции трансляции при недостатке факторов роста, но и о том, что эта регуляция отличается от ситуации при использовании ингибиторов mTOR. Это утверждение в последнее время получает все больше подтверждений [502].



#### 4. Альтернативные формы белка YB-1 и мРНК YB-1

Предпосылками к этой части работы послужили несколько фактов. Во-первых, в публикации Fukuda et al. [483] утверждалось, что в клетках содержится несколько форм мРНК YB-1, длина 5'НТО которых варьировала от 72 до 331 нуклеотида. Также было установлено, что YB-1 специфично связывается с 5'НТО собственной мРНК, обеспечивая негативную регуляцию своей трансляции *in vitro*. При этом специфичный YB-1-связывающий сайт был локализован в начальной части (1-200 н.) самой длинной 331-нуклеотидной 5'НТО мРНК YB-1. В то же время в базе данных GenBank содержалось на момент этого исследования (2013 год) несколько последовательностей мРНК YB-1, длина 5'НТО которых не превышает 180 н. (см. Табл. 3), а часть 5'НТО, отвечающая, согласно Fukuda et al., за связывание YB-1, вовсе отсутствует.

Вторая предпосылка заключалась в противоречии между данными, полученными в настоящей работе (раздел 3 части «Регуляция трансляции мРНК YB-1» главы «Результаты и обсуждение»), и данными статьи Hsieh et al. [489]. 5'НТО мРНК YB-1 необходима для mTOR-зависимой регуляции синтеза YB-1 в клетке, однако, согласно Hsieh et al. [489], mTOR-зависимая регуляция трансляции наблюдалась в случае мРНК YB-1 с 171 нуклеотидной 5'НТО, в которой ближе к 5' концу содержится TOP-like последовательность, а согласно нашим экспериментам, мРНК YB-1 с 103 нуклеотидной 5'НТО, в которой данная последовательность отсутствовала, все равно была подвержена mTOR-зависимой регуляции трансляции.

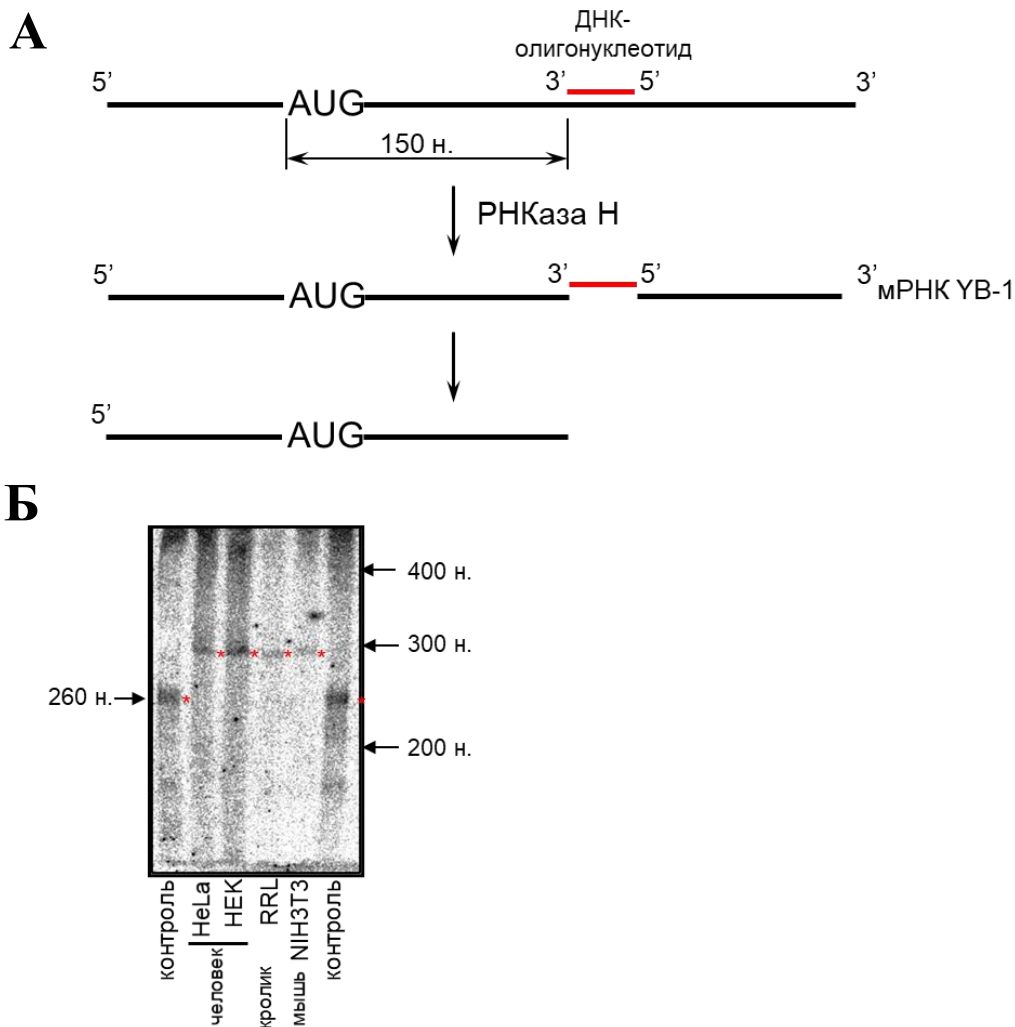
**Таблица 3.** Сравнение длин 5'НТО мРНК YB-1 из разных организмов (по базе данных NCBI, 2013 г.).

Организм	NCBI Reference Sequence	Длина 5'НТО
<i>Homo sapiens</i>	NM_004559.3	171 н.
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	NM_001082785.1	103 н.
<i>Mus musculus</i>	NM_011732.2	150 н.
<i>Rattus norvegicus</i>	NM_031563.3	124 н.
<i>Gallus</i>	NM_204414.1	136 н.
<i>Bos taurus</i>	NM_174815.2	140 н.
<i>Pan troglodytes</i>	XM_525693.4	182 н.

В связи с указанными противоречиями необходимо было выяснить, какова длина 5'НТО мРНК *YB-1* различных организмов и её роль в трансляции мРНК *YB-1*.

#### 4.1. Определение длины 5'НТО мРНК *YB-1* эукариотических клеток

Для определения длины 5'НТО эндогенной мРНК *YB-1* тотальная РНК из клеток человека HeLa и HEK293, клеток мыши NIH3T3 и ретикулоцитов кролика была обработана РНКазой Н в присутствии ДНК-олигонуклеотида длиной 21 н., комплементарного последовательности мРНК *YB-1* на расстоянии 150 н. и далее от стартового кодона трансляции (Рис. 41А).



**Рисунок 41.** Анализ длины 5'НТО мРНК *YB-1* из клеток человека, мыши и кролика. **А.** Схема эксперимента. Тотальную клеточную РНК отжигали с ДНК-олигонуклеотидом длиной 21 н., комплементарным последовательности мРНК *YB-1* в области 150–170 н. после стартового кодона трансляции, а затем образец обрабатывали РНКазой Н. Продукты реакции разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях, а 5'-концевые фрагменты мРНК *YB-1* выявляли методом Нозерн-блоттинга с помощью [<sup>32</sup>P]-меченного ДНК-зонда. **Б.** Результаты эксперимента (радиоавтограф) с тотальной РНК клеток человека (HeLa и HEK293Т) – дорожки 2 и 3, клеток кролика (ретикулоциты) – дорожка 4 и клеток мыши (NIH3T3) – дорожка 5. В качестве контроля (дорожки 1 и 6) использовали кроличью мРНК *YB-1* (GenBank, NM\_001082785.1), полученную методом транскрипции *in vitro*.

Продукты реакции разделяли электрофорезом в денатурирующем полиакриламидном геле и переносили из геля на нейлоновую мембрану. Фрагменты мРНК *УВ-1*, содержащие 5'НТО и часть кодирующей области мРНК *УВ-1*, детектировали с помощью радиоактивно меченного зонда, комплементарного 5' концевой части мРНК *УВ-1*. Как видно на рисунке 41Б, детектируемые с помощью зонда фрагменты мРНК *УВ-1* из разных линий клеток имеют примерно одинаковую длину около 290 н. (Рис. 41Б, дорожки 2-5). В то же время, они приблизительно на 30 нуклеотидов превосходят по длине фрагмент мРНК *УВ-1* кролика (260 н.), полученной согласно базе данных GenBank и имеющей 5'НТО длиной 103 нуклеотида и небольшой довесок (10 нуклеотидов) из вектора pBluescript KS (Рис. 41Б, дорожки 1 и 6).

Кроме того, тотальную РНК из клеток HeLa (человек), HEK293Т (человек) и ретикулоцитов кролика использовали для определения последовательности 5' конца мРНК *УВ-1* методом быстрой амплификации 5' конца кДНК (5' RACE) с последующим клонированием ПЦР-продукта в вектор pJET1.2 и секвенированием полученных клонов. Результаты секвенирования нескольких клонов представлены в таблице 4. Из этой таблицы следует, что длина 5' нетранслируемой области мРНК *УВ-1* составляет 138-140 нуклеотидов. Лишь в одном случае (мРНК *УВ-1* из ретикулоцитов кролика) длина 5'НТО мРНК *УВ-1* составила 118 нуклеотидов.

**Таблица 4.** Результаты экспериментов 5'RACE.

образец	Последовательность	длина 5'НТО
HEK 293_1	GAGTTCGATCGGTAGCGGGAGCGGAGAGCGGACCCCAGAGAGCCCTGAGC AGCCCCACCGCCGCCGCGGCCTAGTTACCATCACACCCCGGGAGGAGCCG CAGCTGCCGCAGCCGGCCCCAGTCACCATCACCGCAACA	140
HEK 293_2	AGTTCGATCGGTAGCGGGAGCGGAGAGCGGACCCCAGAGAGCCCTGAGCA GCCCCACCGCCGCCGCGGCCTAGTTACCATCACACCCCGGGAGGAGCCGC GGCTGCCGCAGCCGGCCCCAGTCACCATCACCGCAACC	139
HEK 293_3	GGAGAGCGGACCCCAGAGAGCCCTGAGCAGCCCCACCGCCGCCGCGGCCT AGTTACCATCACACCCCGGGAGGAGCCGCAGCTGCCGCAGCCGGCCCCAGT CACCATCACCGCAACC	118
RRL_1	AGTTCGATCGGTAGCGGGAGCGGAGAGCGGACCCCTGAGAGCCCTGAGCAG CCCCACCGCCGCCGCGGCCTAGTTACCATCACACCCCGGGAGGAGCCGCA GCTGCCGCAGCCGGCCCCAGTCACCATCACCGCAACC	139
RRL_2	CGATCGGTAGCGGGAGCGGAGAGCGGACCCCAGAGAACCCTGAGCAGCCC CACCGCCGCCGCGGCCTAGTTACCATCACACCCCGGGAGGAGCCGCAGCT GCCGCAGCCGGCCCCAGTCACCATCACCGCAACC	136

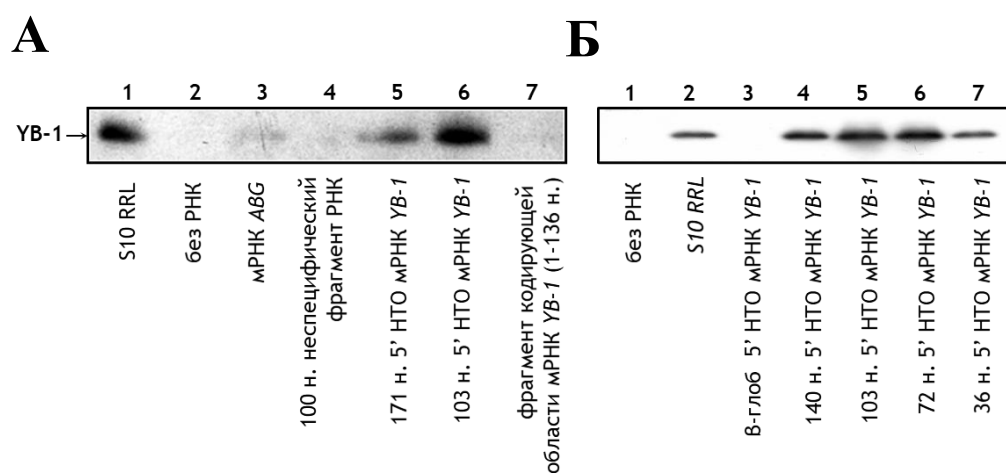
RRL_3	AGTTCGATCGGTAGCGGGAGCGGAGAGCGGACCCCTGAGAGCCCTGAGCAG CCCCACCGCCGCCGGCCTAGTTACCATCACACCCCGGGAGGAGCCGCA GCTGCCGCAGCCGGCCCCAGTCACCATCACCGCAACC	139
HeLa	GAGTTCGATCGGTAGCGGGAGCGGAGAGCGGACCCAGAGAGCCCTGAGC AGCCCCACCGCCGCCGGCCTAGTTACCATCACACCCCGGGAGGAGCCG CAGCTGCCGCAGCCGGCCCCAGTCACCATCACCGCAACC	140

Таким образом, можно утверждать, что длина 5'НТО мРНК *YB-1* различных линий клеток и организмов не имеет заметных отличий и составляет примерно 140 н. База данных GenBank, по-видимому, содержит неполноразмерную мРНК *YB-1* кролика (NM\_001082785.1) с укороченной 5'НТО.

Что касается формы мРНК *YB-1* с 5'НТО длиной 331 н. из публикации Fukuda et al. [483], то, согласно высокопроизводительному кэп-анализу экспрессии (CAGE-анализ), который появился несколько позже этой части диссертационной работы, такая мРНК существует, но является минорной [511]. Кроме того, согласно этому же анализу, старт транскрипции гена *YBX1* является довольно широким, и, как следствие, длины 5'НТО мРНК *YB-1* варьируют в диапазоне от 177 до 129 н., однако наиболее представлены мРНК с длинами 5'НТО около 148 или 139 нт.

В статье Fukuda et al. было показано, что белок YB-1 взаимодействует с 200-нуклеотидной частью 5'НТО мРНК *YB-1*, которая отсутствует в основной форме мРНК. Однако нельзя было исключать, что YB-1 взаимодействует специфично с 5'НТО основной формы мРНК *YB-1*. Для проверки возможности связывания YB-1 с такой 5'НТО мРНК *YB-1* лизат ретикулоцитов кролика инкубировали с биотинилированными фрагментами мРНК *YB-1*, содержащими полноразмерную (171 н., как максимально возможная длина 5'НТО основной формы мРНК *YB-1*) или укороченные 5'НТО мРНК *YB-1*, либо с биотинилированными контрольными фрагментами РНК, иммобилизованными на стрептавидин-сефарозе. Связывание YB-1 с РНК анализировали методом иммуноблоттинга. Как видно на рисунке 42А, YB-1 специфично связывается с полноразмерной формой 5'НТО собственной мРНК (дорожка 5), но не с контрольными РНК (дорожки 2, 3) и не с фрагментом кодирующей области мРНК *YB-1* (дорожка 7). Более того, как видно на рисунке 42Б, YB-1 специфично связывается со всеми использованными укороченными вариантами 5'НТО мРНК *YB-1* (от 140 до 36 нуклеотидов).

Интересно, что ранее (Рис. 33В) было предположено, что GC-богатая последовательность 5'НТО мРНК *YB-1* обуславливает чувствительность трансляции этой мРНК к ингибиторам mTOR, вероятно за счет связывания какого-либо белкового фактора с ней. Этим фактором мог бы быть YB-1: он мог бы мешать взаимодействию факторов инициации трансляции с 5'НТО мРНК *YB-1*, и таким образом делать трансляцию более зависимой от факторов инициации, например, 4 группы. Связывание YB-1 с 5'НТО мРНК *YB-1* различной длины (Рис. 42Б) хорошо согласуется с результатами исследования влияния Torin-2 на трансляцию репортерных мРНК с укороченными вариантами 5'НТО мРНК *YB-1* (рисунок 33В). Это позволяет предположить, что взаимодействие YB-1 с 5'НТО мРНК *YB-1* может обуславливать повышенную восприимчивость этой мРНК к ингибированию mTOR-киназы.



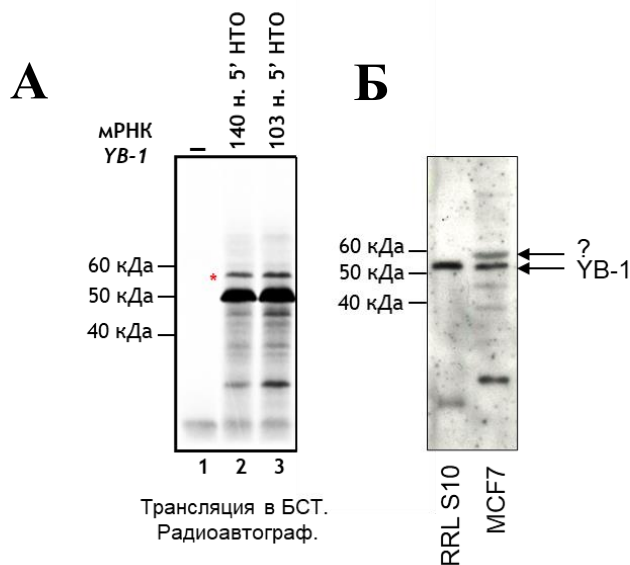
**Рисунок 42. Специфичность взаимодействия YB-1 с 5'НТО мРНК *YB-1*.** А. Фрагменты биотинилированной РНК, иммобилизованные на стрептавидин-сефарозе (мРНК *AβG*, фрагмент неспецифической РНК длиной 100 нуклеотидов, 5'НТО мРНК *YB-1* длиной 171 нуклеотидов, 5'НТО мРНК *YB-1* длиной 103 нуклеотида и фрагмент кодирующей области мРНК *YB-1* длиной 136 нуклеотидов) (по 15 пмоль каждого) инкубировали с 300 мкл лизата ретикулоцитов кролика. Связанные с РНК белки элюировали, разделяли с помощью ДСН-гель-электрофореза, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и детектировали антителами против С-концевого пептида YB-1. Дорожка 1 – лизат ретикулоцитов кролика, дорожка 2 – контрольный опыт без РНК, дорожка 3 – мРНК *AβG*, дорожка 4 – 100 н. фрагмент неспецифической РНК, дорожка 5 – 171 н. 5'НТО мРНК *YB-1*, дорожка 6 – 103 н. 5'НТО мРНК *YB-1*, дорожка 7 – 136 нуклеотидный фрагмент кодирующей области мРНК *YB-1* (начало кодирующей области). Б. Аналогичный А опыт, но с использованием укороченных 5'НТО мРНК *YB-1*. Дорожка 1 – контрольный опыт без РНК, дорожка 2 – лизат ретикулоцитов кролика, дорожка 3 – 160 н. фрагмент мРНК *β-глоб\_Fluc*, дорожка 4 – 140 н. 5'НТО мРНК *YB-1*, дорожка 5 – 103 н. 5'НТО мРНК *YB-1*, дорожка 6 – 72 н. 5'НТО мРНК *YB-1*, дорожка 7 – 36 н. 5'НТО мРНК *YB-1*.

#### 4.2. Сравнение трансляции укороченной и полноразмерной форм мРНК *YB-1* в бесклеточной системе белкового синтеза.

Итак, мажорная форма мРНК *YB-1* кролика, мыши и человека имеет 5'НТО длиной 140 н.. Возникает вопрос, как транслируется такая мРНК *YB-1* в бесклеточной системе трансляции и отличается ли эффективность её трансляции по сравнению с трансляцией мРНК *YB-1* с укороченной 5'НТО.

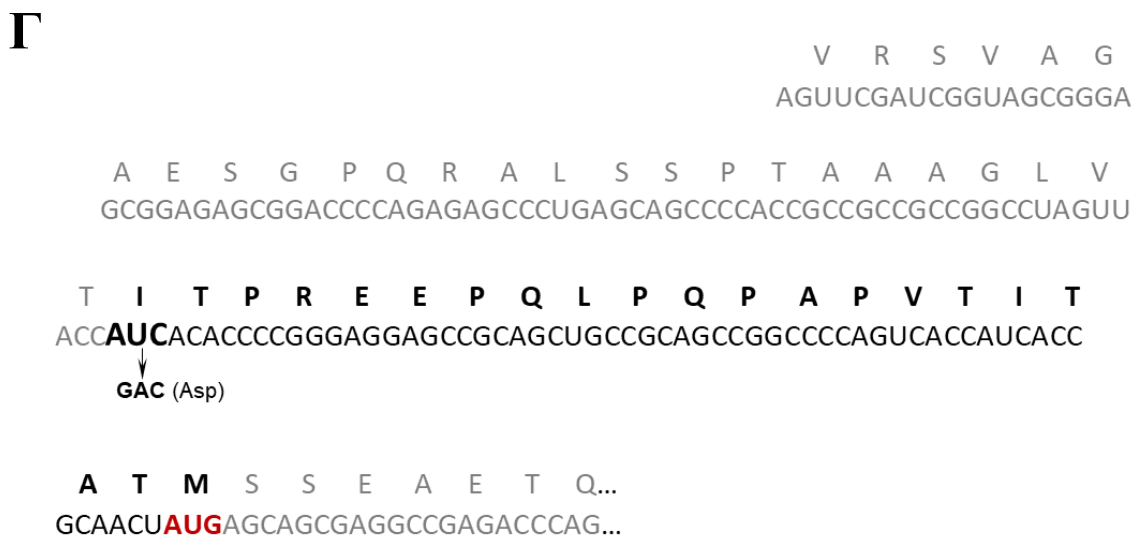
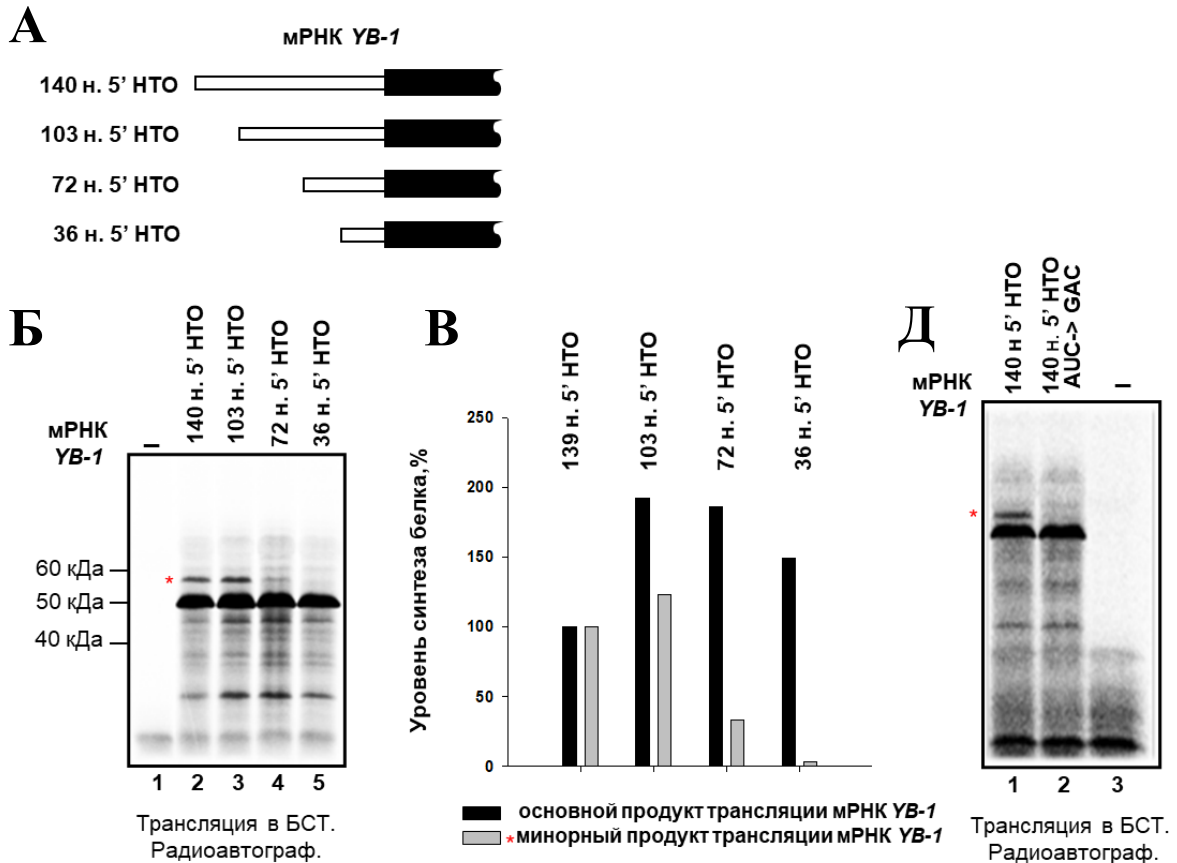
Кэпированные мРНК *YB-1* с 5'НТО 103 н. и 140 н. транслировали в БСТ на основе лизата ретикулоцитов кролика в присутствии [<sup>35</sup>S]-метионина. [<sup>35</sup>S]-меченные продукты трансляции разделяли SDS-гель-электрофорезом и детектировали автордиографией. В БСТ синтез основного продукта (белка *YB-1*) идёт с обеих форм мРНК *YB-1* (Рис. 43А, ср. дорожки 2 и 3). Что более интересно, как с укороченной, так и с полноразмерной мРНК *YB-1* синтезируется дополнительный продукт, имеющий меньшую электрофоретическую подвижность (отмечен звездочкой). Доля этого продукта от основного составляет примерно 5 %.

Следует отметить, что в некоторых клеточных лизатах с помощью высокоспецифичных антител против С-концевого пептида *YB-1* помимо основной формы белка *YB-1* можно детектировать белок с электрофоретической подвижностью около 60 кДа, соответствующий минорному продукту трансляции мРНК *YB-1* в БСТ (Рис. 43Б).



**Рисунок 43. Трансляция мРНК *YB-1* с полноразмерной и укороченной 5'НТО в бесклеточной системе трансляции** А. 0,1 пмоль К+А+ мРНК *YB-1* с 5'НТО длиной 140 н. (дорожка 2) или 103 н. (дорожка 3) транслировали в бесклеточной системе трансляции на основе лизата ретикулоцитов кролика в присутствии [<sup>35</sup>S]-метионина. [<sup>35</sup>S]-меченные продукты трансляции разделяли с помощью ДСН-гель-электрофореза и детектировали с помощью автордиографии. Дорожка 1 – система трансляции без экзогенной мРНК. Б. Лизат ретикулоцитов кролика или лизат клеток MCF7 анализировали методом иммуноблоттинга с использованием антител против С-концевого пептида *YB-1*.

Вероятно, данный продукт образуется из-за старта трансляции с неканонического сайта инициации трансляции, находящегося в той же рамке, что и основной продукт трансляции. При трансляции мРНК *YB-1* с 5'НТО длиной 72 и 36 нуклеотидов (Рис. 44А) было выяснено, что синтез дополнительного продукта заметно снижается при укорочении 5'НТО до 72 нуклеотидов и полностью пропадает при укорочении до 36 нуклеотидов (Рис. 44Б, дорожки 4 и 5; 44В). Это предполагает, что иницирующий кодон находится близко к 5' концу 72-нуклеотидной 5'НТО.



**Рисунок 44. Трансляция мРНК *YB-1* с полноразмерной и укороченными 5'НТО в бесклеточной системе трансляции.** А. Схема мРНК *YB-1* с 5'НТО разной длины, использованные в бесклеточной системе трансляции. Б. 0,1 пмоль K+A+ мРНК *YB-1* с 5'НТО различной длины (140 н. – дорожка 2, 103 н. – дорожка 3, 72 н. – дорожка 4, 36 н. – дорожка 5) транслировали в бесклеточной системе трансляции на основе лизата ретикулоцитов кролика в присутствии [<sup>35</sup>S]-метионина. [<sup>35</sup>S]-меченные продукты трансляции разделяли с помощью ДСН-гель-электрофореза и детектировали с помощью автордиографии. Дорожка 1 – система трансляции без экзогенной мРНК. В. Относительное количество радиоактивности в полосах (Б) определяли с использованием Packard Cyclone Storage Phosphor System (Packard Instrument Company, Inc.). Уровень трансляции мРНК *YB-1* с 5'НТО длиной 140 н. принимали за 100%. Г. Нуклеотидная последовательность 5'-концевого фрагмента мРНК *YB-1* и кодируемая им аминокислотная последовательность. Жирным шрифтом выделена дополнительная аминокислотная последовательность, синтезированная с АУС кодона в положении –(60–58) относительно основного стартового кодона. Указана мутация в предполагаемом иницилирующем кодоне. Д. 0,1 пмоль K+A+ мРНК *YB-1* с 5'НТО длиной 140 н. (WT, дорожка 1) или 5'НТО той же длины, но с заменой АУС→GAC в положении –(60–58) (дорожка 2) транслировали в бесклеточной системе трансляции на основе лизата ретикулоцитов кролика в присутствии [<sup>35</sup>S]-метионина. [<sup>35</sup>S]-меченные продукты трансляции разделяли с помощью ДСН-гель-электрофореза и детектировали с помощью автордиографии. Дорожка 3 – система трансляции без экзогенной мРНК.

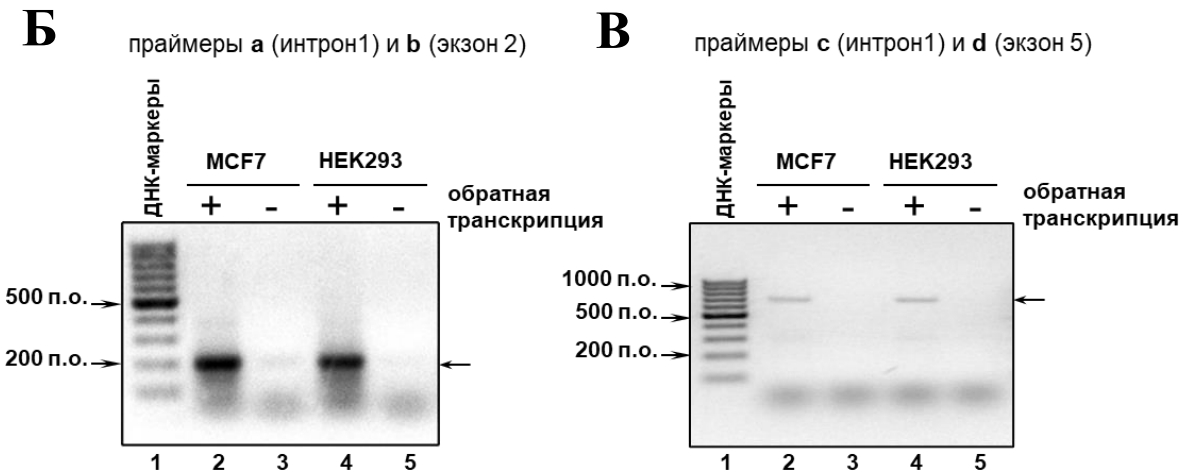
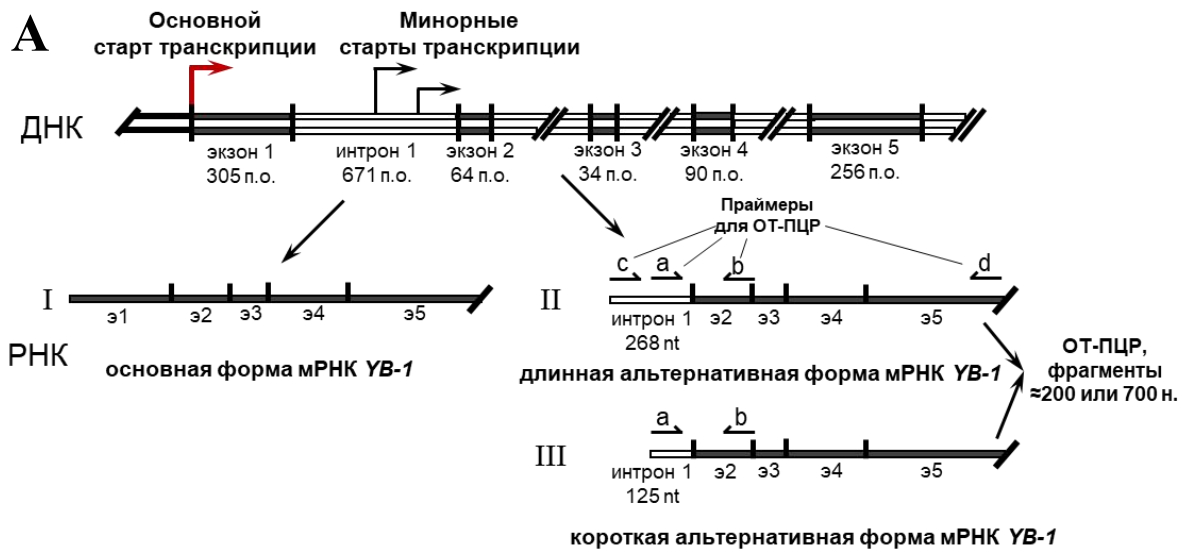
Наиболее подходящим кодоном оказался кодон АУС в положении –(60–58). Чтобы удостовериться в правильности этого предположения, была получена мРНК *YB-1*, в которой этот кодон был заменен на GAC (Рис. 44Г), и исследована её трансляция. Как видно на рисунке 44Д, такая замена привела к полному исчезновению дополнительного продукта трансляции мРНК *YB-1* и не повлияла на синтез основного. Таким образом, при трансляции мРНК *YB-1* в клетке наряду с основным продуктом может синтезироваться дополнительный удлиненный с N-конца белок.

#### 4.3. Альтернативные формы мРНК *YB-1*

По данным полногеномного анализа сайтов начала транскрипции (TSS) [512], ген *YBX1* имеет альтернативные TSS, два из которых обнаружены в первом интроне *YB-1* в положениях 404 и 547 (относительно начала интрона) (Рис. 45А). мРНК *YB-1*, синтезируемая с этих стартов транскрипции, не содержит первый экзон и находящийся в ней стартовый кодон трансляции. Чтобы подтвердить существование мРНК, синтезированных с этих TSS, из клеток НЕК293Т и MCF7 была выделена тотальная РНК. Образцы обрабатывали ДНКазой I и подвергали обратной транскрипции с праймером, комплементарным экзону 5 мРНК *YB-1* (праймер *d*), с последующей ПЦР с праймерами, комплементарными экзону 2 и интрону 1 (нуклеотиды 547–570 в интроне 1) (праймеры *a* и *b*, Рис. 45А). Это позволило выявить как укороченную, так и полноразмерную форму альтернативной мРНК *YB-1*. В качестве контрольной ПЦР-матрицы использовали тотальную РНК, не подвергавшуюся обратной транскрипции. Как видно на рисунке 45Б, продукты ПЦР, соответствующие мРНК, синтезированной с TSS в интроне 1 гена *YBX1*, были обнаружены в тотальной РНК из клеток НЕК293Т и MCF7 (дорожки 2 и 4 соответственно), но не в контроле (дорожки 3 и 5, соответственно). Как и ожидалось, продукты



ПЦР имели размер около 200 п.о., а их секвенирование показало, что альтернативная мРНК *YB-1* содержит часть интрона 1, за которой следует экзон 2 (Рис. 46). Чтобы исключить возможность синтеза продукта ОТ-ПЦР с геномной ДНК (которая могла остаться при выделении РНК), в аналогичном эксперименте на стадии ПЦР использовали другой праймер, комплементарный интрону 1 (нуклеотиды 404–423 в интроне 1), и праймер, комплементарный экзону 5 (праймеры *c* и *d*, Рис. 45А), что предсказуемо давало продукт ПЦР размером около 700 п.н. (Рис. 45В, дорожки 1 и 3). Это означает, что данный продукт кДНК был синтезирован из сплайсированной мРНК, инициация синтеза которой происходила с интрона 1.



**Рисунок 45.** Альтернативные формы мРНК *YB-1* детектируются в клетках MCF7 и HEK293Т. **А.** Схема предсказанной альтернативной формы мРНК *YB-1*. **Б и В.** Тотальная РНК из клеток MCF7 (дорожки 2 и 3) и HEK293Т (дорожки 4 и 5) использовали в реакции обратной транскрипции с последующей ПЦР (дорожки 2 и 4) или только в ПЦР (дорожки 3 и 5) с праймерами *a* и *b*, специфичными к интрону 1 и экзону 2 гена *YBX1* (**Б**), или праймерами *c* и *d*, специфичными к интрону 1 и экзону 5 гена *YBX1* (**В**). Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 2% агарозном геле. Детекцию проводили бромистым этидием. На дорожке 1 показаны маркеры ДНК.

**A**

....TGGAGAGAAAGGGCTGTCAGGTGGCCGCGGGCGGCCGGCGTGCGAGGGACCGGATGCCCAAGCCGGG

CGGATTTGGAAAAGGATAGCTGGTAATCGTGGCTTGTTTTGCTTTGTTTTCTTTTCCAG | CAACGAAGGTTTT

intron 1 | exon 2

GGGAACAGTAAAATGGTTCAATGTAAGGAA....

**Б**

....TGGAGAGAAAGGGCTGTCAGGTGGCCGCGGGCGGCCGGCGTGCGAGGGACCGGATGCCCAAGCCGGG

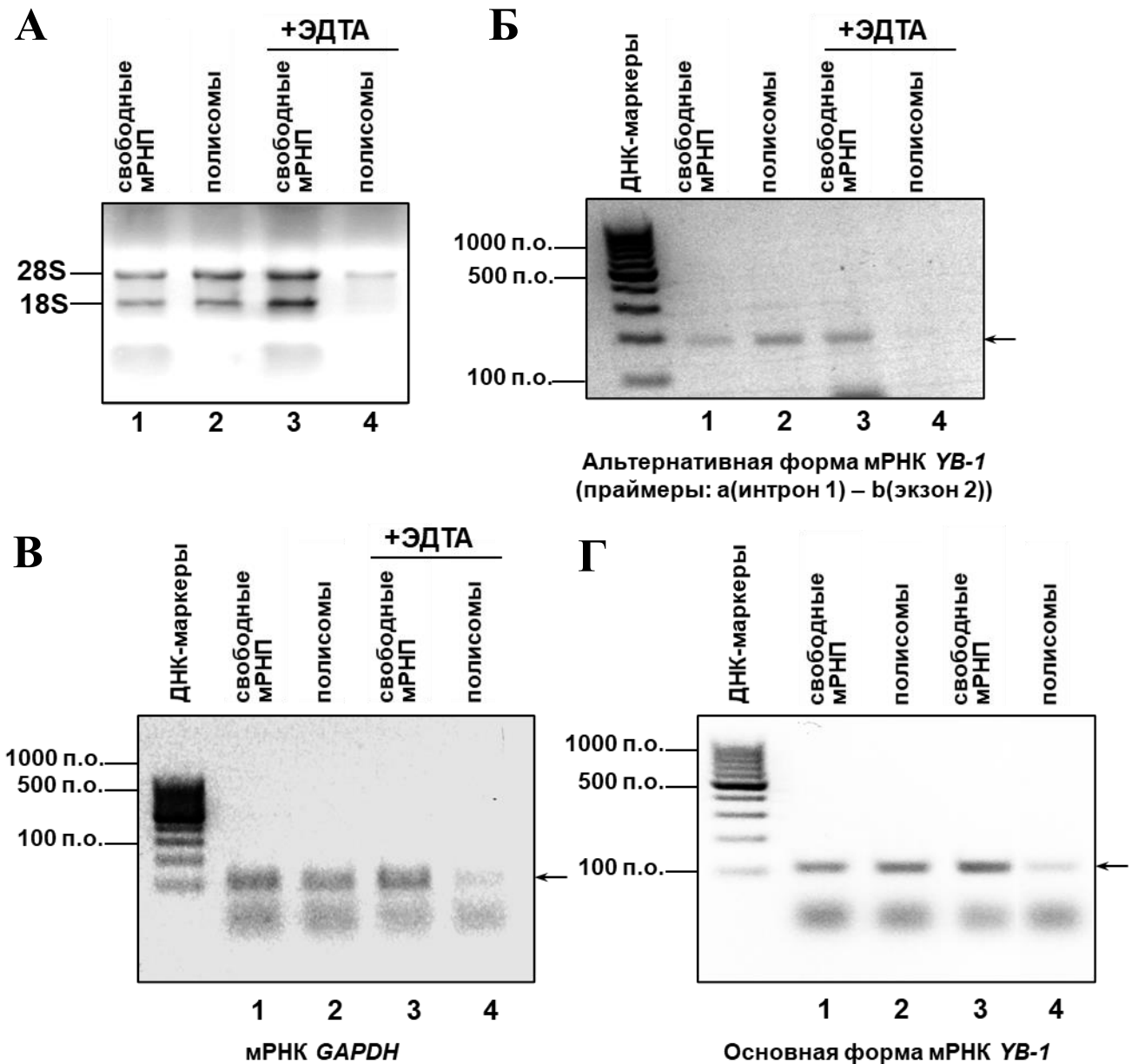
CGGATTTGGAAAAGGATAGCTGGTAATCGTGGCTTGTTTTGCTTTGTTTTCTTTTCCAG | CAACGAAGGTTTT

intron 1 | exon 2

GGGAACAGTAAAATGGTTCAATGTAAGGAA....

**Рисунок 46.** Нуклеотидные последовательности фрагментов альтернативной кДНК *YB-1* из клеток MCF7 (А) и HEK293Т (Б) человека, полученные секвенированием ПЦР-продуктов (Рис. 45Б).

Далее необходимо было выяснить, может ли альтернативная мРНК *YB-1* служить матрицей для синтеза белка. Об этом может свидетельствовать наличие альтернативной формы мРНК *YB-1* в полисомах. Лизат клеток MCF7 центрифугировали через 50% сахарозу с получением свободных мРНК в основном в супернатанте и полисомальных мРНК в осадке. После выделения тотальной РНК из этих фракций альтернативную форму мРНК *YB-1* (или мРНК *GAPDH* и основную форму мРНК *YB-1* в качестве контролей) детектировали с помощью ОТ-ПЦР с транскрипт-специфическими праймерами. На рисунке 47А показана эффективность фракционирования лизата на полисомальную и постполисомальную фракции. В отсутствие ЭДТА большая часть 28S рРНК и 18S рРНК наблюдалась во фракции полисом. Добавление 30 мМ ЭДТА к клеточному лизату приводило к диссоциации рибосом и переходу почти всей рРНК в постполисомную фракцию (свободные мРНК), тогда как только небольшая часть 28S рРНК была обнаружена во фракции полисом. На рисунке 47Б-Г видно, что фракция полисом содержала альтернативную форму мРНК *YB-1*, а также и контрольные мРНК: основную форму мРНК *YB-1* и мРНК *GAPDH*. Добавление EDTA к клеточному лизату приводило к переходу почти всей мРНК в свободную область мРНК (см. дорожки 3 и 4 на рисунке. 47Б, 47В и 47Г, соответственно). В совокупности эти результаты свидетельствуют о наличии мРНК *YB-1* в полисомах, что, в свою очередь, указывает на её вероятную трансляцию в клетке.

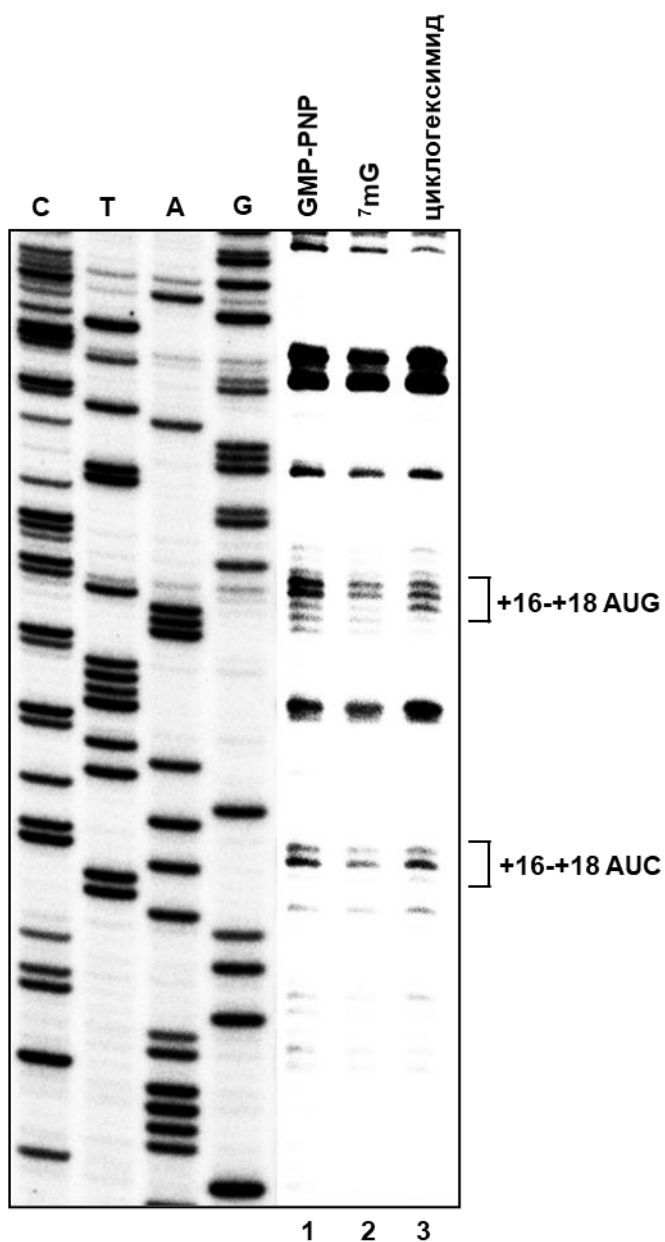


**Рисунок 47.** Альтернативная форма мРНК *YB-1* обнаруживается в полисомной фракции. Лизат клеток MCF7 с ЭДТА или без ЭДТА центрифугировали через 50% сахарозную подушку при 90000 об/мин в центрифуге TL-100 (Beckman) в течение 13 мин для отделения постполисомного супернатанта от полисом. Тотальную РНК из постполисомного супернатанта и полисомных фракций (ресуспендированные осадки) экстрагировали с помощью TRIzol и пересаждали LiCl. Часть тотальной РНК анализировали электрофорезом в денатурирующем агарозном геле. Остальное использовали для обратной транскрипции и ПЦР с геноспецифическими праймерами и анализировали электрофорезом в агарозном геле. А. Суммарная РНК. ДНК-продукты ОТ-ПЦР: альтернативная форма мРНК *YB-1* (праймеры а и в для ПЦР) (Б); мРНК *GAPDH* (В); основная форма мРНК *YB-1* (Г).

Далее длинную и короткую альтернативные формы мРНК *YB-1* (Рис. 48А) транслировали в бесклеточной системе трансляции. Оказалось, что как длинная, так и короткая формы могут транслироваться в БСТ. При этом в обоих случаях синтезируется белок, имеющий электрофоретическую подвижность, соответствующую белку примерно 40 кДа, то есть меньшую, чем обычный белок *YB-1* (Рис. 48Б). Это означает, что стартовый кодон скорее всего



Чтобы выяснить, на каком кодоне альтернативной формы мРНК *YB-1* может происходить инициация трансляции и образовываться преинициаторный 48S комплекс, был применен метод тупринтинга (toeprinting). Сборку комплексов на мРНК проводили не с чистыми компонентами, а в лизате ретикулоцитов кролика. 48S-комплекс собирали в присутствии негидролизуемого аналога GTP, GMP-PNP, ингибитора связывания рибосомной субчастицы 60S с комплексом 48S. 80S-комплекс был собран в присутствии циклогексимида, ингибитора элонгации трансляции.



**Рисунок 49.** Сборка комплексов инициации трансляции 48S и 80S на альтернативной форме мРНК *YB-1* в обработанном нуклеазой лизате ретикулоцитов кролика (RRL). Для сборки комплексов инициации трансляции использовали лизат ретикулоцитов кролика, обработанный микрококковой нуклеазой, как описано в разделе «Материалы и методы» (пункт 39).

Ингибирование удлинения праймера в случае образования 48S-комплекса (Рис. 49, дорожка 1) и 80S-комплекса (Рис. 49, дорожка 3) характеризуется появлением на электрофореграмме трех полос в положениях +16 до +18 относительно AUG-кодона в плохом контексте. В контрольном эксперименте с аналогом кэпа (7mGpppG) сигнал +18 отсутствует, а сигналы +16 и +17 выражены слабее (Рис. 49, дорожка 2).

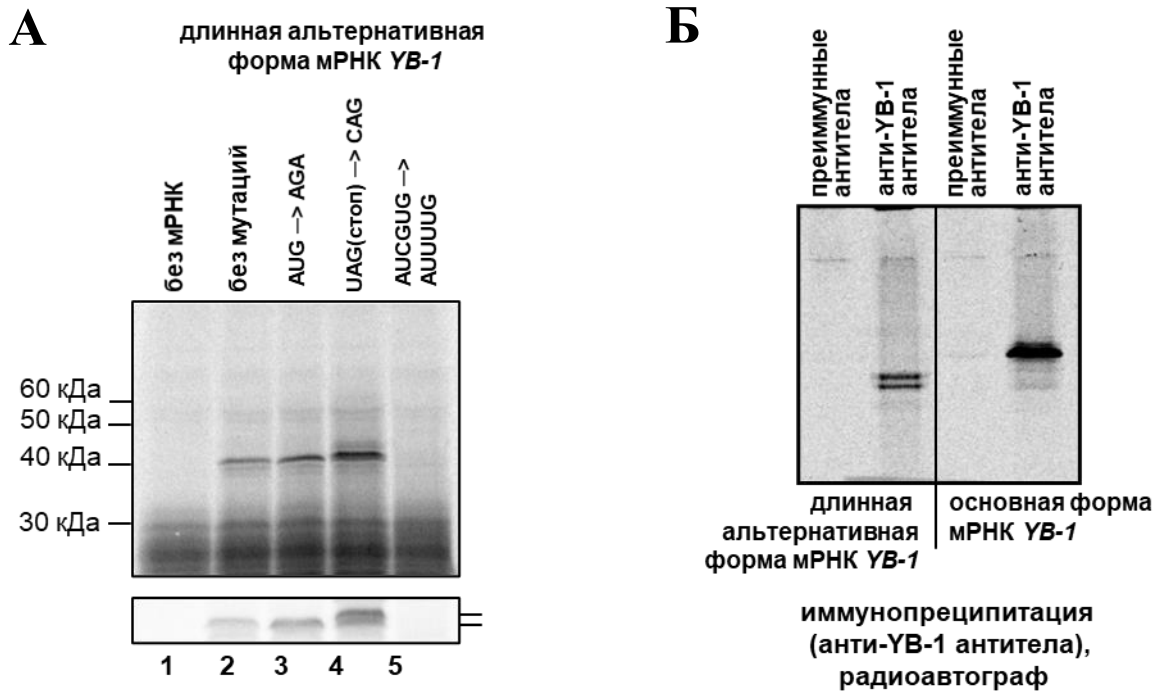
Этот результат предполагает, что инициация трансляции альтернативной мРНК *YB-1* может происходить на рассматриваемом AUG-кодоне. Нельзя исключать, что синтез может начинаться с этого кодона и продолжается из-за проскакивания рибосомой последующего стоп-кодона. Однако наиболее вероятно, что синтез длинного 40 кДа-продукта начинается с одного из двух кодонов (неканонических), находящихся в хорошем козаковском контексте в 3' концевой области интрона, AUC или GUG, в рамке по отношению к остальной части мРНК *YB-1*, начинающейся со 2 экзона (Рис. 48В). В пользу этого говорит и наличие остановок обратной транскриптазы в положениях +16 - +18 относительно кодона AUC. (Рис. 49).

Для того, чтобы установить, с какого кодона начинается трансляция альтернативной мРНК *YB-1*, были получены мутантные альтернативные мРНК *YB-1*, в которых кодон AUG был заменен на AGA, либо стоп-кодон UAG на глутаминовый кодон CAG, либо AUCGUG (наиболее вероятные кодоны старта трансляции) заменены на AUUUUG (Рис. 48В). Эти мРНК и контрольную альтернативную мРНК *YB-1* без замен транслировали в БСТ на основе лизата ретикулоцитов кролика в присутствии [<sup>35</sup>S]-метионина. [<sup>35</sup>S]-меченные продукты трансляции разделяли ДНС-гель-электрофорезом и детектировали автордиографией (Рис. 50). Согласно рисунку 50А, замена AUG-кодона не повлияла негативно на синтез альтернативной формы белка *YB-1* (ср. дорожки 2, 3 на рисунке 50А). При этом замена двух рядом расположенных возможных стартовых кодонов AUCGUG на AUUUUG привела к полному отсутствию синтеза альтернативной формы белка *YB-1* (Рис. 50А, дорожка 5). Стоит отметить, что замена стоп-кодона UAG на CAG приводила к синтезу дополнительного продукта с несколько меньшей подвижностью (Рис. 50А, нижняя панель, дорожка 4). Это подтверждает предположение, что инициация трансляции может начинаться с кодона AUG, в результате чего синтезируется белок большего молекулярного веса (примерно на 1 кДа). Кроме того, замена AUG на AGA привела к более высокому уровню синтеза белка (ср. дорожки 2 и 3 на рисунке 50А). Предположительно, эта мутация увеличивала вероятность использования стартового кодона AUC или GUG.

В целом трансляцию альтернативной мРНК *YB-1* можно описать следующим образом. Сканирующая 40S-субъединица достигает кодона AUG и инициирует синтез полипептида, который останавливается на ближайшем стоп-кодоне UAG. Затем рибосома (или её субъединица 40S после диссоциации 60S), скорее всего, находит другой близко расположенный стартовый кодон (AUC или GUG) и инициирует синтез альтернативной формы *YB-1*. Нельзя

также исключать, что рибосома может пропускать AUG-кодон, поскольку он находится в «слабом» контексте, и инициировать синтез белка сразу с AUC или CUG кодонов.

Таким образом, можно утверждать, что с части интрона 1 синтезируется 10-11 аминокислотный фрагмент, за которым следует последовательность белка YB-1, кодируемая частью мРНК *YB-1*, начинающейся со второго экзона, т. е. фактически домен холодового шока и С-концевой домен обычного белка YB-1.



**Рисунок 50. Анализ трансляции мутантных форм альтернативной мРНК *YB-1*.** А. 0,1 пмоль  $K^+A^+$  длинной альтернативной мРНК *YB-1* (дорожка 2) или длинной альтернативной мРНК *YB-1* с мутацией AUG→AGA (дорожка 3), или мутацией UAG(stop)→CAG (дорожка 4), или AUCGUG →Мутация AUUUUG (дорожка 5) транслировали в бесклеточной системе трансляции на основе ретикулоцитов кролика в присутствии  $[^{35}S]$ -метионина.  $[^{35}S]$ -меченные продукты трансляции разделяли с помощью ДСН-гель-электрофореза и детектировали с помощью автордиографии. На дорожке 1 показана трансляция системы без экзогенной мРНК. На нижней панели показаны те же образцы, но после более длительного электрофореза. Б. Реакционную смесь для трансляции с длинной альтернативной мРНК *YB-1* или основной формой мРНК *YB-1* использовали для иммунопреципитации с преиммунными антителами или антителами против YB-1. Белки, связанные с антителами, разделяли с помощью кислотного-мочевинного электрофореза в ПААГ, а  $[^{35}S]$ -меченные белки выявляли с помощью автордиографии.

Чтобы подтвердить наличие С-концевой части YB-1 в продукте трансляции альтернативной мРНК *YB-1*, была проведена иммунопреципитация белков, синтезированных в присутствии  $[^{35}S]$ -метионина в бесклеточной системе трансляции с исходной или альтернативной мРНК *YB-1*. Оказалось, что в преципитате, полученном с помощью антител против С-концевого пептида YB-1, обнаруживается как обычный белок YB-1 (Рис. 50Б, дорожка 4), так и продукт трансляции альтернативной мРНК *YB-1* (Рис. 50Б, дорожка 2). При

использовании контрольных преиммунных антител [<sup>35</sup>S]-меченные белки в преципитате не детектируются (Рис. 50Б, дорожки 1 и 3). Это свидетельствует в пользу того, что синтезируемый с альтернативной формы мРНК белок - действительно укороченный с N-конца белок *YB-1*.

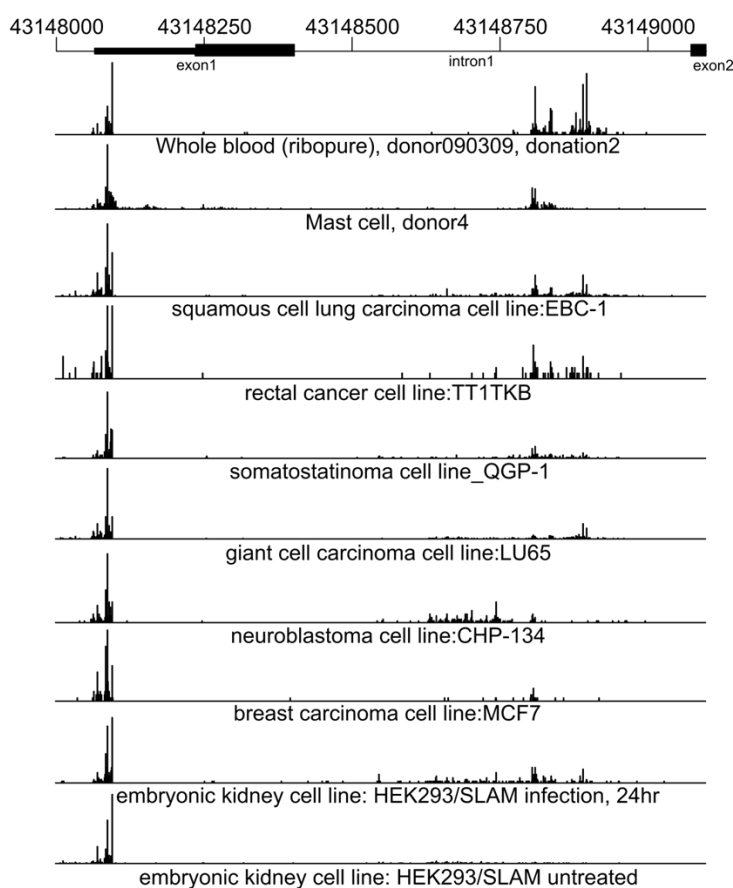
Подводя итог этой части диссертационной работы, можно сделать следующие выводы. Длина 5'НТО мРНК *YB-1* человека кролика и мыши составляет приблизительно 140 нуклеотидов. В базе данных GenBank для некоторых 5'НТО мРНК *YB-1* были указаны другие значения, например, для мРНК *YB-1* кролика (NM\_001082785.1) или мРНК *YB-1* человека (NM\_004559.3). В настоящее время для человеческой мРНК *YB-1* в базе данных GenBank находится последовательность с 5'НТО длиной 148 нуклеотидов (NM\_004559.5), что значительно ближе к длине 5'НТО основной формы мРНК *YB-1*, определенной в настоящей работе. Предположительно, мРНК с 5'НТО длиной 148 н. - это также минорная форма, которая может возникать в результате того, что область инициации транскрипции *YB-1* довольно широка [513]. Известно, что около 70% эукариотических промоторов классифицируются как «широкие» («broad»), потому что их сайты начала транскрипции (TSS) охватывают десятки нуклеотидов. Существует вероятность того, что кДНК *YB-1* (мРНК), полученная клонированием библиотеки кДНК кролика в 1995 г. [16], была укорочена, что подтверждается тем фактом, что и в одном из наших образцов из клеток НЕК293Т методом 5'RACE была обнаружена 5'НТО мРНК *YB-1* длиной 118 нуклеотидов. Нам не удалось найти 5'НТО мРНК *YB-1* длиной 331 нуклеотид, упомянутую Fukuda et al. [483], что либо ставит под сомнение существование такой протяженной 5' НТО, либо предполагает её существование только для определенных типов клеток (KB3-1 и H1299), либо, что более вероятно, такая форма мРНК *YB-1* также является минорной. Можно еще раз отметить и то, что наиболее распространенная 139 нуклеотидная 5'НТО не включает TOP-подобный мотив, обнаруженный в начале 171-нуклеотидной 5'НТО мРНК *YB-1* в работе Hsieh et al. [489].

Кроме того оказалось, что в бесклеточной системе трансляции с мРНК *YB-1*, содержащей как полноразмерную, так и укороченную 5'НТО, возможен синтез дополнительного продукта. При этом стартовым кодоном служит кодон AUC в положении -(60-58) по отношению к основному стартовому кодону. О возможности присутствия более длинных продуктов синтеза *YB-1 in vivo* говорят некоторые литературные данные. Так в статье David et al. [453] было показано, что в кардиомиоцитах мыши наряду с 50 кДа формой белка *YB-1* детектируется 60 кДа-форма. Более того, в течение постнатального развития желудочка сердца мыши количество 60 кДа-формы постепенно увеличивается и у взрослого животного преобладает. Как показано, данное изменение соотношения двух изоформ важно для регуляции экспрессии гена актина SM $\alpha$ A (smooth muscle  $\alpha$ -actin). Помимо этого, в некоторых лизатах культивируемых клеток



высокоспецифичными антителами против С-концевого пептида YB-1 можно детектировать белок с электрофоретической подвижностью, сходной с подвижностью дополнительной формы YB-1 (Рис. 43Б).

Наконец, в данной работе была обнаружена альтернативная форма мРНК *YB-1* в клетках линии HEK293T и MCF7, которая вместо первого экзона содержит часть первого интрона. Интересно, что такая мРНК может служить матрицей для синтеза белка, при этом в качестве иницирующего кодона выступает один из двух соседних триплетов AUC и GUG. В таком случае с минорной формы РНК может быть синтезирован укороченный с N-конца вариант YB-1 с 10-11-аминокислотным довеском вместо А/Р-домена. Интересно, что анализ клеточно-специфической транскрипционной активности, проведенный методами высокопроизводительного секвенирования Консорциумом FANTOM [511], показал, что интронные старты начала транскрипции (TSS) YB-1 очень активны в некоторых типах клеток, включая как раковые, так и нормальные клетки (Рис. 51). Кроме того, изоформа, транскрибируемая из интронного TSS, была включена в специально подобранную аннотацию GENCODE [470]. Предположительно, существуют механизмы, регулирующие количество альтернативного YB-1 в клетке. Однако этот вопрос требует дополнительного исследования. Так же как вопрос о возможных функциях альтернативных форм белка YB-1.



**Рисунок 51.** Область инициации транскрипции YB-1, исследованная с помощью HeliScopeCAGE (508). Показаны данные для нескольких выбранных типов клеток. Минорные TSS в интронной области гена *YBX1* проявляют видимую активность. Ось X соответствует геномным координатам со структурой гена, показанной на верхней панели. Высота столбцов пропорциональна количеству мРНК, транскрибируемых с определенного положения.

## **II. ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА БЕЛКА YB-1 НА ТРАНСКРИПТОМ И ТРАНСЛАТОМ КЛЕТОК**

На современном этапе исследования функций YB-1 можно утверждать, что этот белок участвует во множестве клеточных процессов, включая пролиферацию, дифференцировку и ответ на стрессовые воздействия. Однако вопрос о том, каким образом, на каких этапах передачи генетической информации действует YB-1, остается дискуссионным.

Участие YB-1 в процессе репликации ДНК, репарации ДНК и альтернативном сплайсинге пре-мРНК, а также внеклеточные функции YB-1, связанные с его секрецией, (сортинг миРНК, связывание с рецептором Notch) пока изучены очень слабо. Основное внимание исследователи уделяют YB-1 как транскрипционному и трансляционному фактору [514, 515].

Важным подходом к пониманию роли того или иного белка для функционирования клетки или организма являются эксперименты по выключению или повышению экспрессии соответствующего гена. Нокаут гена *YBX1* у мышей приводил к тому, что эмбрионы развиваются нормально до 13,5 дней, после чего рост эмбриона резко снижается, наблюдаются аномалии в формировании нервной трубки и пренатальная гибель животных [96]. Но при этом в мышечных эмбриональных фибробластах, полученных из YB-1<sup>-/-</sup> эмбрионов, нокаут YB-1 не приводил к серьезным изменениям в транскрипции и синтезе белка. Таким образом, возникает противоречие между этими данными и данными о YB-1 как глобальном регуляторе трансляции и транскрипции.

В этой части диссертационной работы методами высокопроизводительного планировалось выяснить изменения в транскриптоме и транслятоме клеток HEK293T, а также клеток HEK293T, в которых экспрессия YB-1 выключена с помощью системы редактирования генома CRISPR-Cas9.

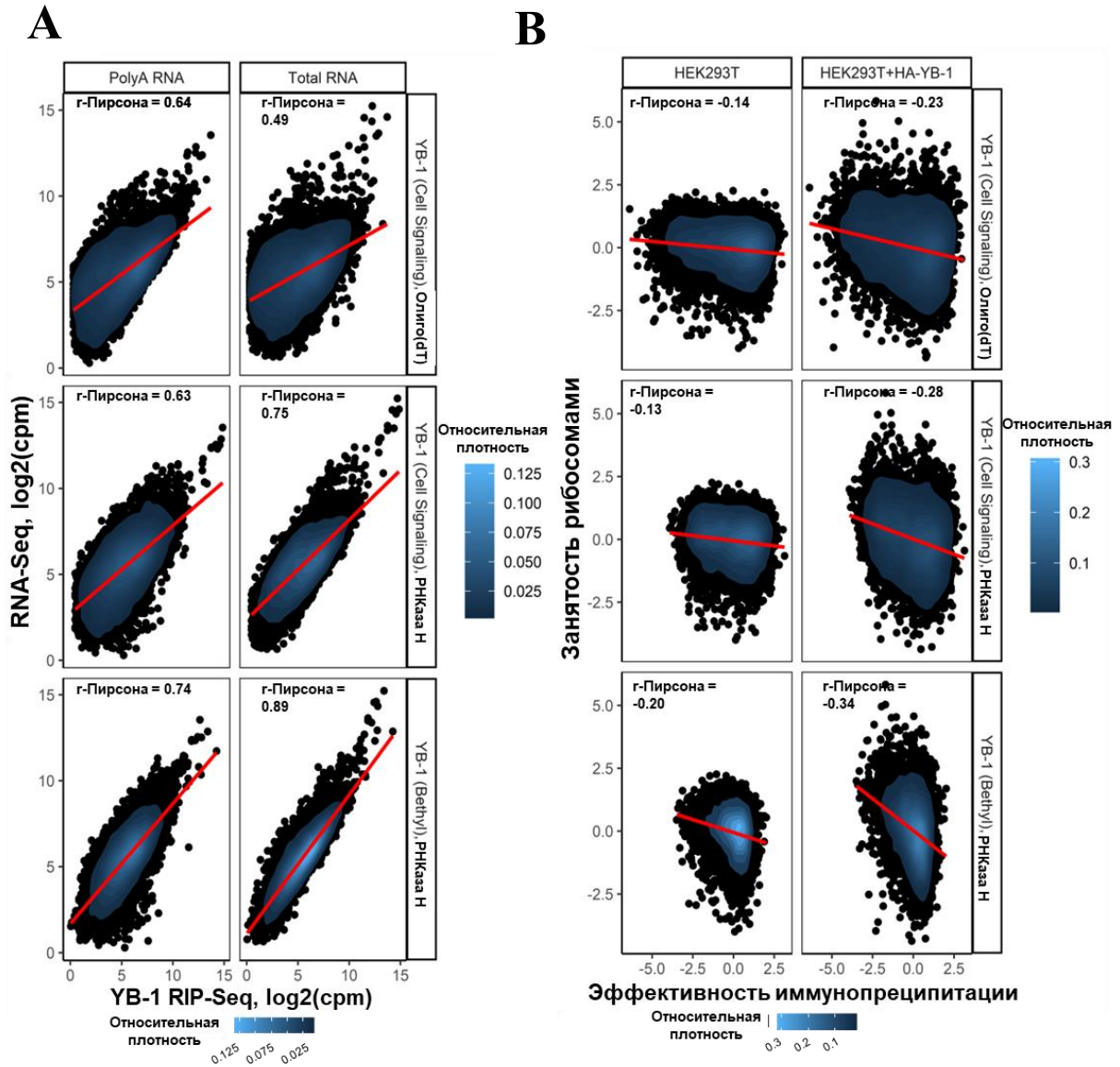
### **1. Влияние оверэкспрессии и нокаута YB-1 на транскриптом и транслятом клеток HEK293T**

#### **1.1. В клетках HEK293T YB-1 действует как ингибитор общей трансляции**

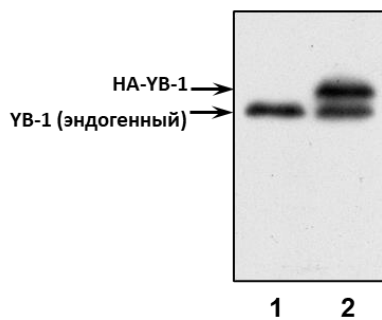
Одной из многих предполагаемых функций YB-1 является глобальный контроль трансляции. Чтобы выяснить, действительно ли это так, для клеточных мРНК были выполнены эксперименты по рибосомному профайлингу (Ribo-Seq), секвенированию РНК (RNA-Seq) и иммунопреципитации мРНК за антитела против YB-1 с последующим высокопроизводительным секвенированием (RIP-Seq) для оценки взаимосвязи между занятостью рибосомами (эффективностью трансляции) и эффективностью связывания YB-1 с

мРНК в масштабе транскриптома клеток HEK293T (подробности постановки эксперимента и терминологии см. главу «Материалы и Методы», пункты 44-47).

При сопоставимой глубине секвенирования RNA-Seq и RIP-Seq количество прочтений (reads) в них хорошо коррелирует между собой (коэффициент корреляции  $r$ -Пирсона от 0,49 до 0,89 в зависимости от антител и протокола удаления рРНК (Рис. 52А). Для более чем 80% генов экспрессируемые транскрипты обнаруживаются во фракции транскриптома, связанного с YB-1.



**Б**



**Рисунок 52. YB-1 действует в клетках HEK293T как ингибитор общей трансляции.** А. Корреляция между количеством прочтений YB-1-RIP-Seq и RNA-Seq. Эксперимент RIP-Seq проведен с двумя антителами против YB-1 (Cell Signaling (# 4202), Bethyl (# A303-230A)) и с использованием различных способов удаления рРНК (олиго(dT) – очистка от рРНК с помощью олиго(dT) (NEBNext Poly(A) (NEB)), РНКазы H – с помощью РНКазы H и олигонуклеотидов, комплементарных рРНК (NEBNext rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) (NEB)). Б. Лизаты клеток HEK293T и HEK293T, оверэкспрессирующих HA-YB-1, анализировали методом иммуноблоттинга с помощью антител против С-концевого пептида YB-1. В. Корреляция между занятостью рибосомами в клетках HEK293T (слева, ось Y) или клетках HEK293T, оверэкспрессирующих YB-1 (справа, ось Y) и эффективностью иммунопреципитации за антитела против YB-1 в клетках HEK293T (ось X). Для каждого гена занятость рибосомами оценивали в кодирующих сегментах, исключая нетранслируемые области. Цвет отражает относительную плотность точек. Показана прямая линейной регрессии и коэффициент корреляции r-Пирсона. Все r значимы (значение  $P < 10^{-15}$ ).

Таким образом, YB-1 действительно следует рассматривать как универсальный мРНК-ассоциированный белок, способный связывать очень широкий спектр РНК.

Кроме того, сравнивая занятость рибосомами (количество прочтений Ribo-Seq, нормализованное к количеству прочтений RNA-Seq) и эффективность иммунопреципитации мРНК антителами против YB-1, можно обнаружить значимую отрицательную корреляцию (r-Пирсона = от -0,13 до -0,2,  $P < 10^{-15}$ ), а при оверэкспрессии *YBX1* (Рис. 52Б) даже более сильную зависимость (r-Пирсона = от -0,23 до -0,34,  $P < 10^{-15}$ ) (Рис. 52В). Таким образом, YB-1 связывает большую часть транскриптома, и его связывание отрицательно коррелирует с эффективностью трансляции мРНК. Это согласуется с литературными данными, полученными в системе бесклеточной трансляции, где YB-1 способен служить неспецифическим ингибитором трансляции [100, 113].

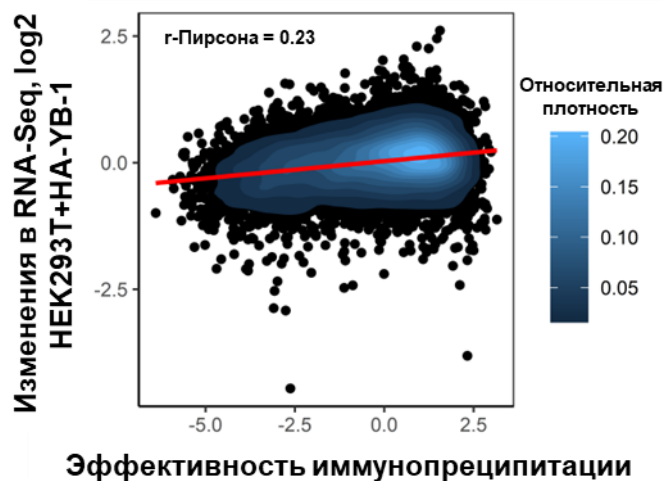
Следует подчеркнуть, что оба наблюдения согласуются с результатами RIP-Seq, полученных с помощью двух разных антител против YB-1.

## 1.2. При оверэкспрессии YB-1 транскриптом клеток HEK293T не изменяется.

Как уже говорилось, YB-1 участвует во множестве ДНК- и РНК-зависимых процессов, включая регуляцию транскрипции, трансляции и стабильности РНК [17, 514]. Участие YB-1 в регуляции транскрипции широко изучается, но остается неясным [85, 514]. Во-первых, YB-1 является преимущественно цитоплазматическим белком, который попадает в ядро только в определенных условиях, таких как ингибирование транскрипции и стресс [147, 185, 186, 516, 517], повреждающий ДНК. Во-вторых, в данных ChIP-Seq не удается выявить характерный паттерн связывания YB-1, чего можно было бы ожидать для факторов транскрипции, которые специфически распознают ДНК [84, 85].

Данные RNA-Seq, полученные в настоящей работе, также указывают на то, что YB-1 влияет на транскрипцию в небольшой степени. В частности, не обнаруживается дифференциально экспрессируемых генов (при FDR 5%) при оверэкспрессии *YBX1*. Однако,

можно отметить слабую, но значимую положительную корреляцию (Рис. 53,  $r$ -Пирсона = 0,23,  $P < 10^{-15}$ ) между эффективностью иммунопреципитации YB-1 и изменениями в RNA-Seq при гиперэкспрессии *YBX1* в HEK293T. Такая корреляция между вызванными гиперэкспрессией изменениями в содержании РНК и эффективностью иммунопреципитации косвенно намекает, что YB-1, вероятно, может контролировать стабильность РНК, но не транскрипцию РНК как таковую. Это предположение согласуется с данными о том, что YB-1 может упаковывать и стабилизировать РНК в форме нетранслируемых мРНК [92].



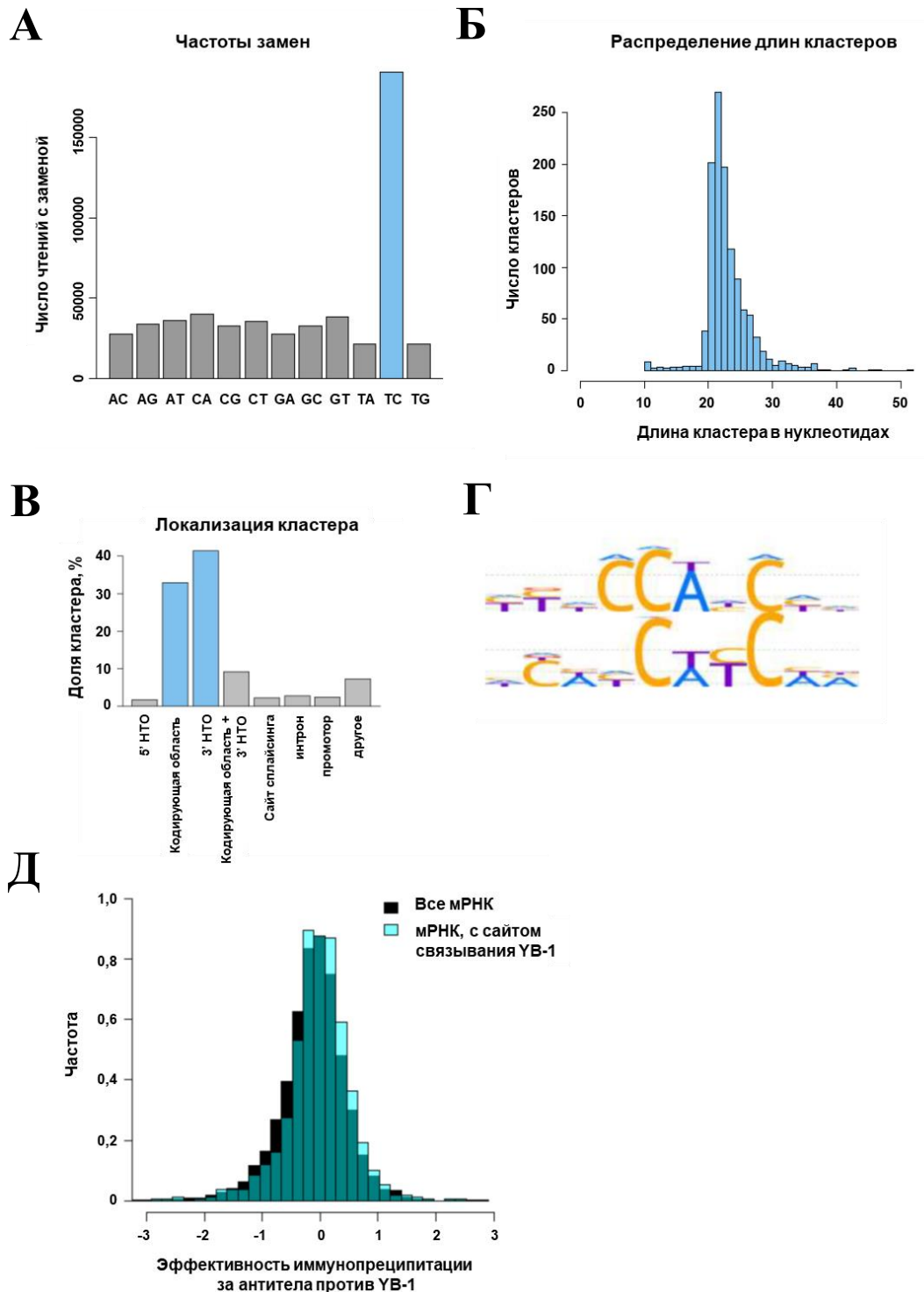
**Рисунок 53.** Корреляция между изменениями содержания РНК (в клетках HEK293T, гиперэкспрессирующих YB-1 по сравнению с исходными клетками HEK293T) и эффективностью иммунопреципитации YB-1 в HEK293T. Цвет отражает относительную плотность точек. Показана прямая линейной регрессии и коэффициент корреляции  $r$ -Пирсона.  $r$  значим (значение  $P < 10^{-15}$ ).

### 1.3. PAR-CLIP

Метод PAR-CLIP (Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation) позволяет найти консенсусную нуклеотидную последовательность РНК, с которой предпочитает связываться тот или иной белок, а также установить участки мРНК, с которыми он взаимодействует (5' нетранслируемая область (НТО) мРНК, 3'НТО мРНК или кодирующая область мРНК). Проведение такого эксперимента для YB-1 дает информацию не только о том, с какими мРНК взаимодействует YB-1 непосредственно, но и о возможном механизме влияния YB-1 на трансляцию той или иной мРНК. Метод состоит в сшивках под действием мягкого ультрафиолета клеточных белков с клеточной РНК, которая метаболитически мечена фотоактивируемыми рибонуклеозидами. После иммунопреципитации РНК-белковых комплексов антителами против YB-1 РНК-фрагменты, связанные с YB-1, выделяют и создают библиотеку для секвенирования.

Для начала необходимо было проверить качество полученных данных. В данном эксперименте как фотореактивная метка использовался тиюридин. Это означает, что после сшивки и обратной транскрипции в месте пришивки должна происходить замена уридина (тимина в финальной библиотеке ДНК) на цитозин. Как видно на рисунке 54А, замены Т на С действительно наиболее представлены в полученных данных. На рисунке 54Б показано

распределение длин кластеров. Как и ожидалось, средняя длина кластера составляет около 20-25 н., что соответствует длине мРНК, защищаемой белком YB-1 от действия РНКаз.



**Рисунок 54.** А. Количество чтений PAR-CLIP с заменами, цветом отмечена замена Т на С. Б. Распределение длин полученных кластеров прочтений. В. Локализация кластеров прочтений по типам функциональных районов генома. Г. Мотив специфического связывания YB-1, обнаруженный в 3'НТО (верх) и кодирующих областях (низ) мРНК. Д. Распределение эффективности иммунопреципитации (силы взаимодействия YB-1 с мРНК) для всех экспрессируемых мРНК (черный) и для мРНК, с которыми YB-1 взаимодействует напрямую (голубой, PAR-CLIP).

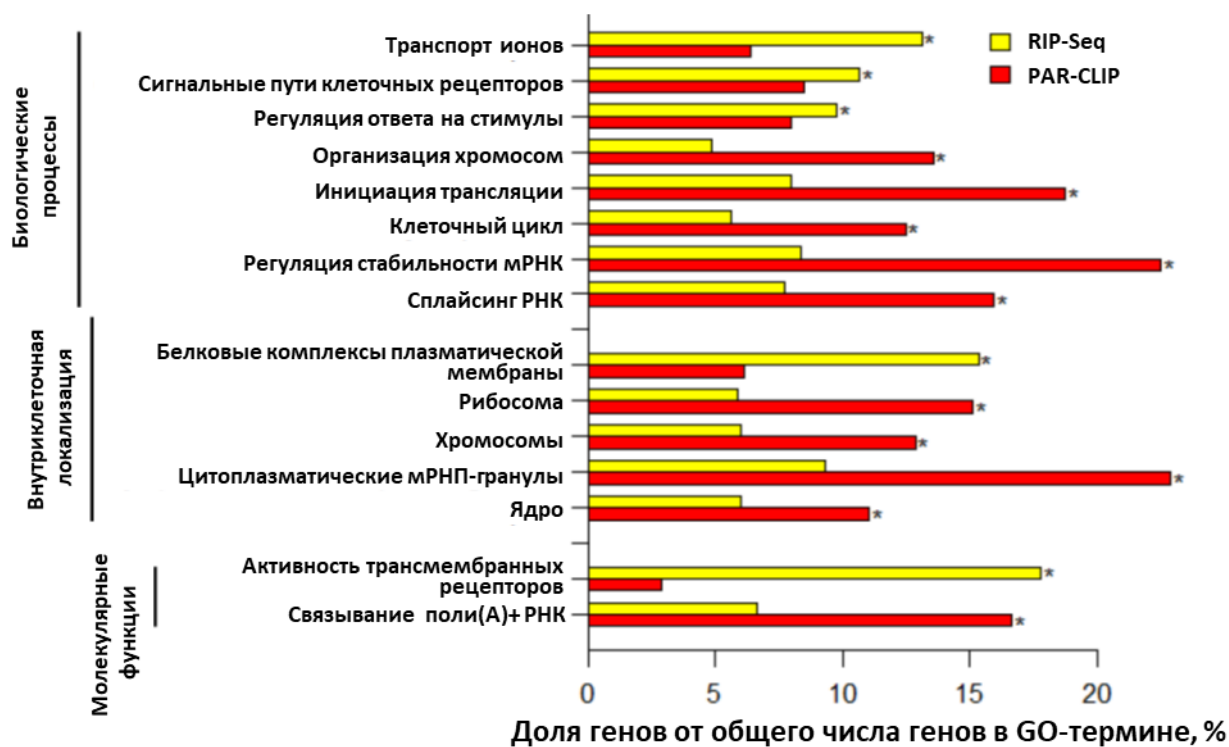
Было обнаружено около 1200 кластеров прочтений с заменами Т на С, из них 75% попадают в белок-кодирующие гены, преимущественно в кодирующую область и в 3' нетранслируемую область мРНК (Рис. 54В). Количество кластеров, попадающих в интронные области и области стыка интронов и экзонов (сайтов сплайсинга) невелико: около 2,5% и 1% соответственно.

Для определения сайта специфического связывания YB-1 была использована программа для поиска мотивов в нуклеотидных последовательностях ChIPMunk (<http://autosome.ru/ChIPMunk/>). Поиск мотива был проведен для всех последовательностей и отдельно для кластеров, локализованных в кодирующих областях и 3'НТО мРНК. Наилучший результат показал поиск мотивов в 3' нетранслируемых областях (Рис. 54Г). Найденный мотив очень похож на определенный ранее мотив связывания YB-1 в 3'НТО мРНК YB-1 (UCCAA/GCA, жирным выделены позиции, наиболее важные для взаимодействия с YB-1 [17]. Можно заметить, что мотив, который обнаруживается в кодирующих областях, похож на таковой, обнаруженный в 3'НТО. Также стоит отметить, что в обнаруженном нами мотиве не наблюдается G в позиции 7, как в одном из мотивов в мРНК YB-1, и локальный нуклеотидный состав последовательностей с фланками крайне G-бедный. По всей видимости, данные явления - это следствие использования G-щепящей РНКазы T1 в относительно высокой концентрации в классическом методе PAR-CLIP, протокол которого использовался. Подобное явление также было описано в литературе [518]. Можно предположить, что в нашем эксперименте наблюдается только подгруппа сайтов, преимущественно расположенных в G-бедных районах мРНК. Этим может объясняться как отсутствие G в мотиве, так и небольшое число кластеров, расположенных в 5'НТО, которые имеют тенденцию быть G-обогащенными.

Далее было проверено, коррелирует ли эффективность иммунопреципитации (связывания YB-1 с мРНК) с наличием сайта специфического связывания YB-1. Можно было ожидать, что в группе наиболее сильно взаимодействующих с YB-1 мРНК представлено большее число мРНК, с которыми YB-1 взаимодействует напрямую, а не в составе комплексов. Однако оказалось, что наличие сайта специфического связывания YB-1, определенного PAR-CLIP, не коррелирует с силой взаимодействия YB-1 с мРНК (Рис. 54Д). Этому может быть несколько объяснений. Например, за силу взаимодействия YB-1 с мРНК может отвечать не факт прямого связывания YB-1 с мРНК, а состав комплекса на мРНК, в который входит YB-1. Кроме того, нельзя исключить возможность связывания YB-1 с G-богатыми областями, про которые упоминалось в литературе.

На следующем этапе работы было решено посмотреть, с какими именно генами YB-1 взаимодействует напрямую. Для этого был проведен анализ генной онтологии (GO). Для сравнения была выбрана такая же по размеру группа генов, наиболее сильно

взаимодействующая с YB-1 по данным RIP-Seq в нормальных условиях и в той же клеточной линии. На рисунке 55 представлены наиболее интересные GO-термины. Видно, что группа мРНК, непосредственно взаимодействующая с YB-1, и группа мРНК, наиболее сильно иммунопреципитирующая за антитела против YB-1, значительно отличаются и по составу, (пересекается всего около 10% генов) и по функциональной принадлежности. Так, мРНК, наиболее сильно взаимодействующие с YB-1 (по данным RIP-Seq), преимущественно вовлечены в передачу клеточных сигналов и ответ на внешние стимулы, в то время как мРНК, непосредственно взаимодействующие с YB-1, вовлечены в трансляцию, сплайсинг, регуляцию стабильности мРНК, клеточного цикла и организацию хромосом.



**Рисунок 55.** Функциональная аннотация генов, непосредственно связанных с YB-1 (PAR-CLIP, красный), и генов, наиболее сильно связанных с YB-1 по данным эксперимента RIP-Seq (IP, желтый). Показана доля генов от общего числа генов в каждом GO-термине. BP – биологический процесс, CC – клеточная локализация, MF – молекулярная функция,  $P < 0.001$  (после поправки на множественное тестирование).

Таким образом, с помощью метода PAR-CLIP были определены мРНК, непосредственно связанные (сшивающиеся) с YB-1, и найдены места посадки YB-1 на этих мРНК. Справедливости ради нужно отметить, что качество полученной библиотеки было невысоким, и скорее всего она является неполной. Возможно, причина этого кроется в самом используемом методе: для сшивок используется тиоурдин, в то время как YB-1 может связываться и с G-

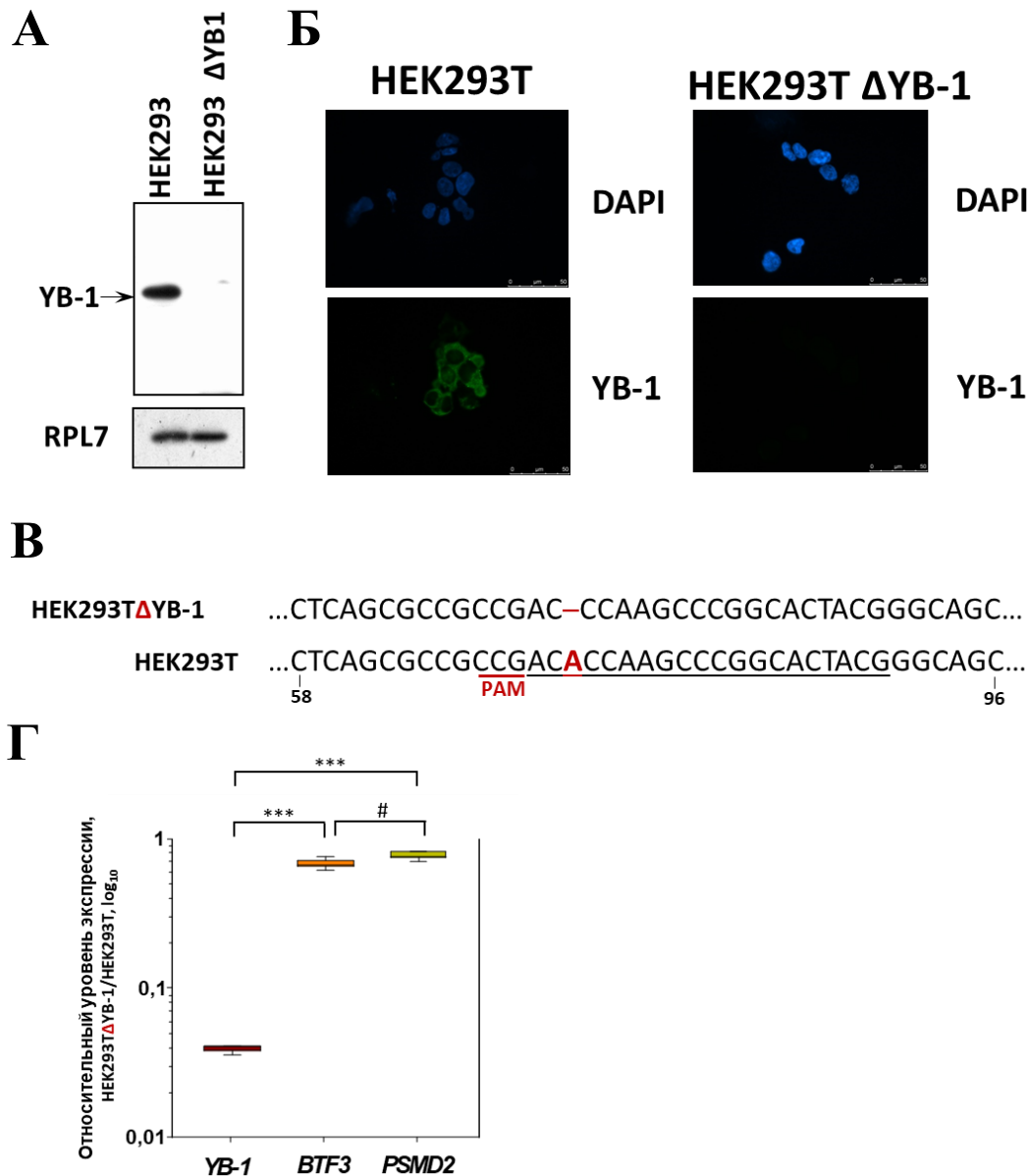


богатыми участками мРНК. Поэтому в будущем дополнительно необходимо будет использовать тиогуанидин либо применять иной метод iCLIP (и его более совершенную модификацию - eCLIP) для получения полной картины.

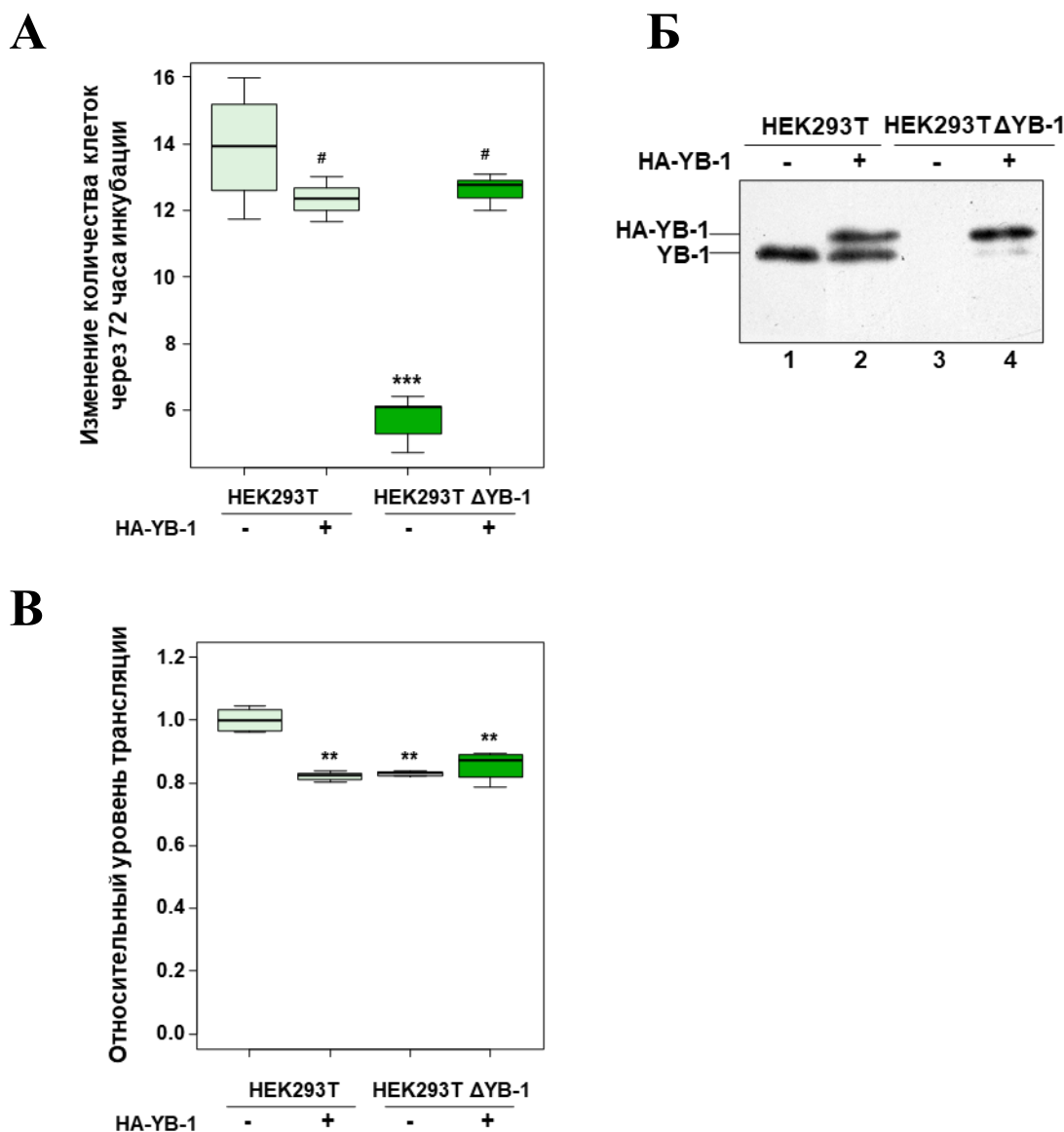
#### **1.4. Нокаут *YBX1* приводит к незначительным изменениям в транслятоме.**

Данные высокопроизводительного секвенирования показали, что YB-1 является глобальным ингибитором трансляции. С другой стороны, в работе Lu et al. [96] анализ уровня тотального белкового синтеза в эмбриональных фибробластах мыши не показал практически никаких изменений при нокауте *YBX1*. Чтобы прояснить это несоответствие, была создана клеточная линия НЕК293ТΔYB-1, в которой экспрессия гена *YBX1* была выключена с использованием системы редактирования генома CRISPR/Cas9 [457]. Отсутствие экспрессии *YBX1* было показано методом иммуноблоттинга и иммунофлюоресцентной микроскопии (Рис. 56А,Б). Секвенирование фрагмента геномной ДНК, соответствующего первому экзону гена *YBX1*, показало наличие делеции А в положении +73 от стартового кодона трансляции, которая приводит к сдвигу рамки считывания и нарушению синтеза белка YB-1 (Рис. 56В). Поскольку последующий анализ методом ОТ-ПЦР в реальном времени показал значительное падение содержания мРНК *YB-1* (Рис. 56Г), можно предположить, что данная мутация привела к активации системы деградации мРНК, содержащих преждевременный терминационный кодон (NMD, nonsense-mediated decay).

Далее были исследованы некоторые свойства клеток с нокаутом по гену *YBX1*. Во-первых, клетки НЕК293ТΔYB-1 имели более низкую скорость деления (Рис. 57А), что согласуется с предыдущими наблюдениями о том, что уменьшение количества YB-1 приводит к снижению скорости деления клеток [55, 286]. Синтез экзогенного НА-YB-1 в клетках НЕК293ТΔYB-1 (Рис. 57Б) восстанавливает скорость деления до нормального уровня клеток НЕК293Т (Рис. 57А). Таким образом, пониженная скорость деления клеток НЕК293ТΔYB-1 действительно вызвана отсутствием YB-1, и полученные клетки НЕК293ТΔYB-1 представляют собой вполне адекватную модель для изучения нокаута гена *YBX1*.



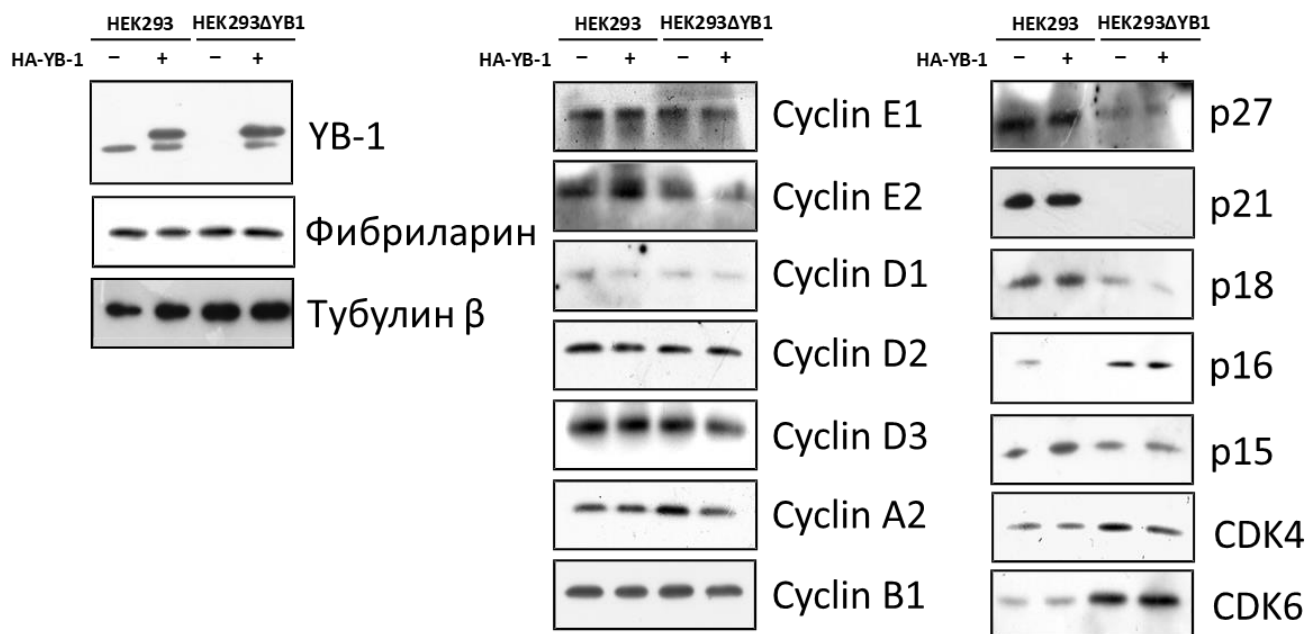
**Рисунок 56.** Получение клеточной линии HEK293TΔYB-1. **А.** Анализ лизатов клеток HEK293T и HEK293TΔYB-1 методом иммуноблоттинга; RPL7, рибосомный белок L7 (внутренний контроль). **Б.** Изображения клеток HEK293T и HEK293TΔYB-1, полученные методом иммунофлюоресцентной микроскопии с использованием антител против С-концевого пептида YB-1. Краситель DAPI окрашивает ядра. **В.** Опосредованная CRISPR/Cas9 мутация гена *YBX1* с использованием гидовой РНК, комплементарной экзону 1 гена *YBX1*. Черная линия указывает целевую последовательность гРНК в гене *YBX1*. Наличие мутации в гене *YBX1* было доказано секвенированием соответствующего сегмента геномной ДНК клеток HEK293TΔYB-1 и HEK293T. **Г.** Изменения количества мРНК *YB-1*, *BTF3* (контроль) и *PSMD2* (контроль) в клетках HEK293TΔYB-1 определены с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени. Ошибки – стандартное отклонение. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний t-критерий Стьюдента; \*\*\* -  $p < 0,001$ , # - недостоверно.



**Рисунок 57. Нокаут *YBX1* приводит к снижению клеточной пролиферации и слабому подавлению глобальной трансляции.** **А.** Изменение количества клеток HEK293T и HEK293TΔYB-1 через 72 ч культивирования. Равное количество клеток HEK293T и HEK293TΔYB-1 через 24 часа после трансфекции плазмидами pcDNA3-NA или pcDNA3-NA-YB-1 высевали на чашки и контролировали рост клеточной культуры путем подсчета клеток в течение 72 часов. Данные представляют три независимых эксперимента. **Б.** Изменения количества YB-1 в клетках HEK293T и HEK293TΔYB-1 после трансфекции плазмидами pcDNA3-NA или pcDNA3-NA-YB-1, выявленные методом иммуноблоттинга. **В.** Общий уровень трансляции в клетках HEK293T и HEK293TΔYB-1, трансфицированных плазмидами pcDNA3-NA или pcDNA3-NA-YB-1 (HA-YB-1), оценивали по включению азидогомоаланина. Значения рассчитывали следующим образом: для каждой биологической повторности значения нормализовали к среднему значению конкретной повторности; полученные значения затем нормализовали по экспериментам к среднему значению клеток HEK293T, трансфицированных плазмидой pcDNA3-NA. Ошибки – стандартное отклонение. Для оценки статистической значимости по сравнению с клетками HEK293T, трансфицированными плазмидой pcDNA3-NA, использовали двусторонний t-критерий Стьюдента. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , # – не значимо.

Из нескольких публикаций известно, что для клеток, в которых выключался синтез YB-1 (в основном с помощью siRNA) [96, 286, 519, 520], наиболее характерным является снижение количества циклина D1 и возрастание количества p16/INK4 (ингибитора циклин-зависимой

киназы 4, CDKN2A), и как следствие, снижение скорости деления клеток. В случае полученных в настоящей работе клеток наблюдается только увеличение количества p16/INK4 и никаких изменений в количестве циклина D1 (Рис. 58). Кроме того, можно говорить об увеличении количества циклина A2, циклин-зависимых киназ 4 и 6 и об уменьшении количества ингибиторов CDK- p18, p21 и p27. Таким образом, наблюдается некоторое изменение в соотношении нескольких регуляторов клеточного цикла, что, вероятно, объясняет замедленное деление клеток НЕК293ТΔYB-1.

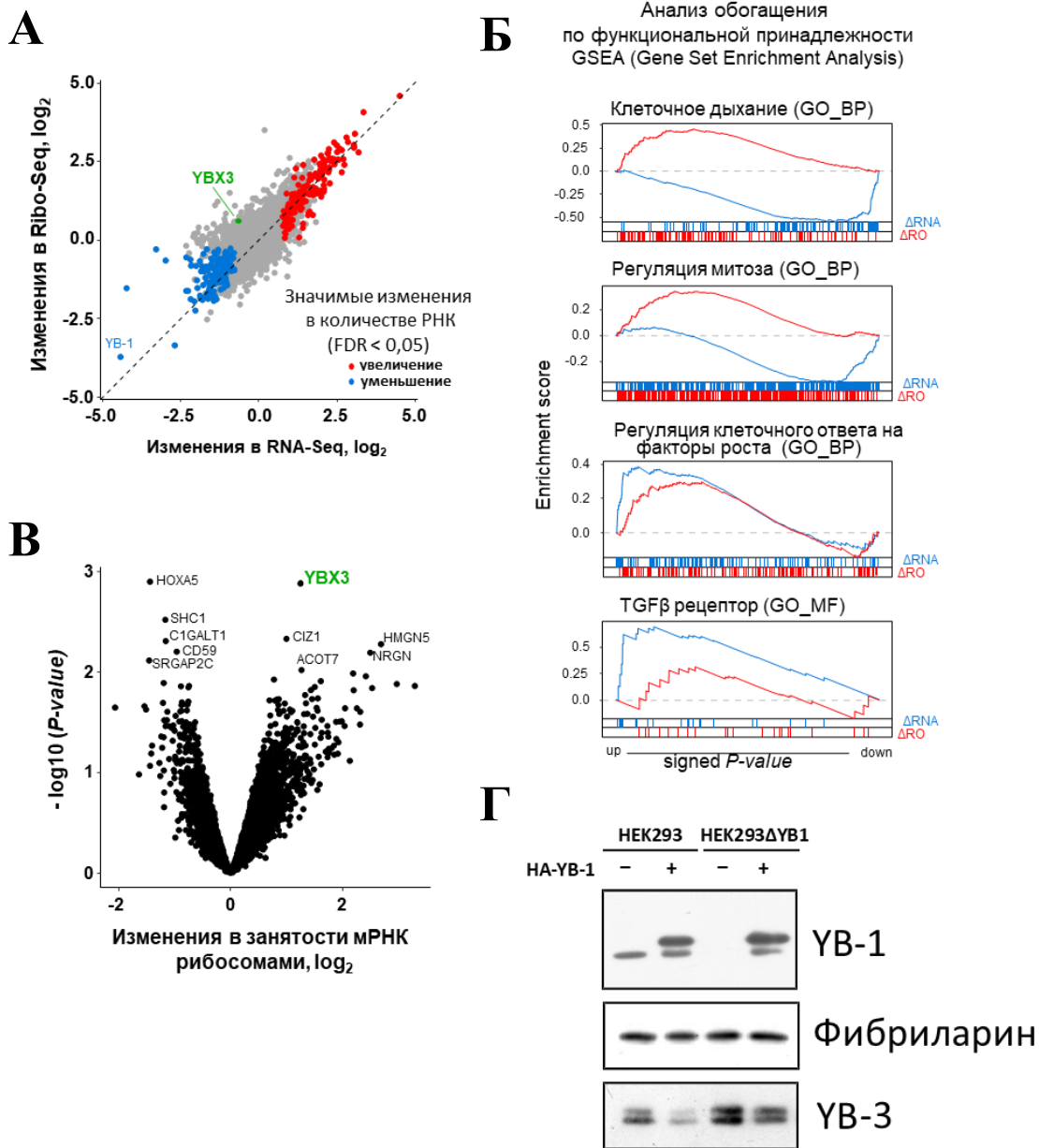


**Рисунок 58.** Анализ лизатов клеток НЕК293Т и НЕК293ТΔYB-1, экспрессирующих и не экспрессирующих НА-YB-1 с плазмиды, на количество некоторых белков-регуляторов клеточного цикла методом иммуноблоттинга. Фибрилларин и тубулин β использовались в качестве контроля.

Во-вторых, было исследовано влияние нокаута *YBX1* на уровень общей трансляции в клетках НЕК293Т методом метаболического мечения белков аналогом метионина - азидогомоаланином (Рис. 57В). Уровень общей трансляции в расчете на клетку в случае нокаута *YBX1* снижается лишь незначительно, примерно на 15% (аналогично тому, что наблюдается у Lu et al. [96]). Экспрессия НА-YB-1 в клетках НЕК293ТΔYB-1 повышала уровень трансляции, но только на 5-10% (статистически незначимо). Если рассматривать YB-1 как глобальный ингибитор трансляции, снижение уровня общей трансляции при нокауте *YBX1* интуитивно противоречиво. Данное наблюдение предполагает наличие некоего сильного компенсаторного механизма, который будет обсуждаться ниже.

При незначительном влиянии нокаута гена *YBX1* на глобальную трансляцию можно ожидать более выраженного изменения трансляции в НЕК293ТΔYB-1 для конкретных мРНК, чья трансляция сильно зависит от YB-1. Для того, чтобы это выяснить, был проведен

эксперимент по рибосомному профайлингу клеток НЕК293ТΔYB-1, а его результаты сравнили с аналогичным экспериментом на клетках НЕК293Т. (Верификация данных Ribo-Seq и RNA-Seq представлены в разделе 1 Приложения.)



**Рисунок 59. Нокаут гена *YBX1* приводит к небольшим изменениям в транскрипте и трансляции. А.** Диаграмма рассеяния изменений количества футпринтов рибосом (Ribo-Seq), построенная в зависимости от содержания РНК (RNA-Seq) в клетках НЕК293ТΔYB-1 по сравнению с клетками НЕК293Т. Гены со значительно измененным содержанием РНК (значения  $P$  с поправкой на множественное тестирование  $<0,05$ ) выделены красным (повышенная регуляция) или синим (пониженная регуляция). **Б.** Анализ обогащения набора генов (GSEA), изменений содержания РНК (синяя линия) или занятости рибосомами (красная линия). Гены были отсортированы по  $P$ -значению слева направо в соответствии с изменениями содержания РНК ( $\Delta$ RNA, синяя линия) или занятости рибосомами ( $\Delta$ RO, красная линия) в НЕК293ТΔYB-1 по сравнению с НЕК293Т. Вертикальные полосы указывают расположение генов из определенной группы генов в отсортированном списке. **В.** Volcano-диаграмма изменений занятости рибосомами в клетках НЕК293ТΔYB-1 по сравнению с НЕК293Т; *YBX3* выделен зеленым цветом. Гены с значением  $P < 0,01$  помечены. **Г.** Анализ лизатов клеток НЕК293Т и НЕК293ТΔYB-1, экспрессирующих и не экспрессирующих НА-YB-1 с плазмиды, на количество YB-3 методом иммуноблоттинга. Фибрилларин использовался в качестве контроля.

На рисунке 59А представлена корреляция между изменениями Ribo-Seq и изменениями в RNA-Seq ( $r$ -Пирсона = 0,76,  $P < 10^{-15}$ ) в клетках НЕК293ТΔУВ-1. Как видно, она очень сильна, что говорит о том, что в большинстве случаев изменения в занятости рибосомами в клетках НЕК293ТΔУВ-1 обусловлены изменениями в количестве мРНК, а не её транскрируемости. Дальнейший дифференциальный анализ занятости рибосомами, направленный на выявление изменений трансляции отдельных транскриптов, не выявил статистически значимых генов после поправки на множественное тестирование. Однако анализ обогащения набора генов к ранжированным спискам генов позволил обнаружить несколько функциональных групп РНК с повышенной занятостью рибосомами в клетках НЕК293ТΔУВ-1. В частности, увеличение уровня трансляции было обнаружено для мРНК, связанных с клеточным циклом и клеточным дыханием, что компенсировало снижение количества мРНК (Рис. 59Б). Такая картина была типична для других важных терминов геномной онтологии и функциональных групп.

Однако можно было заметить и иную картину: гены, вовлеченные в ответ клетки на стимуляцию факторами роста, в частности TGF- $\beta$ , активируются на уровне транскрипции и немного на уровне трансляции. Это представляет особый интерес, поскольку известно, что УВ-1 действует как антагонист в передаче сигналов TGF- $\beta$  до некоторой степени [521, 522], и более того, УВ-1 и TGF- $\beta$  противодействуют друг другу [391, 523]:

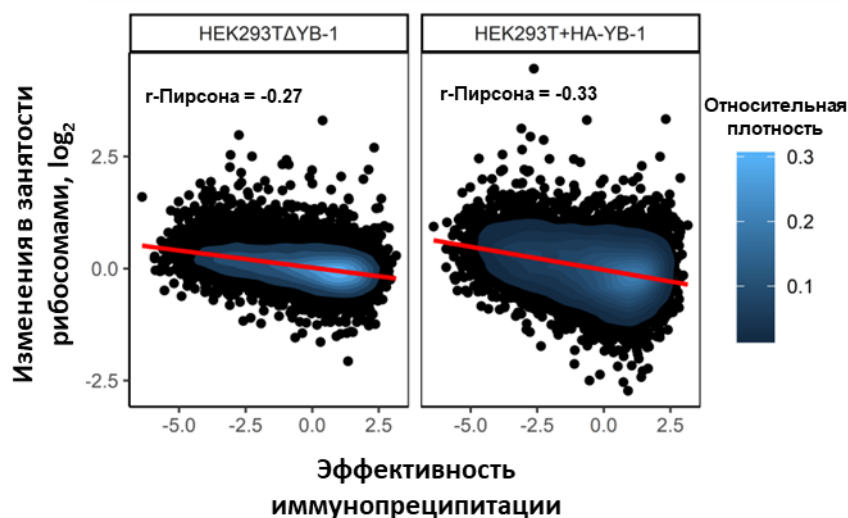
Таким образом, не было обнаружено генов с значимыми изменениями на уровне трансляции, но было обнаружено несколько значимых функциональных групп генов, которые демонстрировали небольшие, но согласованные изменения. Это свидетельствует об активном компенсаторном механизме, активированном в отсутствие УВ-1.

Хотя никакие мРНК не показали статистически значимых изменений уровня трансляции в клетках НЕК293ТΔУВ-1, было замечено несколько так называемых выбросов на диаграмме Volcano (диаграмма зависимости статистической значимости от амплитуды изменения) (Рис. 59В), из которых особое внимание на себя обращает ген *УВХ3*, который показал наиболее значимое повышение уровня трансляции мРНК. В пользу этого говорит и повышение количества белка УВ-3 в клетках НЕК293ТΔУВ-1 (Рис. 59Г). УВ-3 является гомологом УВ-1 и, не исключено, может иметь перекрывающиеся функции с УВ-1.

## 2. УВ-3 заменяет УВ-1 в клетках НЕК293ТΔУВ-1 при связывании мРНК

В клетках, нокаутных по гену *УВХ1*, можно было ожидать повышенного уровня трансляции мРНК с высокой эффективностью связывания УВ-1 и пониженного уровня для других транскриптов. Однако наблюдался противоположный эффект, аналогичный эффекту, наблюдаемому в клетках при оверэкспрессии УВ-1 (Рис. 60), то есть отрицательная корреляция между эффективностью связывания УВ-1 и дифференциальной занятостью рибосомами. Было

предположено, что данное противоречие возникает из-за сверхэкспрессии гомолога YB-1 – белка YB-3, в клетках HEK293TΔYB-1.

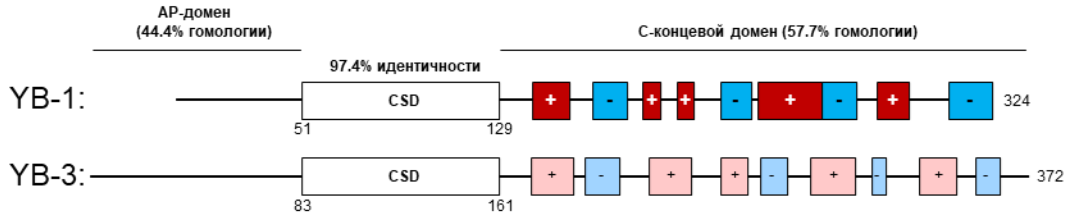


**Рисунок 60.** Корреляция между изменениями занятости рибосомами в клетках HEK293TΔYB-1 (слева) или клетках HEK293T, сверхэкспрессирующих YB-1 (справа) и эффективностью иммунопреципитации за антитела против YB-1 (по данным, полученным на клетках HEK293T). Цвет отражает относительную плотность точек. Показана прямая линейной регрессии и коэффициент корреляции  $r$ -Пирсона.  $r$  значим (значение  $P < 10^{-15}$ ).

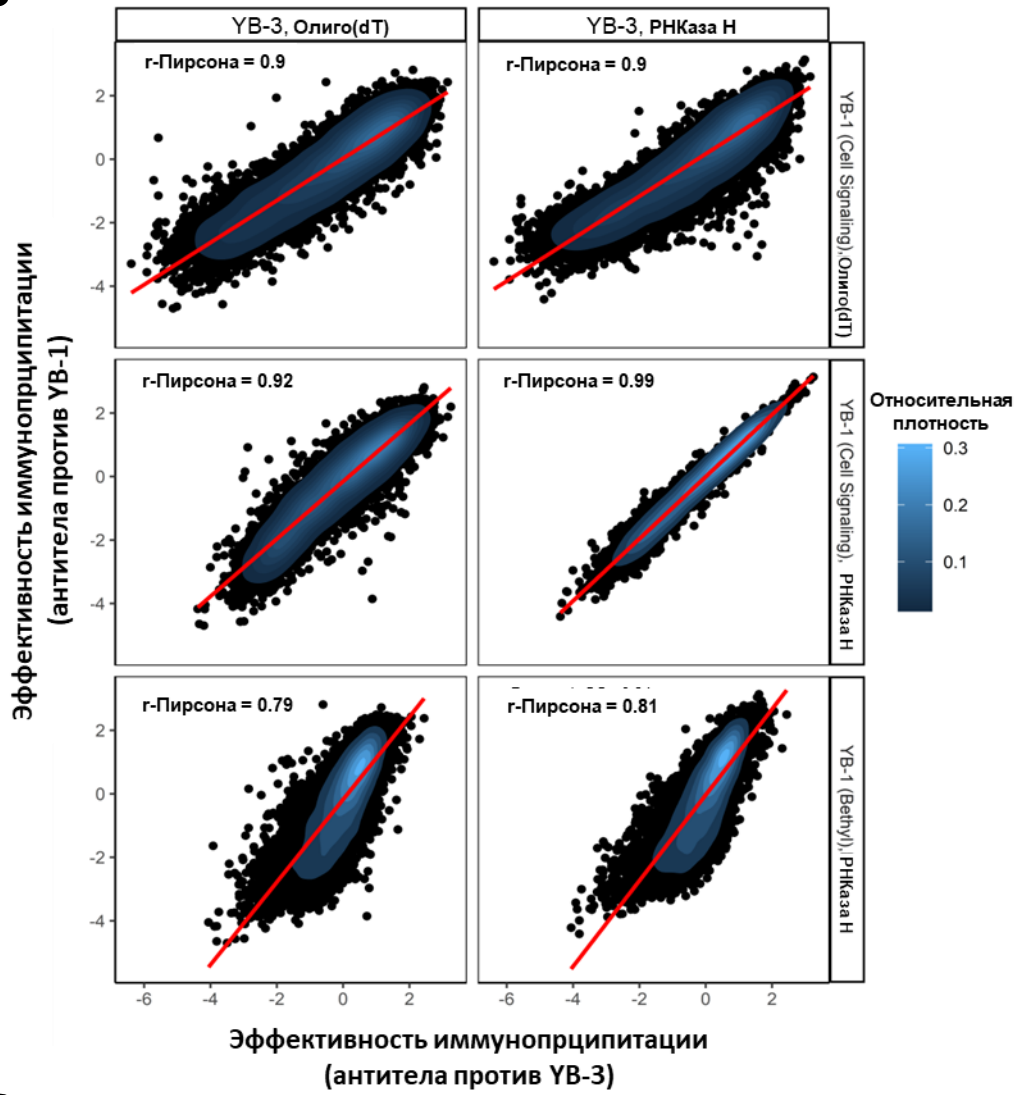
Белки YB-1 и YB-3 высокогомологичны (Рис. 61А): они имеют почти идентичные домены холодного шока, неупорядоченные N- и C-концы с аналогичным аминокислотным составом и аналогичное распределение заряженных аминокислотных остатков в C-концевой домен [17, 18]. Специфическое сродство YB-1 к мРНК, как полагают, определяется доменом холодного шока [20, 35], и можно ожидать аналогичного набора мРНК, связанных с YB-1 и YB-3, а также сходства функций этих белков. В том числе, способности YB-3 участвовать в регуляции трансляции мРНК.

Для проверки этого предположения, в первую очередь, была проведена иммунопреципитация мРНК из клеток HEK293T и HEK293TΔYB-1 с помощью антител против YB-3, а мРНК из иммунопреципитата секвенирована. Действительно, оказалось, что YB-1 и YB-3 имеют очень сходный набор мРНК, с которыми они связываются (Рис. 61Б). RIP-Seq YB-3 обнаруживает около 80% транскрибируемых мРНК, при этом эффективность иммунопреципитации YB-3 сильно и положительно коррелирует с эффективностью иммунопреципитации YB-1 ( $r$ -Пирсона = 0,9,  $P < 10^{-15}$ ). Интересно, что эффективность связывания YB-3 глобально увеличивается в клетках HEK293TΔYB-1 по сравнению с исходными клетками HEK293T (Рис. 61В).

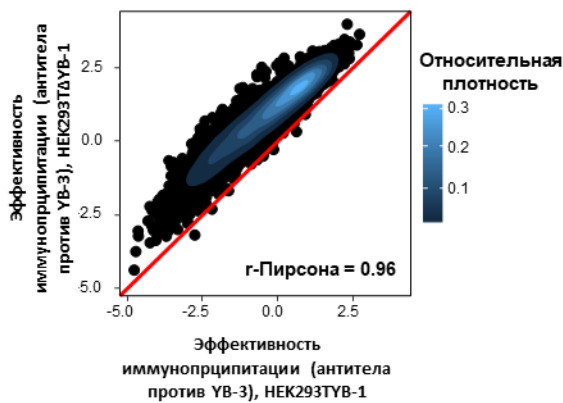
**А**



**Б**



**В**



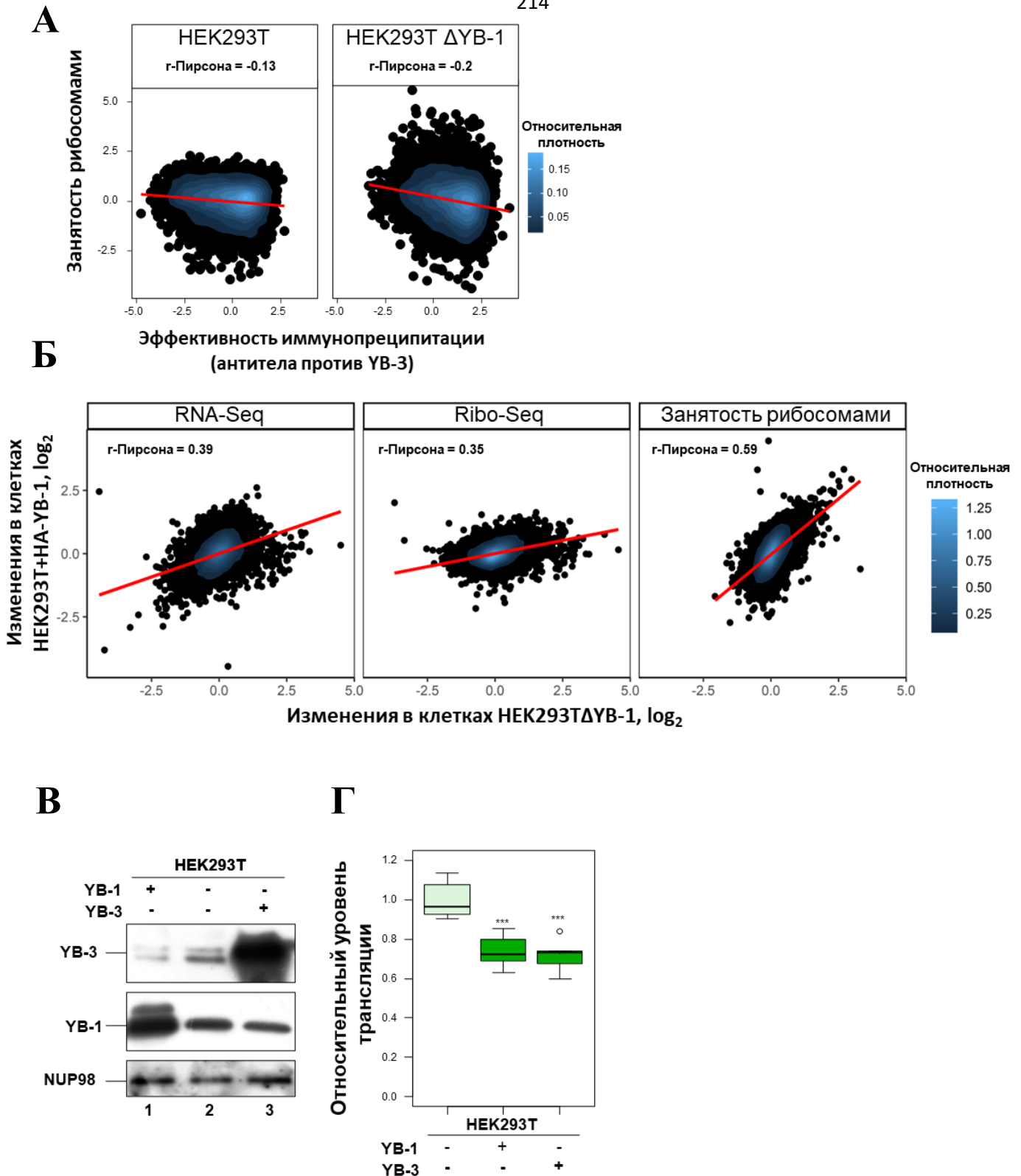


**Рисунок 61. YB-3 заменяет YB-1 в связывании с мРНК в клетках НЕК293ТΔYB-1.** А. Доменная организация Y-бокс-связывающих белков 1 и 3. Показаны относительные положения кластеров положительно- (красный) и отрицательно- (синий) заряженных аминокислотных остатков. AP-домен: домен, богатый аланином/пролином, CDS: домен холодового шока. Б. Корреляция между эффективностью иммунопреципитации РНК за антитела против YB-3 и YB-1 в клетках НЕК293Т. Эксперимент RIP-Seq проведен с двумя антителами против YB-1 и с использованием различных способов удаления рРНК (олиго(dT) – очистка от рРНК с помощью олиго(dT), РНКазы H – с помощью РНКазы H и олигонуклеотидов, комплементарных рРНК). Цвет отражает относительную плотность точек. Показана прямая линейной регрессии и коэффициент корреляции r-Пирсона. r значимы (значение  $P < 10^{-15}$ ). В. Корреляция между эффективностью иммунопреципитации РНК за антитела против YB-3 в клетках НЕК293Т и НЕК293ТΔYB-1. Цвет отражает относительную плотность точек. Показана прямая линейной регрессии, коэффициент корреляции r-Пирсона и эталонная диагональная линия ( $y = x$ ). r значимы (значение  $P < 10^{-15}$ ).

Во-вторых, сравнение занятости рибосомами и эффективности иммунопреципитации YB-3 (Рис. 62А правая панель) показало ту же картину, что и в случае YB-1 – отрицательную корреляцию. Интересно, что в клетках НЕК293ТΔYB-1 отрицательная корреляция между эффективностью иммунопреципитации YB-3 и занятостью рибосомами была даже сильнее, чем в случае клеток с YB-1 (Рис. 62А). Это означает, что YB-3, также как и YB-1, может являться ингибитором трансляции.

Важно также и то, что была обнаружена значительная положительная корреляция при сравнении изменений RNA-Seq и Ribo-Seq при оверэкспрессии *YBX1* и нокауте *YBX1*, оцениваемых относительно НЕК293Т (r-Пирсона = 0,39 и 0,35,  $P < 10^{-15}$ ) (Рис. 62Б). Корреляция еще выше для изменений занятости рибосомами (r-Пирсона = 0,59,  $P < 10^{-15}$ ) (Рис. 62Б). Эти данные указывают на то, что клетки с нокаутом по гену *YBX1* имеют молекулярный фенотип, сходный с фенотипом клеток, оверэкспрессирующих YB-1. Вероятно, в отсутствие регуляции синтеза YB-3 белком YB-1 в клетках НЕК293ТΔYB-1 достигается избыточная экспрессия *YBX3*, что может быть причиной глобального снижения трансляции в клетках НЕК293ТΔYB-1.

Чтобы подтвердить это предположение, в клетках НЕК293Т был оверэкспрессирован с плазмиды ген *YBX3*. Оказалось, что это приводит к общему снижению белкового синтеза примерно в той же степени, что и оверэкспрессия YB-1 (Рис. 62В,Г).



**Рисунок 62. YB-3, как и YB-1, является ингибитором общей трансляции.** А. Корреляция между занятостью рибосомами (ось Y) и эффективностью иммунопреципитации мРНК за антитела против YB-3 в клетках HEK293T (слева) и HEK293T $\Delta$ YB-1 (справа). Для каждого гена оценивалась занятость рибосомами в кодирующих областях (т.е. исключая НТО). Цвет отражает относительную плотность точек. Показана прямая линейной регрессии и коэффициент корреляции  $r$ -Пирсона.  $r$  значим (значение  $P < 10^{-15}$ ). Б. Корреляция изменений (относительно клеток HEK293T) содержания РНК (RNA-Seq, слева), количества футпринтов рибосом (Ribo-Seq, в центре) или занятости рибосомами (справа) между клетками HEK293T $\Delta$ YB-1 и YB-1- HEK293T+HA-YB-1. Цвет отражает относительную плотность точек. Показана прямая линейной регрессии и коэффициент корреляции  $r$ -Пирсона.  $r$  значим (значение  $P < 10^{-15}$ ).

<sup>15</sup>). В. Изменения в количестве YB-1 и YB-3 в клетках HEK293T после оверэкспрессии *YBX1* или *YBX3* с плазмиды, проанализированные методом иммуноблоттинга. NUP98 использовали в качестве контроля на нагрузку. Г. Общий уровень трансляции в клетках HEK293T, трансфицированных либо пустым вектором pcDNA3.1-puro, либо pcDNA3.1-puro-YB-1 (YB-1), либо pcDNA3.1-puro-YB-3 (YB-3), определенный по включению азидогомоаланина. Ошибки – стандартное отклонение. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний t-критерий Стьюдента. \*\*\* $p < 0,001$ .

Необходимо подвести некоторые итоги по этой части работы. Y-бокс-связывающие белки различных организмов были первоначально признаны основными белками мРНК, которые упаковывают и защищают мРНК [14, 16]. Позже были идентифицированы несколько мРНК, специфически связывающихся с YB-1 (см. ссылки в 1). С тех пор степень специфичности связывания YB-1 с РНК и набор его мРНК-мишеней в клетке являются предметом дискуссий. Некоторые исследования показали, что только 15-20% всех мРНК связаны с YB-1 [72, 524]. Однако более свежие данные, такие как iCLIP в клетках глиобластомы [73], подтверждают сайты связывания YB-1 в мРНК почти 15 тысяч генов, что сопоставимо с разнообразием мРНК всего транскриптома. Следует отметить, что специфические сайты связывания YB-1 были обнаружены только в 17% областей связывания [73], что позволяет предположить наличие большого вклада неспецифического связывания во взаимодействие YB-1 с мРНК.

В настоящем исследовании с использованием двух разных антител удалось показать, что YB-1 связывает около 80% транскриптома, и такой же широкий спектр мРНК может связываться с YB-3. Принимая во внимание сильную положительную корреляцию между RIP-Seq и RNA-Seq, можно предположить, что Y-бокс-связывающие белки связывают большинство РНК неспецифическим образом, вероятно с участием не прямых взаимодействий, которым способствуют другие РНК-связывающие белки. Последнее утверждение подтверждается PAR-CLIP экспериментом, проведенным в данной работе: наличие сайта специфического связывания YB-1, определенного PAR-CLIP, не коррелирует с силой взаимодействия YB-1 с мРНК.

YB-1 играет двойную роль в трансляции мРНК. При высоком соотношении YB-1 к РНК YB-1 ингибирует трансляцию либо за счет конкуренции с eIF4F и PABP [100, 115], либо за счет упаковки мРНК в свободные мРНК [38, 113]. При низком соотношении YB-1 к РНК, YB-1 стимулирует трансляцию, вероятно смещая факторы инициации трансляции в сторону 5'UTR [37, 113] или участвуя в плавлении вторичной структуры РНК [70]. В настоящем исследовании была обнаружена значительная отрицательная корреляция между занятостью рибосомами и эффективностью иммунопреципитации YB-1, которая становится еще более заметна в клетках с оверэкспрессией YB-1. Таким образом, можно говорить о том, что для большинства транскриптов YB-1 служит неспецифическим ингибитором трансляции в клетках HEK293T.

В клетках, нокаутных по гену *YBX1*, можно было ожидать повышенного уровня трансляции мРНК с высокой эффективностью связывания YB-1 и пониженного уровня для других транскриптов. Однако наблюдался противоположный эффект, аналогичный эффекту, наблюдаемому в клетках при оверэкспрессии YB-1, то есть отрицательная корреляция между эффективностью связывания YB-1 и дифференциальной занятостью рибосомами. Это кажущееся противоречие можно объяснить тем, что YB-3, гомолог YB-1, может являться частичным функциональным заменителем YB-1. Известно, что YB-3, наряду с YB-2 - другим гомологом YB-1, необходим для репрессии трансляции сотен мРНК в семенниках мышей [74]. Однако ничего не известно об участии YB-3 в регуляции трансляции в соматических клетках. В этом исследовании было обнаружено, что YB-3 специфически оверэкспрессируется в клетках с нокаутом *YBX1*. В свою очередь, повышенное количество YB-3 может быть причиной ингибирования трансляции мРНК-мишеней YB-1, которые вместо YB-1 были связаны YB-3.

В пользу концепции функциональной взаимозаменяемости YB-1 и YB-3 свидетельствуют следующие факты:

1. YB-1 и YB-3 имеют идентичные домены холодного шока (CSD), а также структурно схожие N- и C-концы [17]. Как для YB-1, так и для YB-3 показано, что киназы AKT и RSK фосфорилируют CSD по одному и тому же аминокислотному остатку (Ser102 для YB-1 и Ser134 для YB-3) [434]. Считается, что CSDs Y-бокс-связывающих белков ответственны за специфическое связывание РНК [20, 35], что позволяет предположить, что YB-1 и YB-3 связывают аналогичные наборы мишеней мРНК. Как показала данная работа, это действительно так, а кроме того, связывание YB-3 более выражено в отсутствие YB-1.

2. Эксперименты с мышами, в которых нокаутированы *YBX1* и *YBX3*, косвенно демонстрируют их частичную функциональную взаимозаменяемость [96, 97]. У нокаутных по гену *YBX3* мышей не было других патологий, кроме отсутствия фертильности, в то время как двойные мутантные эмбрионы (*YBX1*<sup>-/-</sup> и *YBX3*<sup>-/-</sup>) имели серьезные патологии и умирали раньше (8,5-11,5 суток), чем эмбрионы *YBX1*<sup>-/-</sup> (серьезные нарушения через 13,5 суток и перинатальная смерть). Таким образом, YB-3, по-видимому, способен функционально заменять YB-1 на ранних стадиях развития эмбриона, хотя более поздние стадии требуют функций YB-1, которые не полностью выполняются его паралогом.

Правомерен вопрос о способности белка YB-2 выполнять некоторые функции YB-1 или YB-3. Однако, мРНК *YB-2* экспрессируется исключительно в половых клетках и в некоторых клеточных культурах, но не в использованных клетках НЕК293Т. Поэтому можно утверждать, что в клетках НЕК293Т YB-2 не вовлечен во взаимозаменяемость YB-1 и YB-3.

Интересен пример перекликающихся функций YB-1 и YB-3, касающийся регуляции экспрессии гена циклина D1, вероятно на уровне транскрипции. Характерным проявлением

частичного подавления экспрессии YB-1 при помощи siRNA является снижение количества мРНК и белка циклина D1. Однако в случае полного выключения экспрессии YB-1 с помощью CRISPR/Cas9 этого не наблюдается (Рис. 58), и даже наоборот, количество мРНК *CCND1* возрастает. Однако это можно объяснить тем, что YB-3, также как и YB-1, является положительным регулятором синтеза циклина D1 [447] и берет эту функцию на себя. Следует отметить, что, вероятно, частичное подавление экспрессии YB-1 с помощью siRNA еще не приводит к активации синтеза YB-3, поскольку того количества YB-1, что еще синтезируется, достаточно для ингибирования синтеза YB-3. По крайней мере, в наших пробных экспериментах с использованием siRNA против мРНК *YB-1* не наблюдалось увеличение количества YB-3 на фоне примерно двукратного снижения количества YB-1 (данные не приводятся).

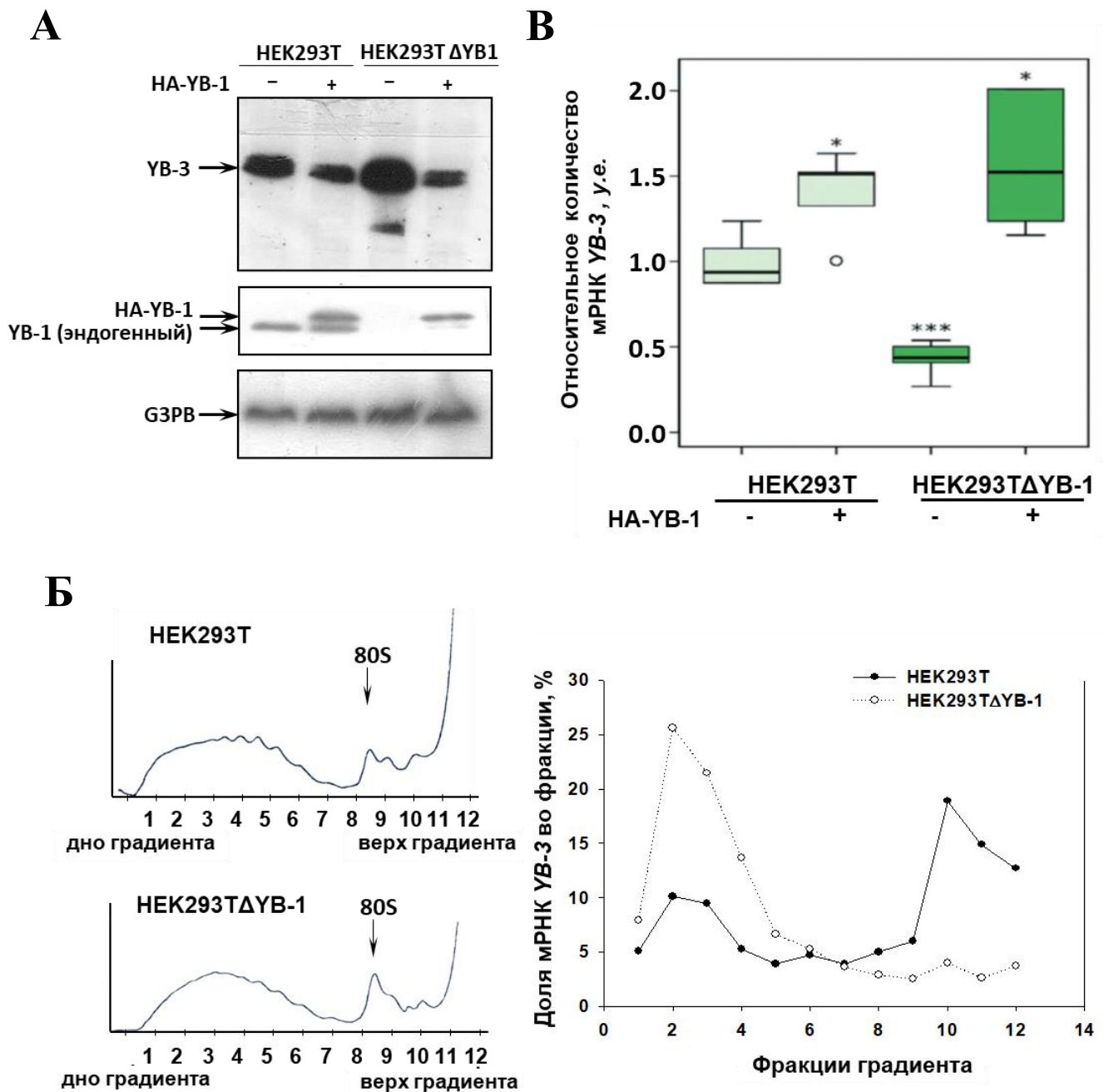
Среди множества функций YB-1 есть функции, характерные только для YB-1 и не выполняемые YB-3. В частности, сравнительный анализ GSEA клеток НЕК293ТΔYB-1 и исходных клеток НЕК293Т выявил пониженное количество, но повышенную занятость рибосомами для мРНК, связанных с клеточным дыханием и с прохождением клеточного цикла. Это предполагает, что YB-1 связывает и стабилизирует эти мРНК и специфически ингибирует их трансляцию, что подтверждает раннюю работу [72], показавшую, что YB-1 избирательно взаимодействует с мРНК, кодирующими циклины, факторы роста и факторы трансляции, подавляя их трансляцию. Кроме того, было известно, что YB-1 может действовать как негативный регулятор трансляции мРНК, связанных с митохондриальным окислительным фосфорилированием (OXPHOS) [105].

Совершенно иной случай представлен мРНК, связанными TGFβ-опосредованным сигнальным каскадом. После нокаута гена *YBX1* увеличивалось как количество этих мРНК, так и занятость мРНК рибосомами (в меньшей степени). Вероятно, и для этих мРНК YB-3 не может полностью компенсировать потерю YB-1. Эти данные представляет особый интерес, поскольку известно, что YB-1 в некоторой степени действует как антагонист в передаче сигналов TGFβ [521, 522], и кроме того, YB-1 и TGFβ противодействуют друг другу [391, 523]. Помимо этого, активация сигнального каскада TGFβ связана с замедлением клеточного деления [525], что также согласуется со сниженной скоростью клеточного деления клеток НЕК293ТΔYB-1.

Однако самый важный для нас пример специфического контроля трансляции с помощью YB-1, который удалось выявить при анализе данных RNA-Seq и Ribo-Seq - репрессия трансляции мРНК *YB-3*. В клетках, нокаутных по гену *YBX1*, уровень YB-3 повышен вероятно из-за повышения трансляции мРНК *YB-3*. Молекулярному механизму этого трансляционного контроля будет посвящен следующий раздел диссертации.

### 3. Регуляция синтеза YB-3 при участии YB-1

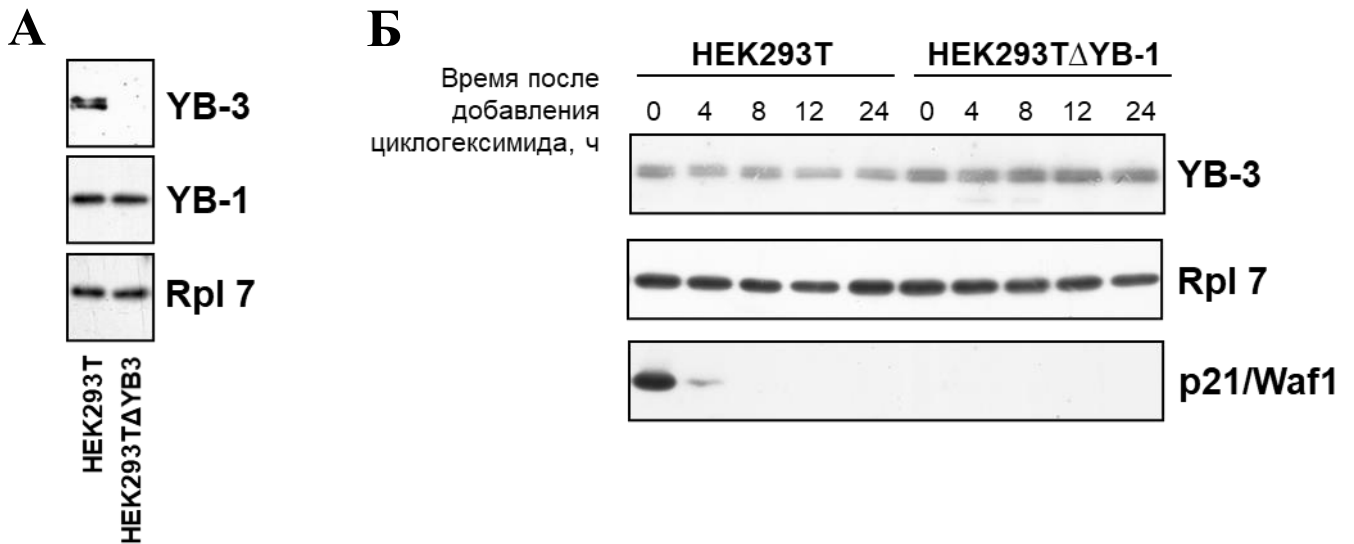
На следующем этапе исследований было решено сосредоточиться на более подробном изучении механизма регуляции синтеза YB-3 при участии YB-1. И по данным Ribo-Seq, и по данным анализа распределения мРНК между фракциями свободных и полисомных мРНК, и по данным иммуноблоттинга трансляция мРНК *YB-3* и количество белка YB-3 возрастает в клетках HEK293TΔYB-1 (Рис. 63А,Б). При этом количество мРНК *YB-3* уменьшается при нокауте YB-1 в клетках HEK293T (Рис. 63В). Все это говорит о возможном участии YB-1 в регуляции синтеза YB-3 на уровне трансляции, а возможно и на уровне синтеза и стабилизации мРНК *YB-3*.



**Рисунок 63. YB-1 регулирует синтез YB-3.** А. Анализ количества YB-3 в клетках HEK293T и HEK293TΔYB-1, экспрессирующих и не экспрессирующих HA-YB-1 с плазмиды, методом иммуноблоттинга. Фибрилларин использовали в качестве контроля. Б. Лизаты клеток HEK293T и HEK293TΔYB-1 центрифугировали в линейном градиенте сахарозы (15-45%) в течение 1 часа при 45000 об/мин в роторе SW-60. Показаны полисомные профили ( $A_{254}$ ) (панели слева). мРНК YB-3 во фракциях детектировали методом ОТ-ПЦР в реальном времени (правая панель). В. Анализ количества мРНК YB-3 в клетках HEK293T и HEK293TΔYB-1, экспрессирующих и не экспрессирующих HA-YB-1 с плазмиды, методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Данные нормализовали по 18S рРНК и мРНК *BTF3*. Для оценки статистической значимости отличий по сравнению с клетками HEK293T, трансфицированными пустым вектором, использовали двусторонний t-критерий Стьюдента. \*\*\* $p < 0,001$ , \* $p < 0,05$ .

### 3.1. Отсутствие YB-1 приводит к увеличению количества белка YB-3, тогда как отсутствие YB-3 не влияет на количество YB-1.

Итак, имеются довольно убедительные данные о том, что YB-1 может контролировать синтез YB-3 в клетках HEK293T. Логично также задаться вопросом о том, контролирует ли YB-3 синтез YB-1. Для проверки этого предположения были получены клетки HEK293T, в которых с помощью системы редактирования генома CRISPR-Cas9 была подавлена экспрессия YB-3 (HEK293TΔYB-3, см. главу «Материалы и методы», пункт 39), и исследовано изменение количества YB-1 по сравнению с клетками HEK293T. Как видно на рисунке 64А, подавление экспрессии YB-3 не привело к изменению количества YB-1. Этот результат позволяет говорить о том, что YB-3 не участвует в регуляции количества своего гомолога в клетках HEK293T.



**Рисунок 64. Подавление экспрессии YB-1 влечет за собой перераспределение мРНК YB-3 в полисомы без какого-либо влияния на стабильность YB-3.** А. Анализ количества YB-1 в клетках HEK293T и HEK293TΔYB-3 методом иммуноблоттинга; Rpl7 (рибосомный белок L7) использован в качестве контроля. Б. Анализ деградации белка YB-3 в клетках HEK293T и HEK293TΔYB-1. Клетки инкубировали с циклогексимидом (СНХ, 100 мкг/мл) и собирали в указанные моменты времени. Лизаты клеток уравнивали по общему белку и использовали для иммуноблоттинга. p21/Waf1 использовали в качестве положительного контроля.

### 3.2. В отсутствие YB-1 стабильность белка YB-3 не изменяется

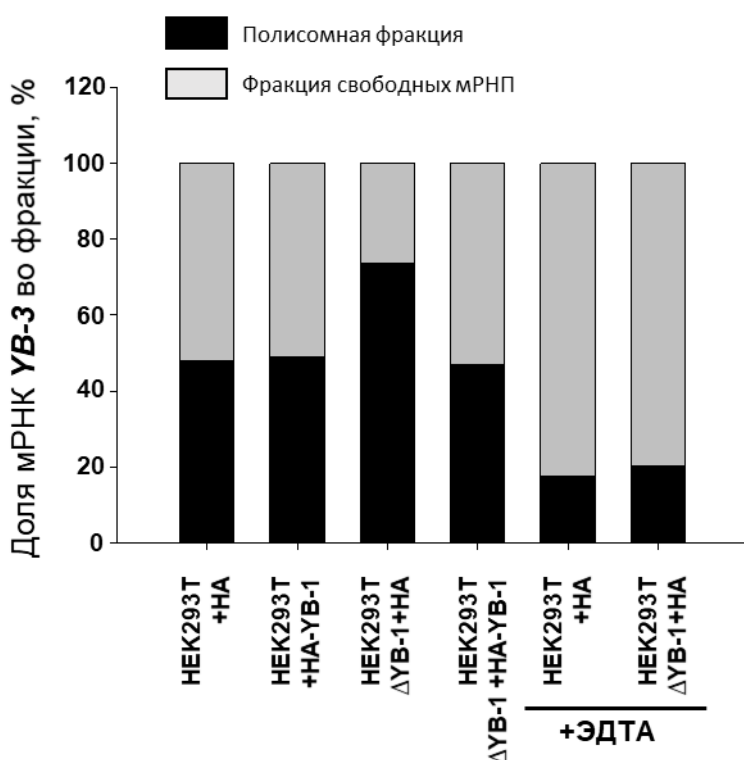
Повышенное количество белка YB-3 в клетках HEK293TΔYB-1 можно также объяснить повышенной стабильностью белка, увеличением количества мРНК или усилением трансляции мРНК. Прежде чем исследовать роль YB-1 в регуляции стабильности и трансляции мРНК YB-3 (в пользу чего свидетельствовали предыдущие эксперименты), необходимо было выяснить, не является ли увеличение количества белка YB-3 также следствием повышения его стабильности в клетках, не экспрессирующих YB-1. Для этого определяли количество белка YB-3 в клетках HEK293T и HEK293TΔYB-1 после их обработки ингибитором трансляции - циклогексимидом в течение 24 часов. Оказалось, что белок YB-3 весьма стабилен, и период его полураспада, вероятно, больше 24 часов, в отличие от контрольного белка p21 (Waf1/Cip1) с периодом полураспада менее 4 часов (Рис. 64Б). Нужно отметить, что p21/Waf в клетках HEK293TΔYB-1 практически не детектируется (как было показано ранее на рисунке 49). Кроме того, можно сказать, что стабильность белка YB-3 не зависит от уровня экспрессии YB-1 в клетках HEK293T, а следовательно, наблюдаемые изменения в его количестве вероятно обусловлены только влиянием YB-1 на трансляцию и/или стабильность мРНК YB-3.

### 3.3. Распределение эндогенной мРНК YB-3 между фракциями полисом и свободных мРНК зависит от экспрессии YB-1

Далее более подробно было исследовано распределение эндогенной мРНК YB-3 между фракциями полисом и свободных мРНК в клетках HEK293T, экспрессирующих и не экспрессирующих YB-1. Для этого лизаты, полученные из клеток HEK293T и HEK293TΔYB-1 и этих же клеток, но экспрессирующих HA-YB-1 с плазмиды, центрифугировали через сахарозную подушку. Осадок представлял собой полисомы и моносомы, а супернатант - свободные мРНК. Количество мРНК YB-3 во фракциях определяли методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Результаты, представленные на рисунке 65, говорят о том, что в отсутствие YB-1 мРНК YB-3 транслируется лучше (большая её доля находится в полисомной фракции), что подтверждает предыдущий результат (Рис. 63Б). Но еще более важно, что при экспрессии YB-1 с плазмиды мРНК YB-3 перераспределяется обратно в нетранслируемые свободные мРНК.



Таким образом, из описанных экспериментов следует, что в полном согласии с предыдущими данными трансляция мРНК *УВ-3* усиливается в отсутствие белка *УВ-1* (в клетках НЕК293ТΔ*УВ-1*) и уменьшается при синтезе *УВ-1*, что, вероятно и приводит к изменению количества белка *УВ-3*. Это позволяет утверждать, что *УВ-1* действительно контролирует экспрессию *УВ-3* на уровне трансляции мРНК *УВ-3*. Однако не стоит забывать, что в клетках НЕК293ТΔ*УВ-1* количество мРНК *УВ-3* уменьшается, а в случае восстановления синтеза *УВ-1* в клетках количество мРНК *УВ-3* наоборот возрастает (Рис. 63В). Это означает, что *УВ-1* может помимо трансляции *УВ-3* контролировать и её стабильность или синтез.

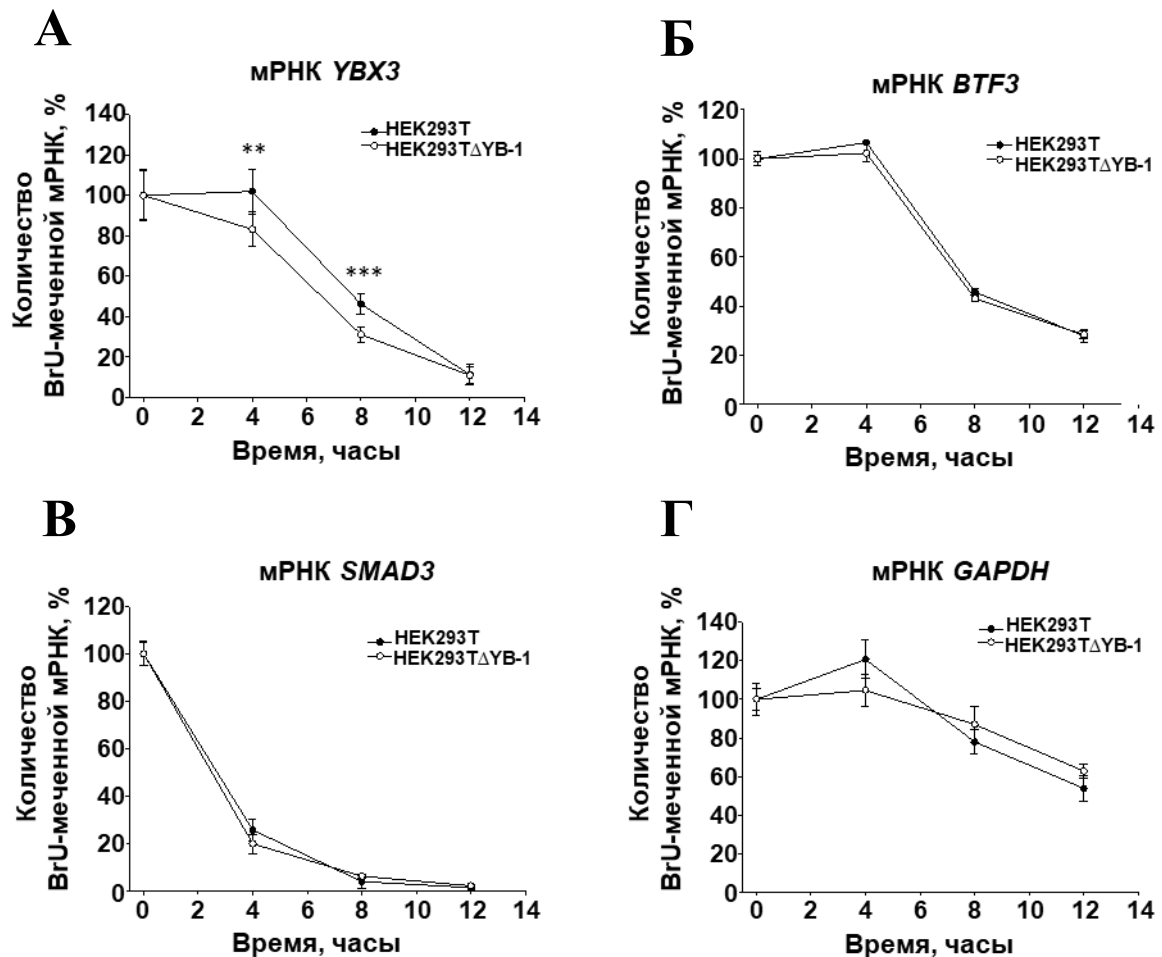


**Рисунок 65.** Распределение мРНК *УВ-3* между полисомными и свободными мРНК в клетках НЕК293Т, НЕК293Т+*УВ-1*, НЕК293ТΔ*УВ-1* и НЕК293ТΔ*УВ-1*+*УВ-1*. Цитозольные экстракты клеток центрифугировали через 50% сахарозную подушку при 90000 об/мин в центрифуге TL-100 (Beckman) в течение 13 мин для отделения постполисомного супернатанта от полисом. Тотальную РНК из постполисомного супернатанта и полисомных фракций (ресуспендированные осадки) экстрагировали с помощью TRIzol и анализировали ОТ-ПЦР в реальном времени со помощью специфических праймеров для мРНК *УВ-3*. Образцы с добавлением ЭДТА (для диссоциации полисом на субчастицы) служили контролем на наличие свободных мРНК в полисомных фракциях. За 100 % принимали сумму относительного количества мРНК *УВ-3* в свободной и полисомной фракциях мРНК.

### 3.4. В отсутствие *УВ-1* стабильность мРНК *УВ-3* снижается

Для сравнения стабильности мРНК *УВ-3* в клетках НЕК293Т, экспрессирующих и не экспрессирующих *УВ-1*, применялся метод метаболического мечения клеточных мРНК бромуридином по типу «пульс-чейз» с последующей иммунопреципитацией бромуридин-

меченной РНК за антитела против бромдезоксипуридина. Детекцию мРНК в иммунопреципитате проводили методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Очевидно, что изменение содержания бромдезоксипуридина в конкретной мРНК с течением времени будет зависеть от её стабильности. На рисунке 66 можно увидеть, что стабильность мРНК *YB-3* (Рис. 66А) достоверно снижается в клетках HEK293TΔYB-1 в отличие от стабильности мРНК *BTF3*, *SMAD3* и *GAPDH* (Рис. 66Б-Г).

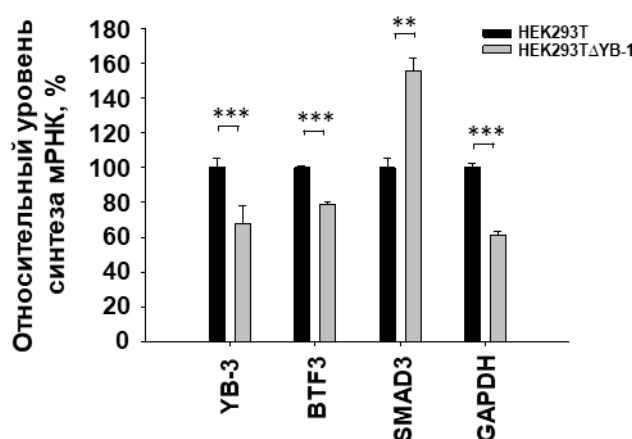


**Рисунок 66.** Подавление экспрессии YB-1 приводит к снижению стабильности мРНК YB-3. А-Е Клетки HEK293T и HEK293TΔYB-1 инкубировали в среде DMEM с бромдезоксипуридином (BrU) в течение 24 часов, а затем в стандартной среде в течение 0, 4, 8 или 12 часов. Далее выделяли тотальную РНК и использовали её для иммунопреципитации антителами против BrU. В иммунопреципитате избранные мРНК детектировали методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Для каждой клеточной линии количество мРНК в точке 0 ч принимали за 100%. Ошибка – два стандартных отклонения. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний t-критерий Стьюдента. \*\*\* $p < 0,001$ , \* $p < 0,05$ .

Для приблизительной оценки уровня синтеза мРНК *YB-3* было проанализировано количество мРНК *YB-3* в иммунопреципитате из лизатов клеток HEK293T и клеток HEK293TΔYB-1, полученных сразу после мечения бромдезоксипуридином (0 часов). На рисунке 67 видно, что синтез мРНК *YB-3* несколько снижен в клетках HEK293TΔYB-1 по сравнению с контрольными, но в той же степени, что и синтез контрольной мРНК *BTF3* и мРНК *GAPDH*.

Можно, вероятно, говорить о небольшом общем снижении уровня транскрипции этих клеточных мРНК, причины которого напрямую связать с отсутствием *YB-1* пока сложно. Интересно, что синтез мРНК *SMAD3* возрос, что предполагает участие *YB-1* в специфической регуляции синтеза этой мРНК, вероятно на уровне регуляции транскрипции.

Таким образом, можно говорить о том, что уменьшение количества мРНК *YB-3* при нокауте *YBX1* в клетках HEK293T обусловлено как снижением синтеза этой мРНК, так и снижением стабильности этой РНК.



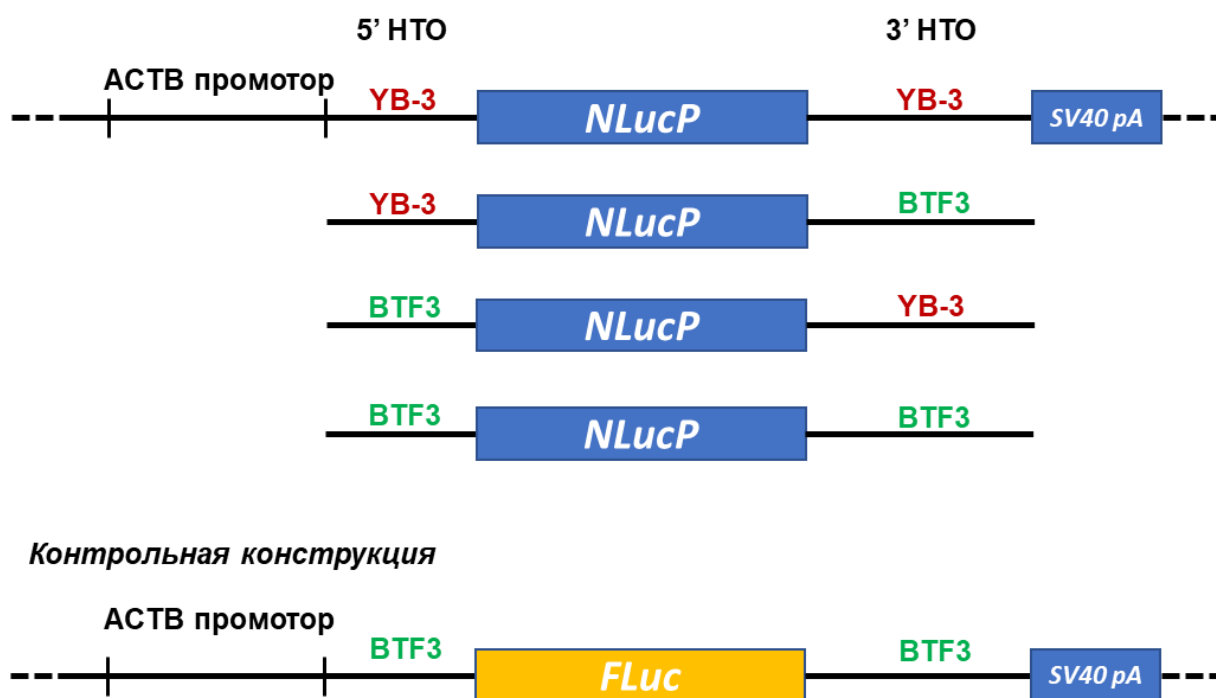
**Рисунок 67.** Клетки HEK293T и HEK293TΔYB-1 инкубировали в среде DMEM с бромдезоксипуридином (BrdU) в течение 24 часов. Далее выделяли тотальную РНК и использовали её для иммунопреципитации антителами против BrdU. В иммунопреципитате избранные мРНК детектировали методом ОТ-ПЦР в реальном времени. В клетках HEK293T количество мРНК в точке 0 ч принимали за 100%. Ошибка – два стандартных отклонения. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний t-критерий Стьюдента. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ .

### 3.5. 5' и 3'НТО мРНК *YB-3* необходимы для регуляции трансляции и стабильности репортерных мРНК *ex vivo*.

Поскольку регуляция трансляции и стабильности мРНК идет зачастую при участии нетранслируемых областей мРНК, было предположено, что и в случае мРНК *YB-3* важную роль играют 5' и/или 3'НТО этой мРНК. Для этого исследовалась трансляция репортерных мРНК люциферазы *NLucP* с 5'- и 3'-нетранслируемыми областями мРНК *YB-3* и/или мРНК *BTF3* (в качестве контроля) в клетках HEK293TΔYB-1 и клетках HEK293TΔYB-1, стабильно экспрессирующих *YB-1* (HEK293TΔYB-1+YB-1, см. Материалы и методы).

Плазмидами pNL2.2, кодирующими мРНК *NLucP* с различными комбинациями НТО мРНК *YB-3*, трансфицировали указанные клетки. Важно отметить, что при трансфекции в клетки вводилась не только плазмида pNL2.2, но и плазмида, кодирующая мРНК люциферазы светлячка (*Fluc*) с 5' и 3'НТО мРНК *BTF3*, в качестве внутреннего контроля (Рис. 68). Во всех

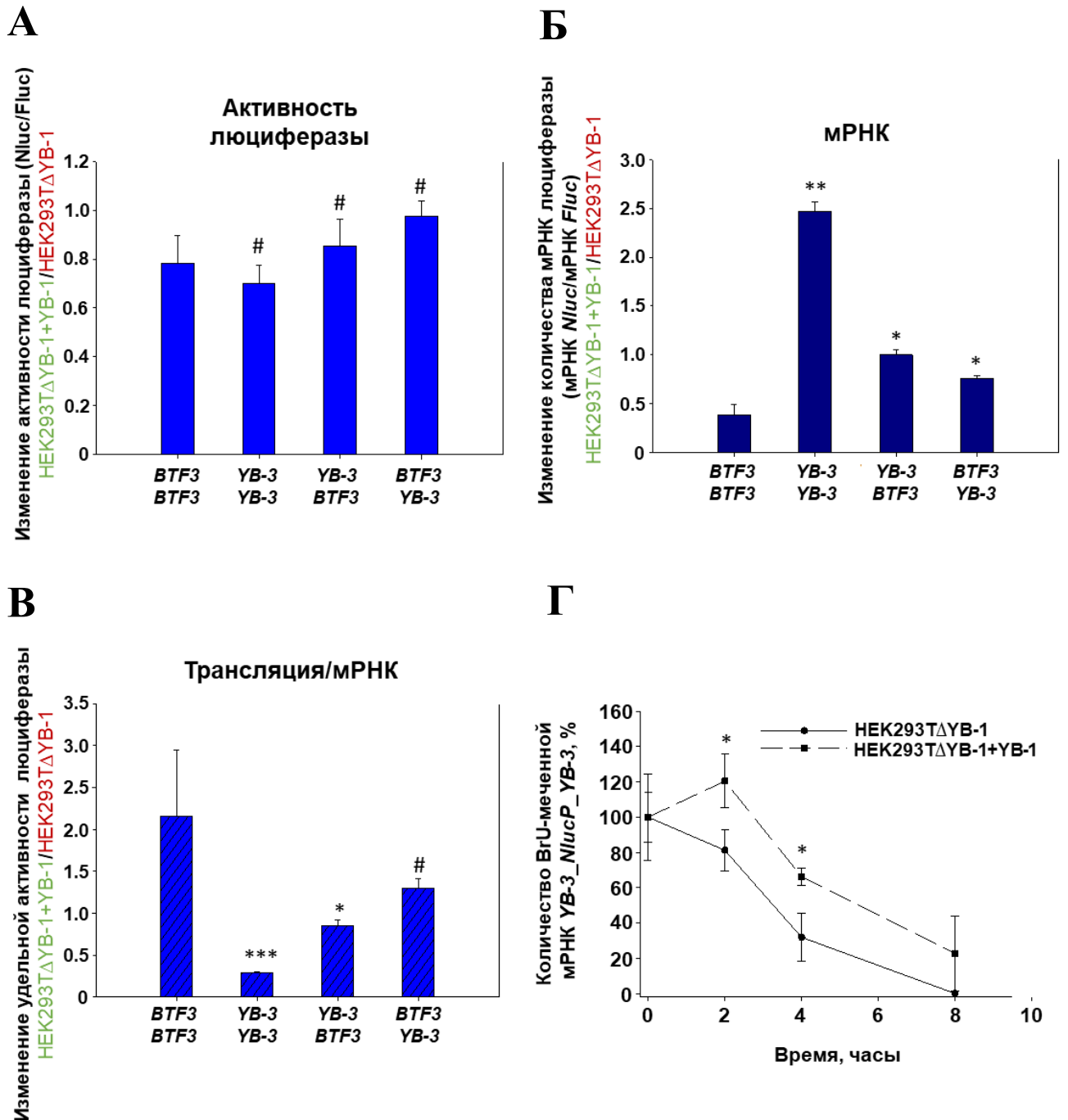
полученных конструкциях репортерные последовательности находятся под контролем промотора  $\beta$ -актина (АСТВ), что должно обеспечивать одинаковую эффективность их транскрипции.



**Рисунок 68.** Схема используемых плазмид рNL2.2. Для трансфекции клеток НЕК293ТΔYB-1 и НЕК293Т ΔYB-1+YB-1 использовали плазмиды рNL2.2, кодирующие репортерные мРНК *NlucP* с комбинацией НТО из мРНК *YB-3* и мРНК *BTF3*, и плазмиду рNL2.2BTF3\_*Fluc*\_BTF3, кодирующую мРНК люциферазы светлячка (в качестве внутреннего контроля).

После 24 часов культивирования из части клеток выделяли РНК для измерения количества синтезированных мРНК *NlucP* и *Fluc*, а другую часть использовали для измерения активности люцифераз *NlucP* и *Fluc*. Измерение активности *Fluc* и количества мРНК *Fluc* использовалось как внутренний контроль во всех экспериментах. То есть, активность люциферазы *NlucP* (для каждого вида мРНК) нормализовали по активности внутреннего контроля *Fluc*, а количество мРНК *NlucP* (для каждого вида мРНК) – по количеству мРНК *BTF3\_Fluc\_BTF3*. На рисунке 69А видно, что активность люциферазы, синтезируемой любой из четырех конструкций, как таковая практически не изменяется при удалении из клеток белка YB-1. При этом количество мРНК *NlucP* существенно различается в зависимости от нетранслируемых областей мРНК (Рис. 69Б). Одновременное наличие 5' и 3' НТО мРНК *YB-3* приводит к значительному падению количества репортерной мРНК в отсутствие YB-1 в клетках. К снижению количества репортерной мРНК приводит также и наличие только 5' НТО или только 3' НТО мРНК *YB-3*. Таким образом, в условиях подавленной экспрессии YB-1 в клетках наличие обеих НТО мРНК *YB-3* приводит к тому, что репортерной мРНК становится

меньше, но при этом она транслируется значительно лучше (Рис. 69В), т.е. с неё синтезируется примерно столько же активной люциферазы, сколько с гораздо большего количества контрольной мРНК. По-видимому, обе НТО необходимы для обеспечения чувствительности трансляции репортерной мРНК к YB-1, поскольку в отдельности 3'НТО не способен этого делать, а 5'НТО способствует этому в меньшей степени (Рис. 69В).



**Рисунок 69.** 5'- и 3'НТО мРНК YB-3 необходимы для регуляции трансляции и стабильности репортерных мРНК в клетках HEK293T. Через 24 ч после трансфекции плазидами pNL2.2 (рис. 59) клетки собирали и делили на две части. Одну часть использовали для выделения тотальной РНК для измерения количества мРНК *NlucP* и *Fluc* методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Другую часть использовали для определения активности *NlucP* и *Fluc*. А. Активность люциферазы NanoLuc

(нормализованная по активности *Fluc*, синтезированной с плазмиды *pNL2.2BTF3\_Fluc\_BTF3*) в клетках НЕК293Т ΔУВ-1 и НЕК293ТΔУВ-1+УВ-1 для плазмид *pNL2.2*, кодирующих репортерные мРНК *NlucP* с различными НТО мРНК *УВ-3* и мРНК *BTF3*. Ошибка – два стандартных отклонения. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний t-критерий Стьюдента; # означает статистически незначимые отличия. Б. Количество мРНК *NlucP* (нормированное к количеству мРНК *Fluc*, синтезированной с плазмиды *pNL2.2BTF3\_Fluc\_BTF3*) в клетках НЕК293ТΔУВ-1 и НЕК293ТΔУВ-1+УВ-1 для плазмид *pNL2.2*, кодирующих репортерные мРНК *NlucP* с различными НТО мРНК *УВ-3*- и *BTF3*. Ошибка – два стандартных отклонения. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний t-критерий Стьюдента. \*\*\**p* < 0,001, \**p* < 0,05, # означает статистически незначимые отличия. В. Активность *NlucP* в перерасчете на количество мРНК, полученная из данных, приведенных на панелях Б и В. Ошибка – два стандартных отклонения. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний t-критерий Стьюдента. \*\**p* < 0,01, \**p* < 0,05. Г. Клетки НЕК293ТΔУВ-1 и НЕК293ТΔУВ-1+УВ-1 трансфицировали плазмидами *pNL2.2*, кодирующими репортерную мРНК *NlucP* с НТО мРНК *УВ-3*. Через 6 ч после трансфекции в среду DMEM добавляли BrU для дальнейшей инкубации в течение 24 ч. Затем меняли среду на стандартную и инкубировали клетки в течение 0, 2, 4 или 8 ч. Далее выделяли тотальную РНК и использовали её для иммунопреципитации антителами против BrU. В иммунопреципитате мРНК *УВ-3\_Nluc\_УВ-3* детектировали методом ОТ-ПЦР в реальном времени с помощью праймеров к последовательности *Nluc*. Для каждой клеточной линии количество мРНК в точке 0 ч принимали за 100%. Ошибка – два стандартных отклонения. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний t-критерий Стьюдента. \* *p* < 0,05. Сравнение проводилось относительно мРНК *BTF3\_NlucP\_BTF3*.

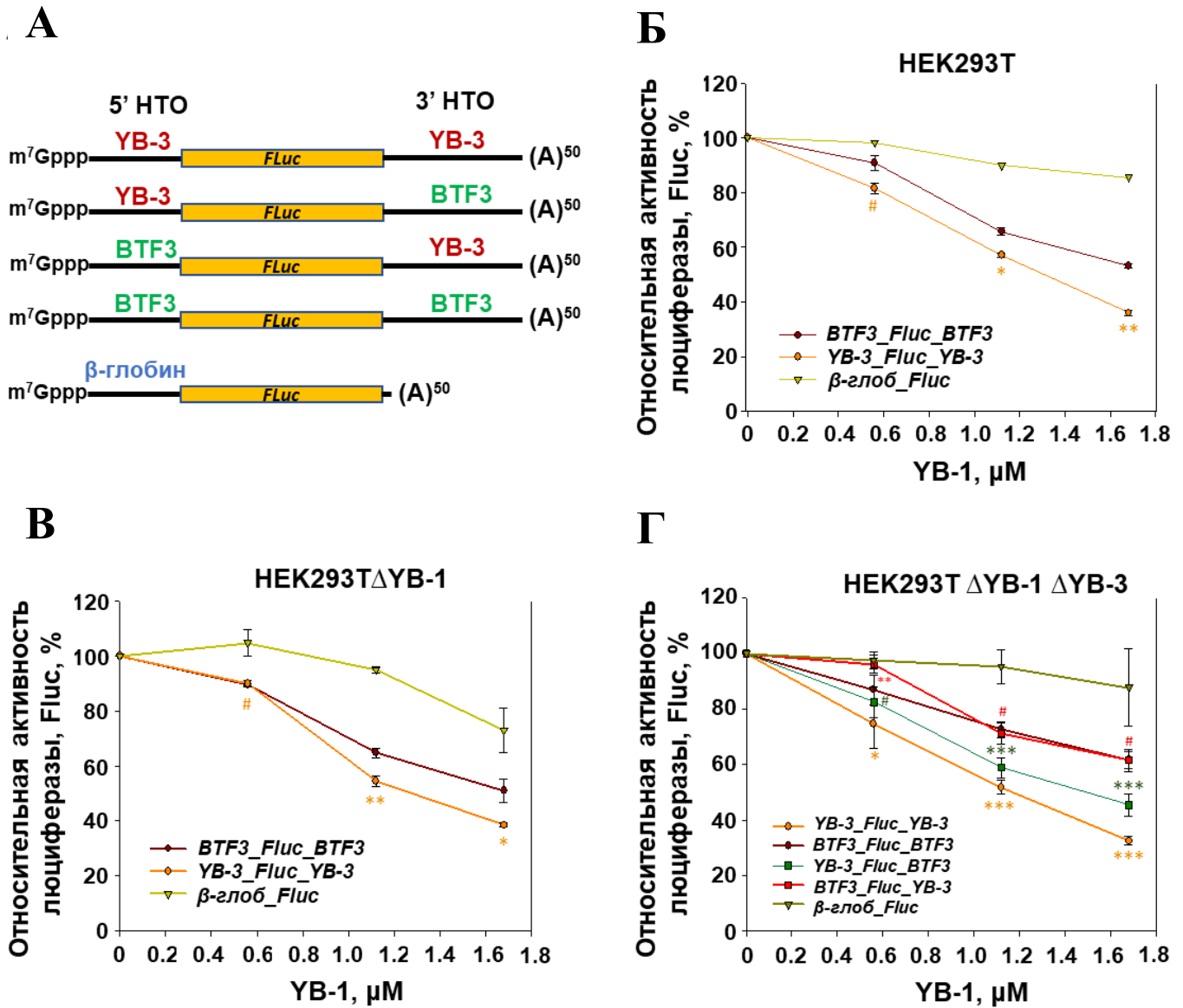
Кроме того, вероятно, за уменьшение количества мРНК ответственны обе НТО мРНК *УВ-3*, так как наличие только 5'НТО или только 3'НТО мРНК *УВ-3* ведет к меньшему снижению количества репортерной мРНК в отсутствие УВ-1. Влияние НТО мРНК *УВ-3* на стабильность репортерных мРНК подтверждается экспериментом по изучению стабильности мРНК *УВ-3\_NlucP\_УВ-3* в клетках НЕК293ТΔУВ-1 и НЕК293ТΔУВ-1+УВ-1. Плазмидой *pNL2.2\_УВ-3\_NlucP\_УВ-3* трансфицировали указанные клетки и через 12 часов проводили метаболическое мечение клеточных мРНК бромуридином по типу «пульс-чейз» как описано выше. На рисунке 69Г можно увидеть, что стабильность мРНК *УВ-3\_NlucP\_УВ-3* достоверно снижается примерно в 2 раза в клетках НЕК293ТΔУВ-1 по сравнению с клетками НЕК293ТΔУВ-1+УВ-1.

Таким образом, можно говорить о том, что нетранслируемые области мРНК *УВ-3* в зависимости от наличия белка УВ-1 в клетках действительно определяют трансляцию и стабильность репортерной мРНК и, по-видимому, самой мРНК *УВ-3*.

### 3.6. 5'НТО мРНК *УВ-3* необходим для регуляции трансляции репортерных мРНК *in vitro*

Другим способом показать влияние УВ-1 на трансляцию репортерных мРНК с НТО мРНК *УВ-3* являются эксперименты в бесклеточной системе трансляции на основе экстрактов клеток НЕК293Т. Было исследовано влияние экзогенного белка УВ-1 на трансляцию репортерных мРНК *люциферазы светлячка FLuc* с 5'- и 3'-нетранслируемыми областями мРНК *УВ-3* и/или мРНК *BTF3* или с 5'НТО β-глобина (Рис. 70А) в бесклеточной системе трансляции

на основе лизатов клеток НЕК293Т, экспрессирующих и не экспрессирующих YB-1. Как видно на рисунке 70 (панели Б,В) трансляция мРНК *Fluc* с НТО мРНК *YB-3* избирательно ингибируется при добавлении в систему трансляции белка YB-1. Это наблюдается как в системе на основе экстракта клеток НЕК293Т, так и на основе экстракта из клеток НЕК293ТΔYB-1.



**Рисунок 70.** 5'НТО мРНК *YB-3* опосредует регуляцию трансляции репортерных мРНК в бесклеточной системе трансляции. А. Схема используемых репортерных мРНК. 0,1 пмоль K<sup>+</sup>A<sup>+</sup> репортерной мРНК люциферазы светлячка с указанными 5'НТО транслировали в бесклеточной системе трансляции на основе экстрактов клеток НЕК293Т (Б), НЕК293ТΔYB-1 (В) или НЕК293Т ΔYB-1 ΔYB-3 (Г) в присутствии возрастающего количества рекомбинантного белка YB-1 (0,56, 1,12 и 1,68 мкМ) или без него. В реакционных смесях анализировали активность люциферазы светлячка после 45 мин инкубации при 30 °С. Активность *Fluc* без добавления YB-1 принимали за 100%. Значения получены на основании по крайней мере трех независимых экспериментов. Ошибка – стандартное отклонение. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний t-критерий Стьюдента. \*\*\* -  $p < 0,001$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \* -  $p < 0,05$ , # означает статистически незначимые отличия. Сравнение проводилось с активностью люциферазы, синтезируемой с мРНК *BTF3\_Fluc\_BTF3*.

Следует отметить, что в обоих случаях разница в ингибировании между контрольной матрицей с 5'НТО бета-глобина и матрицей с НТО мРНК *УВ-3* довольно существенна, а между другой контрольной матрицей с НТО мРНК *ВТФЗ* и матрицей с НТО мРНК *УВ-3* не столь драматична, но достоверна.  $\beta$ -глобиновый лидер, по опыту нашей лаборатории, всегда проявляет меньшую чувствительность к *УВ-1*, в силу, вероятно, структурных особенностей (короткий, А-богатый, неструктурированный) и эффективности в инициации трансляции.

Важно отметить, что в экстракте клеток НЕК293Т уже присутствуют эндогенные белки *УВ-1* и *УВ-3*, а в экстракте клеток НЕК293Т $\Delta$ *УВ-1* присутствует только белок *УВ-3*, но в увеличенных количествах. Возможно, на трансляцию репортерных мРНК влияют оба *У*-боксы-связывающих белка, суммарное количество которых в клетках НЕК293Т и НЕК293Т $\Delta$ *УВ-1* остается примерно одинаковым. Можно предположить, что слабая разница между контрольной матрицей с НТО мРНК *ВТФЗ* и матрицей с НТО мРНК *УВ-3* связана с тем, что их трансляция уже частично отрегулирована (подавлена) в используемых нами системах трансляции. Поэтому была проведена трансляция в системе на основе клеток НЕК293Т $\Delta$ *УВ-1* $\Delta$ *УВ-3* (получение описано в главе «Материалы и методы», пункт 39), в которых не экспрессируются оба белка (Рис. 70Г).

В этих условиях разница в ингибировании белком *УВ-1* трансляции контрольной и целевой мРНК оказалась еще больше. Более того, в этой системе трансляции было проверено, как 5'НТО и 3'НТО мРНК *УВ-3* влияют на трансляцию репортерной мРНК в присутствии увеличивающихся количеств *УВ-1*. Оказалось, что наличие только 5'НТО, но не 3'НТО мРНК *УВ-3* делало трансляцию такой мРНК чувствительной к добавлению в систему белка *УВ-1*. Следует отметить, что наблюдаемая чувствительность к *УВ-1* матрицы только с 5'НТО мРНК *УВ-3* несколько слабее, чем у матрицы и с 5', и с 3'НТО мРНК *УВ-3*. Это позволяет говорить о том, что, по-видимому, за регуляцию белком *УВ-1* трансляции мРНК *УВ-3* отвечает в большей степени 5'НТО этой мРНК, но наличие 3'НТО усиливает её эффект.

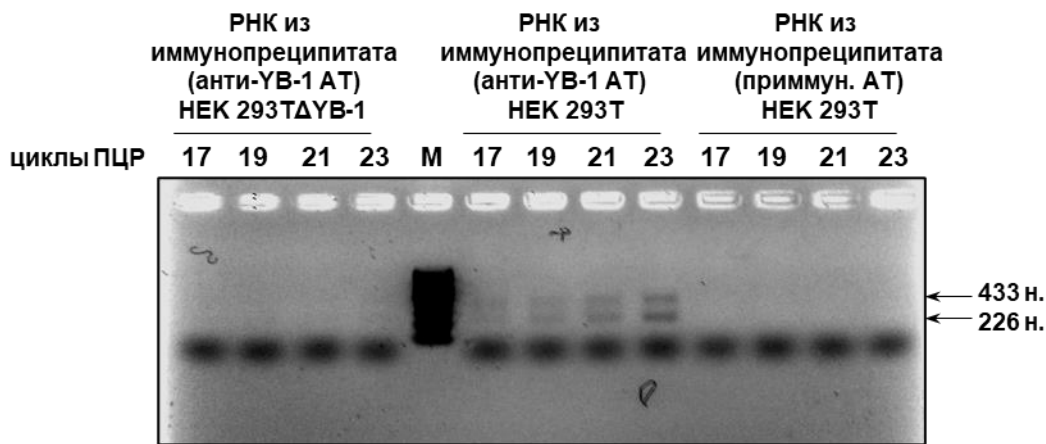
Можно отметить, что эффект от добавления *УВ-1* в систему трансляции *in vitro* на трансляцию репортерной мРНК с НТО мРНК *УВ-3* не такой сильный, как в экспериментах на клетках (в 1,5 раза (в лизате НЕК293Т $\Delta$ *УВ-1*) против в 7 раз (в клетках)). Это может объясняться тем, что уменьшение количества репортерной мРНК с НТО мРНК *УВ-3* в клетках без *УВ-1* происходит в основном за счет деградации неактивной мРНК, находящейся в свободных мРНК. При этом количество репортерной мРНК с лидерами мРНК *УВ-3*, ассоциированной с полисомами, а следовательно и количество синтезируемой люциферазы возрастает, но не столь значительно как можно ожидать. Однако весьма вероятно, что в клетках изменение уровня *УВ-1* приводит к изменениям уровня экспрессии некоторых генов, напрямую или косвенно, влияющих на трансляцию и стабильность мРНК с НТО мРНК *УВ-3*. А в *in vitro* системе можно



наблюдать исключительно эффект от добавления YB-1. Поэтому возможно, что, помимо прямого эффекта на трансляцию мРНК YB-3, YB-1 оказывает влияние на количество других белков, которые участвуют в регуляции трансляции мРНК YB-3.

### 3.7. Связывание YB-1 с НТО мРНК YB-3

Итак, наличие белка YB-1 в клетках и в системе *in vitro* влияет на трансляцию и стабильность мРНК YB-3 или репортерных мРНК с НТО мРНК YB-3. По данным RIP-Seq с использованием антител против YB-1, мРНК YB-3 является одной из взаимодействующих с YB-1 мРНК. Кроме того, наши PAR-CLIP данные указывают, что YB-1 имеет сайт связывания в 3'НТО мРНК YB-3. Наконец, ОТ-ПЦР-анализ препарата мРНК, иммунопреципитирующихся с YB-1, показал наличие в нём мРНК YB-3 (Рис. 71). Однако возникает вопрос, взаимодействует ли сам YB-1 с этими областями или его влияние опосредовано другими белками.



**Рисунок 71. YB-1 взаимодействует с мРНК YB-3 в клетках HEK293Т.** Лизаты клеток HEK293Т и HEK293ТΔYB-1 были использованы для иммунопреципитации РНК антителами против YB-1 или контрольной пре-иммунной сывороткой. Иммунопреципитированная РНК была выделена с помощью реагента TRIzol LS. мРНК YB-3 детектировалась методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Используемые праймеры специфичны к обеим изоформам мРНК YB-3. Два полосы (433 и 226 н.) на электрофореграмме соответствуют длинной и короткой изоформам мРНК YB-3.

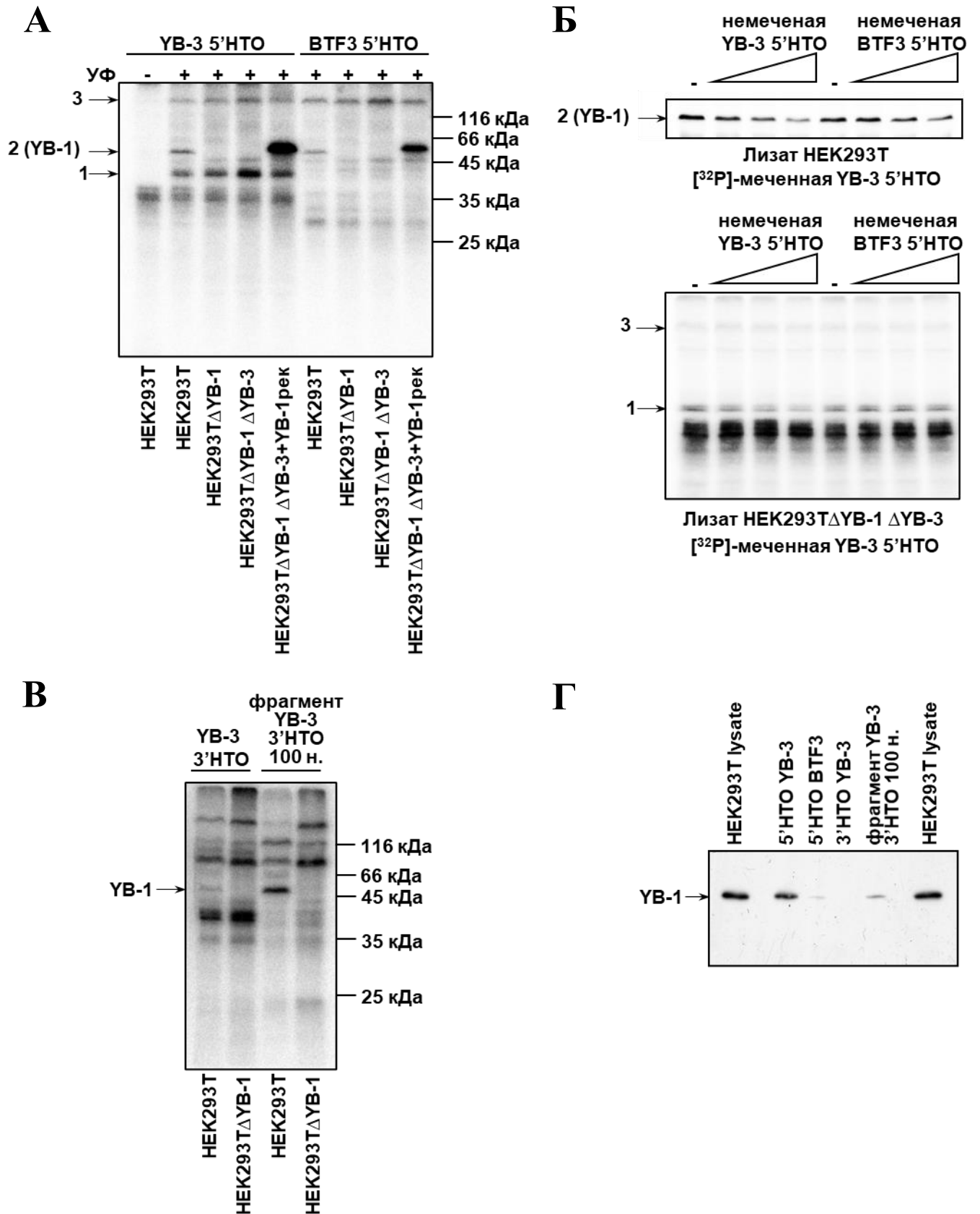
Чтобы прояснить ситуацию, были проведены эксперименты по УФ-сшивкам радиоактивно меченных НТО мРНК YB-3 и BTF3 с белками из лизатов клеток, экспрессирующих YB-белки, не экспрессирующих YB-1 или не экспрессирующих YB-1 и YB-3. Как видно на рисунке 72А, с 5'НТО мРНК YB-3 перешиваются 3 белка лизата клеток HEK293Т. Один из них (отмечен как 2) вероятно YB-1, поскольку данная полоса исчезает в лизатах клеток без YB-1 и появляется при добавлении в лизат белка YB-1. Можно отметить, что YB-1 перешивается и с контрольной 5'НТО мРНК BTF3, однако интенсивность полосы в случае 5'НТО мРНК YB-3 заметно выше, что может указывать на большее сродство YB-1 именно к 5'НТО мРНК YB-3. Другой белок молекулярной массой около 35-40 кДа (отмечен как 1), вероятно специфически перешивается только с 5'НТО мРНК YB-3. Интересно, что

интенсивность полосы этого белка возрастает при удалении из лизата YB-1 и еще больше при удалении YB-1 и YB-3. При добавлении YB-1 интенсивность сигнала снижается, что говорит о возможной конкуренции между этим белком и YB-1 за связывание с 5'НТО мРНК YB-3. Такое же возрастание интенсивности полосы при удалении YB-белков характерно для белка, отмеченного как 3, но в этом случае можно говорить о неспецифическом взаимодействии, поскольку такая картина наблюдается и в случае контрольной 5'НТО мРНК *BTF3*.

Специфичность связывания обнаруженных белков (1-3) с 5'НТО мРНК YB-3 была исследована в экспериментах по УФ-сшивкам белков лизатов клеток с радиоактивно меченной 5'НТО мРНК YB-3 в присутствии немеченой конкурентной РНК: специфической – 5'НТО мРНК YB-3 и неспецифической - 5'НТО мРНК *BTF3*. В случае YB-1 (белок 2) эксперимент проводили с лизатом клеток НЕК293Т. Как видно на рисунке 72Б (верхняя панель), немеченая 5'НТО мРНК YB-3 способна вытеснять свой меченый вариант из комплекса с белком YB-1 более эффективно, чем немеченая 5'НТО мРНК *BTF3*.

В случае белков 1 и 3 эксперимент проводили с лизатом клеток НЕК293ТΔYB-1ΔYB-3, где наблюдалась наибольшая интенсивность сигнала от этих белков. При лучшем разделении в PAGE оказалось, что белок 1 — это два белка близкой массы и, вероятно, специфичности. Как и ожидалось, эти белки имеют большее сродство к 5'НТО мРНК YB-3, поскольку только немеченая 5'НТО мРНК YB-3, но не 5'НТО мРНК *BTF3*, способна вытеснить свой меченый вариант из комплекса с белком. Белок 3 не показал специфичности во взаимодействии с 5'НТО мРНК YB-3 (Рис. 72Б, нижняя панель).

Эксперименты по ультрафиолетовым сшивкам с радиоактивно меченной 3'НТО мРНК YB-3 и фрагментом 3'НТО мРНК YB-3, в котором, согласно нашим предварительным данным, находится сайт связывания YB-1, показал, что YB-1 способен взаимодействовать с 3'НТО (Рис. 72В). При этом интенсивность полосы, соответствующей YB-1, была высокой в случае фрагмента 3'НТО и довольно слабой в случае полноразмерной 3'НТО. Примечательно, что в случае полноразмерной 3'НТО мРНК YB-3, как и в случае с 5'НТО, детектируется два белка молекулярной массы 35-40 кДа, однако об их идентичности пока сказать ничего нельзя.



**Рисунок 72. Связывание УВ-1 с НТО мРНК УВ-3.** А. Экстракт клеток HEK293T, HEK293TΔУВ-1, HEK293T ΔУВ-1 ΔУВ-3 или экстракт клеток HEK293T ΔУВ-1 ΔУВ-3 с добавлением 1 мкг рекомбинантного УВ-1 инкубировали в течение 15 мин при 30 °С с [<sup>32</sup>P]-меченной 5'НТО мРНК УВ-3 или 5'НТО мРНК ВТF3 (по 0,57 пмоль), обрабатывали ультрафиолетом, а затем смесью нуклеаз (РНКаза

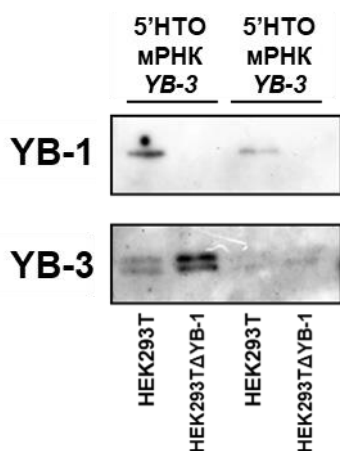
А и микрококковая нуклеаза). Далее образцы анализировали с помощью ДСН-гель-электрофореза и автордиографии. Цифры обозначают белки, специфически взаимодействующие с 5'НТО мРНК *УВ-3*. **Б.** Экстракт клеток НЕК293ТΔУВ-1ΔУВ-3 инкубировали в течение 15 минут при 30 °С с [<sup>32</sup>P]-меченной 5'НТО мРНК *УВ-3* (0,57 пмоль) в присутствии возрастающих количеств немеченных 5'НТО мРНК *УВ-3* или 5'НТО мРНК *ВТF3* (0,57, 1,14 и 2,28 пмоль), обрабатывали ультрафиолетом, а затем смесью нуклеаз (РНКаза А и микрококковая нуклеаза). Далее образцы анализировали с помощью ДСН-гель-электрофореза и автордиографии. **В.** Экстракт клеток НЕК293Т НЕК293ТΔУВ-1 инкубировали в течение 15 мин при 30 °С с [<sup>32</sup>P]-меченной 3'НТО мРНК *УВ-3* (0,6 пмоль) или 100 н. фрагментом 3'НТО мРНК *УВ-3* (0,6 пмоль), обрабатывали ультрафиолетом, а затем смесью нуклеаз (РНКаза А и микрококковая нуклеаза). Далее образцы анализировали с помощью ДСН-гель-электрофореза и автордиографии. **Г.** Белки экстракта клеток НЕК293Т (50 мкл) выделяли хроматографией на стрептавидин-сефарозе с иммобилизованной на ней биотинилированной 5'НТО мРНК *УВ-3* или контрольной 5'НТО мРНК *ВТF3* (по 60 пмоль). Белки, связавшиеся с РНК, разделяли с помощью ДСН-гель-электрофореза и детектировали УВ-1 методом иммуноблоттинга с помощью антител против С-концевого пептида УВ-1.

Чтобы дополнительно убедиться в специфичном связывании УВ-1 с НТО мРНК *УВ-3* был проведен эксперимент по выделению белков лизатов клеток за биотинилированные фрагменты РНК. На рисунке 72Г видно, что УВ-1 действительно проявляет большее сродство к 5'НТО мРНК *УВ-3*, чем к 5'НТО мРНК *ВТF3*. Интересно, что в случае полноразмерной 3'НТО УВ-3 мРНК *УВ-1* не детектируется вообще, но при этом фрагмент 100 н из 3'НТО мРНК *УВ-3* имеет довольно высокое специфичное сродство к УВ-1. Возможно, взаимодействие УВ-1 с 3'НТО зависит от конкуренции с другими белками, взаимодействующими с 3'НТО, а также от конформации РНК. Нельзя исключить, что существует некое взаимодействие между 5' и 3'НТО мРНК *УВ-3*, в результате которого связывание УВ-1 с 3'НТО может меняться (в т.ч. усиливаться) в случае полноразмерной мРНК.

Таким образом, УВ-1 связывается специфически с 5'НТО, что может обуславливать эффекты этого белка на трансляцию и стабильность репортерных мРНК с НТО мРНК *УВ-3* и природной мРНК *УВ-3*. Не исключено, что связывание УВ-1 с 3'НТО мРНК *УВ-3* также играет определенную роль в этих процессах. Кроме того, с НТО мРНК *УВ-3* связываются еще несколько белков, вероятно, вовлеченные в регуляцию синтеза УВ-3.

Правомерен вопрос о том, может ли сам белок УВ-3 связываться с собственной мРНК и контролировать её стабильность и трансляцию, как это делает УВ-1. Что касается связывания, то действительно, как показал эксперимент по аффинной хроматографии с биотинилированными фрагментами РНК, УВ-3 специфично взаимодействует с 5'НТО мРНК *УВ-3*, но не с 5'НТО контрольной мРНК *ВТF3* (Рис. 73). Интересно отметить, что в случае лизата клеток НЕК293ТΔУВ-1 связывание УВ-3 усиливается, что, вероятно, обусловлено увеличением в лизате количества самого УВ-3. Трудно сказать, ингибирует ли специфично УВ-3 трансляцию собственной мРНК. Провести опыт в бесклеточной системе трансляции с очищенным белком УВ-3 на настоящий момент невозможно, поскольку для этого необходимо получить чистый препарат рекомбинантного белка УВ-3, что на настоящий момент невозможно. Этот

эксперимент, а также эксперименты *ex vivo* с клетками, не экспрессирующими YB-3, еще ждут своего часа.



**Рисунок 73. YB-3 специфично взаимодействует с 5'НТО собственной мРНК.** Белки выделяли из экстрактов клеток HEK293T или HEK293TΔYB-1 (50 мкл) хроматографией на стрептавидин-сефарозе с иммобилизованными на ней биотинилированными фрагментами мРНК YB-3 или контрольным фрагментом РНК – 5'НТО мРНК *VTF3* (по 60 пмоль). Белки, связавшиеся с РНК, разделяли с помощью ДСН-гель-электрофореза и детектировали методом иммуноблоттинга с помощью соответствующих антител.

В качестве итога к этому разделу диссертации можно сказать следующее. Одним из наиболее важных вопросов в изучении Y-бокс-связывающих белков состоит в том, могут ли эти структурно очень близкие белки функционально заменять друг друга. Предполагается, что по крайней мере, YB-1 и YB-3, связывающие значительно перекрывающиеся наборы мРНК, способны на такую взаимозаменяемость. Отсюда же следует вопрос о существовании механизма, регулирующего общее содержание YB-белков в клетке и их соотношение. На настоящий момент, известно, что количество белка YB-1 в клетке может регулироваться на уровне стабильности белка, на уровне синтеза мРНК и на уровне трансляции [17, 526]. В последнем случае обращает на себя внимание механизм авторегуляции синтеза YB-1, при котором YB-1 способен специфично связываться с 3'НТО [65, 67] или с 5'НТО [483] собственной мРНК и подавлять её трансляцию. Согласно данным, полученным в настоящей работе, YB-1, связываясь с 5'НТО и, возможно, 3'НТО мРНК, может контролировать трансляцию и стабильность мРНК YB-3.

Таким образом, полагаясь на эти наблюдения, можно предположить, что белок YB-1 является регулятором количества обоих Y-бокс-связывающих белков, синтезируемых в соматических клетках. YB-3, вероятно, не принимает участия в регуляции количества YB-1 в клетках. Однако не исключено, что он может участвовать в регуляции трансляции или стабильности собственной мРНК, поскольку, по крайней мере, он связывается специфично с 5'НТО своей мРНК. Однако, существует ли авторегуляция синтеза YB-3, еще предстоит выяснить.

Механизм регуляции трансляции и стабильности мРНК YB-3 белком YB-1 еще не полностью ясен, однако можно утверждать, что он связан со взаимодействием YB-1 с

нетранслируемыми областями мРНК *УВ-3*. В первую очередь, это относится к 5'НТО, поскольку в *in vitro* системе эта область достаточна для специфического ингибирования трансляции репортерной мРНК белком *УВ-1*. В экспериментах на клеточных культурах присутствие 5'НТО или 3'НТО мРНК *УВ-3* в репортерной мРНК приводило к уменьшению количества мРНК, но только 5'НТО обеспечивала достоверную, хотя и небольшую, чувствительность репортерной мРНК к *УВ-1* по сравнению с контрольной мРНК и мРНК только с 3'НТО. Кроме того, только 5'НТО мРНК *УВ-3* проявляла высокое сродство к *УВ-1*.

В то же время, наибольший эффект в экспериментах *ex vivo* наблюдался, когда репортерная мРНК содержала одновременно и 5', и 3'НТО мРНК *УВ-3*. Это говорит о том, что, вероятно, существует некоторое взаимодействие между 3' и 5'НТО мРНК *УВ-3* при регуляции трансляции и стабильности мРНК *УВ-3*. Возможно, благодаря этому взаимодействию, осуществляется связь между регуляцией трансляции и регуляцией стабильности мРНК *УВ-1*. Вполне может быть, что как и в случае некоторых мРНК (*c-fos*, *c-myc* [527, 528]), существует механизм деградации молекул мРНК, который связан с эффективностью трансляции мРНК, при котором важную роль играет не только *УВ-1*, но и другие связывающиеся с НТО мРНК *УВ-3* белки. Хорошим кандидатом на роль еще одного белка – регулятора трансляции и стабильности мРНК *УВ-1* является белок (или возможно 2 белка) молекулярной массы около 35 кДа, специфически взаимодействующий с 5'НТО мРНК *УВ-3*. Примечательно, что его связывание с этой областью обратно зависит от связывания *УВ-1*. Возможно, этот белок взаимодействует и с 3'НТО мРНК *УВ-3*, по крайней мере УФ-сшивки показывают связывание похожих по электрофоретической подвижности белков. Идентификация этих белков поможет в будущем выяснить их роль в регуляции трансляции и стабильности мРНК *УВ-3*.

Следует отметить, что примеров регуляции белками трансляции или стабильности собственной мРНК у эукариот не так много. Можно привести в пример регуляцию синтеза РАВР за счет связывания с 5'НТО собственной мРНК [529], регуляцию трансляции мРНК *eIF1* [530] за счет влияния на выбор стартового кодона самим *eIF1* и влияние TDP-43 на стабильность собственной мРНК за счет связывания с 3'НТО [531]. Уникальность ситуации с *УВ-1* состоит в том, что он может контролировать не только собственный синтез, но и синтез своего гомолога, таким образом поддерживая в клетке постоянный уровень *У*-бокс-связывающих белков.

Что может быть следствием регуляции синтеза *УВ-3* белком *УВ-1*? Известно, что развитие множественной лекарственной устойчивости и эпителиально-мезенхимального перехода коррелирует с количеством *УВ-1* и его субклеточным распределением [17, 118, 532]. Вышеописанные данные свидетельствуют о том, что изменение количества *УВ-1* должно влечь за собой изменение количества *УВ-3*, что может способствовать указанным выше процессам,

поскольку YB-3 также является их предполагаемым участником. Также преднамеренный нокдаун YB-1 (например, с помощью siRNA) при лечении некоторых заболеваний может повышать экспрессию YB-3, что может как компенсировать дефицит экспрессии YB-1, так и вызывать новые неожиданные и, вероятно, негативные эффекты.

#### 4. Функциональная взаимозаменяемость YB-1 и YB-3

Предыдущие исследования показали возможность взаимозаменяемости YB-1 и YB-3 при выполнении их функций в клетке. По крайней мере тех, что основаны на взаимодействии с РНК. Действительно ли это так? Чтобы ответить на этот вопрос, было решено исследовать методами высокопроизводительного секвенирования изменения в количестве и трансляции мРНК при экспрессии в клетках генов двух Y-бокс-связывающих белков или одного из них по сравнению с клетками, не экспрессирующими *YB-1* и *YB-3*.

##### 4.1. Получение клеток НЕК293Т с различным уровнем экспрессии *YB-1* и *YB-3*

Для этого необходимо было использовать наряду с клетками НЕК293ТΔΔ (с нокаутом генов *YB-1* и *YB-3*), эти же клетки, но синтезирующие YB-1, YB-3 или оба белка. Для решения этой проблемы было решено получить клеточные линии на основе клеток НЕК293ТΔΔ, стабильно экспрессирующие полноразмерные (содержащие нетранслируемые области) мРНК *YB-1* или/и *YB-3*.

В вектор pcDNA3.1-Puro были вставлены кДНК *YB-1* (pcDNA3.1-Puro-YB-1), кДНК *YB-3* (pcDNA3.1-Puro-YB-3), а также обе кДНК одновременно (pcDNA3.1-Puro-YB-1&YB-3). Далее полученные плазмиды линейаризовали и трансфицировали ими клетки НЕК293ТΔΔ. Через 24 часа переводили клетки на среду, содержащую пурамицин (устойчивость к которому обеспечивалась плазмидой), и культивировали их в течение 2 недель, периодически меняя среду. Линейаризованная плазида с небольшой вероятностью встраивается в хромосомную ДНК (место встраивания непредсказуемо), при этом клетки, в которых это произошло, способны выживать на среде с пурамицином. Можно было ожидать, что в таких клетках мРНК *YB-1* и мРНК *YB-3* с нативными НТО будут синтезироваться в меньшем количестве, а их трансляция будет контролироваться белком YB-1. Действительно, Иммуноблот-анализ клеточных лизатов на количество белков YB-1 и YB-3 показал, что белок YB-1 экспрессируется в клетках НЕК293ТΔΔ+YB-1 и НЕК293ТΔΔ+YB-1+YB-3, полученных с помощью плазмид pcDNA3.1-Puro-YB-1 и pcDNA3.1-Puro-YB-1&YB-3 на том же уровне, что и в исходных клетках НЕК293Т (из которых получали НЕК293ТΔΔ). Важно, что в клетках НЕК293ТΔΔ+YB-3, полученных с помощью плазмиды pcDNA3.1-Puro-YB-3, количество YB-3 заметно выше, чем во всех остальных линиях. Это объясняется тем, что в этих клетках отсутствует YB-1, который, как было показано ранее, является ингибитором трансляции мРНК *YB-3*. Поэтому в таких клетках синтез YB-3 не контролируется. Если же в клетках синтезируется еще и YB-1 (как в клетках НЕК293ТΔΔ+YB-1+YB-3), то количество YB-3 заметно снижается до примерно того же уровня как в исходных клетках НЕК293Т (Рис. 74).



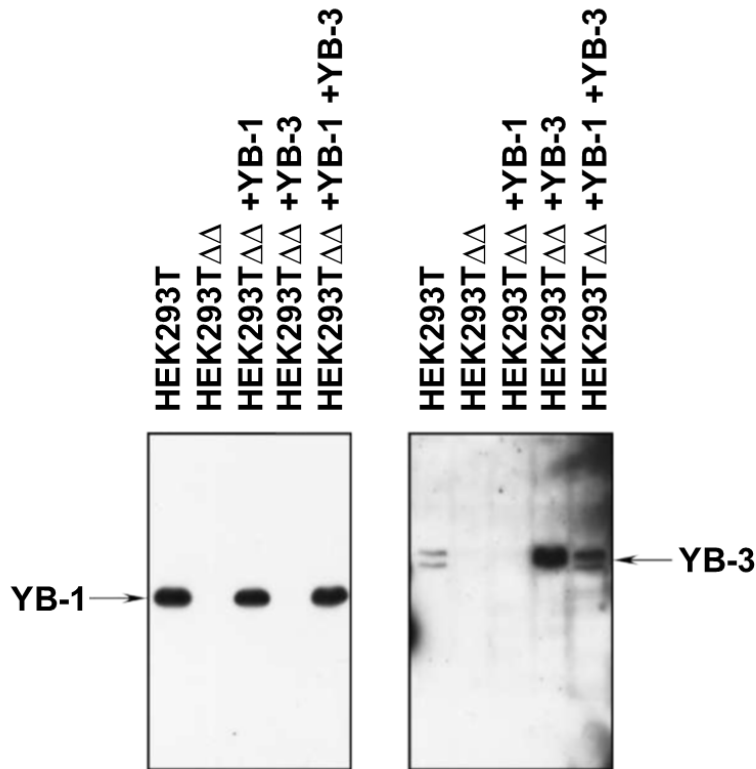


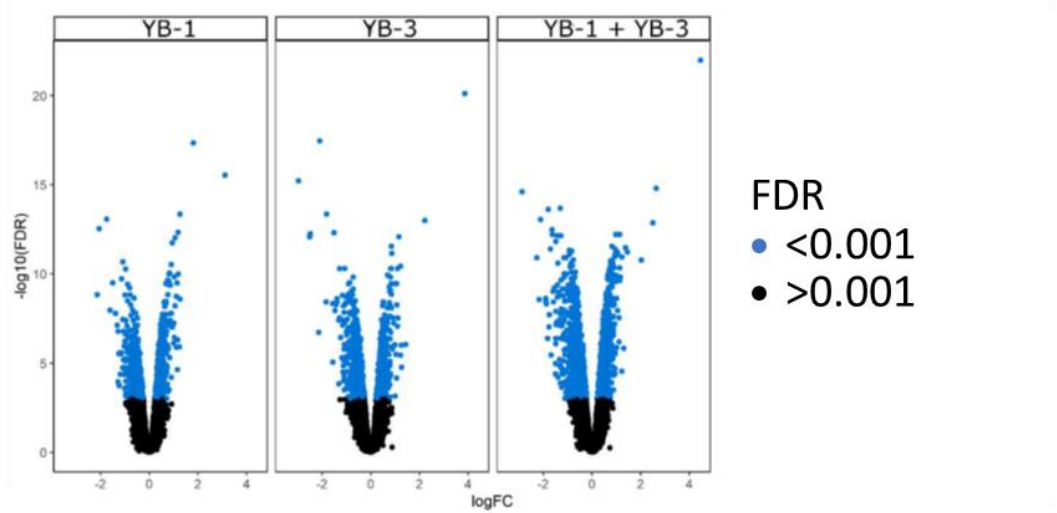
Рисунок 74. Анализ лизатов клеток HEK293T и клеток HEK293TΔYB-1ΔYB-3, экспрессирующих *YB-1* и/или *YB-3*, методом иммуноблоттинга. Лизаты уравновешены по тотальному белку.

#### 4.2. Анализ изменений транскриптома и транслатома клеток HEK293T с различным уровнем экспрессии *YB-1* и *YB-3*

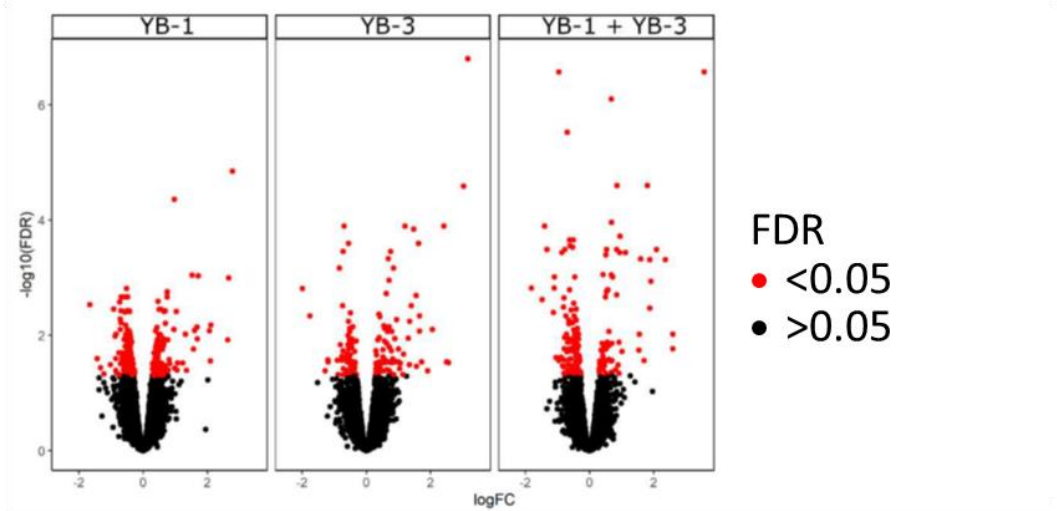
Из клеток HEK293T с разным уровнем экспрессии *YB-1* и *YB-3* были получены лизаты для приготовления библиотек RNA-Seq и Ribo-Seq, их последующего секвенирования и анализа дифференциальной экспрессии генов при восстановлении синтеза одного или обоих Y-бокс связывающих белков по сравнению с клетками с двойным нокаутом Y-бокс-связывающих белков. (Верификация этих данных Ribo-Seq и RNA-Seq представлены в разделе 2 Приложения.)

Изменение эффективности трансляции оценивалось по изменению занятости рибосомами РНК (соотношение Ribo-Seq/RNA-Seq). На рисунке 75 представлены диаграммы зависимости статистической значимости от амплитуды изменения (Volcano-диаграммы), на которых можно заметить, что для всех клеточных линий характерны небольшие по амплитуде (Fold Change) изменения как в RNA-Seq, так и в эффективности трансляции. При этом количество значимо изменившихся генов существенно выше для изменения в РНК.

А

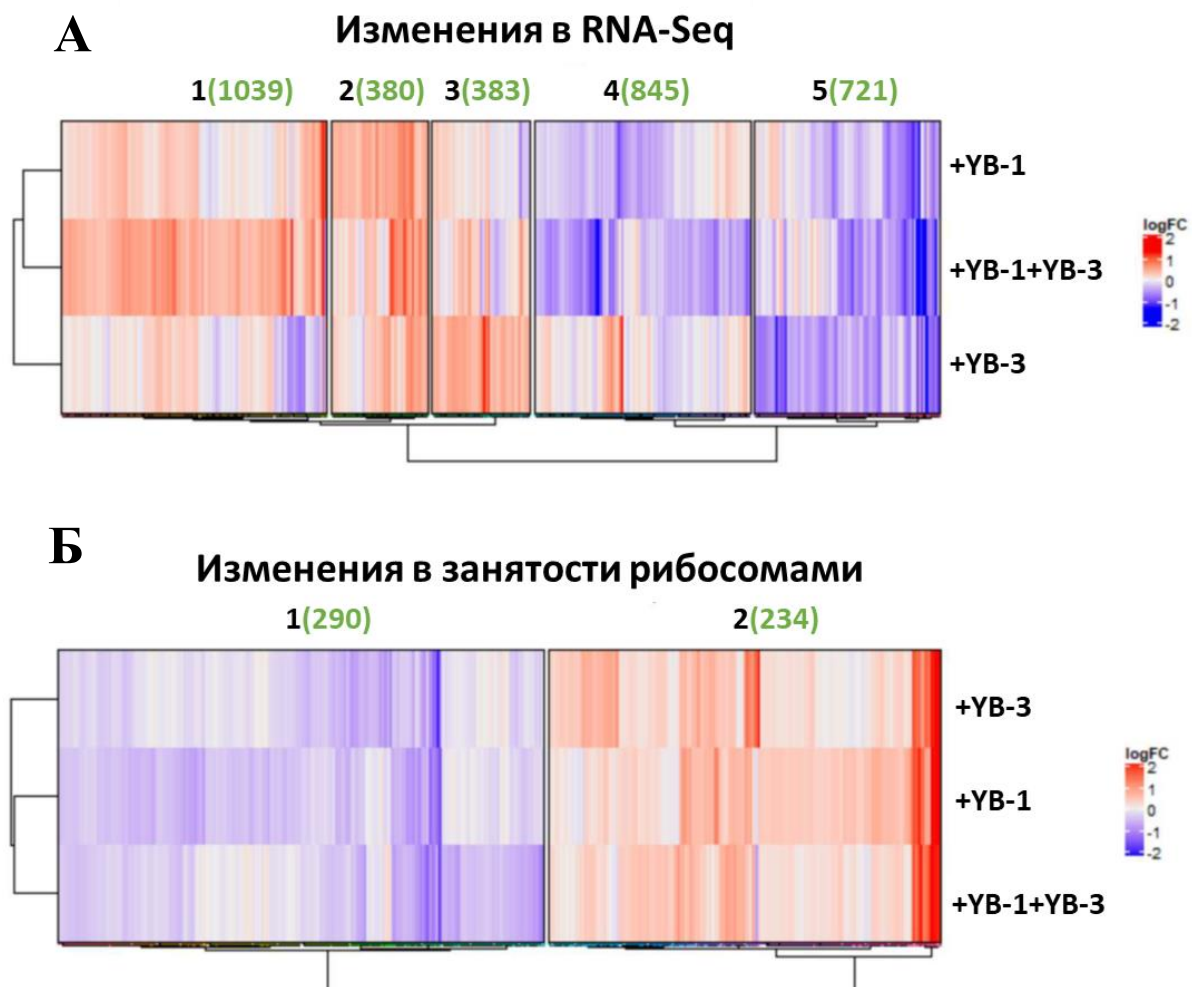


Б



**Рисунок 75.** Зависимость статистической значимости (ось Y) и степени изменения экспрессии (logFC) (Volcano-диаграмма), построенная по данным RNA-Seq (А) и занятости рибосомами (эффективности трансляции) (Б). Дифференциальная экспрессия рассчитана относительно клеток с двойным нокаутом Y-бокс-связывающих белков (НЕК293ТΔYB-1ΔYB-3).

Следует отметить, что полученный массив данных довольно велик и требует тщательного анализа. В этой же части работы основное внимание будет уделено ответу на вопрос о том, могут ли YB-1 и YB-3 функционально заменять друг друга. Для ответа на этот вопрос была проанализирована согласованность изменения эффективности трансляции или количества РНК в клетках, экспрессирующих YB-1, YB-3 или оба белка. Для этого была проведена кластеризация генов. На рисунке 76 представлены так называемые тепловые карты изменений количества РНК и эффективности трансляции. В анализ были взяты только те гены, которые наиболее значительно изменились ( $FDR < 0.001$  для РНК,  $FDR < 0.05$  для эффективности трансляции) хотя бы в одной клеточной линии. Видно, что в отличие от изменений в эффективности трансляции (2 кластера), изменения в количестве РНК значительно различаются между клетками (5 кластеров).



**Рисунок 76.** Тепловые карты изменений количества РНК (А) и эффективности трансляции (Б) в клетках, экспрессирующих различные Y-бокс-связывающие белки. Представлены гены, значительно изменившиеся ( $FDR < 0.001$  для РНК,  $FDR < 0.05$  для эффективности трансляции) хотя бы в одной клеточной линии. Сравнение проведено относительно клеток с двойным нокаутом Y-бокс-связывающих белков. Кластерный анализ сделан с помощью пакетов dendextend и ComplexHeatmap для R. Количество генов в кластере указано зеленым. Красный цвет – увеличение количества мРНК или занятости рибосомами, синий – уменьшение ( $\log_{2}FC$  – логарифм кратности изменений).

Все гены с изменившимся количеством транскрибируемой РНК (Рис. 76А, Рис. 77), можно разделить на 5 кластеров:

1. Количество РНК наиболее сильно возросло в клетках с экспрессией обоих белков одновременно. Этот кластер обогащен генами, чьи продукты участвуют трансляции, клеточном цикле и протеолизе;

2. Количество РНК возросло во всех клеточных линиях (экспрессирующих либо YB-1, либо YB-3, либо оба белка). В этом кластере много мРНК, чьи продукты участвуют в клеточном старении;

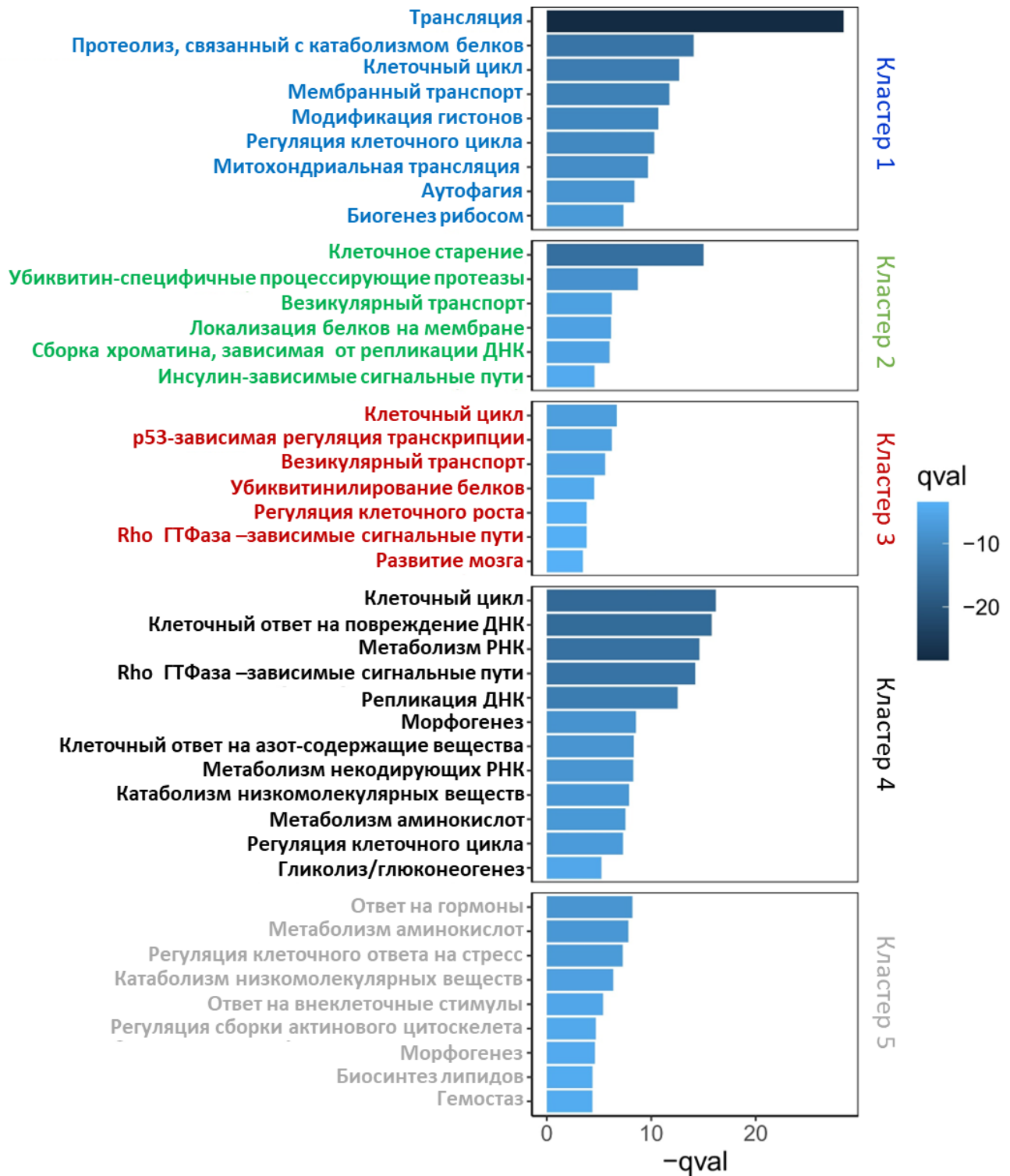
3. Количество РНК наиболее сильно возросло в клетках с экспрессией YB-3. Этот кластер обогащен мРНК, чьи продукты участвуют в клеточном цикле, р53-зависимой регуляции транскрипции, везикулярном транспорте;

4. Количество РНК упало в клетках с экспрессией YB-1 или обоих белков. К этому кластеру относятся мРНК, чьи продукты важны в таких процессах как метаболизм ДНК и РНК, репликация ДНК, ответ на повреждение ДНК и клеточный цикл;

5. Количество РНК упало во всех клеточных линиях, экспрессирующих хотя бы один YB-белок. В этом кластере много мРНК, чьи продукты участвуют в метаболизме аминокислот, в клеточном ответе на стресс и гормоны.

Видно, что некоторые процессы обогащены в нескольких различных кластерах, например, регуляция клеточного цикла. Это говорит о том, что различные гены, участвующие в этом процессе, по-разному изменяют свою экспрессию при экспрессии разных Y-бокс-связывающих белков в клетке. Важно отметить, что изменения в количестве РНК при экспрессии YB-1 или YB-3 слабо положительно коррелируют ( $r$ -Пирсона  $\sim 0.3$ ,  $P < 10^{-15}$ , Рис. 78А) и лишь около 20% значимо изменившихся генов - общие для клеточных линий, экспрессирующих только YB-1 или только YB-3. Возможно, для этого набора РНК *YB-1* и *YB-3* могут функционально заменять друг друга либо на этапе транскрипции РНК, либо на уровне регуляции стабильности мРНК.

Что касается трансляции, то изменения в эффективности трансляции при экспрессии Y-бокс-связывающих белков хорошо согласуются между всеми тремя клеточными линиями (экспрессирующими либо *YB-1*, либо *YB-3*, либо оба гена), а все гены с изменившейся эффективностью трансляции мРНК (Рис. 76Б, Рис. 79) можно разделить всего на 2 кластера. Среди мРНК, чья трансляция активируется при экспрессии Y-бокс-связывающих белков - мРНК белков, участвующих в сплайсинге, транспорте РНК и делении клеток (в том числе в анафазе и цитокинезе). Среди мРНК, чья трансляция снижается при экспрессии Y-бокс-связывающих белков - мРНК белков, участвующих в трансляции (в том числе рибосомных белков и белков биогенеза рибосом) и клеточном дыхании.



**Рисунок 77.** Избранные функциональные группы, которыми обогащены кластеры генов, для которых значительно меняется количество РНК в клеточных линиях с экспрессией различных Y-бокс-связывающих белков. Обогащение рассчитано с помощью сервиса metascapе.org. Более темная окраска соответствует более значимому обогащению.

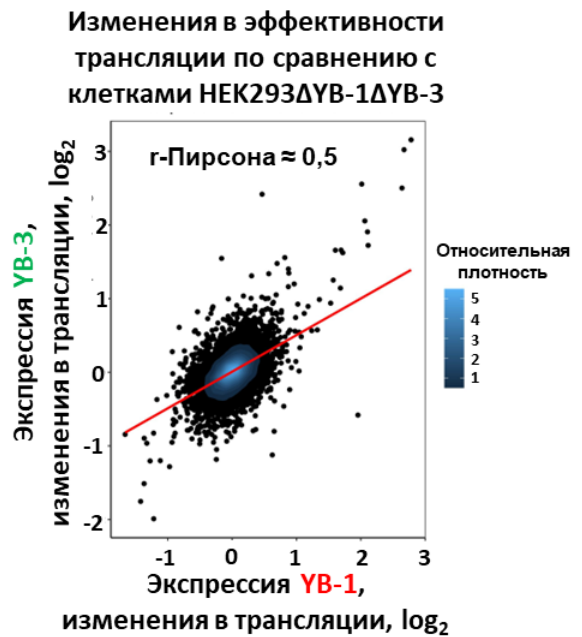
Но самое важное в контексте основной задачи этой части исследования состоит в том, что изменения в эффективности трансляции при экспрессии YB-1 или YB-3 коррелируют значительно лучше, чем изменения в РНК ( $r$ -Пирсона  $\sim 0.5$ ,  $P < 10^{-15}$ , Рис. 78Б). Данные факты

могут говорить о том, что белки YB-1 и YB-3 могут функционально заменять друг друга в большей степени в регуляции трансляции.

А



Б



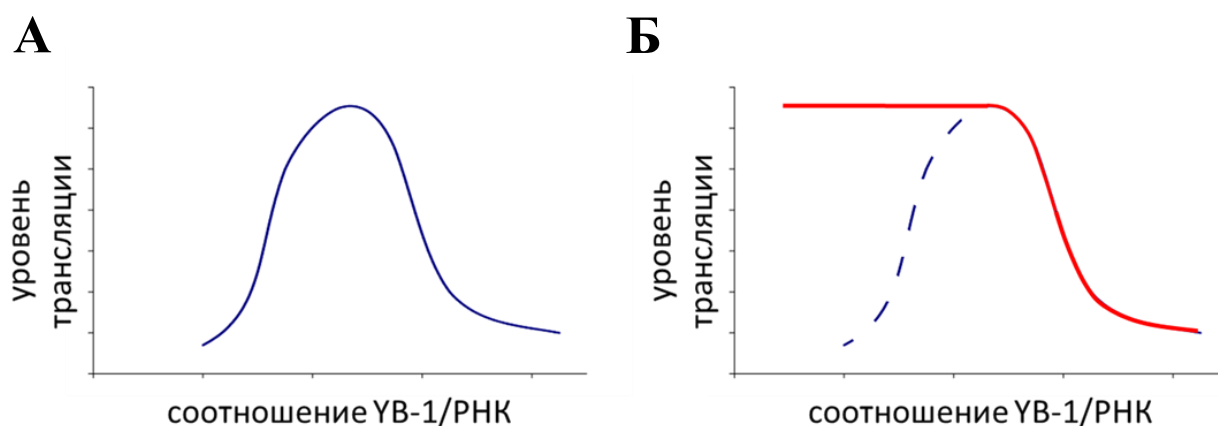
**Рисунок 78.** YB-1 и YB-3 частично заменяют друг друга в РНК-зависимых функциях. Корреляция изменений (относительно клеток НЕК293ΔYB-1ΔYB-3) содержания РНК (RNA-Seq, слева) или занятости рибосомами (справа) между клетками НЕК293ΔYB-1ΔYB-3 + YB-1 и НЕК293ΔYB-1ΔYB-3 + YB-3). Цвет отражает относительную плотность точек. Показана прямая линейной регрессии и коэффициент корреляции г-Пирсона.  $r$  значим (значение  $P < 10^{-15}$ ).



**Рисунок 79.** Избранные функциональные группы, которыми обогащены кластер 1 (эффективность трансляции упала при экспрессии Y-бокс-связывающих белков) и кластер 2 (эффективность трансляции возросла при экспрессии Y-бокс-связывающих белков). Обогащение рассчитано с помощью сервиса metascapre.org. Более темная окраска соответствует более значимому обогащению.

Подводя краткие итоги этого раздела, можно сказать следующее. Наши эксперименты с клетками, не экспрессирующими YB-1 и YB-3 и экспрессирующими один из них или оба белка, показали, что функциональная взаимозаменяемость YB-1 и YB-3 – это возможное явление. Однако наиболее выражена она в трансляционных функциях YB-белков. Именно на

этом этапе экспрессии генов наблюдается более сильная корреляция изменений, вызванных экспрессией YB-1 и YB-3. При этом наблюдается и совпадение модальности YB-1 и YB-3: они оба подавляют трансляцию некоторого набора мРНК и стимулируют трансляцию другого набора мРНК. Подобного нельзя сказать в отношении влияния YB-белков на транскриптом клеток. В этом случае, помимо группы генов, чья экспрессия регулируется одинаковым образом и YB-1, и YB-3, имеют место и другие механизмы регуляции количества мРНК. В частности, можно выделить группу генов наиболее сильно регулируемых только YB-3, или группу генов, чья экспрессия подавляется только белком YB-1. Кроме того, вероятно, возможна ситуация, когда можно наблюдать аддитивный эффект от экспрессии YB-1 и YB-3. Можно предположить, что такое разнообразие эффектов YB-1 и YB-3 на количество мРНК в клетке связано с тем, что YB-белки могут влиять не только на транскрипцию, но и на стабильность мРНК. Кроме того, эффект YB-белков на транскрипцию, в отличие от трансляции, в большей степени зависит от их белков-партнеров, а они у YB-1 и YB-3 могут быть разными.



**Рисунок 80. Влияние белка YB-1 на трансляцию мРНК в клетках.** А. Схема, построенная на основе экспериментов в лизате ретикулоцитов кролика и справедливая для глобиновых мРНК [113]. Б. Схема, построенная на основании результатов диссертационной работы и описывающая поведение большинства клеточных мРНК (красная линия). Для небольшого набора мРНК (порядка нескольких сотен) наблюдается ингибирование или стимуляция трансляции при низких соотношениях YB-1/мРНК (не показано на графике).

Кроме того, полученные результаты меняют наши представления о YB-1 как о глобальном регуляторе трансляции. Эти представления были разработаны на основе экспериментов в бесклеточной системе трансляции на основе лизата ретикулоцитов кролика, и согласно им YB-1 при добавлении в систему трансляции сначала стимулирует трансляцию, а затем её ингибирует (Рис. 80А). Вполне возможно, что это справедливо для ретикулоцитов кролика и для глобиновых мРНК, которые составляют значительную долю мРНК в этих клетках. Однако влияние YB-1 на трансляцию мРНК в культивируемых клетках, вероятно, описывается иначе (Рис. 80Б). Можно сказать, что до определенного уровня эффект YB-1 на

трансляцию большинства мРНК незначителен или вовсе отсутствует. Лишь для небольшого набора мРНК (несколько сотен) YB-1 является либо стимулятором их трансляции, либо ингибитором (Рис. 76Б). При увеличении же количества YB-1 в клетке выше этого уровня он оказывает неспецифическое ингибирующее действие на трансляцию подавляющего количества мРНК.

Наконец из результатов, представленных на рисунке 75, следует, что эффект YB-1 и YB-3 на экспрессию генов в первую очередь обусловлен регуляцией ими количества мРНК, и в меньшей степени регуляцией трансляции. Таким образом, вполне вероятно, что в ситуации когда в клетке содержится оптимальное количество YB-белков, они в основном контролируют синтез (транскрипцию) или стабильность мРНК, в то время как их регуляторная функция в трансляции еще не столь выражена, как при их оверэкспрессии. Однако нельзя исключать, что наблюдаемая разница обусловлена непрямыми эффектами экспрессии YB-белков, например, их влиянием на экспрессию одного или нескольких генов, контролируемых, в свою очередь, экспрессию большого количества генов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения настоящей работы решались две основные проблемы – регуляция синтеза белка YB-1 и его функционирование. Эти исследования «эволюционировали» от экспериментов *in vitro* до более сложных опытов на живых эукариотических клетках и привели к нескольким важным выводам.

Первый вывод состоит в том, что авторегуляцию трансляции мРНК *YB-1* можно наблюдать в культивируемых эукариотических клетках. На данный момент можно говорить, что ингибирующее действие YB-1 на трансляцию собственной мРНК опосредовано нетранслируемыми областями. Однако какая из НТО вносит решающий вклад в этот процесс, сказать до сих пор трудно. С одной стороны, эксперименты *in vitro* говорят о том, что регуляторного элемента в 3'НТО мРНК *YB-1* достаточно для ингибирующего влияния YB-1, но в экспериментах на культурах эукариотических клеток ситуация может быть сложнее. В литературе имеются данные, что в авторегуляцию синтеза YB-1, как негативную, так и позитивную, вовлечена 5'НТО мРНК *YB-1*. Вероятно, в зависимости от клеточного контекста и от дополнительных белков, взаимодействующих с НТО мРНК *YB-1*, эффект YB-1 на трансляцию собственной мРНК может меняться. Этими дополнительными белками, в частности, являются PABP и hnRNP Q. В этой связи изучение механизма регуляции трансляции мРНК *YB-1* белком YB-1 всё еще требует внимательного изучения.

Второй важный вывод, который можно сделать из данной работы, состоит в том, что синтез белка YB-1 зависит от пролиферативного статуса клеток. Замедление клеточного деления, вызванного отсутствием стимулирующих его факторов, приводит к снижению синтеза



YB-1 и впоследствии к снижению его количества. Ключевую роль в этом играет активность mTOR-сигнального каскада. Неактивный mTOR-сигнальный каскад приводит к снижению трансляции матриц, сильно зависящих в том числе от активности канонических факторов инициации трансляции (eIF4E, eIF4A). К таким мРНК относится и мРНК *YB-1*. Указанная зависимость мРНК *YB-1* обусловлена её 5'НТО, особенности первичной или вторичной структуры которой, а также, вероятно, белки взаимодействующие с ней, делают мРНК *YB-1* чувствительной к ключевым компонентам кэп-зависимой трансляции.

Интересно, что недавно на клетках глиобластомы было показано участие YB-1 в стимуляции активности mTOR-киназного комплекса. Таким образом, можно проследить положительную обратную связь между активностью mTORC и количеством YB-1, а сам YB-1 можно рассматривать не только как мишень сигнальных каскадов, регулирующих клеточный рост и деление, но и как компонент этих каскадов, контролирующей их активность.

Третье достижение данной работы состоит в открытии альтернативных форм мРНК *YB-1*, которые образуются за счет минорных стартов транскрипции в первом интроне гена *YBX1*, и удлиненной с N-конца формы белка YB-1, образующейся за счет инициации трансляции на неканоническом стартовом кодоне AUC в 5'НТО основной формы мРНК *YB-1*, находящемся в той же рамке считывания, что и основной стартовый AUG-кодон. В случае альтернативных форм мРНК *YB-1*, инициация их трансляции также происходит не на каноническом AUG-кодоне, а продуктом трансляции является белок YB-1 без N-концевого домена. Количество альтернативных форм YB-1 в клетках и тканях, вероятно, мало по сравнению с основной формой белка YB-1 и мРНК *YB-1*, однако может достигать значимого уровня в некоторых тканях или в раковых клетках. В случае последних, наличие альтернативных форм мРНК *YB-1* может рассматриваться как диагностический признак. Не исключено также, что формы белка YB-1 с удлиненным N-концевым доменом или вовсе без него могут обладать иными свойствами и функциями по сравнению с основной формой белка YB-1, что может влиять на регуляцию экспрессии генов-мишеней YB-1.

Четвертый важный результат работы говорит о том, что нокаут гена *YBX1* в клетках не приводит к глобальным изменениям в транскриптоме и транслатоме благодаря повышению в клетках количества гомолога YB-1 – белка YB-3, который способен заменять YB-1 по крайней мере в РНК-зависимых функциях – в первую очередь, в трансляции. Кроме того, было установлено, что указанное повышение количества YB-3 связано с регуляцией белком YB-1 трансляции и стабильности мРНК *YB-3* за счет его прямого взаимодействия с нетранслируемыми областями этой мРНК. Белок YB-1, регулируя трансляцию собственной мРНК и мРНК *YB-3*, поддерживает уровень и соотношение двух Y-бокс-связывающих белков на уровне, вероятно, оптимальном для регуляции экспрессии генов, зависящих от этих YB-

белков. А это, в первую очередь, согласно предварительным результатам настоящей работы, гены, вовлеченные в прохождение клеточного цикла, РНК-зависимые процессы (трансляция, сплайсинг), репарацию ДНК и окислительное фосфорилирование.

Наконец, важен еще один вопрос, который поднимает факт существования регуляции синтеза YB-3 белком YB-1: какие последствия может иметь такая регуляция в практическом, медицинском смысле? Известно, что с количеством YB-1 и его ядерно-цитоплазматическим распределением коррелирует развитие таких процессов как множественная лекарственная устойчивость, эпителиально-мезенхимальный переход. Однако при изменении количества YB-1 количество YB-3 также должно изменяться. Возможно, это также вносит вклад в развитие вышеуказанных процессов, поскольку YB-3 может в них участвовать. Кроме того, предполагаемое использование при терапии некоторых заболеваний выключение синтеза YB-1 может повышать экспрессию YB-3, что может как компенсировать экспрессию YB-1, так и привносить новые неожиданные и, возможно, негативные эффекты.

## ВЫВОДЫ

1. Авторегуляцию трансляции мРНК *YB-1*, ранее обнаруженную в бесклеточной системе трансляции, можно наблюдать в культивируемых эукариотических клетках. Ингибирующее действие *YB-1* на трансляцию собственной мРНК опосредовано её нетранслируемыми областями.
2. Помимо *YB-1* и PABP, в регуляции трансляции мРНК *YB-1* может принимать участие белок гетерогенных ядерных мРНК Q (hnRNP Q). Усиливая взаимодействие *YB-1* с 3'НТО мРНК *YB-1* и ослабляя взаимодействие с ней PABP, hnRNP Q ингибирует трансляцию мРНК *YB-1* в бесклеточной системе трансляции.
3. Синтез белка *YB-1* зависит от пролиферативного статуса клеток. Замедление клеточного деления приводит к снижению синтеза *YB-1*. Ключевую роль в этом играют активность mTOR-сигнального каскада и 5' нетранслируемая область мРНК *YB-1*.
4. Альтернативные формы мРНК *YB-1* образуются за счет минорных стартов транскрипции в первом интроне гена *YBX1* и способны транслироваться. Инициация их трансляции происходит не на каноническом AUG-кодоне, а на смежной паре кодонов AUCGUG. Продуктом трансляции альтернативных форм мРНК *YB-1* является белок *YB-1* без N-концевого домена. С основной формы мРНК *YB-1*, помимо основного продукта (белка *YB-1*), синтезируется удлиненная с N-конца форма белка *YB-1*, образующаяся за счет инициации трансляции на неканоническом стартовом кодоне AUC в 5'НТО, находящемся в той же рамке считывания, что и основной стартовый AUG-кодон.
5. Нокаут гена *YBX1* в клетках HEK293T не приводит к глобальным изменениям в транскриптоме и транслатоме благодаря повышению в клетках количества гомолога *YB-1* – белка *YB-3*, который способен заменять *YB-1* по крайней мере в РНК-зависимых функциях – в первую очередь, в трансляции.
6. Белок *YB-1* регулирует трансляцию и стабильность мРНК *YB-3* за счет его прямого взаимодействия с нетранслируемыми областями этой мРНК.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cohen, I., and Reynolds, W. F. (1991) The Xenopus YB3 protein binds the B box element of the class III promoter, *Nucleic Acids Res.*, **19**, 4753-4759, doi: 10.1093/nar/19.17.4753.
2. Didier, D. K., Schiffenbauer, J., Woulfe, S. L., Zacheis, M., and Schwartz, B. D. (1988) Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 7322-7326, doi: 10.1073/pnas.85.19.7322.
3. Gai, X. X., Lipson, K. E., and Prystowsky, M. B. (1992) Unusual DNA binding characteristics of an in vitro translation product of the CCAAT binding protein mYB-1, *Nucleic Acids Res.*, **20**, 601-606, doi: 10.1093/nar/20.3.601.
4. Ozer, J., Faber, M., Chalkley, R., and Sealy, L. (1990) Isolation and characterization of a cDNA clone for the CCAAT transcription factor EFIA reveals a novel structural motif, *J. Biol. Chem.*, **265**, 22143-22152,
5. Tafuri, S. R., and Wolffe, A. P. (1990) Xenopus Y-box transcription factors: molecular cloning, functional analysis and developmental regulation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 9028-9032, doi: 10.1073/pnas.87.22.9028.
6. Tafuri, S. R., and Wolffe, A. P. (1992) DNA binding, multimerization, and transcription stimulation by the Xenopus Y box proteins in vitro, *New Biol*, **4**, 349-359,
7. Blobel, G. (1972) Protein tightly bound to globin mRNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 88-95, doi: 10.1016/s0006-291x(72)80014-7.
8. Darnbrough, C. H., and Ford, P. J. (1981) Identification in *Xenopus laevis* of a class of oocyte-specific proteins bound to messenger RNA, *Eur. J. Biochem.*, **113**, 415-424, doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb05081.x.
9. Kumar, A., and Pederson, T. (1975) Comparison of proteins bound to heterogeneous nuclear RNA and messenger RNA in HeLa cells, *J. Mol. Biol.*, **96**, 353-365, doi: 10.1016/0022-2836(75)90165-5.
10. Lindberg, U., and Sundquist, B. (1974) Isolation of messenger ribonucleoproteins from mammalian cells, *J. Mol. Biol.*, **86**, 451-468, doi: 10.1016/0022-2836(74)90030-8.
11. Morel, C., Gander, E. S., Herzberg, M., Dubochet, J., and Scherrer, K. (1973) The duck-globin messenger-ribonucleoprotein complex. Resistance to high ionic strength, particle gel electrophoresis, composition and visualisation by dark-field electron microscopy, *Eur. J. Biochem.*, **36**, 455-464, doi: 10.1111/j.1432-1033.1973.tb02930.x.
12. Morel, C., Kayibanda, B., and Scherrer, K. (1971) Proteins associated with globin messenger RNA in avian erythroblasts: Isolation and comparison with the proteins bound to nuclear messenger-like RNA, *FEBS Lett.*, **18**, 84-88, doi: 10.1016/0014-5793(71)80413-1.
13. van Venrooij, W. J., van Eekelen, C. A., Jansen, R. T., and Princen, J. M. (1977) Specific poly-A-binding protein of 76,000 molecular weight in polyribosomes is not present on poly A of free cytoplasmic mRNP, *Nature*, **270**, 189-191, doi: 10.1038/270189a0.
14. Murray, M. T., Schiller, D. L., and Franke, W. W. (1992) Sequence analysis of cytoplasmic mRNA-binding proteins of *Xenopus* oocytes identifies a family of RNA-binding proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 11-15, doi: 10.1073/pnas.89.1.11.
15. Tafuri, S. R., Familiari, M., and Wolffe, A. P. (1993) A mouse Y box protein, MSY1, is associated with paternal mRNA in spermatocytes, *J. Biol. Chem.*, **268**, 12213-12220,
16. Evdokimova, V. M., Wei, C. L., Sitikov, A. S., Simonenko, P. N., Lazarev, O. A., Vasilenko, K. S., Ustinov, V. A., Hershey, J. W., and Ovchinnikov, L. P. (1995) The major protein of messenger ribonucleoprotein particles in somatic cells is a member of the Y-box binding transcription factor family, *J. Biol. Chem.*, **270**, 3186-3192, doi: 10.1074/jbc.270.7.3186.
17. Eliseeva, I. A., Kim, E. R., Guryanov, S. G., Ovchinnikov, L. P., and Lyabin, D. N. (2011) Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions, *Biochemistry (Mosc)*, **76**, 1402-1433, doi: 10.1134/S0006297911130049.

18. Kleene, K. C. (2018) Y-box proteins combine versatile cold shock domains and arginine-rich motifs (ARMs) for pleiotropic functions in RNA biology, *Biochem. J.*, **475**, 2769-2784, doi: 10.1042/BCJ20170956.
19. Kloks, C. P., Spronk, C. A., Lasonder, E., Hoffmann, A., Vuister, G. W., Grzesiek, S., and Hilbers, C. W. (2002) The solution structure and DNA-binding properties of the cold-shock domain of the human Y-box protein YB-1, *J. Mol. Biol.*, **316**, 317-326, doi: 10.1006/jmbi.2001.5334.
20. Yang, X. J., Zhu, H., Mu, S. R., Wei, W. J., Yuan, X., Wang, M., Liu, Y., Hui, J., and Huang, Y. (2019) Crystal structure of a Y-box binding protein 1 (YB-1)-RNA complex reveals key features and residues interacting with RNA, *J. Biol. Chem.*, **294**, 10998-11010, doi: 10.1074/jbc.RA119.007545.
21. Kloks, C. P., Tessari, M., Vuister, G. W., and Hilbers, C. W. (2004) Cold shock domain of the human Y-box protein YB-1. Backbone dynamics and equilibrium between the native state and a partially unfolded state, *Biochemistry*, **43**, 10237-10246, doi: 10.1021/bi049524s.
22. Guryanov, S. G., Filimonov, V. V., Timchenko, A. A., Melnik, B. S., Kihara, H., Kutysenko, V. P., Ovchinnikov, L. P., and Semisotnov, G. V. (2013) The major mRNP protein YB-1: structural and association properties in solution, *Biochim. Biophys. Acta*, **1834**, 559-567, doi: 10.1016/j.bbapap.2012.11.007.
23. Petrosian, S. A., and Makhatadze, G. I. (2000) Contribution of proton linkage to the thermodynamic stability of the major cold-shock protein of Escherichia coli CspA, *Protein Sci.*, **9**, 387-394, doi: 10.1110/ps.9.2.387.
24. Hillier, B. J., Rodriguez, H. M., and Gregoret, L. M. (1998) Coupling protein stability and protein function in Escherichia coli CspA, *Fold Des*, **3**, 87-93, doi: 10.1016/S1359-0278(98)00014-5.
25. Rodriguez, H. M., Vu, D. M., and Gregoret, L. M. (2000) Role of a solvent-exposed aromatic cluster in the folding of Escherichia coli CspA, *Protein Sci.*, **9**, 1993-2000, doi: 10.1110/ps.9.10.1993.
26. Schindler, T., Graumann, P. L., Perl, D., Ma, S., Schmid, F. X., and Marahiel, M. A. (1999) The family of cold shock proteins of Bacillus subtilis. Stability and dynamics in vitro and in vivo, *J. Biol. Chem.*, **274**, 3407-3413, doi: 10.1074/jbc.274.6.3407.
27. Rath, A., Davidson, A. R., and Deber, C. M. (2005) The structure of "unstructured" regions in peptides and proteins: role of the polyproline II helix in protein folding and recognition, *Biopolymers*, **80**, 179-185, doi: 10.1002/bip.20227.
28. Tompa, P., and Csermely, P. (2004) The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones, *FASEB J.*, **18**, 1169-1175, doi: 10.1096/fj.04-1584rev.
29. Tokuriki, N., Oldfield, C. J., Uversky, V. N., Berezovsky, I. N., and Tawfik, D. S. (2009) Do viral proteins possess unique biophysical features?, *Trends Biochem. Sci.*, **34**, 53-59, doi: 10.1016/j.tibs.2008.10.009.
30. Venyaminov, S. Y., and Gogia, Z. V. (1982) Optical characteristics of all individual proteins from the small subunit of Escherichia coli ribosomes, *Eur. J. Biochem.*, **126**, 299-309, doi: 10.1111/j.1432-1033.1982.tb06779.x.
31. Selivanova, O. M., Guryanov, S. G., Enin, G. A., Skabkin, M. A., Ovchinnikov, L. P., and Serdyuk, I. N. (2010) YB-1 is capable of forming extended nanofibrils, *Biochemistry (Mosc)*, **75**, 115-120, doi: 10.1134/s0006297910010153.
32. Guryanov, S. G., Selivanova, O. M., Nikulin, A. D., Enin, G. A., Melnik, B. S., Kretov, D. A., Serdyuk, I. N., and Ovchinnikov, L. P. (2012) Formation of amyloid-like fibrils by Y-box binding protein 1 (YB-1) is mediated by its cold shock domain and modulated by disordered terminal domains, *PLoS One*, **7**, e36969, doi: 10.1371/journal.pone.0036969.
33. Kato, M., Han, T. W., Xie, S., Shi, K., Du, X., Wu, L. C., Mirzaei, H., Goldsmith, E. J., Longgood, J., Pei, J., Grishin, N. V., Frantz, D. E., Schneider, J. W., Chen, S., Li, L., Sawaya, M. R., Eisenberg, D., Tycko, R., and McKnight, S. L. (2012) Cell-free formation of RNA

- granules: low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels, *Cell*, **149**, 753-767, doi: 10.1016/j.cell.2012.04.017.
34. Wang, N., Yamanaka, K., and Inouye, M. (2000) Acquisition of double-stranded DNA-binding ability in a hybrid protein between *Escherichia coli* CspA and the cold shock domain of human YB-1, *Mol. Microbiol.*, **38**, 526-534, doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.02146.x.
  35. Bouvet, P., Matsumoto, K., and Wolffe, A. P. (1995) Sequence-specific RNA recognition by the *Xenopus* Y-box proteins. An essential role for the cold shock domain, *J. Biol. Chem.*, **270**, 28297-28303, doi: 10.1074/jbc.270.47.28297.
  36. Izumi, H., Imamura, T., Nagatani, G., Ise, T., Murakami, T., Uramoto, H., Torigoe, T., Ishiguchi, H., Yoshida, Y., Nomoto, M., Okamoto, T., Uchiyumi, T., Kuwano, M., Funa, K., and Kohno, K. (2001) Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'→5' exonuclease activity, *Nucleic Acids Res.*, **29**, 1200-1207, doi: 10.1093/nar/29.5.1200.
  37. Pisarev, A. V., Skabkin, M. A., Thomas, A. A., Merrick, W. C., Ovchinnikov, L. P., and Shatsky, I. N. (2002) Positive and negative effects of the major mammalian messenger ribonucleoprotein p50 on binding of 40 S ribosomal subunits to the initiation codon of beta-globin mRNA, *J. Biol. Chem.*, **277**, 15445-15451, doi: 10.1074/jbc.M111954200.
  38. Skabkin, M. A., Kiselyova, O. I., Chernov, K. G., Sorokin, A. V., Dubrovin, E. V., Yaminsky, I. V., Vasiliev, V. D., and Ovchinnikov, L. P. (2004) Structural organization of mRNA complexes with major core mRNP protein YB-1, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 5621-5635, doi: 10.1093/nar/gkh889.
  39. Kretov, D. A., Clement, M. J., Lambert, G., Durand, D., Lyabin, D. N., Bollot, G., Bauvais, C., Samsonova, A., Budkina, K., Maroun, R. C., Hamon, L., Bouhss, A., Lescop, E., Toma, F., Curmi, P. A., Maucuer, A., Ovchinnikov, L. P., and Pastre, D. (2019) YB-1, an abundant core mRNA-binding protein, has the capacity to form an RNA nucleoprotein filament: a structural analysis, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 3127-3141, doi: 10.1093/nar/gky1303.
  40. Sakura, H., Maekawa, T., Imamoto, F., Yasuda, K., and Ishii, S. (1988) Two human genes isolated by a novel method encode DNA-binding proteins containing a common region of homology, *Gene*, **73**, 499-507, doi: 10.1016/0378-1119(88)90514-8.
  41. Spitkovsky, D. D., Royer-Pokora, B., Delius, H., Kisseljov, F., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., and Royer, H. D. (1992) Tissue restricted expression and chromosomal localization of the YB-1 gene encoding a 42 kD nuclear CCAAT binding protein, *Nucleic Acids Res.*, **20**, 797-803, doi: 10.1093/nar/20.4.797.
  42. Grant, C. E., and Deeley, R. G. (1993) Cloning and characterization of chicken YB-1: regulation of expression in the liver, *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 4186-4196, doi: 10.1128/mcb.13.7.4186-4196.1993.
  43. Kolluri, R., Torrey, T. A., and Kinniburgh, A. J. (1992) A CT promoter element binding protein: definition of a double-strand and a novel single-strand DNA binding motif, *Nucleic Acids Res.*, **20**, 111-116, doi: 10.1093/nar/20.1.111.
  44. Yan, C., and Tamm, I. (1991) Molecular cloning and characterization of interferon alpha/beta response element binding factors of the murine (2'-5')oligoadenylate synthetase ME-12 gene, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 144-148, doi: 10.1073/pnas.88.1.144.
  45. Hasegawa, S. L., Doetsch, P. W., Hamilton, K. K., Martin, A. M., Okenquist, S. A., Lenz, J., and Boss, J. M. (1991) DNA binding properties of YB-1 and dbpA: binding to double-stranded, single-stranded, and abasic site containing DNAs, *Nucleic Acids Res.*, **19**, 4915-4920, doi: 10.1093/nar/19.18.4915.
  46. Lenz, J., Okenquist, S. A., LoSardo, J. E., Hamilton, K. K., and Doetsch, P. W. (1990) Identification of a mammalian nuclear factor and human cDNA-encoded proteins that recognize DNA containing apurinic sites, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 3396-3400, doi: 10.1073/pnas.87.9.3396.

47. Deschamps, S., Viel, A., Garrigos, M., Denis, H., and le Maire, M. (1992) mRNP4, a major mRNA-binding protein from *Xenopus* oocytes is identical to transcription factor FRG Y2, *J. Biol. Chem.*, **267**, 13799-13802,
48. Minich, W. B., Maidebura, I. P., and Ovchinnikov, L. P. (1993) Purification and characterization of the major 50-kDa repressor protein from cytoplasmic mRNP of rabbit reticulocytes, *Eur. J. Biochem.*, **212**, 633-638, doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17701.x.
49. Murray, M. T. (1994) Nucleic acid-binding properties of the *Xenopus* oocyte Y box protein mRNP3+4, *Biochemistry*, **33**, 13910-13917, doi: 10.1021/bi00250a046.
50. Yu, J., Hecht, N. B., and Schultz, R. M. (2002) RNA-binding properties and translation repression in vitro by germ cell-specific MSY2 protein, *Biol. Reprod.*, **67**, 1093-1098, doi: 10.1095/biolreprod67.4.1093.
51. Tanabe, Y., Nagatoishi, S., and Tsumoto, K. (2015) Thermodynamic characterization of the interaction between the human Y-box binding protein YB-1 and nucleic acids, *Mol Biosyst*, **11**, 2441-2448, doi: 10.1039/c5mb00184f.
52. Marello, K., LaRovere, J., and Sommerville, J. (1992) Binding of *Xenopus* oocyte masking proteins to mRNA sequences, *Nucleic Acids Res.*, **20**, 5593-5600, doi: 10.1093/nar/20.21.5593.
53. MacDonald, G. H., Itoh-Lindstrom, Y., and Ting, J. P. (1995) The transcriptional regulatory protein, YB-1, promotes single-stranded regions in the DRA promoter, *J. Biol. Chem.*, **270**, 3527-3533, doi: 10.1074/jbc.270.8.3527.
54. Kljashtorny, V., Nikonov, S., Ovchinnikov, L., Lyabin, D., Vodovar, N., Curmi, P., and Manivet, P. (2015) The Cold Shock Domain of YB-1 Segregates RNA from DNA by Non-Bonded Interactions, *PLoS One*, **10**, e0130318, doi: 10.1371/journal.pone.0130318.
55. En-Nia, A., Yilmaz, E., Klinge, U., Lovett, D. H., Stefanidis, I., and Mertens, P. R. (2005) Transcription factor YB-1 mediates DNA polymerase alpha gene expression, *J. Biol. Chem.*, **280**, 7702-7711, doi: 10.1074/jbc.M413353200.
56. Jurchott, K., Bergmann, S., Stein, U., Walther, W., Janz, M., Manni, I., Piaggio, G., Fietze, E., Dietel, M., and Royer, H. D. (2003) YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression, *J. Biol. Chem.*, **278**, 27988-27996, doi: 10.1074/jbc.M212966200.
57. Kandala, J. C., and Guntaka, R. V. (1994) Cloning of Rous sarcoma virus enhancer factor genes. I. Evidence that RSV-EF-I is related to Y-box (inverted CCAAT) binding proteins and binds to multiple motifs in the RSV enhancer, *Virology*, **198**, 514-523, doi: 10.1006/viro.1994.1062.
58. Zasedateleva, O. A., Krylov, A. S., Prokopenko, D. V., Skabkin, M. A., Ovchinnikov, L. P., Kolchinsky, A., and Mirzabekov, A. D. (2002) Specificity of mammalian Y-box binding protein p50 in interaction with ss and ds DNA analyzed with generic oligonucleotide microchip, *J. Mol. Biol.*, **324**, 73-87, doi: 10.1016/s0022-2836(02)00937-3.
59. Gaudreault, I., Guay, D., and Lebel, M. (2004) YB-1 promotes strand separation in vitro of duplex DNA containing either mispaired bases or cisplatin modifications, exhibits endonucleolytic activities and binds several DNA repair proteins, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 316-327, doi: 10.1093/nar/gkh170.
60. Ise, T., Nagatani, G., Imamura, T., Kato, K., Takano, H., Nomoto, M., Izumi, H., Ohmori, H., Okamoto, T., Ohga, T., Uchiyama, T., Kuwano, M., and Kohno, K. (1999) Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen, *Cancer Res.*, **59**, 342-346,
61. Kretov, D. A., Curmi, P. A., Hamon, L., Abrakhi, S., Desforges, B., Ovchinnikov, L. P., and Pastre, D. (2015) mRNA and DNA selection via protein multimerization: YB-1 as a case study, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 9457-9473, doi: 10.1093/nar/gkv822.
62. Coles, L. S., Bartley, M. A., Bert, A., Hunter, J., Polyak, S., Diamond, P., Vadas, M. A., and Goodall, G. J. (2004) A multi-protein complex containing cold shock domain (Y-box) and polypyrimidine tract binding proteins forms on the vascular endothelial growth factor mRNA.

- Potential role in mRNA stabilization, *Eur. J. Biochem.*, **271**, 648-660, doi: 10.1111/j.1432-1033.2003.03968.x.
63. Giorgini, F., Davies, H. G., and Braun, R. E. (2001) MSY2 and MSY4 bind a conserved sequence in the 3' untranslated region of protamine 1 mRNA in vitro and in vivo, *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 7010-7019, doi: 10.1128/MCB.21.20.7010-7019.2001.
  64. Paranjape, S. M., and Harris, E. (2007) Y box-binding protein-1 binds to the dengue virus 3'-untranslated region and mediates antiviral effects, *J. Biol. Chem.*, **282**, 30497-30508, doi: 10.1074/jbc.M705755200.
  65. Skabkina, O. V., Lyabin, D. N., Skabkin, M. A., and Ovchinnikov, L. P. (2005) YB-1 autoregulates translation of its own mRNA at or prior to the step of 40S ribosomal subunit joining, *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 3317-3323, doi: 10.1128/MCB.25.8.3317-3323.2005.
  66. Wei, W. J., Mu, S. R., Heiner, M., Fu, X., Cao, L. J., Gong, X. F., Bindereif, A., and Hui, J. (2012) YB-1 binds to CAUC motifs and stimulates exon inclusion by enhancing the recruitment of U2AF to weak polypyrimidine tracts, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 8622-8636, doi: 10.1093/nar/gks579.
  67. Lyabin, D. N., Eliseeva, I. A., Skabkina, O. V., and Ovchinnikov, L. P. (2011) Interplay between Y-box-binding protein 1 (YB-1) and poly(A) binding protein (PABP) in specific regulation of YB-1 mRNA translation, *RNA Biol*, **8**, 883-892, doi: 10.4161/rna.8.5.16022.
  68. Ivanov, P., O'Day, E., Emara, M. M., Wagner, G., Lieberman, J., and Anderson, P. (2014) G-quadruplex structures contribute to the neuroprotective effects of angiogenin-induced tRNA fragments, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**, 18201-18206, doi: 10.1073/pnas.1407361111.
  69. Ladomery, M., and Sommerville, J. (1994) Binding of Y-box proteins to RNA: involvement of different protein domains, *Nucleic Acids Res.*, **22**, 5582-5589, doi: 10.1093/nar/22.25.5582.
  70. Skabkin, M. A., Evdokimova, V., Thomas, A. A., and Ovchinnikov, L. P. (2001) The major messenger ribonucleoprotein particle protein p50 (YB-1) promotes nucleic acid strand annealing, *J. Biol. Chem.*, **276**, 44841-44847, doi: 10.1074/jbc.M107581200.
  71. Jiang, W., Hou, Y., and Inouye, M. (1997) CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone, *J. Biol. Chem.*, **272**, 196-202, doi: 10.1074/jbc.272.1.196.
  72. Evdokimova, V., Ruzanov, P., Anglesio, M. S., Sorokin, A. V., Ovchinnikov, L. P., Buckley, J., Triche, T. J., Sonenberg, N., and Sorensen, P. H. (2006) Akt-mediated YB-1 phosphorylation activates translation of silent mRNA species, *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 277-292, doi: 10.1128/MCB.26.1.277-292.2006.
  73. Wu, S. L., Fu, X., Huang, J., Jia, T. T., Zong, F. Y., Mu, S. R., Zhu, H., Yan, Y., Qiu, S., Wu, Q., Yan, W., Peng, Y., Chen, J., and Hui, J. (2015) Genome-wide analysis of YB-1-RNA interactions reveals a novel role of YB-1 in miRNA processing in glioblastoma multiforme, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 8516-8528, doi: 10.1093/nar/gkv779.
  74. Snyder, E., Soundararajan, R., Sharma, M., Dearth, A., Smith, B., and Braun, R. E. (2015) Compound Heterozygosity for Y Box Proteins Causes Sterility Due to Loss of Translational Repression, *PLoS Genet.*, **11**, e1005690, doi: 10.1371/journal.pgen.1005690.
  75. Hinze, F., Drewe-Boss, P., Milek, M., Ohler, U., Landthaler, M., and Gotthardt, M. (2018) Expanding the map of protein-RNA interaction sites via cell fusion followed by PAR-CLIP, *RNA Biol*, **15**, 359-368, doi: 10.1080/15476286.2017.1384120.
  76. Gopanenko, A. V., Malygin, A. A., Kossinova, O. A., Tupikin, A. E., Kabilov, M. R., and Karpova, G. G. (2020) Degenerate consensus sequences in the 3'-untranslated regions of cellular mRNAs as specific motifs potentially involved in the YB-1-mediated packaging of these mRNAs, *Biochimie*, **170**, 152-162, doi: 10.1016/j.biochi.2020.01.005.
  77. Van Nostrand, E. L., Gelboin-Burkhart, C., Wang, R., Pratt, G. A., Blue, S. M., and Yeo, G. W. (2017) CRISPR/Cas9-mediated integration enables TAG-eCLIP of endogenously tagged RNA binding proteins, *Methods*, **118-119**, 50-59, doi: 10.1016/j.ymeth.2016.12.007.
  78. Kossinova, O. A., Gopanenko, A. V., Tamkovich, S. N., Krasheninina, O. A., Tupikin, A. E., Kiseleva, E., Yanshina, D. D., Malygin, A. A., Ven'yaminova, A. G., Kabilov, M. R., and Karpova, G. G. (2017) Cytosolic YB-1 and NSUN2 are the only proteins recognizing specific



- motifs present in mRNAs enriched in exosomes, *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, **1865**, 664-673, doi: 10.1016/j.bbapap.2017.03.010.
79. Batagov, A. O., Kuznetsov, V. A., and Kurochkin, I. V. (2011) Identification of nucleotide patterns enriched in secreted RNAs as putative cis-acting elements targeting them to exosome nano-vesicles, *BMC Genomics*, **12 Suppl 3**, S18, doi: 10.1186/1471-2164-12-S3-S18.
  80. Yang, Y., Wang, L., Han, X., Yang, W. L., Zhang, M., Ma, H. L., Sun, B. F., Li, A., Xia, J., Chen, J., Heng, J., Wu, B., Chen, Y. S., Xu, J. W., Yang, X., Yao, H., Sun, J., Lyu, C., Wang, H. L., Huang, Y., et al. (2019) RNA 5-Methylcytosine Facilitates the Maternal-to-Zygotic Transition by Preventing Maternal mRNA Decay, *Mol. Cell*, **75**, 1188-1202 e1111, doi: 10.1016/j.molcel.2019.06.033.
  81. Kramer, K., Sachsenberg, T., Beckmann, B. M., Qamar, S., Boon, K. L., Hentze, M. W., Kohlbacher, O., and Urlaub, H. (2014) Photo-cross-linking and high-resolution mass spectrometry for assignment of RNA-binding sites in RNA-binding proteins, *Nat. Methods*, **11**, 1064-1070, doi: 10.1038/nmeth.3092.
  82. Astanehe, A., Finkbeiner, M. R., Krzywinski, M., Fotovati, A., Dhillon, J., Berquin, I. M., Mills, G. B., Marra, M. A., and Dunn, S. E. (2012) MKNK1 is a YB-1 target gene responsible for imparting trastuzumab resistance and can be blocked by RSK inhibition, *Oncogene*, **31**, 4434-4446, doi: 10.1038/onc.2011.617.
  83. Finkbeiner, M. R., Astanehe, A., To, K., Fotovati, A., Davies, A. H., Zhao, Y., Jiang, H., Stratford, A. L., Shadeo, A., Boccaccio, C., Comoglio, P., Mertens, P. R., Eirew, P., Raouf, A., Eaves, C. J., and Dunn, S. E. (2009) Profiling YB-1 target genes uncovers a new mechanism for MET receptor regulation in normal and malignant human mammary cells, *Oncogene*, **28**, 1421-1431, doi: 10.1038/onc.2008.485.
  84. Dolfini, D., and Mantovani, R. (2013) Targeting the Y/CCAAT box in cancer: YB-1 (YBX1) or NF-Y?, *Cell Death Differ.*, **20**, 676-685, doi: 10.1038/cdd.2013.13.
  85. Dolfini, D., and Mantovani, R. (2013) YB-1 (YBX1) does not bind to Y/CCAAT boxes in vivo, *Oncogene*, **32**, 4189-4190, doi: 10.1038/onc.2012.521.
  86. Soop, T., Nashchekin, D., Zhao, J., Sun, X., Alzhanova-Ericsson, A. T., Bjorkroth, B., Ovchinnikov, L., and Daneholt, B. (2003) A p50-like Y-box protein with a putative translational role becomes associated with pre-mRNA concomitant with transcription, *J. Cell Sci.*, **116**, 1493-1503, doi: 10.1242/jcs.00353.
  87. Schwanhauser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., and Selbach, M. (2011) Global quantification of mammalian gene expression control, *Nature*, **473**, 337-342, doi: 10.1038/nature10098.
  88. Castello, A., Fischer, B., Eichelbaum, K., Horos, R., Beckmann, B. M., Strein, C., Davey, N. E., Humphreys, D. T., Preiss, T., Steinmetz, L. M., Krijgsveld, J., and Hentze, M. W. (2012) Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins, *Cell*, **149**, 1393-1406, doi: 10.1016/j.cell.2012.04.031.
  89. Kedersha, N., and Anderson, P. (2007) Mammalian stress granules and processing bodies, *Methods Enzymol.*, **431**, 61-81, doi: 10.1016/S0076-6879(07)31005-7.
  90. Shurtleff, M. J., Temoche-Diaz, M. M., Karfilis, K. V., Ri, S., and Schekman, R. (2016) Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction, *Elife*, **5**, doi: 10.7554/eLife.19276.
  91. Hartmuth, K., Urlaub, H., Vornlocher, H. P., Will, C. L., Gentzel, M., Wilm, M., and Luhrmann, R. (2002) Protein composition of human pre-spliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16719-16724, doi: 10.1073/pnas.262483899.
  92. Evdokimova, V., Ruzanov, P., Imataka, H., Raught, B., Svitkin, Y., Ovchinnikov, L. P., and Sonenberg, N. (2001) The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer, *EMBO J.*, **20**, 5491-5502, doi: 10.1093/emboj/20.19.5491.

93. Ovchinnikov, L. P., Skabkin, M. A., Ruzanov, P. V., and Evdokimova, V. M. (2001) [Major mRNP proteins in the structural organization and function of mRNA in eukaryotic cells], *Mol Biol (Mosk)*, **35**, 548-558,
94. Sommerville, J. (1999) Activities of cold-shock domain proteins in translation control, *Bioessays*, **21**, 319-325, doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199904)21:4<319::AID-BIES8>3.0.CO;2-3.
95. Sun, J., Yan, L., Shen, W., and Meng, A. (2018) Maternal Ybx1 safeguards zebrafish oocyte maturation and maternal-to-zygotic transition by repressing global translation, *Development*, **145**, doi: 10.1242/dev.166587.
96. Lu, Z. H., Books, J. T., and Ley, T. J. (2005) YB-1 is important for late-stage embryonic development, optimal cellular stress responses, and the prevention of premature senescence, *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 4625-4637, doi: 10.1128/MCB.25.11.4625-4637.2005.
97. Lu, Z. H., Books, J. T., and Ley, T. J. (2006) Cold shock domain family members YB-1 and MSY4 share essential functions during murine embryogenesis, *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 8410-8417, doi: 10.1128/MCB.01196-06.
98. Minich, W. B., Korneyeva, N. L., and Ovchinnikov, L. P. (1989) Translational active mRNPs from rabbit reticulocytes are qualitatively different from free mRNA in their translatability in cell-free system, *FEBS Lett.*, **257**, 257-259, doi: 10.1016/0014-5793(89)81547-9.
99. Minich, W. B., Volyanik, E. V., Korneyeva, N. L., Berezin, Y. V., and Ovchinnikov, L. P. (1990) Cytoplasmic mRNP proteins affect mRNA translation, *Mol. Biol. Rep.*, **14**, 65-67, doi: 10.1007/BF00360418.
100. Nekrasov, M. P., Ivshina, M. P., Chernov, K. G., Kovrigina, E. A., Evdokimova, V. M., Thomas, A. A., Hershey, J. W., and Ovchinnikov, L. P. (2003) The mRNA-binding protein YB-1 (p50) prevents association of the eukaryotic initiation factor eIF4G with mRNA and inhibits protein synthesis at the initiation stage, *J. Biol. Chem.*, **278**, 13936-13943, doi: 10.1074/jbc.M209145200.
101. Davydova, E. K., Evdokimova, V. M., Ovchinnikov, L. P., and Hershey, J. W. (1997) Overexpression in COS cells of p50, the major core protein associated with mRNA, results in translation inhibition, *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2911-2916, doi: 10.1093/nar/25.14.2911.
102. Piovesan, A., Caracausi, M., Antonaros, F., Pelleri, M. C., and Vitale, L. (2016) GeneBase 1.1: a tool to summarize data from NCBI gene datasets and its application to an update of human gene statistics, *Database (Oxford)*, **2016**, doi: 10.1093/database/baw153.
103. Gandin, V., Masvidal, L., Hulea, L., Gravel, S. P., Cargnello, M., McLaughlan, S., Cai, Y., Balanathan, P., Morita, M., Rajakumar, A., Furic, L., Pollak, M., Porco, J. A., Jr., St-Pierre, J., Pelletier, J., Larsson, O., and Topisirovic, I. (2016) nanoCAGE reveals 5' UTR features that define specific modes of translation of functionally related MTOR-sensitive mRNAs, *Genome Res.*, **26**, 636-648, doi: 10.1101/gr.197566.115.
104. Zaucker, A., Nagorska, A., Kumari, P., Hecker, N., Wang, Y., Huang, S., Cooper, L., Sivashanmugam, L., VijayKumar, S., Brosens, J., Gorodkin, J., and Sampath, K. (2018) Translational co-regulation of a ligand and inhibitor by a conserved RNA element, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 104-119, doi: 10.1093/nar/gkx938.
105. Matsumoto, S., Uchiumi, T., Tanamachi, H., Saito, T., Yagi, M., Takazaki, S., Kanki, T., and Kang, D. (2012) Ribonucleoprotein Y-box-binding protein-1 regulates mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) protein expression after serum stimulation through binding to OXPHOS mRNA, *Biochem. J.*, **443**, 573-584, doi: 10.1042/BJ20111728.
106. Ohashi, S., Moue, M., Tanaka, T., and Kobayashi, S. (2011) Translational level of acetylcholine receptor alpha mRNA in mouse skeletal muscle is regulated by YB-1 in response to neural activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **414**, 647-652, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.09.086.
107. Tanaka, T., Ohashi, S., Moue, M., and Kobayashi, S. (2012) Mechanism of YB-1-mediated translational induction of GluR2 mRNA in response to neural activity through nAChR, *Biochim. Biophys. Acta*, **1820**, 1035-1042, doi: 10.1016/j.bbagen.2012.04.005.

108. Kwon, E., Todorova, K., Wang, J., Horos, R., Lee, K. K., Neel, V. A., Negri, G. L., Sorensen, P. H., Lee, S. W., Hentze, M. W., and Mandinova, A. (2018) The RNA-binding protein YBX1 regulates epidermal progenitors at a posttranscriptional level, *Nat Commun*, **9**, 1734, doi: 10.1038/s41467-018-04092-0.
109. Swamynathan, S. K., Nambiar, A., and Guntaka, R. V. (2000) Chicken Y-box proteins chk-YB-1b and chk-YB-2 repress translation by sequence-specific interaction with single-stranded RNA, *Biochem. J.*, **348 Pt 2**, 297-305,
110. Jenkins, R. H., Bennagi, R., Martin, J., Phillips, A. O., Redman, J. E., and Fraser, D. J. (2010) A conserved stem loop motif in the 5'untranslated region regulates transforming growth factor-beta(1) translation, *PLoS One*, **5**, e12283, doi: 10.1371/journal.pone.0012283.
111. Evdokimova, V. M., Kovrigina, E. A., Nashchekin, D. V., Davydova, E. K., Hershey, J. W., and Ovchinnikov, L. P. (1998) The major core protein of messenger ribonucleoprotein particles (p50) promotes initiation of protein biosynthesis in vitro, *J. Biol. Chem.*, **273**, 3574-3581, doi: 10.1074/jbc.273.6.3574.
112. Matsumoto, K., Meric, F., and Wolffe, A. P. (1996) Translational repression dependent on the interaction of the *Xenopus* Y-box protein FRGY2 with mRNA. Role of the cold shock domain, tail domain, and selective RNA sequence recognition, *J. Biol. Chem.*, **271**, 22706-22712, doi: 10.1074/jbc.271.37.22706.
113. Minich, W. B., and Ovchinnikov, L. P. (1992) Role of cytoplasmic mRNP proteins in translation, *Biochimie*, **74**, 477-483, doi: 10.1016/0300-9084(92)90088-v.
114. Svitkin, Y. V., Ovchinnikov, L. P., Dreyfuss, G., and Sonenberg, N. (1996) General RNA binding proteins render translation cap dependent, *EMBO J.*, **15**, 7147-7155,
115. Svitkin, Y. V., Evdokimova, V. M., Brasey, A., Pestova, T. V., Fantus, D., Yanagiya, A., Imataka, H., Skabkin, M. A., Ovchinnikov, L. P., Merrick, W. C., and Sonenberg, N. (2009) General RNA-binding proteins have a function in poly(A)-binding protein-dependent translation, *EMBO J.*, **28**, 58-68, doi: 10.1038/emboj.2008.259.
116. Cobbold, L. C., Wilson, L. A., Sawicka, K., King, H. A., Kondrashov, A. V., Spriggs, K. A., Bushell, M., and Willis, A. E. (2010) Upregulated c-myc expression in multiple myeloma by internal ribosome entry results from increased interactions with and expression of PTB-1 and YB-1, *Oncogene*, **29**, 2884-2891, doi: 10.1038/onc.2010.31.
117. El-Naggar, A. M., Veinotte, C. J., Cheng, H., Grunewald, T. G., Negri, G. L., Somasekharan, S. P., Corkery, D. P., Tirode, F., Mathers, J., Khan, D., Kyle, A. H., Baker, J. H., LePard, N. E., McKinney, S., Hajee, S., Bosiljcic, M., Leprivier, G., Tognon, C. E., Minchinton, A. I., Bennewith, K. L., et al. (2015) Translational Activation of HIF1alpha by YB-1 Promotes Sarcoma Metastasis, *Cancer Cell*, **27**, 682-697, doi: 10.1016/j.ccell.2015.04.003.
118. Evdokimova, V., Tognon, C., Ng, T., Ruzanov, P., Melnyk, N., Fink, D., Sorokin, A., Ovchinnikov, L. P., Davicioni, E., Triche, T. J., and Sorensen, P. H. (2009) Translational activation of snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition, *Cancer Cell*, **15**, 402-415, doi: 10.1016/j.ccr.2009.03.017.
119. Terenin, I. M., Smirnova, V. V., Andreev, D. E., Dmitriev, S. E., and Shatsky, I. N. (2017) A researcher's guide to the galaxy of IRESSs, *Cell. Mol. Life Sci.*, **74**, 1431-1455, doi: 10.1007/s00018-016-2409-5.
120. Bert, A. G., Grepin, R., Vadas, M. A., and Goodall, G. J. (2006) Assessing IRES activity in the HIF-1alpha and other cellular 5' UTRs, *RNA*, **12**, 1074-1083, doi: 10.1261/rna.2320506.
121. Young, R. M., Wang, S. J., Gordan, J. D., Ji, X., Liebhaber, S. A., and Simon, M. C. (2008) Hypoxia-mediated selective mRNA translation by an internal ribosome entry site-independent mechanism, *J. Biol. Chem.*, **283**, 16309-16319, doi: 10.1074/jbc.M710079200.
122. Ivanova, I. G., Park, C. V., Yemm, A. I., and Kenneth, N. S. (2018) PERK/eIF2alpha signaling inhibits HIF-induced gene expression during the unfolded protein response via YB1-dependent regulation of HIF1alpha translation, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 3878-3890, doi: 10.1093/nar/gky127.

123. Lyons, S. M., Achorn, C., Kedersha, N. L., Anderson, P. J., and Ivanov, P. (2016) YB-1 regulates tiRNA-induced Stress Granule formation but not translational repression, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 6949-6960, doi: 10.1093/nar/gkw418.
124. Ivanova, I. G., Park, C. V., and Kenneth, N. S. (2019) Translating the Hypoxic Response-the Role of HIF Protein Translation in the Cellular Response to Low Oxygen, *Cells*, **8**, doi: 10.3390/cells8020114.
125. El-Naggar, A. M., Somasekharan, S. P., Wang, Y., Cheng, H., Negri, G. L., Pan, M., Wang, X. Q., Delaidelli, A., Rafn, B., Cran, J., Zhang, F., Zhang, H., Colborne, S., Gleave, M., Mandinova, A., Kedersha, N., Hughes, C. S., Surdez, D., Delattre, O., Wang, Y., et al. (2019) Class I HDAC inhibitors enhance YB-1 acetylation and oxidative stress to block sarcoma metastasis, *EMBO Rep*, **20**, e48375, doi: 10.15252/embr.201948375.
126. Somasekharan, S. P., El-Naggar, A., Leprivier, G., Cheng, H., Hajee, S., Grunewald, T. G., Zhang, F., Ng, T., Delattre, O., Evdokimova, V., Wang, Y., Gleave, M., and Sorensen, P. H. (2015) YB-1 regulates stress granule formation and tumor progression by translationally activating G3BP1, *J. Cell Biol.*, **208**, 913-929, doi: 10.1083/jcb.201411047.
127. Wang, Y., Su, J., Wang, Y., Fu, D., Ideozu, J. E., Geng, H., Cui, Q., Wang, C., Chen, R., Yu, Y., Niu, Y., and Yue, D. (2019) The interaction of YBX1 with G3BP1 promotes renal cell carcinoma cell metastasis via YBX1/G3BP1-SPP1- NF-kappaB signaling axis, *J Exp Clin Cancer Res*, **38**, 386, doi: 10.1186/s13046-019-1347-0.
128. Wang, Y., Arribas-Layton, M., Chen, Y., Lykke-Andersen, J., and Sen, G. L. (2015) DDX6 Orchestrates Mammalian Progenitor Function through the mRNA Degradation and Translation Pathways, *Mol. Cell*, **60**, 118-130, doi: 10.1016/j.molcel.2015.08.014.
129. Medvedev, S., Pan, H., and Schultz, R. M. (2011) Absence of MSY2 in mouse oocytes perturbs oocyte growth and maturation, RNA stability, and the transcriptome, *Biol. Reprod.*, **85**, 575-583, doi: 10.1095/biolreprod.111.091710.
130. Medvedev, S., Yang, J., Hecht, N. B., and Schultz, R. M. (2008) CDC2A (CDK1)-mediated phosphorylation of MSY2 triggers maternal mRNA degradation during mouse oocyte maturation, *Dev. Biol.*, **321**, 205-215, doi: 10.1016/j.ydbio.2008.06.016.
131. Yartseva, V., and Giraldez, A. J. (2015) The Maternal-to-Zygotic Transition During Vertebrate Development: A Model for Reprogramming, *Curr Top Dev Biol*, **113**, 191-232, doi: 10.1016/bs.ctdb.2015.07.020.
132. Chen, X., Li, A., Sun, B. F., Yang, Y., Han, Y. N., Yuan, X., Chen, R. X., Wei, W. S., Liu, Y., Gao, C. C., Chen, Y. S., Zhang, M., Ma, X. D., Liu, Z. W., Luo, J. H., Lyu, C., Wang, H. L., Ma, J., Zhao, Y. L., Zhou, F. J., et al. (2019) 5-methylcytosine promotes pathogenesis of bladder cancer through stabilizing mRNAs, *Nat. Cell Biol.*, **21**, 978-990, doi: 10.1038/s41556-019-0361-y.
133. Park, O. H., Park, J., Yu, M., An, H. T., Ko, J., and Kim, Y. K. (2016) Identification and molecular characterization of cellular factors required for glucocorticoid receptor-mediated mRNA decay, *Genes Dev.*, **30**, 2093-2105, doi: 10.1101/gad.286484.116.
134. Dhawan, L., Liu, B., Pytlak, A., Kulshrestha, S., Blaxall, B. C., and Taubman, M. B. (2012) Y-box binding protein 1 and RNase UK114 mediate monocyte chemoattractant protein 1 mRNA stability in vascular smooth muscle cells, *Mol. Cell Biol.*, **32**, 3768-3775, doi: 10.1128/MCB.00846-12.
135. van Zalen, S., Jeschke, G. R., Hexner, E. O., and Russell, J. E. (2012) AUF-1 and YB-1 are critical determinants of beta-globin mRNA expression in erythroid cells, *Blood*, **119**, 1045-1053, doi: 10.1182/blood-2011-10-387316.
136. Chen, C. Y., Gherzi, R., Andersen, J. S., Gaietta, G., Jurchott, K., Royer, H. D., Mann, M., and Karin, M. (2000) Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation, *Genes Dev.*, **14**, 1236-1248,
137. Shim, J., Lim, H., J, R. Y., and Karin, M. (2002) Nuclear export of NF90 is required for interleukin-2 mRNA stabilization, *Mol. Cell*, **10**, 1331-1344, doi: 10.1016/s1097-2765(02)00730-x.

138. Esnault, S., and Malter, J. S. (2003) Hyaluronic acid or TNF-alpha plus fibronectin triggers granulocyte macrophage-colony-stimulating factor mRNA stabilization in eosinophils yet engages differential intracellular pathways and mRNA binding proteins, *J. Immunol.*, **171**, 6780-6787, doi: 10.4049/jimmunol.171.12.6780.
139. Chen, J., Adamiak, W., Huang, G., Atasoy, U., Rostami, A., and Yu, S. (2017) Interaction of RNA-binding protein HuR and miR-466i regulates GM-CSF expression, *Sci Rep*, **7**, 17233, doi: 10.1038/s41598-017-17371-5.
140. Weidensdorfer, D., Stohr, N., Baude, A., Lederer, M., Kohn, M., Schierhorn, A., Buchmeier, S., Wahle, E., and Huttelmaier, S. (2009) Control of c-myc mRNA stability by IGF2BP1-associated cytoplasmic RNPs, *RNA*, **15**, 104-115, doi: 10.1261/rna.1175909.
141. Huang, H., Weng, H., Sun, W., Qin, X., Shi, H., Wu, H., Zhao, B. S., Mesquita, A., Liu, C., Yuan, C. L., Hu, Y. C., Huttelmaier, S., Skibbe, J. R., Su, R., Deng, X., Dong, L., Sun, M., Li, C., Nachtergaele, S., Wang, Y., et al. (2018) Recognition of RNA N(6)-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation, *Nat. Cell Biol.*, **20**, 285-295, doi: 10.1038/s41556-018-0045-z.
142. Mateu-Regue, A., Christiansen, J., Bagger, F. O., Winther, O., Hellriegel, C., and Nielsen, F. C. (2019) Single mRNP Analysis Reveals that Small Cytoplasmic mRNP Granules Represent mRNA Singletons, *Cell Rep*, **29**, 736-748 e734, doi: 10.1016/j.celrep.2019.09.018.
143. Nie, M., Balda, M. S., and Matter, K. (2012) Stress- and Rho-activated ZO-1-associated nucleic acid binding protein binding to p21 mRNA mediates stabilization, translation, and cell survival, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 10897-10902, doi: 10.1073/pnas.1118822109.
144. Cooke, A., Schwarzl, T., Huppertz, I., Kramer, G., Mantas, P., Alleaume, A. M., Huber, W., Krijgsveld, J., and Hentze, M. W. (2019) The RNA-Binding Protein YBX3 Controls Amino Acid Levels by Regulating SLC mRNA Abundance, *Cell Rep*, **27**, 3097-3106 e3095, doi: 10.1016/j.celrep.2019.05.039.
145. Bargou, R. C., Jurchott, K., Wagener, C., Bergmann, S., Metzner, S., Bommert, K., Mapara, M. Y., Winzer, K. J., Dietel, M., Dorken, B., and Royer, H. D. (1997) Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression, *Nat. Med.*, **3**, 447-450, doi: 10.1038/nm0497-447.
146. Ohga, T., Koike, K., Ono, M., Makino, Y., Itagaki, Y., Tanimoto, M., Kuwano, M., and Kohno, K. (1996) Role of the human Y box-binding protein YB-1 in cellular sensitivity to the DNA-damaging agents cisplatin, mitomycin C, and ultraviolet light, *Cancer Res.*, **56**, 4224-4228,
147. Stein, U., Jurchott, K., Walther, W., Bergmann, S., Schlag, P. M., and Royer, H. D. (2001) Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters, *J. Biol. Chem.*, **276**, 28562-28569, doi: 10.1074/jbc.M100311200.
148. Sengupta, S., Mantha, A. K., Mitra, S., and Bhakat, K. K. (2011) Human AP endonuclease (APE1/Ref-1) and its acetylation regulate YB-1-p300 recruitment and RNA polymerase II loading in the drug-induced activation of multidrug resistance gene MDR1, *Oncogene*, **30**, 482-493, doi: 10.1038/onc.2010.435.
149. Kaszubiak, A., Kupstat, A., Muller, U., Hausmann, R., Holm, P. S., and Lage, H. (2007) Regulation of MDR1 gene expression in multidrug-resistant cancer cells is independent from YB-1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **357**, 295-301, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.03.145.
150. Astanehe, A., Finkbeiner, M. R., Hojabrpour, P., To, K., Fotovati, A., Shadeo, A., Stratford, A. L., Lam, W. L., Berquin, I. M., Duronio, V., and Dunn, S. E. (2009) The transcriptional induction of PIK3CA in tumor cells is dependent on the oncoprotein Y-box binding protein-1, *Oncogene*, **28**, 2406-2418, doi: 10.1038/onc.2009.81.
151. Higashi, K., Inagaki, Y., Suzuki, N., Mitsui, S., Mauviel, A., Kaneko, H., and Nakatsuka, I. (2003) Y-box-binding protein YB-1 mediates transcriptional repression of human alpha 2(I) collagen gene expression by interferon-gamma, *J. Biol. Chem.*, **278**, 5156-5162, doi: 10.1074/jbc.M208724200.

152. Lasham, A., Lindridge, E., Rudert, F., Onrust, R., and Watson, J. (2000) Regulation of the human fas promoter by YB-1, Puralpha and AP-1 transcription factors, *Gene*, **252**, 1-13, doi: 10.1016/s0378-1119(00)00220-1.
153. Mertens, P. R., Alfonso-Jaume, M. A., Steinmann, K., and Lovett, D. H. (1998) A synergistic interaction of transcription factors AP2 and YB-1 regulates gelatinase A enhancer-dependent transcription, *J. Biol. Chem.*, **273**, 32957-32965, doi: 10.1074/jbc.273.49.32957.
154. Mertens, P. R., Steinmann, K., Alfonso-Jaume, M. A., En-Nia, A., Sun, Y., and Lovett, D. H. (2002) Combinatorial interactions of p53, activating protein-2, and YB-1 with a single enhancer element regulate gelatinase A expression in neoplastic cells, *J. Biol. Chem.*, **277**, 24875-24882, doi: 10.1074/jbc.M200445200.
155. Ou, Y., Zhao, Z., Zhang, W., Wu, Q., Wu, C., Liu, X., Fu, M., Ji, N., Wang, D., Qiu, J., Zhang, L., Yu, C., Song, Y., and Zhan, Q. (2016) Kindlin-2 interacts with beta-catenin and YB-1 to enhance EGFR transcription during glioma progression, *Oncotarget*, **7**, 74872-74885, doi: 10.18632/oncotarget.12439.
156. Park, J. H., Kang, H. J., Kang, S. I., Lee, J. E., Hur, J., Ge, K., Mueller, E., Li, H., Lee, B. C., and Lee, S. B. (2013) A multifunctional protein, EWS, is essential for early brown fat lineage determination, *Dev. Cell*, **26**, 393-404, doi: 10.1016/j.devcel.2013.07.002.
157. Zhang, W., Dong, Z., Xu, M., Zhang, S., Liu, C., and Chen, S. (2020) SWI/SNF complex subunit BAF60a represses hepatic ureagenesis through a crosstalk between YB-1 and PGC-1alpha, *Mol Metab*, **32**, 85-96, doi: 10.1016/j.molmet.2019.12.007.
158. Tian, B., Liu, J., Liu, B., Dong, Y., Liu, J., Song, Y., and Sun, Z. (2011) p53 Suppresses lung resistance-related protein expression through Y-box binding protein 1 in the MCF-7 breast tumor cell line, *J Cell Physiol*, **226**, 3433-3441, doi: 10.1002/jcp.22700.
159. Shi, J. H., Zheng, B., Li, Y. H., Sun, Y., Han, A. L., Zhang, X. H., Lv, X. R., Chen, S., and Wen, J. K. (2013) Novel insight into Y-box binding protein 1 in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation through targeting GC box-dependent genes, *FEBS Lett.*, **587**, 1326-1332, doi: 10.1016/j.febslet.2013.02.047.
160. Lasham, A., Samuel, W., Cao, H., Patel, R., Mehta, R., Stern, J. L., Reid, G., Woolley, A. G., Miller, L. D., Black, M. A., Shelling, A. N., Print, C. G., and Braithwaite, A. W. (2012) YB-1, the E2F pathway, and regulation of tumor cell growth, *J. Natl. Cancer Inst.*, **104**, 133-146, doi: 10.1093/jnci/djr512.
161. Safak, M., Gallia, G. L., and Khalili, K. (1999) Reciprocal interaction between two cellular proteins, Puralpha and YB-1, modulates transcriptional activity of JCVCY in glial cells, *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 2712-2723, doi: 10.1128/MCB.19.4.2712.
162. Chen, N. N., and Khalili, K. (1995) Transcriptional regulation of human JC polyomavirus promoters by cellular proteins YB-1 and Pur alpha in glial cells, *J. Virol.*, **69**, 5843-5848, doi: 10.1128/JVI.69.9.5843-5848.1995.
163. Safak, M., Gallia, G. L., Ansari, S. A., and Khalili, K. (1999) Physical and functional interaction between the Y-box binding protein YB-1 and human polyomavirus JC virus large T antigen, *J. Virol.*, **73**, 10146-10157, doi: 10.1128/JVI.73.12.10146-10157.1999.
164. Holm, P. S., Bergmann, S., Jurchott, K., Lage, H., Brand, K., Ladhoff, A., Mantwill, K., Curiel, D. T., Dobbstein, M., Dietel, M., Gansbacher, B., and Royer, H. D. (2002) YB-1 relocates to the nucleus in adenovirus-infected cells and facilitates viral replication by inducing E2 gene expression through the E2 late promoter, *J. Biol. Chem.*, **277**, 10427-10434, doi: 10.1074/jbc.M106955200.
165. Jung, Y. M., Yu, K. L., Park, S. H., Lee, S. D., Kim, M. J., and You, J. C. (2018) Investigation of function and regulation of the YB-1 cellular factor in HIV replication, *BMB Rep*, **51**, 290-295, doi: 10.5483/bmbrep.2018.51.6.231.
166. Berquin, I. M., Pang, B., Dziubinski, M. L., Scott, L. M., Chen, Y. Q., Nolan, G. P., and Ethier, S. P. (2005) Y-box-binding protein 1 confers EGF independence to human mammary epithelial cells, *Oncogene*, **24**, 3177-3186, doi: 10.1038/sj.onc.1208504.

167. Fujii, T., Kawahara, A., Basaki, Y., Hattori, S., Nakashima, K., Nakano, K., Shirouzu, K., Kohno, K., Yanagawa, T., Yamana, H., Nishio, K., Ono, M., Kuwano, M., and Kage, M. (2008) Expression of HER2 and estrogen receptor alpha depends upon nuclear localization of Y-box binding protein-1 in human breast cancers, *Cancer Res.*, **68**, 1504-1512, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2362.
168. Stratford, A. L., Habibi, G., Astanehe, A., Jiang, H., Hu, K., Park, E., Shadeo, A., Buys, T. P., Lam, W., Pugh, T., Marra, M., Nielsen, T. O., Klinge, U., Mertens, P. R., Aparicio, S., and Dunn, S. E. (2007) Epidermal growth factor receptor (EGFR) is transcriptionally induced by the Y-box binding protein-1 (YB-1) and can be inhibited with Iressa in basal-like breast cancer, providing a potential target for therapy, *Breast Cancer Res*, **9**, R61, doi: 10.1186/bcr1767.
169. Wu, J., Lee, C., Yokom, D., Jiang, H., Cheang, M. C., Yorida, E., Turbin, D., Berquin, I. M., Mertens, P. R., Iftner, T., Gilks, C. B., and Dunn, S. E. (2006) Disruption of the Y-box binding protein-1 results in suppression of the epidermal growth factor receptor and HER-2, *Cancer Res.*, **66**, 4872-4879, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3561.
170. Deckert, J., Hartmuth, K., Boehringer, D., Behzadnia, N., Will, C. L., Kastner, B., Stark, H., Urlaub, H., and Luhrmann, R. (2006) Protein composition and electron microscopy structure of affinity-purified human spliceosomal B complexes isolated under physiological conditions, *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 5528-5543, doi: 10.1128/MCB.00582-06.
171. Stickeler, E., Fraser, S. D., Honig, A., Chen, A. L., Berget, S. M., and Cooper, T. A. (2001) The RNA binding protein YB-1 binds A/C-rich exon enhancers and stimulates splicing of the CD44 alternative exon v4, *EMBO J.*, **20**, 3821-3830, doi: 10.1093/emboj/20.14.3821.
172. Watermann, D. O., Tang, Y., Zur Hausen, A., Jager, M., Stamm, S., and Stickeler, E. (2006) Splicing factor Tra2-beta1 is specifically induced in breast cancer and regulates alternative splicing of the CD44 gene, *Cancer Res.*, **66**, 4774-4780, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3294.
173. Wang, Y., Xiao, X., Zhang, J., Choudhury, R., Robertson, A., Li, K., Ma, M., Burge, C. B., and Wang, Z. (2013) A complex network of factors with overlapping affinities represses splicing through intronic elements, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 36-45, doi: 10.1038/nsmb.2459.
174. Raffetseder, U., Frye, B., Rauen, T., Jurchott, K., Royer, H. D., Jansen, P. L., and Mertens, P. R. (2003) Splicing factor SRp30c interaction with Y-box protein-1 confers nuclear YB-1 shuttling and alternative splice site selection, *J. Biol. Chem.*, **278**, 18241-18248, doi: 10.1074/jbc.M212518200.
175. Skoko, N., Baralle, M., Buratti, E., and Baralle, F. E. (2008) The pathological splicing mutation c.6792C>G in NF1 exon 37 causes a change of tenancy between antagonistic splicing factors, *FEBS Lett.*, **582**, 2231-2236, doi: 10.1016/j.febslet.2008.05.018.
176. Nasrin, F., Rahman, M. A., Masuda, A., Ohe, K., Takeda, J., and Ohno, K. (2014) HnRNP C, YB-1 and hnRNP L coordinately enhance skipping of human MUSK exon 10 to generate a Wnt-insensitive MuSK isoform, *Sci Rep*, **4**, 6841, doi: 10.1038/srep06841.
177. Huan, W., Zhang, J., Li, Y., and Zhi, K. (2019) Involvement of DHX9/YB-1 complex induced alternative splicing of Kruppel-like factor 5 mRNA in phenotypic transformation of vascular smooth muscle cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **317**, C262-C269, doi: 10.1152/ajpcell.00067.2019.
178. Chansky, H. A., Hu, M., Hickstein, D. D., and Yang, L. (2001) Oncogenic TLS/ERG and EWS/Fli-1 fusion proteins inhibit RNA splicing mediated by YB-1 protein, *Cancer Res.*, **61**, 3586-3590,
179. Dutertre, M., Sanchez, G., De Cian, M. C., Barbier, J., Dardenne, E., Gratadou, L., Dujardin, G., Le Jossic-Corcoc, C., Corcos, L., and Auboeuf, D. (2010) Cotranscriptional exon skipping in the genotoxic stress response, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 1358-1366, doi: 10.1038/nsmb.1912.
180. Rapp, T. B., Yang, L., Conrad, E. U., 3rd, Mandahl, N., and Chansky, H. A. (2002) RNA splicing mediated by YB-1 is inhibited by TLS/CHOP in human myxoid liposarcoma cells, *J Orthop Res*, **20**, 723-729, doi: 10.1016/S0736-0266(02)00006-2.

181. Liu, X., Chen, D., Chen, H., Wang, W., Liu, Y., Wang, Y., Duan, C., Ning, Z., Guo, X., Otkur, W., Liu, J., Qi, H., Liu, X., Lin, A., Xia, T., Liu, H. X., and Piao, H. L. (2021) YB1 regulates miR-205/200b-ZEB1 axis by inhibiting microRNA maturation in hepatocellular carcinoma, *Cancer Commun (Lond)*, **41**, 576-595, doi: 10.1002/cac2.12164.
182. Zhou, Y., Li, X., Xue, W. L., Jin, S., Li, M. Y., Zhang, C. C., Yu, B., Zhu, L., Liang, K., Chen, Y., Tao, B. B., Zhu, Y., Wang, M. J., and Zhu, Y. C. (2022) YB-1 recruits Drosha to promote splicing of pri-miR-192 to mediate the proangiogenic effects of H<sub>2</sub>S, *Antioxid. Redox Signal.*, doi: 10.1089/ars.2021.0105.
183. Blenkiron, C., Hurley, D. G., Fitzgerald, S., Print, C. G., and Lasham, A. (2013) Links between the oncoprotein YB-1 and small non-coding RNAs in breast cancer, *PLoS One*, **8**, e80171, doi: 10.1371/journal.pone.0080171.
184. Das, S., Chattopadhyay, R., Bhakat, K. K., Boldogh, I., Kohno, K., Prasad, R., Wilson, S. H., and Hazra, T. K. (2007) Stimulation of NEIL2-mediated oxidized base excision repair via YB-1 interaction during oxidative stress, *J. Biol. Chem.*, **282**, 28474-28484, doi: 10.1074/jbc.M704672200.
185. Koike, K., Uchiumi, T., Ohga, T., Toh, S., Wada, M., Kohno, K., and Kuwano, M. (1997) Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation, *FEBS Lett.*, **417**, 390-394, doi: 10.1016/s0014-5793(97)01296-9.
186. Fujita, T., Ito, K., Izumi, H., Kimura, M., Sano, M., Nakagomi, H., Maeno, K., Hama, Y., Shingu, K., Tsuchiya, S., Kohno, K., and Fujimori, M. (2005) Increased nuclear localization of transcription factor Y-box binding protein 1 accompanied by up-regulation of P-glycoprotein in breast cancer pretreated with paclitaxel, *Clin. Cancer Res.*, **11**, 8837-8844, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0945.
187. Chang, Y. W., Mai, R. T., Fang, W. H., Lin, C. C., Chiu, C. C., and Wu Lee, Y. H. (2014) YB-1 disrupts mismatch repair complex formation, interferes with MutS $\alpha$  recruitment on mismatch and inhibits mismatch repair through interacting with PCNA, *Oncogene*, **33**, 5065-5077, doi: 10.1038/onc.2013.450.
188. Lasham, A., Moloney, S., Hale, T., Homer, C., Zhang, Y. F., Murison, J. G., Braithwaite, A. W., and Watson, J. (2003) The Y-box-binding protein, YB1, is a potential negative regulator of the p53 tumor suppressor, *J. Biol. Chem.*, **278**, 35516-35523, doi: 10.1074/jbc.M303920200.
189. Guay, D., Evoy, A. A., Paquet, E., Garand, C., Bachvarova, M., Bachvarov, D., and Lebel, M. (2008) The strand separation and nuclease activities associated with YB-1 are dispensable for cisplatin resistance but overexpression of YB-1 in MCF7 and MDA-MB-231 breast tumor cells generates several chemoresistance signatures, *Int J Biochem Cell Biol*, **40**, 2492-2507, doi: 10.1016/j.biocel.2008.04.011.
190. Shibahara, K., Uchiumi, T., Fukuda, T., Kura, S., Tominaga, Y., Maehara, Y., Kohno, K., Nakabeppu, Y., Tsuzuki, T., and Kuwano, M. (2004) Targeted disruption of one allele of the Y-box binding protein-1 (YB-1) gene in mouse embryonic stem cells and increased sensitivity to cisplatin and mitomycin C, *Cancer Sci.*, **95**, 348-353, doi: 10.1111/j.1349-7006.2004.tb03214.x.
191. Okamoto, T., Izumi, H., Imamura, T., Takano, H., Ise, T., Uchiumi, T., Kuwano, M., and Kohno, K. (2000) Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1: a mechanism for regulation of human gene expression, *Oncogene*, **19**, 6194-6202, doi: 10.1038/sj.onc.1204029.
192. Marenstein, D. R., Ocampo, M. T., Chan, M. K., Altamirano, A., Basu, A. K., Boorstein, R. J., Cunningham, R. P., and Teebor, G. W. (2001) Stimulation of human endonuclease III by Y box-binding protein 1 (DNA-binding protein B). Interaction between a base excision repair enzyme and a transcription factor, *J. Biol. Chem.*, **276**, 21242-21249, doi: 10.1074/jbc.M101594200.
193. Guay, D., Gaudreault, I., Massip, L., and Lebel, M. (2006) Formation of a nuclear complex containing the p53 tumor suppressor, YB-1, and the Werner syndrome gene product in cells



- treated with UV light, *Int J Biochem Cell Biol*, **38**, 1300-1313, doi: 10.1016/j.biocel.2006.01.008.
194. Chattopadhyay, R., Das, S., Maiti, A. K., Boldogh, I., Xie, J., Hazra, T. K., Kohno, K., Mitra, S., and Bhakat, K. K. (2008) Regulatory role of human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) in YB-1-mediated activation of the multidrug resistance gene MDR1, *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 7066-7080, doi: 10.1128/MCB.00244-08.
  195. Fomina, E. E., Pestryakov, P. E., Maltseva, E. A., Petruseva, I. O., Kretov, D. A., Ovchinnikov, L. P., and Lavrik, O. I. (2015) Y-box binding protein 1 (YB-1) promotes detection of DNA bulky lesions by XPC-HR23B factor, *Biochemistry (Mosc)*, **80**, 219-227, doi: 10.1134/S000629791502008X.
  196. Alemasova, E. E., Naumenko, K. N., Moor, N. A., and Lavrik, O. I. (2017) Y-Box-Binding Protein 1 Stimulates Abasic Site Cleavage, *Biochemistry (Mosc)*, **82**, 1521-1528, doi: 10.1134/S0006297917120112.
  197. Fomina, E. E., Pestryakov, P. E., Kretov, D. A., Zharkov, D. O., Ovchinnikov, L. P., Curmi, P. A., and Lavrik, O. I. (2015) Inhibition of abasic site cleavage in bubble DNA by multifunctional protein YB-1, *J Mol Recognit*, **28**, 117-123, doi: 10.1002/jmr.2435.
  198. Alemasova, E. E., Moor, N. A., Naumenko, K. N., Kutuzov, M. M., Sukhanova, M. V., Pestryakov, P. E., and Lavrik, O. I. (2016) Y-box-binding protein 1 as a non-canonical factor of base excision repair, *Biochim. Biophys. Acta*, **1864**, 1631-1640, doi: 10.1016/j.bbapap.2016.08.012.
  199. Alemasova, E. E., and Lavrik, O. I. (2019) Poly(ADP-ribosylation) by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 3811-3827, doi: 10.1093/nar/gkz120.
  200. Alemasova, E. E., Naumenko, K. N., Kurgina, T. A., Anarbaev, R. O., and Lavrik, O. I. (2018) The multifunctional protein YB-1 potentiates PARP1 activity and decreases the efficiency of PARP1 inhibitors, *Oncotarget*, **9**, 23349-23365, doi: 10.18632/oncotarget.25158.
  201. Alemasova, E. E., Pestryakov, P. E., Sukhanova, M. V., Kretov, D. A., Moor, N. A., Curmi, P. A., Ovchinnikov, L. P., and Lavrik, O. I. (2015) Poly(ADP-ribosylation) as a new posttranslational modification of YB-1, *Biochimie*, **119**, 36-44, doi: 10.1016/j.biochi.2015.10.008.
  202. Naumenko, K. N., Sukhanova, M. V., Hamon, L., Kurgina, T. A., Alemasova, E. E., Kutuzov, M. M., Pastre, D., and Lavrik, O. I. (2020) Regulation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Activity by Y-Box-Binding Protein 1, *Biomolecules*, **10**, doi: 10.3390/biom10091325.
  203. Polo, S. E., and Jackson, S. P. (2011) Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications, *Genes Dev.*, **25**, 409-433, doi: 10.1101/gad.2021311.
  204. Caron, M. C., Sharma, A. K., O'Sullivan, J., Myler, L. R., Ferreira, M. T., Rodrigue, A., Coulombe, Y., Ethier, C., Gagne, J. P., Langelier, M. F., Pascal, J. M., Finkelstein, I. J., Hendzel, M. J., Poirier, G. G., and Masson, J. Y. (2019) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 antagonizes DNA resection at double-strand breaks, *Nat Commun*, **10**, 2954, doi: 10.1038/s41467-019-10741-9.
  205. Alemasova, E. E., Naumenko, K. N., Sukhanova, M. V., and Lavrik, O. I. (2022) Role of YB-1 in Regulation of Poly(ADP-Ribosylation) Catalyzed by Poly(ADP-Ribose) Polymerases, *Biochemistry (Mosc)*, **87**, S32-S30, doi: 10.1134/S0006297922140048.
  206. de Souza-Pinto, N. C., Mason, P. A., Hashiguchi, K., Weissman, L., Tian, J., Guay, D., Lebel, M., Stevnsner, T. V., Rasmussen, L. J., and Bohr, V. A. (2009) Novel DNA mismatch-repair activity involving YB-1 in human mitochondria, *DNA Repair (Amst)*, **8**, 704-719, doi: 10.1016/j.dnarep.2009.01.021.
  207. Machado, A. M., Desler, C., Boggild, S., Strickertsson, J. A., Friis-Hansen, L., Figueiredo, C., Seruca, R., and Rasmussen, L. J. (2013) Helicobacter pylori infection affects mitochondrial function and DNA repair, thus, mediating genetic instability in gastric cells, *Mech Ageing Dev*, **134**, 460-466, doi: 10.1016/j.mad.2013.08.004.

208. Sorokin, A. V., Selyutina, A. A., Skabkin, M. A., Guryanov, S. G., Nazimov, I. V., Richard, C., Th'ng, J., Yau, J., Sorensen, P. H., Ovchinnikov, L. P., and Evdokimova, V. (2005) Proteasome-mediated cleavage of the Y-box-binding protein 1 is linked to DNA-damage stress response, *EMBO J.*, **24**, 3602-3612, doi: 10.1038/sj.emboj.7600830.
209. Kim, E. R., Selyutina, A. A., Buldakov, I. A., Evdokimova, V., Ovchinnikov, L. P., and Sorokin, A. V. (2013) The proteolytic YB-1 fragment interacts with DNA repair machinery and enhances survival during DNA damaging stress, *Cell Cycle*, **12**, 3791-3803, doi: 10.4161/cc.26670.
210. Frye, B. C., Halfter, S., Djudjaj, S., Muehlenberg, P., Weber, S., Raffetseder, U., En-Nia, A., Knott, H., Baron, J. M., Dooley, S., Bernhagen, J., and Mertens, P. R. (2009) Y-box protein-1 is actively secreted through a non-classical pathway and acts as an extracellular mitogen, *EMBO Rep*, **10**, 783-789, doi: 10.1038/embor.2009.81.
211. Nickel, W. (2003) The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes, *Eur. J. Biochem.*, **270**, 2109-2119, doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03577.x.
212. Kang, S., Lee, T. A., Ra, E. A., Lee, E., Choi, H., Lee, S., and Park, B. (2014) Differential control of interleukin-6 mRNA levels by cellular distribution of YB-1, *PLoS One*, **9**, e112754, doi: 10.1371/journal.pone.0112754.
213. Rauen, T., Raffetseder, U., Frye, B. C., Djudjaj, S., Muhlenberg, P. J., Eitner, F., Lendahl, U., Bernhagen, J., Dooley, S., and Mertens, P. R. (2009) YB-1 acts as a ligand for Notch-3 receptors and modulates receptor activation, *J. Biol. Chem.*, **284**, 26928-26940, doi: 10.1074/jbc.M109.046599.
214. Raffetseder, U., Rauen, T., Boor, P., Ostendorf, T., Hanssen, L., Floege, J., En-Nia, A., Djudjaj, S., Frye, B. C., and Mertens, P. R. (2011) Extracellular YB-1 blockade in experimental nephritis upregulates Notch-3 receptor expression and signaling, *Nephron Exp Nephrol*, **118**, e100-108, doi: 10.1159/000324209.
215. Liu, J., Sato, C., Cerletti, M., and Wagers, A. (2010) Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation, *Curr Top Dev Biol*, **92**, 367-409, doi: 10.1016/S0070-2153(10)92012-7.
216. Guarino, A. M., Troiano, A., Pizzo, E., Bosso, A., Vivo, M., Pinto, G., Amoresano, A., Pollice, A., La Mantia, G., and Calabro, V. (2018) Oxidative Stress Causes Enhanced Secretion of YB-1 Protein that Restrains Proliferation of Receiving Cells, *Genes (Basel)*, **9**, doi: 10.3390/genes9100513.
217. Kalluri, R., and LeBleu, V. S. (2020) The biology, function, and biomedical applications of exosomes, *Science*, **367**, doi: 10.1126/science.aau6977.
218. Yanshina, D. D., Kossinova, O. A., Gopanenko, A. V., Krasheninina, O. A., Malygin, A. A., Venyaminova, A. G., and Karpova, G. G. (2018) Structural features of the interaction of the 3'-untranslated region of mRNA containing exosomal RNA-specific motifs with YB-1, a potential mediator of mRNA sorting, *Biochimie*, **144**, 134-143, doi: 10.1016/j.biochi.2017.11.007.
219. Zou, F., Tu, R., Duan, B., Yang, Z., Ping, Z., Song, X., Chen, S., Price, A., Li, H., Scott, A., Perera, A., Li, S., and Xie, T. (2020) Drosophila YBX1 homolog YPS promotes ovarian germ line stem cell development by preferentially recognizing 5-methylcytosine RNAs, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **117**, 3603-3609, doi: 10.1073/pnas.1910862117.
220. Lin, F., Zeng, Z., Song, Y., Li, L., Wu, Z., Zhang, X., Li, Z., Ke, X., and Hu, X. (2019) YBX-1 mediated sorting of miR-133 into hypoxia/reoxygenation-induced EPC-derived exosomes to increase fibroblast angiogenesis and MEndoT, *Stem Cell Res Ther*, **10**, 263, doi: 10.1186/s13287-019-1377-8.
221. Palicharla, V. R., and Maddika, S. (2015) HACE1 mediated K27 ubiquitin linkage leads to YB-1 protein secretion, *Cell. Signal.*, **27**, 2355-2362, doi: 10.1016/j.cellsig.2015.09.001.
222. Bernhardt, A., Fehr, A., Brandt, S., Jerchel, S., Ballhause, T. M., Philipsen, L., Stolze, S., Geffers, R., Weng, H., Fischer, K. D., Isermann, B., Brunner-Weinzierl, M. C., Batra, A., Siegmund, B., Zhu, C., Lindquist, J. A., and Mertens, P. R. (2017) Inflammatory cell

- infiltration and resolution of kidney inflammation is orchestrated by the cold-shock protein Y-box binding protein-1, *Kidney Int*, **92**, 1157-1177, doi: 10.1016/j.kint.2017.03.035.
223. Alidousty, C., Rauen, T., Hanssen, L., Wang, Q., Alampour-Rajabi, S., Mertens, P. R., Bernhagen, J., Floege, J., Ostendorf, T., and Raffetseder, U. (2014) Calcineurin-mediated YB-1 dephosphorylation regulates CCL5 expression during monocyte differentiation, *J. Biol. Chem.*, **289**, 21401-21412, doi: 10.1074/jbc.M114.562991.
  224. Mo, D., Fang, H., Niu, K., Liu, J., Wu, M., Li, S., Zhu, T., Aleskandarany, M. A., Arora, A., Lobo, D. N., Madhusudan, S., Balajee, A. S., Chi, Z., and Zhao, Y. (2016) Human Helicase RECQL4 Drives Cisplatin Resistance in Gastric Cancer by Activating an AKT-YB1-MDR1 Signaling Pathway, *Cancer Res.*, **76**, 3057-3066, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2361.
  225. Sutherland, B. W., Kucab, J., Wu, J., Lee, C., Cheang, M. C., Yorida, E., Turbin, D., Dedhar, S., Nelson, C., Pollak, M., Leighton Grimes, H., Miller, K., Badve, S., Huntsman, D., Blake-Gilks, C., Chen, M., Pallen, C. J., and Dunn, S. E. (2005) Akt phosphorylates the Y-box binding protein 1 at Ser102 located in the cold shock domain and affects the anchorage-independent growth of breast cancer cells, *Oncogene*, **24**, 4281-4292, doi: 10.1038/sj.onc.1208590.
  226. Raffetseder, U., Rauen, T., Djudjaj, S., Kretzler, M., En-Nia, A., Tacke, F., Zimmermann, H. W., Nelson, P. J., Frye, B. C., Floege, J., Stefanidis, I., Weber, C., and Mertens, P. R. (2009) Differential regulation of chemokine CCL5 expression in monocytes/macrophages and renal cells by Y-box protein-1, *Kidney Int*, **75**, 185-196, doi: 10.1038/ki.2008.457.
  227. Evdokimova, V., Ovchinnikov, L. P., and Sorensen, P. H. (2006) Y-box binding protein 1: providing a new angle on translational regulation, *Cell Cycle*, **5**, 1143-1147, doi: 10.4161/cc.5.11.2784.
  228. Kosnopfel, C., Sinnberg, T., Sauer, B., Busch, C., Niessner, H., Schmitt, A., Forchhammer, S., Grimm, C., Mertens, P. R., Hailfinger, S., Dunn, S. E., Garbe, C., and Schitteck, B. (2018) YB-1 Expression and Phosphorylation Regulate Tumorigenicity and Invasiveness in Melanoma by Influencing EMT, *Mol. Cancer Res.*, **16**, 1149-1160, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0528.
  229. Sogorina, E. M., Kim, E. R., Sorokin, A. V., Lyabin, D. N., Ovchinnikov, L. P., Mordovkina, D. A., and Eliseeva, I. A. (2021) YB-1 Phosphorylation at Serine 209 Inhibits Its Nuclear Translocation, *Int J Mol Sci*, **23**, doi: 10.3390/ijms23010428.
  230. Liu, Q., Tao, T., Liu, F., Ni, R., Lu, C., and Shen, A. (2016) Hyper-O-GlcNAcylation of YB-1 affects Ser102 phosphorylation and promotes cell proliferation in hepatocellular carcinoma, *Exp. Cell Res.*, **349**, 230-238, doi: 10.1016/j.yexcr.2016.10.011.
  231. Prabhu, L., Mundade, R., Wang, B., Wei, H., Hartley, A. V., Martin, M., McElyea, K., Temm, C. J., Sandusky, G., Liu, Y., and Lu, T. (2015) Critical role of phosphorylation of serine 165 of YBX1 on the activation of NF-kappaB in colon cancer, *Oncotarget*, **6**, 29396-29412, doi: 10.18632/oncotarget.5120.
  232. Martin, M., Hua, L., Wang, B., Wei, H., Prabhu, L., Hartley, A. V., Jiang, G., Liu, Y., and Lu, T. (2017) Novel Serine 176 Phosphorylation of YBX1 Activates NF-kappaB in Colon Cancer, *J. Biol. Chem.*, **292**, 3433-3444, doi: 10.1074/jbc.M116.740258.
  233. van Roeyen, C. R., Scurt, F. G., Brandt, S., Kuhl, V. A., Martinkus, S., Djudjaj, S., Raffetseder, U., Royer, H. D., Stefanidis, I., Dunn, S. E., Dooley, S., Weng, H., Fischer, T., Lindquist, J. A., and Mertens, P. R. (2013) Cold shock Y-box protein-1 proteolysis autoregulates its transcriptional activities, *Cell Commun Signal*, **11**, 63, doi: 10.1186/1478-811X-11-63.
  234. Jayavelu, A. K., Schnoder, T. M., Perner, F., Herzog, C., Meiler, A., Krishnamoorthy, G., Huber, N., Mohr, J., Edelmann-Stephan, B., Austin, R., Brandt, S., Palandri, F., Schroder, N., Isermann, B., Edlich, F., Sinha, A. U., Ungelenk, M., Hubner, C. A., Zeiser, R., Rahmig, S., et al. (2020) Splicing factor YBX1 mediates persistence of JAK2-mutated neoplasms, *Nature*, **588**, 157-163, doi: 10.1038/s41586-020-2968-3.

235. Bader, A. G., and Vogt, P. K. (2005) Inhibition of protein synthesis by Y box-binding protein 1 blocks oncogenic cell transformation, *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 2095-2106, doi: 10.1128/MCB.25.6.2095-2106.2005.
236. Lee, B. J., Cansizoglu, A. E., Suel, K. E., Louis, T. H., Zhang, Z., and Chook, Y. M. (2006) Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2, *Cell*, **126**, 543-558, doi: 10.1016/j.cell.2006.05.049.
237. Mordovkina, D. A., Kim, E. R., Buldakov, I. A., Sorokin, A. V., Eliseeva, I. A., Lyabin, D. N., and Ovchinnikov, L. P. (2016) Transportin-1-dependent YB-1 nuclear import, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **480**, 629-634, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.107.
238. Chua, P. J., Lim, J. P., Guo, T. T., Khanna, P., Hu, Q., Bay, B. H., and Baeg, G. H. (2018) Y-box binding protein-1 and STAT3 independently regulate ATP-binding cassette transporters in the chemoresistance of gastric cancer cells, *Int. J. Oncol.*, **53**, 2579-2589, doi: 10.3892/ijco.2018.4557.
239. Kawaguchi, A., Matsumoto, K., and Nagata, K. (2012) YB-1 functions as a porter to lead influenza virus ribonucleoprotein complexes to microtubules, *J. Virol.*, **86**, 11086-11095, doi: 10.1128/JVI.00453-12.
240. Basaki, Y., Hosoi, F., Oda, Y., Fotovati, A., Maruyama, Y., Oie, S., Ono, M., Izumi, H., Kohno, K., Sakai, K., Shimoyama, T., Nishio, K., and Kuwano, M. (2007) Akt-dependent nuclear localization of Y-box-binding protein 1 in acquisition of malignant characteristics by human ovarian cancer cells, *Oncogene*, **26**, 2736-2746, doi: 10.1038/sj.onc.1210084.
241. Higashi, K., Inagaki, Y., Fujimori, K., Nakao, A., Kaneko, H., and Nakatsuka, I. (2003) Interferon-gamma interferes with transforming growth factor-beta signaling through direct interaction of YB-1 with Smad3, *J. Biol. Chem.*, **278**, 43470-43479, doi: 10.1074/jbc.M302339200.
242. Bader, A. G., and Vogt, P. K. (2008) Phosphorylation by Akt disables the anti-oncogenic activity of YB-1, *Oncogene*, **27**, 1179-1182, doi: 10.1038/sj.onc.1210719.
243. Rauen, T., Frye, B. C., Wang, J., Raffetseder, U., Alidousty, C., En-Nia, A., Floege, J., and Mertens, P. R. (2016) Cold shock protein YB-1 is involved in hypoxia-dependent gene transcription, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **478**, 982-987, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.08.064.
244. Shiota, M., Yokomizo, A., Takeuchi, A., Itsumi, M., Imada, K., Kashiwagi, E., Inokuchi, J., Tatsugami, K., Uchiumi, T., and Naito, S. (2014) Inhibition of RSK/YB-1 signaling enhances the anti-cancer effect of enzalutamide in prostate cancer, *Prostate*, **74**, 959-969, doi: 10.1002/pros.22813.
245. Tiwari, A., Rebholz, S., Maier, E., Dehghan Harati, M., Zips, D., Sers, C., Rodemann, H. P., and Toulany, M. (2018) Stress-Induced Phosphorylation of Nuclear YB-1 Depends on Nuclear Trafficking of p90 Ribosomal S6 Kinase, *Int J Mol Sci*, **19**, doi: 10.3390/ijms19082441.
246. Mehta, S., McKinney, C., Algie, M., Verma, C. S., Kannan, S., Harfoot, R., Bartolec, T. K., Bhatia, P., Fisher, A. J., Gould, M. L., Parker, K., Cesare, A. J., Cunliffe, H. E., Cohen, S. B., Kleffmann, T., Braithwaite, A. W., and Woolley, A. G. (2020) Dephosphorylation of YB-1 is Required for Nuclear Localisation During G2 Phase of the Cell Cycle, *Cancers (Basel)*, **12**, doi: 10.3390/cancers12020315.
247. Bouvet, P., and Wolffe, A. P. (1994) A role for transcription and FRGY2 in masking maternal mRNA within *Xenopus* oocytes, *Cell*, **77**, 931-941, doi: 10.1016/0092-8674(94)90141-4.
248. Matsumoto, K., Kose, S., Kuwahara, I., Yoshimura, M., Imamoto, N., and Yoshida, M. (2018) Y-box protein-associated acidic protein (YBAP1/C1QBP) affects the localization and cytoplasmic functions of YB-1, *Sci Rep*, **8**, 6198, doi: 10.1038/s41598-018-24401-3.
249. Tanaka, T., Ohashi, S., and Kobayashi, S. (2016) Four nucleocytoplasmic-shuttling proteins and p53 interact specifically with the YB-NLS and are involved in anticancer reagent-induced nuclear localization of YB-1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **478**, 1363-1369, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.08.129.

250. Kretov, D. A., Mordovkina, D. A., Eliseeva, I. A., Lyabin, D. N., Polyakov, D. N., Joshi, V., Desforges, B., Hamon, L., Lavrik, O. I., Pastre, D., Curmi, P. A., and Ovchinnikov, L. P. (2019) Inhibition of Transcription Induces Phosphorylation of YB-1 at Ser102 and Its Accumulation in the Nucleus, *Cells*, **9**, doi: 10.3390/cells9010104.
251. Tanaka, T., Kasai, M., and Kobayashi, S. (2018) Mechanism responsible for inhibitory effect of indirubin 3'-oxime on anticancer agent-induced YB-1 nuclear translocation in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells, *Exp. Cell Res.*, **370**, 454-460, doi: 10.1016/j.yexcr.2018.07.009.
252. Wu, K., Chen, K., Wang, C., Jiao, X., Wang, L., Zhou, J., Wang, J., Li, Z., Addya, S., Sorensen, P. H., Lisanti, M. P., Quong, A., Ertel, A., and Pestell, R. G. (2014) Cell fate factor DACH1 represses YB-1-mediated oncogenic transcription and translation, *Cancer Res.*, **74**, 829-839, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2466.
253. Zhang, Y. F., Homer, C., Edwards, S. J., Hananeia, L., Lasham, A., Royds, J., Sheard, P., and Braithwaite, A. W. (2003) Nuclear localization of Y-box factor YB1 requires wild-type p53, *Oncogene*, **22**, 2782-2794, doi: 10.1038/sj.onc.1206357.
254. Di Costanzo, A., Troiano, A., di Martino, O., Cacace, A., Natale, C. F., Ventre, M., Netti, P., Caserta, S., Pollice, A., La Mantia, G., and Calabro, V. (2012) The p63 protein isoform DeltaNp63alpha modulates Y-box binding protein 1 in its subcellular distribution and regulation of cell survival and motility genes, *J. Biol. Chem.*, **287**, 30170-30180, doi: 10.1074/jbc.M112.349951.
255. Ohashi, S., Atsumi, M., and Kobayashi, S. (2009) HSP60 interacts with YB-1 and affects its polysome association and subcellular localization, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **385**, 545-550, doi: 10.1016/j.bbrc.2009.05.094.
256. Stenina, O. I., Shaneyfelt, K. M., and DiCorleto, P. E. (2001) Thrombin induces the release of the Y-box protein dbpB from mRNA: a mechanism of transcriptional activation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7277-7282, doi: 10.1073/pnas.121592298.
257. Gandhi, M., Gross, M., Holler, J. M., Coggins, S. A., Patil, N., Leupold, J. H., Munschauer, M., Schenone, M., Hartigan, C. R., Allgayer, H., Kim, B., and Diederichs, S. (2020) The lncRNA lincNMR regulates nucleotide metabolism via a YBX1 - RRM2 axis in cancer, *Nat Commun*, **11**, 3214, doi: 10.1038/s41467-020-17007-9.
258. Zhang, Y., Huang, Y. X., Wang, D. L., Yang, B., Yan, H. Y., Lin, L. H., Li, Y., Chen, J., Xie, L. M., Huang, Y. S., Liao, J. Y., Hu, K. S., He, J. H., Saw, P. E., Xu, X., and Yin, D. (2020) LncRNA DSCAM-AS1 interacts with YBX1 to promote cancer progression by forming a positive feedback loop that activates FOXA1 transcription network, *Theranostics*, **10**, 10823-10837, doi: 10.7150/thno.47830.
259. Yu, X., Yang, Y., Li, Y., Cao, Y., Tang, L., Chen, F., and Xia, J. (2018) Baicalein inhibits cervical cancer progression via downregulating long noncoding RNA BDLNR and its downstream PI3K/Akt pathway, *Int J Biochem Cell Biol*, **94**, 107-118, doi: 10.1016/j.biocel.2017.11.009.
260. Zhao, X., Liu, Y., and Yu, S. (2017) Long noncoding RNA AWPPH promotes hepatocellular carcinoma progression through YBX1 and serves as a prognostic biomarker, *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, **1863**, 1805-1816, doi: 10.1016/j.bbadis.2017.04.014.
261. Deng, S. J., Chen, H. Y., Ye, Z., Deng, S. C., Zhu, S., Zeng, Z., He, C., Liu, M. L., Huang, K., Zhong, J. X., Xu, F. Y., Li, Q., Liu, Y., Wang, C. Y., and Zhao, G. (2018) Hypoxia-induced LncRNA-BX111 promotes metastasis and progression of pancreatic cancer through regulating ZEB1 transcription, *Oncogene*, **37**, 5811-5828, doi: 10.1038/s41388-018-0382-1.
262. Zheng, S., Yang, L., Zou, Y., Liang, J. Y., Liu, P., Gao, G., Yang, A., Tang, H., and Xie, X. (2020) Long non-coding RNA HUMT hypomethylation promotes lymphangiogenesis and metastasis via activating FOXK1 transcription in triple-negative breast cancer, *J Hematol Oncol*, **13**, 17, doi: 10.1186/s13045-020-00852-y.
263. Zhang, E., He, X., Zhang, C., Su, J., Lu, X., Si, X., Chen, J., Yin, D., Han, L., and De, W. (2018) A novel long noncoding RNA HOXC-AS3 mediates tumorigenesis of gastric cancer by binding to YBX1, *Genome Biol*, **19**, 154, doi: 10.1186/s13059-018-1523-0.

264. Su, J., Yu, B., Zhang, C., Yi, P., Li, H., Xu, C., Cao, L., Chen, P., Li, M., Shen, K., and Chen, J. (2020) Long noncoding RNA HOXC-AS3 indicates a poor prognosis and regulates tumorigenesis by binding to YBX1 in breast cancer, *Am J Transl Res*, **12**, 6335-6350,
265. Song, S., He, X., Wang, J., Song, H., Wang, Y., Liu, Y., Zhou, Z., Yu, Z., Miao, D., and Xue, Y. (2021) A novel long noncoding RNA, TMEM92-AS1, promotes gastric cancer progression by binding to YBX1 to mediate CCL5, *Mol Oncol*, **15**, 1256-1273, doi: 10.1002/1878-0261.12863.
266. Fang, J., Hong, H., Xue, X., Zhu, X., Jiang, L., Qin, M., Liang, H., and Gao, L. (2019) A novel circular RNA, circFAT1(e2), inhibits gastric cancer progression by targeting miR-548g in the cytoplasm and interacting with YBX1 in the nucleus, *Cancer Lett.*, **442**, 222-232, doi: 10.1016/j.canlet.2018.10.040.
267. Ali, M. M., Akhade, V. S., Kosalai, S. T., Subhash, S., Statello, L., Meryet-Figuere, M., Abrahamsson, J., Mondal, T., and Kanduri, C. (2018) PAN-cancer analysis of S-phase enriched lncRNAs identifies oncogenic drivers and biomarkers, *Nat Commun*, **9**, 883, doi: 10.1038/s41467-018-03265-1.
268. Wong, C. H., Lou, U. K., Li, Y., Chan, S. L., Tong, J. H., To, K. F., and Chen, Y. (2020) CircFOXK2 Promotes Growth and Metastasis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by Complexing with RNA-Binding Proteins and Sponging MiR-942, *Cancer Res.*, **80**, 2138-2149, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-3268.
269. Zhao, P., Ji, M. M., Fang, Y., Li, X., Yi, H. M., Yan, Z. X., Cheng, S., Xu, P. P., Janin, A., Wang, C. F., Wang, L., and Zhao, W. L. (2021) A novel lncRNA TCLnc1 promotes peripheral T cell lymphoma progression through acting as a modular scaffold of HNRNPD and YBX1 complexes, *Cell Death Dis*, **12**, 321, doi: 10.1038/s41419-021-03594-y.
270. Choong, O. K., Chen, C. Y., Zhang, J., Lin, J. H., Lin, P. J., Ruan, S. C., Kamp, T. J., and Hsieh, P. C. H. (2019) Hypoxia-induced H19/YB-1 cascade modulates cardiac remodeling after infarction, *Theranostics*, **9**, 6550-6567, doi: 10.7150/thno.35218.
271. Diaz-Lagares, A., Crujeiras, A. B., Lopez-Serra, P., Soler, M., Setien, F., Goyal, A., Sandoval, J., Hashimoto, Y., Martinez-Cardus, A., Gomez, A., Heyn, H., Moutinho, C., Espada, J., Vidal, A., Paules, M., Galan, M., Sala, N., Akiyama, Y., Martinez-Iniesta, M., Farre, L., et al. (2016) Epigenetic inactivation of the p53-induced long noncoding RNA TP53 target 1 in human cancer, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **113**, E7535-E7544, doi: 10.1073/pnas.1608585113.
272. Kishikawa, T., Otsuka, M., Yoshikawa, T., Ohno, M., Ijichi, H., and Koike, K. (2016) Satellite RNAs promote pancreatic oncogenic processes via the dysfunction of YBX1, *Nat Commun*, **7**, 13006, doi: 10.1038/ncomms13006.
273. Wang, X., Zhang, X., Dang, Y., Li, D., Lu, G., Chan, W. Y., Leung, P. C. K., Zhao, S., Qin, Y., and Chen, Z. J. (2020) Long noncoding RNA HCP5 participates in premature ovarian insufficiency by transcriptionally regulating MSH5 and DNA damage repair via YB1, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 4480-4491, doi: 10.1093/nar/gkaa127.
274. Marchesini, M., Ogoti, Y., Fiorini, E., Aktas Samur, A., Nezi, L., D'Anca, M., Storti, P., Samur, M. K., Ganan-Gomez, I., Fulciniti, M. T., Mistry, N., Jiang, S., Bao, N., Marchica, V., Neri, A., Bueso-Ramos, C., Wu, C. J., Zhang, L., Liang, H., Peng, X., et al. (2017) ILF2 Is a Regulator of RNA Splicing and DNA Damage Response in 1q21-Amplified Multiple Myeloma, *Cancer Cell*, **32**, 88-100 e106, doi: 10.1016/j.ccell.2017.05.011.
275. Pham, T. P., Bink, D. I., Stanicek, L., van Bergen, A., van Leeuwen, E., Tran, Y., Matic, L., Hedin, U., Wittig, I., Dimmeler, S., and Boon, R. A. (2020) Long Non-coding RNA Aerrie Controls DNA Damage Repair via YBX1 to Maintain Endothelial Cell Function, *Front Cell Dev Biol*, **8**, 619079, doi: 10.3389/fcell.2020.619079.
276. Dimartino, D., Colantoni, A., Ballarino, M., Martone, J., Mariani, D., Danner, J., Bruckmann, A., Meister, G., Morlando, M., and Bozzoni, I. (2018) The Long Non-coding RNA Inc-31 Interacts with Rock1 mRNA and Mediates Its YB-1-Dependent Translation, *Cell Rep*, **23**, 733-740, doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.101.

277. Wang, X., Li, L., Zhao, K., Lin, Q., Li, H., Xue, X., Ge, W., He, H., Liu, D., Xie, H., Wu, Q., and Hu, Y. (2020) A novel LncRNA HITT forms a regulatory loop with HIF-1 $\alpha$  to modulate angiogenesis and tumor growth, *Cell Death Differ.*, **27**, 1431-1446, doi: 10.1038/s41418-019-0449-8.
278. Zhao, P., Deng, Y., Wu, Y., Guo, Q., Zhou, L., Yang, X., and Wang, C. (2021) Long noncoding RNA SNHG6 promotes carcinogenesis by enhancing YBX1-mediated translation of HIF1 $\alpha$  in clear cell renal cell carcinoma, *FASEB J.*, **35**, e21160, doi: 10.1096/fj.202000732RR.
279. Li, D., Liu, X., Zhou, J., Hu, J., Zhang, D., Liu, J., Qiao, Y., and Zhan, Q. (2017) Long noncoding RNA HULC modulates the phosphorylation of YB-1 through serving as a scaffold of extracellular signal-regulated kinase and YB-1 to enhance hepatocarcinogenesis, *Hepatology*, **65**, 1612-1627, doi: 10.1002/hep.29010.
280. Montes, M., Lubas, M., Arendrup, F. S., Mentz, B., Rohatgi, N., Tumas, S., Harder, L. M., Skanderup, A. J., Andersen, J. S., and Lund, A. H. (2021) The long non-coding RNA MIR31HG regulates the senescence associated secretory phenotype, *Nat Commun*, **12**, 2459, doi: 10.1038/s41467-021-22746-4.
281. Grigelioniene, G., Suzuki, H. I., Taylan, F., Mirzamohammadi, F., Borochowitz, Z. U., Ayturk, U. M., Tzur, S., Horemuzova, E., Lindstrand, A., Weis, M. A., Grigelionis, G., Hammarsjo, A., Marsk, E., Nordgren, A., Nordenskjold, M., Eyre, D. R., Warman, M. L., Nishimura, G., Sharp, P. A., and Kobayashi, T. (2019) Gain-of-function mutation of microRNA-140 in human skeletal dysplasia, *Nat. Med.*, **25**, 583-590, doi: 10.1038/s41591-019-0353-2.
282. Uchiumi, T., Fotovati, A., Sasaguri, T., Shibahara, K., Shimada, T., Fukuda, T., Nakamura, T., Izumi, H., Tsuzuki, T., Kuwano, M., and Kohno, K. (2006) YB-1 is important for an early stage embryonic development: neural tube formation and cell proliferation, *J. Biol. Chem.*, **281**, 40440-40449, doi: 10.1074/jbc.M605948200.
283. Parshina, E. A., Eroshkin, F. M., capital O, C. E. E., Gyoeva, F. K., Shokhina, A. G., Staroverov, D. B., Belousov, V. V., Zhigalova, N. A., Prokhortchouk, E. B., Zaraisky, A. G., and Martynova, N. Y. (2020) Cytoskeletal Protein Zyxin Inhibits the Activity of Genes Responsible for Embryonic Stem Cell Status, *Cell Rep*, **33**, 108396, doi: 10.1016/j.celrep.2020.108396.
284. Feng, Q., Huang, S., Zhang, A., Chen, Q., Guo, X., Chen, R., and Yang, T. (2009) Y-box protein 1 stimulates mesangial cell proliferation via activation of ERK1/2, *Nephron Exp Nephrol*, **113**, e16-25, doi: 10.1159/000228079.
285. Bergmann, S., Royer-Pokora, B., Fietze, E., Jurchott, K., Hildebrandt, B., Trost, D., Leenders, F., Claude, J. C., Theuring, F., Bargou, R., Dietel, M., and Royer, H. D. (2005) YB-1 provokes breast cancer through the induction of chromosomal instability that emerges from mitotic failure and centrosome amplification, *Cancer Res.*, **65**, 4078-4087, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4056.
286. Basaki, Y., Taguchi, K., Izumi, H., Murakami, Y., Kubo, T., Hosoi, F., Watari, K., Nakano, K., Kawaguchi, H., Ohno, S., Kohno, K., Ono, M., and Kuwano, M. (2010) Y-box binding protein-1 (YB-1) promotes cell cycle progression through CDC6-dependent pathway in human cancer cells, *Eur. J. Cancer*, **46**, 954-965, doi: 10.1016/j.ejca.2009.12.024.
287. Lasham, A., Print, C. G., Woolley, A. G., Dunn, S. E., and Braithwaite, A. W. (2013) YB-1: oncoprotein, prognostic marker and therapeutic target?, *Biochem. J.*, **449**, 11-23, doi: 10.1042/BJ20121323.
288. Xiao, Y. Z., Yang, M., Xiao, Y., Guo, Q., Huang, Y., Li, C. J., Cai, D., and Luo, X. H. (2020) Reducing Hypothalamic Stem Cell Senescence Protects against Aging-Associated Physiological Decline, *Cell Metab*, **31**, 534-548 e535, doi: 10.1016/j.cmet.2020.01.002.
289. Harada, M., Hu, B., Lu, J., Wang, J., Rinke, A. E., Wu, Z., Liu, T., and Phan, S. H. (2021) The dual distinct role of telomerase in repression of senescence and myofibroblast differentiation, *Aging (Albany NY)*, **13**, 16957-16973, doi: 10.18632/aging.203246.

290. Yang, H. W., Kim, H. D., Kim, T. S., and Kim, J. (2019) Senescent Cells Differentially Translate Senescence-Related mRNAs Via Ribosome Heterogeneity, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, **74**, 1015-1024, doi: 10.1093/gerona/gly228.
291. Lee, C., Dhillon, J., Wang, M. Y., Gao, Y., Hu, K., Park, E., Astanehe, A., Hung, M. C., Eirew, P., Eaves, C. J., and Dunn, S. E. (2008) Targeting YB-1 in HER-2 overexpressing breast cancer cells induces apoptosis via the mTOR/STAT3 pathway and suppresses tumor growth in mice, *Cancer Res.*, **68**, 8661-8666, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1082.
292. Chatterjee, M., Rancso, C., Stuhmer, T., Eckstein, N., Andrusis, M., Gerecke, C., Lorentz, H., Royer, H. D., and Bargou, R. C. (2008) The Y-box binding protein YB-1 is associated with progressive disease and mediates survival and drug resistance in multiple myeloma, *Blood*, **111**, 3714-3722, doi: 10.1182/blood-2007-05-089151.
293. Homer, C., Knight, D. A., Hananeia, L., Sheard, P., Risk, J., Lasham, A., Royds, J. A., and Braithwaite, A. W. (2005) Y-box factor YB1 controls p53 apoptotic function, *Oncogene*, **24**, 8314-8325, doi: 10.1038/sj.onc.1208998.
294. Feng, M., Xie, X., Han, G., Zhang, T., Li, Y., Li, Y., Yin, R., Wang, Q., Zhang, T., Wang, P., Hu, J., Cheng, Y., Gao, Z., Wang, J., Chang, J., Cui, M., Gao, K., Chai, J., Liu, W., Guo, C., et al. (2021) YBX1 is required for maintaining myeloid leukemia cell survival by regulating BCL2 stability in an m6A-dependent manner, *Blood*, **138**, 71-85, doi: 10.1182/blood.2020009676.
295. Guzikowski, A. R., Chen, Y. S., and Zid, B. M. (2019) Stress-induced mRNP granules: Form and function of processing bodies and stress granules, *Wiley Interdiscip Rev RNA*, **10**, e1524, doi: 10.1002/wrna.1524.
296. Tauber, D., Tauber, G., and Parker, R. (2020) Mechanisms and Regulation of RNA Condensation in RNP Granule Formation, *Trends Biochem. Sci.*, **45**, 764-778, doi: 10.1016/j.tibs.2020.05.002.
297. Hofmann, S., Kedersha, N., Anderson, P., and Ivanov, P. (2021) Molecular mechanisms of stress granule assembly and disassembly, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, **1868**, 118876, doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118876.
298. Tanaka, T., Ohashi, S., and Kobayashi, S. (2014) Roles of YB-1 under arsenite-induced stress: translational activation of HSP70 mRNA and control of the number of stress granules, *Biochim. Biophys. Acta*, **1840**, 985-992, doi: 10.1016/j.bbagen.2013.11.002.
299. Chernov, K. G., Mechulam, A., Popova, N. V., Pastre, D., Nadezhdina, E. S., Skabkina, O. V., Shanina, N. A., Vasiliev, V. D., Tarrade, A., Melki, J., Joshi, V., Baconnais, S., Toma, F., Ovchinnikov, L. P., and Curmi, P. A. (2008) YB-1 promotes microtubule assembly in vitro through interaction with tubulin and microtubules, *BMC Biochem.*, **9**, 23, doi: 10.1186/1471-2091-9-23.
300. Chernov, K. G., Barbet, A., Hamon, L., Ovchinnikov, L. P., Curmi, P. A., and Pastre, D. (2009) Role of microtubules in stress granule assembly: microtubule dynamical instability favors the formation of micrometric stress granules in cells, *J. Biol. Chem.*, **284**, 36569-36580, doi: 10.1074/jbc.M109.042879.
301. Yamasaki, S., Ivanov, P., Hu, G. F., and Anderson, P. (2009) Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression, *J. Cell Biol.*, **185**, 35-42, doi: 10.1083/jcb.200811106.
302. Emara, M. M., Ivanov, P., Hickman, T., Dawra, N., Tisdale, S., Kedersha, N., Hu, G. F., and Anderson, P. (2010) Angiogenin-induced tRNA-derived stress-induced RNAs promote stress-induced stress granule assembly, *J. Biol. Chem.*, **285**, 10959-10968, doi: 10.1074/jbc.M109.077560.
303. Ivanov, P., Emara, M. M., Villen, J., Gygi, S. P., and Anderson, P. (2011) Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation, *Mol. Cell*, **43**, 613-623, doi: 10.1016/j.molcel.2011.06.022.
304. Abrakhi, S., Kretov, D. A., Desforgues, B., Dobra, I., Bouhss, A., Pastre, D., and Hamon, L. (2017) Nanoscale Analysis Reveals the Maturation of Neurodegeneration-Associated Protein



- Aggregates: Grown in mRNA Granules then Released by Stress Granule Proteins, *ACS Nano*, **11**, 7189-7200, doi: 10.1021/acsnano.7b03071.
305. Budkina, K., El Hage, K., Clement, M. J., Desforges, B., Bouhss, A., Joshi, V., Maucuer, A., Hamon, L., Ovchinnikov, L. P., Lyabin, D. N., and Pastre, D. (2021) YB-1 unwinds mRNA secondary structures in vitro and negatively regulates stress granule assembly in HeLa cells, *Nucleic Acids Res.*, **49**, 10061-10081, doi: 10.1093/nar/gkab748.
  306. Castanotto, D., Zhang, X., Alluin, J., Zhang, X., Ruger, J., Armstrong, B., Rossi, J., Riggs, A., and Stein, C. A. (2018) A stress-induced response complex (SIRC) shuttles miRNAs, siRNAs, and oligonucleotides to the nucleus, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **115**, E5756-E5765, doi: 10.1073/pnas.1721346115.
  307. Kobayashi, S., Tanaka, T., Moue, M., Ohashi, S., and Nishikawa, T. (2015) YB-1 gene expression is kept constant during myocyte differentiation through replacement of different transcription factors and then falls gradually under the control of neural activity, *Int J Biochem Cell Biol*, **68**, 1-8, doi: 10.1016/j.biocel.2015.08.008.
  308. Fotovati, A., Abu-Ali, S., Wang, P. S., Deleyrolle, L. P., Lee, C., Triscott, J., Chen, J. Y., Franciosi, S., Nakamura, Y., Sugita, Y., Uchiumi, T., Kuwano, M., Leavitt, B. R., Singh, S. K., Jury, A., Jones, C., Wakimoto, H., Reynolds, B. A., Pallen, C. J., and Dunn, S. E. (2011) YB-1 bridges neural stem cells and brain tumor-initiating cells via its roles in differentiation and cell growth, *Cancer Res.*, **71**, 5569-5578, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2805.
  309. di Martino, O., Troiano, A., Guarino, A. M., Pollice, A., Vivo, M., La Mantia, G., and Calabro, V. (2016) DeltaNp63alpha controls YB-1 protein stability: evidence on YB-1 as a new player in keratinocyte differentiation, *Genes Cells*, **21**, 648-660, doi: 10.1111/gtc.12373.
  310. Bhullar, J., and Sollars, V. E. (2011) YBX1 expression and function in early hematopoiesis and leukemic cells, *Immunogenetics*, **63**, 337-350, doi: 10.1007/s00251-011-0517-9.
  311. Evans, M. K., Matsui, Y., Xu, B., Willis, C., Loomer, J., Milburn, L., Fan, Y., Pagala, V., and Peng, J. C. (2020) Ybx1 fine-tunes PRC2 activities to control embryonic brain development, *Nat Commun*, **11**, 4060, doi: 10.1038/s41467-020-17878-y.
  312. Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., and Nieto, M. A. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease, *Cell*, **139**, 871-890, doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007.
  313. Shiota, M., Izumi, H., Onitsuka, T., Miyamoto, N., Kashiwagi, E., Kidani, A., Yokomizo, A., Naito, S., and Kohno, K. (2008) Twist promotes tumor cell growth through YB-1 expression, *Cancer Res.*, **68**, 98-105, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2981.
  314. Chen, Z. F., and Behringer, R. R. (1995) twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis, *Genes Dev.*, **9**, 686-699, doi: 10.1101/gad.9.6.686.
  315. Kolmykov, S., Yevshin, I., Kulyashov, M., Sharipov, R., Kondrakhin, Y., Makeev, V. J., Kulakovskiy, I. V., Kel, A., and Kolpakov, F. (2021) GTRD: an integrated view of transcription regulation, *Nucleic Acids Res.*, **49**, D104-D111, doi: 10.1093/nar/gkaa1057.
  316. Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, **126**, 663-676, doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
  317. Shi, J. H., Zheng, B., Chen, S., Ma, G. Y., and Wen, J. K. (2012) Retinoic acid receptor alpha mediates all-trans-retinoic acid-induced Klf4 gene expression by regulating Klf4 promoter activity in vascular smooth muscle cells, *J. Biol. Chem.*, **287**, 10799-10811, doi: 10.1074/jbc.M111.321836.
  318. Jung, K., Wu, F., Wang, P., Ye, X., Abdulkarim, B. S., and Lai, R. (2014) YB-1 regulates Sox2 to coordinately sustain stemness and tumorigenic properties in a phenotypically distinct subset of breast cancer cells, *BMC Cancer*, **14**, 328, doi: 10.1186/1471-2407-14-328.
  319. Bommert, K. S., Effenberger, M., Leich, E., Kuspert, M., Murphy, D., Langer, C., Moll, R., Janz, S., Mottok, A., Weissbach, S., Rosenwald, A., Bargou, R., and Bommert, K. (2013) The feed-forward loop between YB-1 and MYC is essential for multiple myeloma cell survival, *Leukemia*, **27**, 441-450, doi: 10.1038/leu.2012.185.

320. Cobbold, L. C., Spriggs, K. A., Haines, S. J., Dobbyn, H. C., Hayes, C., de Moor, C. H., Lilley, K. S., Bushell, M., and Willis, A. E. (2008) Identification of internal ribosome entry segment (IRES)-trans-acting factors for the Myc family of IRESs, *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 40-49, doi: 10.1128/MCB.01298-07.
321. Guo, C., Xue, Y., Yang, G., Yin, S., Shi, W., Cheng, Y., Yan, X., Fan, S., Zhang, H., and Zeng, F. (2016) Nanog RNA-binding proteins YBX1 and ILF3 affect pluripotency of embryonic stem cells, *Cell Biol. Int.*, **40**, 847-860, doi: 10.1002/cbin.10539.
322. Raffetseder, U., Liehn, E. A., Weber, C., and Mertens, P. R. (2012) Role of cold shock Y-box protein-1 in inflammation, atherosclerosis and organ transplant rejection, *Eur. J. Cell Biol.*, **91**, 567-575, doi: 10.1016/j.ejcb.2011.07.001.
323. Liverman, C. S., Kaftan, H. A., Cui, L., Hersperger, S. G., Taboada, E., Klein, R. M., and Berman, N. E. (2006) Altered expression of pro-inflammatory and developmental genes in the fetal brain in a mouse model of maternal infection, *Neurosci. Lett.*, **399**, 220-225, doi: 10.1016/j.neulet.2006.01.064.
324. Mertens, P. R., Martin, I. V., Frye, B. C., Rauen, T., Strauch, S., Pabst, M., and Geier, A. (2012) Rat Mrp2 gene expression is regulated by an interleukin-1beta-stimulated biphasic response with enhanced transcription and subcellular shuttling of YB-1, *Eur. J. Cell Biol.*, **91**, 533-541, doi: 10.1016/j.ejcb.2011.12.002.
325. van Roeyen, C. R., Eitner, F., Martinkus, S., Thielges, S. R., Ostendorf, T., Bokemeyer, D., Luscher, B., Luscher-Firzlaff, J. M., Floege, J., and Mertens, P. R. (2005) Y-box protein 1 mediates PDGF-B effects in mesangioproliferative glomerular disease, *J Am Soc Nephrol*, **16**, 2985-2996, doi: 10.1681/ASN.2004111009.
326. Hanssen, L., Alidousty, C., Djudjaj, S., Frye, B. C., Rauen, T., Boor, P., Mertens, P. R., van Roeyen, C. R., Tacke, F., Heymann, F., Tittel, A. P., Koch, A., Floege, J., Ostendorf, T., and Raffetseder, U. (2013) YB-1 is an early and central mediator of bacterial and sterile inflammation in vivo, *J. Immunol.*, **191**, 2604-2613, doi: 10.4049/jimmunol.1300416.
327. Rybalkina, E. Y., and Moiseeva, N. I. (2022) Role of YB-1 Protein in Inflammation, *Biochemistry (Mosc)*, **87**, S94-202, doi: 10.1134/S0006297922140085.
328. Gimenez-Bonafe, P., Fedoruk, M. N., Whitmore, T. G., Akbari, M., Ralph, J. L., Ettinger, S., Gleave, M. E., and Nelson, C. C. (2004) YB-1 is upregulated during prostate cancer tumor progression and increases P-glycoprotein activity, *Prostate*, **59**, 337-349, doi: 10.1002/pros.20023.
329. Janz, M., Harbeck, N., Dettmar, P., Berger, U., Schmidt, A., Jurchott, K., Schmitt, M., and Royer, H. D. (2002) Y-box factor YB-1 predicts drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumor biologic factors HER2, uPA and PAI-1, *Int. J. Cancer*, **97**, 278-282, doi: 10.1002/ijc.1610.
330. Rubinstein, D. B., Stortchevoi, A., Boosalis, M., Ashfaq, R., and Guillaume, T. (2002) Overexpression of DNA-binding protein B gene product in breast cancer as detected by in vitro-generated combinatorial human immunoglobulin libraries, *Cancer Res.*, **62**, 4985-4991,
331. Saji, H., Toi, M., Saji, S., Koike, M., Kohno, K., and Kuwano, M. (2003) Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human breast carcinoma, *Cancer Lett.*, **190**, 191-197, doi: 10.1016/s0304-3835(02)00590-6.
332. Schitteck, B., Psenner, K., Sauer, B., Meier, F., Iftner, T., and Garbe, C. (2007) The increased expression of Y box-binding protein 1 in melanoma stimulates proliferation and tumor invasion, antagonizes apoptosis and enhances chemoresistance, *Int. J. Cancer*, **120**, 2110-2118, doi: 10.1002/ijc.22512.
333. Shibahara, K., Sugio, K., Osaki, T., Uchiumi, T., Maehara, Y., Kohno, K., Yasumoto, K., Sugimachi, K., and Kuwano, M. (2001) Nuclear expression of the Y-box binding protein, YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small cell lung cancer, *Clin. Cancer. Res.*, **7**, 3151-3155,
334. Shibao, K., Takano, H., Nakayama, Y., Okazaki, K., Nagata, N., Izumi, H., Uchiumi, T., Kuwano, M., Kohno, K., and Itoh, H. (1999) Enhanced coexpression of YB-1 and DNA

- topoisomerase II alpha genes in human colorectal carcinomas, *Int. J. Cancer*, **83**, 732-737, doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19991210)83:6<732::aid-ijc6>3.0.co;2-#.
335. Xu, W., Zhou, L., Qin, R., Tang, H., and Shen, H. (2009) Nuclear expression of YB-1 in diffuse large B-cell lymphoma: correlation with disease activity and patient outcome, *Eur J Haematol*, **83**, 313-319, doi: 10.1111/j.1600-0609.2009.01285.x.
336. Yahata, H., Kobayashi, H., Kamura, T., Amada, S., Hirakawa, T., Kohno, K., Kuwano, M., and Nakano, H. (2002) Increased nuclear localization of transcription factor YB-1 in acquired cisplatin-resistant ovarian cancer, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **128**, 621-626, doi: 10.1007/s00432-002-0386-6.
337. Yasen, M., Kajino, K., Kano, S., Tobita, H., Yamamoto, J., Uchiumi, T., Kon, S., Maeda, M., Obulhasim, G., Arii, S., and Hino, O. (2005) The up-regulation of Y-box binding proteins (DNA binding protein A and Y-box binding protein-1) as prognostic markers of hepatocellular carcinoma, *Clin. Cancer. Res.*, **11**, 7354-7361, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1027.
338. Gessner, C., Woischwill, C., Schumacher, A., Liebers, U., Kuhn, H., Stiehl, P., Jurchott, K., Royer, H. D., Witt, C., and Wolff, G. (2004) Nuclear YB-1 expression as a negative prognostic marker in nonsmall cell lung cancer, *Eur. Respir. J.*, **23**, 14-19, doi: 10.1183/09031936.03.00033203.
339. Вайман А.В., Г. Г. П., Стромская Т.П., Рыбалкина, Е.Ю., Сорокин А.В., Гурьянов С.Г., Овчинников Л.П., Ставровская А.А. (2007), *Молекулярная медицина*, **1**, 31-37,
340. Генс Г.П., С. Т. П., Калита О.В., Вайман А.В., Рыбалкина Е.Ю., Овчинников Л.П., Сорокин А.В., Коробкова Л.И., Астраханцев А.Ф., Муха С.Ф., Моисеева Н.И., Ставровская А.А. (2009), *Клиническая и лабораторная диагностика*, **4**, 21-24,
341. Jiang, L., Yuan, G. L., Liang, Q. L., Zhang, H. J., Huang, J., Cheng, S. A., and Peng, X. X. (2017) Positive expression of Y-box binding protein 1 and prognosis in non-small cell lung cancer: a meta-analysis, *Oncotarget*, **8**, 55613-55621, doi: 10.18632/oncotarget.14732.
342. Bates, M., Boland, A., McDermott, N., and Marignol, L. (2020) YB-1: The key to personalised prostate cancer management?, *Cancer Lett.*, **490**, 66-75, doi: 10.1016/j.canlet.2020.07.006.
343. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, **144**, 646-674, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
344. Zhao, S., Wang, Y., Guo, T., Yu, W., Li, J., Tang, Z., Yu, Z., Zhao, L., Zhang, Y., Wang, Z., Wang, P., Li, Y., Li, F., Sun, Z., Xuan, Y., Tang, R., Deng, W. G., Guo, W., and Gu, C. (2016) YBX1 regulates tumor growth via CDC25a pathway in human lung adenocarcinoma, *Oncotarget*, **7**, 82139-82157, doi: 10.18632/oncotarget.10080.
345. Johnson, T. G., Schelch, K., Mehta, S., Burgess, A., and Reid, G. (2019) Why Be One Protein When You Can Affect Many? The Multiple Roles of YB-1 in Lung Cancer and Mesothelioma, *Front Cell Dev Biol*, **7**, 221, doi: 10.3389/fcell.2019.00221.
346. Chao, H. M., Huang, H. X., Chang, P. H., Tseng, K. C., Miyajima, A., and Chern, E. (2017) Y-box binding protein-1 promotes hepatocellular carcinoma-initiating cell progression and tumorigenesis via Wnt/beta-catenin pathway, *Oncotarget*, **8**, 2604-2616, doi: 10.18632/oncotarget.13733.
347. Guo, T., Kong, J., Liu, Y., Li, Z., Xia, J., Zhang, Y., Zhao, S., Li, F., Li, J., and Gu, C. (2017) Transcriptional activation of NANOG by YBX1 promotes lung cancer stem-like properties and metastasis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **487**, 153-159, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.033.
348. Cong, Z., Diao, Y., Li, X., Jiang, Z., Xu, Y., Zhou, H., Qiang, Y., Wu, H., and Shen, Y. (2020) Long non-coding RNA linc00665 interacts with YB-1 and promotes angiogenesis in lung adenocarcinoma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **527**, 545-552, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.04.108.
349. Gopal, S. K., Greening, D. W., Mathias, R. A., Ji, H., Rai, A., Chen, M., Zhu, H. J., and Simpson, R. J. (2015) YBX1/YB-1 induces partial EMT and tumourigenicity through secretion of angiogenic factors into the extracellular microenvironment, *Oncotarget*, **6**, 13718-13730, doi: 10.18632/oncotarget.3764.

350. Xu, L., Li, H., Wu, L., and Huang, S. (2017) YBX1 promotes tumor growth by elevating glycolysis in human bladder cancer, *Oncotarget*, **8**, 65946-65956, doi: 10.18632/oncotarget.19583.
351. Lai, Y. W., Hsu, W. J., Lee, W. Y., Chen, C. H., Tsai, Y. H., Dai, J. Z., Yang, C. C., and Lin, C. W. (2021) Prognostic Value of a Glycolytic Signature and Its Regulation by Y-Box-Binding Protein 1 in Triple-Negative Breast Cancer, *Cells*, **10**, doi: 10.3390/cells10081890.
352. Davies, A. H., Barrett, I., Pambid, M. R., Hu, K., Stratford, A. L., Freeman, S., Berquin, I. M., Pelech, S., Hieter, P., Maxwell, C., and Dunn, S. E. (2011) YB-1 evokes susceptibility to cancer through cytokinesis failure, mitotic dysfunction and HER2 amplification, *Oncogene*, **30**, 3649-3660, doi: 10.1038/onc.2011.82.
353. Peng, Z., Wang, J., Shan, B., Li, B., Peng, W., Dong, Y., Shi, W., Zhao, W., He, D., Duan, M., Cheng, Y., Zhang, C., and Duan, C. (2018) The long noncoding RNA LINC00312 induces lung adenocarcinoma migration and vasculogenic mimicry through directly binding YBX1, *Mol Cancer*, **17**, 167, doi: 10.1186/s12943-018-0920-z.
354. Yu, C. H., Fang, C. Y., Yu, C. C., Hsieh, P. L., Liao, Y. W., Tsai, L. L., and Chu, P. M. (2020) LINC00312/YBX1 Axis Regulates Myofibroblast Activities in Oral Submucous Fibrosis, *Int J Mol Sci*, **21**, doi: 10.3390/ijms21082979.
355. Deng, X., Xiong, W., Jiang, X., Zhang, S., Li, Z., Zhou, Y., Xiang, B., Zhou, M., Li, X., Li, G., Zeng, Z., and Gong, Z. (2020) LncRNA LINC00472 regulates cell stiffness and inhibits the migration and invasion of lung adenocarcinoma by binding to YBX1, *Cell Death Dis*, **11**, 945, doi: 10.1038/s41419-020-03147-9.
356. Tauro, B. J., Mathias, R. A., Greening, D. W., Gopal, S. K., Ji, H., Kapp, E. A., Coleman, B. M., Hill, A. F., Kusebauch, U., Hallows, J. L., Shteynberg, D., Moritz, R. L., Zhu, H. J., and Simpson, R. J. (2013) Oncogenic H-ras reprograms Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell-derived exosomal proteins following epithelial-mesenchymal transition, *Mol. Cell. Proteomics*, **12**, 2148-2159, doi: 10.1074/mcp.M112.027086.
357. Xue, X., Huang, J., Yu, K., Chen, X., He, Y., Qi, D., and Wu, Y. (2020) YB-1 transferred by gastric cancer exosomes promotes angiogenesis via enhancing the expression of angiogenic factors in vascular endothelial cells, *BMC Cancer*, **20**, 996, doi: 10.1186/s12885-020-07509-6.
358. Kosnopfel, C., Sinnberg, T., Sauer, B., Niessner, H., Muenchow, A., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Mertens, P. R., Garbe, C., Thakur, B. K., and Schitteck, B. (2020) Tumour Progression Stage-Dependent Secretion of YB-1 Stimulates Melanoma Cell Migration and Invasion, *Cancers (Basel)*, **12**, doi: 10.3390/cancers12082328.
359. Makino, Y., Ohga, T., Toh, S., Koike, K., Okumura, K., Wada, M., Kuwano, M., and Kohno, K. (1996) Structural and functional analysis of the human Y-box binding protein (YB-1) gene promoter, *Nucleic Acids Res.*, **24**, 1873-1878, doi: 10.1093/nar/24.10.1873.
360. Consortium, E. P., Moore, J. E., Purcaro, M. J., Pratt, H. E., Epstein, C. B., Shores, N., Adrian, J., Kawli, T., Davis, C. A., Dobin, A., Kaul, R., Halow, J., Van Nostrand, E. L., Freese, P., Gorkin, D. U., Shen, Y., He, Y., Mackiewicz, M., Pauli-Behn, F., Williams, B. A., et al. (2020) Expanded encyclopaedias of DNA elements in the human and mouse genomes, *Nature*, **583**, 699-710, doi: 10.1038/s41586-020-2493-4.
361. Ito, K., Tsutsumi, K., Kuzumaki, T., Gomez, P. F., Otsu, K., and Ishikawa, K. (1994) A novel growth-inducible gene that encodes a protein with a conserved cold-shock domain, *Nucleic Acids Res.*, **22**, 2036-2041, doi: 10.1093/nar/22.11.2036.
362. Mastrangelo, M. A., and Kleene, K. C. (2000) Developmental expression of Y-box protein 1 mRNA and alternatively spliced Y-box protein 3 mRNAs in spermatogenic cells in mice, *Mol Hum Reprod*, **6**, 779-788, doi: 10.1093/molehr/6.9.779.
363. Tanaka, T., Kondo, S., Iwasa, Y., Hiai, H., and Toyokuni, S. (2000) Expression of stress-response and cell proliferation genes in renal cell carcinoma induced by oxidative stress, *Am J Pathol*, **156**, 2149-2157, doi: 10.1016/S0002-9440(10)65085-7.

364. Jiang, L., Wang, M., Lin, S., Jian, R., Li, X., Chan, J., Dong, G., Fang, H., Robinson, A. E., Consortium, G. T., and Snyder, M. P. (2020) A Quantitative Proteome Map of the Human Body, *Cell*, **183**, 269-283 e219, doi: 10.1016/j.cell.2020.08.036.
365. Uhlen, M., Hallstrom, B. M., Lindskog, C., Mardinoglu, A., Ponten, F., and Nielsen, J. (2016) Transcriptomics resources of human tissues and organs, *Mol. Syst. Biol.*, **12**, 862, doi: 10.15252/msb.20155865.
366. Wang, D., Eraslan, B., Wieland, T., Hallstrom, B., Hopf, T., Zolg, D. P., Zecha, J., Asplund, A., Li, L. H., Meng, C., Frejno, M., Schmidt, T., Schnatbaum, K., Wilhelm, M., Ponten, F., Uhlen, M., Gagneur, J., Hahne, H., and Kuster, B. (2019) A deep proteome and transcriptome abundance atlas of 29 healthy human tissues, *Mol. Syst. Biol.*, **15**, e8503, doi: 10.15252/msb.20188503.
367. Samaras, P., Schmidt, T., Frejno, M., Gessulat, S., Reinecke, M., Jarzab, A., Zecha, J., Mergner, J., Giansanti, P., Ehrlich, H. C., Aiche, S., Rank, J., Kienegger, H., Krcmar, H., Kuster, B., and Wilhelm, M. (2020) ProteomicsDB: a multi-omics and multi-organism resource for life science research, *Nucleic Acids Res.*, **48**, D1153-D1163, doi: 10.1093/nar/gkz974.
368. Lyabin, D. N., Eliseeva, I. A., and Ovchinnikov, L. P. (2012) YB-1 synthesis is regulated by mTOR signaling pathway, *PLoS One*, **7**, e52527, doi: 10.1371/journal.pone.0052527.
369. Miwa, A., Higuchi, T., and Kobayashi, S. (2006) Expression and polysome association of YB-1 in various tissues at different stages in the lifespan of mice, *Biochim. Biophys. Acta*, **1760**, 1675-1681, doi: 10.1016/j.bbagen.2006.08.027.
370. Funakoshi, T., Kobayashi, S., Ohashi, S., Sato, T. A., and Anzai, K. (2003) Isolation and characterization of brain Y-box protein: developmentally regulated expression, polyribosomal association and dendritic localization, *Brain Res Mol Brain Res*, **118**, 1-9, doi: 10.1016/s0169-328x(03)00328-0.
371. Chen, Y. R., Sekine, K., Nakamura, K., Yanai, H., Tanaka, M., and Miyajima, A. (2009) Y-box binding protein-1 down-regulates expression of carbamoyl phosphate synthetase-I by suppressing CCAAT enhancer-binding protein-alpha function in mice, *Gastroenterology*, **137**, 330-340, doi: 10.1053/j.gastro.2009.02.064.
372. Pugh, B. F., and Tjian, R. (1991) Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex, *Genes Dev.*, **5**, 1935-1945, doi: 10.1101/gad.5.11.1935.
373. Walters, E. H., Stickland, N. C., and Loughna, P. T. (2000) The expression of the myogenic regulatory factors in denervated and normal muscles of different phenotypes, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **21**, 647-653, doi: 10.1023/a:1005683825960.
374. Eliseeva, I. A., Sogorina, E. M., Smolin, E. A., Kulakovskiy, I. V., and Lyabin, D. N. (2022) Diverse Regulation of YB-1 and YB-3 Abundance in Mammals, *Biochemistry (Mosc)*, **87**, S48-S167, doi: 10.1134/S000629792214005X.
375. Ohashi, S., Fukumura, R., Higuchi, T., and Kobayashi, S. (2009) YB-1 transcription in the postnatal brain is regulated by a bHLH transcription factor Math2 through an E-box sequence in the 5'-UTR of the gene, *Mol. Cell. Biochem.*, **327**, 267-275, doi: 10.1007/s11010-009-0065-x.
376. Yokoyama, H., Harigae, H., Takahashi, S., Takahashi, S., Furuyama, K., Kaku, M., Yamamoto, M., and Sasaki, T. (2003) Regulation of YB-1 gene expression by GATA transcription factors, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **303**, 140-145, doi: 10.1016/s0006-291x(03)00296-1.
377. Sangermano, F., Delicato, A., and Calabro, V. (2020) Y box binding protein 1 (YB-1) oncoprotein at the hub of DNA proliferation, damage and cancer progression, *Biochimie*, **179**, 205-216, doi: 10.1016/j.biochi.2020.10.004.
378. Alkrekshi, A., Wang, W., Rana, P. S., Markovic, V., and Sossey-Alaoui, K. (2021) A comprehensive review of the functions of YB-1 in cancer stemness, metastasis and drug resistance, *Cell. Signal.*, **85**, 110073, doi: 10.1016/j.cellsig.2021.110073.

379. Uramoto, H., Izumi, H., Ise, T., Tada, M., Uchiumi, T., Kuwano, M., Yasumoto, K., Funa, K., and Kohno, K. (2002) p73 Interacts with c-Myc to regulate Y-box-binding protein-1 expression, *J. Biol. Chem.*, **277**, 31694-31702, doi: 10.1074/jbc.M200266200.
380. Shiota, M., Yokomizo, A., Tada, Y., Uchiumi, T., Inokuchi, J., Tatsugami, K., Kuroiwa, K., Yamamoto, K., Seki, N., and Naito, S. (2010) P300/CBP-associated factor regulates Y-box binding protein-1 expression and promotes cancer cell growth, cancer invasion and drug resistance, *Cancer Sci.*, **101**, 1797-1806, doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01598.x.
381. Shiota, M., Izumi, H., Tanimoto, A., Takahashi, M., Miyamoto, N., Kashiwagi, E., Kidani, A., Hirano, G., Masubuchi, D., Fukunaka, Y., Yasuniwa, Y., Naito, S., Nishizawa, S., Sasaguri, Y., and Kohno, K. (2009) Programmed cell death protein 4 down-regulates Y-box binding protein-1 expression via a direct interaction with Twist1 to suppress cancer cell growth, *Cancer Res.*, **69**, 3148-3156, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2334.
382. Shiota, M., Song, Y., Yokomizo, A., Kiyoshima, K., Tada, Y., Uchino, H., Uchiumi, T., Inokuchi, J., Oda, Y., Kuroiwa, K., Tatsugami, K., and Naito, S. (2010) Foxo3a suppression of urothelial cancer invasiveness through Twist1, Y-box-binding protein 1, and E-cadherin regulation, *Clin. Cancer Res.*, **16**, 5654-5663, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0376.
383. Kalra, J., Sutherland, B. W., Stratford, A. L., Dragowska, W., Gelmon, K. A., Dedhar, S., Dunn, S. E., and Bally, M. B. (2010) Suppression of Her2/neu expression through ILK inhibition is regulated by a pathway involving TWIST and YB-1, *Oncogene*, **29**, 6343-6356, doi: 10.1038/onc.2010.366.
384. Stemmler, M. P., Eccles, R. L., Brabletz, S., and Brabletz, T. (2019) Non-redundant functions of EMT transcription factors, *Nat. Cell Biol.*, **21**, 102-112, doi: 10.1038/s41556-018-0196-y.
385. Xiong, P., Zhang, J., Xu, D., Zhu, J., Li, W., Liu, J., and Liu, F. (2017) Positive feedback loop of YB-1 interacting with Smad2 promotes liver fibrosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **484**, 753-761, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.148.
386. Stope, M. B., Weiss, M., Koensgen, D., Popp, S. L., Joffroy, C., Mustea, A., Buck, M. B., and Knabbe, C. (2017) Y-box Binding Protein-1 Enhances Oncogenic Transforming Growth Factor beta Signaling in Breast Cancer Cells via Triggering Phospho-Activation of Smad2, *Anticancer Res.*, **37**, 6745-6748, doi: 10.21873/anticancer.12134.
387. Zhang, A., Liu, X., Cogan, J. G., Fuerst, M. D., Polikandriotis, J. A., Kelm, R. J., Jr., and Strauch, A. R. (2005) YB-1 coordinates vascular smooth muscle alpha-actin gene activation by transforming growth factor beta1 and thrombin during differentiation of human pulmonary myofibroblasts, *Mol Biol Cell*, **16**, 4931-4940, doi: 10.1091/mbc.e05-03-0216.
388. Luo, C., Tetteh, P. W., Merz, P. R., Dickes, E., Abukiwan, A., Hotz-Wagenblatt, A., Holland-Cunz, S., Sinnberg, T., Schitteck, B., Schadendorf, D., Diederichs, S., and Eichmuller, S. B. (2013) miR-137 inhibits the invasion of melanoma cells through downregulation of multiple oncogenic target genes, *J Invest Dermatol*, **133**, 768-775, doi: 10.1038/jid.2012.357.
389. Zhu, X., Li, Y., Shen, H., Li, H., Long, L., Hui, L., and Xu, W. (2013) miR-137 restoration sensitizes multidrug-resistant MCF-7/ADM cells to anticancer agents by targeting YB-1, *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, **45**, 80-86, doi: 10.1093/abbs/gms099.
390. Liu, S. L., Sui, Y. F., and Lin, M. Z. (2016) MiR-375 is epigenetically downregulated due to promoter methylation and modulates multi-drug resistance in breast cancer cells via targeting YBX1, *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, **20**, 3223-3229,
391. Kato, M., Wang, L., Putta, S., Wang, M., Yuan, H., Sun, G., Lanting, L., Todorov, I., Rossi, J. J., and Natarajan, R. (2010) Post-transcriptional up-regulation of Tsc-22 by Ybx1, a target of miR-216a, mediates TGF- $\beta$ -induced collagen expression in kidney cells, *J. Biol. Chem.*, **285**, 34004-34015, doi: 10.1074/jbc.M110.165027.
392. Lu, J., Li, X., Wang, F., Guo, Y., Huang, Y., Zhu, H., Wang, Y., Lu, Y., and Wang, Z. (2017) YB-1 expression promotes pancreatic cancer metastasis that is inhibited by microRNA-216a, *Exp. Cell Res.*, **359**, 319-326, doi: 10.1016/j.yexcr.2017.07.039.

393. Xu, S., Wang, T., Song, W., Jiang, T., Zhang, F., Yin, Y., Jiang, S. W., Wu, K., Yu, Z., Wang, C., and Chen, K. (2015) The inhibitory effects of AR/miR-190a/YB-1 negative feedback loop on prostate cancer and underlying mechanism, *Sci Rep*, **5**, 13528, doi: 10.1038/srep13528.
394. Xu, M., Jin, H., Xu, C. X., Sun, B., Song, Z. G., Bi, W. Z., and Wang, Y. (2015) miR-382 inhibits osteosarcoma metastasis and relapse by targeting Y box-binding protein 1, *Mol. Ther.*, **23**, 89-98, doi: 10.1038/mt.2014.197.
395. Wang, J., Chen, C., Yan, X., and Wang, P. (2019) The role of miR-382-5p in glioma cell proliferation, migration and invasion, *Onco Targets Ther*, **12**, 4993-5002, doi: 10.2147/OTT.S196322.
396. Cheng, L., Zhu, Y., Han, H., Zhang, Q., Cui, K., Shen, H., Zhang, J., Yan, J., Prochownik, E., and Li, Y. (2017) MicroRNA-148a deficiency promotes hepatic lipid metabolism and hepatocarcinogenesis in mice, *Cell Death Dis*, **8**, e2916, doi: 10.1038/cddis.2017.309.
397. Zhang, F., Duan, C., Yin, S., and Tian, Y. (2020) MicroRNA-379-5p/YBX1 Axis Regulates Cellular EMT to Suppress Migration and Invasion of Nasopharyngeal Carcinoma Cells, *Cancer Manag Res*, **12**, 4335-4346, doi: 10.2147/CMAR.S253504.
398. Cui, G., Zhao, H., and Li, L. (2020) Long noncoding RNA PRKCQ-AS1 promotes CRC cell proliferation and migration via modulating miR-1287-5p/YBX1 axis, *J. Cell. Biochem.*, **121**, 4166-4175, doi: 10.1002/jcb.29712.
399. Zeng, X., Liu, Y., Zhu, H., Chen, D., and Hu, W. (2019) Downregulation of miR-216a-5p by long noncoding RNA PVT1 suppresses colorectal cancer progression via modulation of YBX1 expression, *Cancer Manag Res*, **11**, 6981-6993, doi: 10.2147/CMAR.S208983.
400. Du, X., Tu, Y., Liu, S., Zhao, P., Bao, Z., Li, C., Li, J., Pan, M., and Ji, J. (2020) LINC00511 contributes to glioblastoma tumorigenesis and epithelial-mesenchymal transition via LINC00511/miR-524-5p/YB1/ZEB1 positive feedback loop, *J. Cell. Mol. Med.*, **24**, 1474-1487, doi: 10.1111/jcmm.14829.
401. Lutz, M., Wempe, F., Bahr, I., Zopf, D., and von Melchner, H. (2006) Proteasomal degradation of the multifunctional regulator YB-1 is mediated by an F-Box protein induced during programmed cell death, *FEBS Lett.*, **580**, 3921-3930, doi: 10.1016/j.febslet.2006.06.023.
402. Chibi, M., Meyer, M., Skepu, A., DJ, G. R., Moolman-Smook, J. C., and Pugh, D. J. (2008) RBBP6 interacts with multifunctional protein YB-1 through its RING finger domain, leading to ubiquitination and proteosomal degradation of YB-1, *J. Mol. Biol.*, **384**, 908-916, doi: 10.1016/j.jmb.2008.09.060.
403. Xu, J., Ji, L., Liang, Y., Wan, Z., Zheng, W., Song, X., Gorshkov, K., Sun, Q., Lin, H., Zheng, X., Chen, J., Jin, R. A., Liang, X., and Cai, X. (2020) CircRNA-SORE mediates sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma by stabilizing YBX1, *Signal Transduct Target Ther*, **5**, 298, doi: 10.1038/s41392-020-00375-5.
404. Huang, S., Li, X., Zheng, H., Si, X., Li, B., Wei, G., Li, C., Chen, Y., Chen, Y., Liao, W., Liao, Y., and Bin, J. (2019) Loss of Super-Enhancer-Regulated circRNA Nfix Induces Cardiac Regeneration After Myocardial Infarction in Adult Mice, *Circulation*, **139**, 2857-2876, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.038361.
405. Lei, H., Xu, H. Z., Shan, H. Z., Liu, M., Lu, Y., Fang, Z. X., Jin, J., Jing, B., Xiao, X. H., Gao, S. M., Gao, F. H., Xia, L., Yang, L., Liu, L. G., Wang, W. W., Liu, C. X., Tong, Y., Wu, Y. Z., Zheng, J. K., Chen, G. Q., et al. (2021) Targeting USP47 overcomes tyrosine kinase inhibitor resistance and eradicates leukemia stem/progenitor cells in chronic myelogenous leukemia, *Nat Commun*, **12**, 51, doi: 10.1038/s41467-020-20259-0.
406. Dong, W., Wang, H., Shahzad, K., Bock, F., Al-Dabet, M. M., Ranjan, S., Wolter, J., Kohli, S., Hoffmann, J., Dhople, V. M., Zhu, C., Lindquist, J. A., Esmon, C. T., Grone, E., Grone, H. J., Madhusudhan, T., Mertens, P. R., Schluter, D., and Isermann, B. (2015) Activated Protein C Ameliorates Renal Ischemia-Reperfusion Injury by Restricting Y-Box Binding Protein-1 Ubiquitination, *J Am Soc Nephrol*, **26**, 2789-2799, doi: 10.1681/ASN.2014080846.

407. Stenina, O. I., Poptic, E. J., and DiCorleto, P. E. (2000) Thrombin activates a Y box-binding protein (DNA-binding protein B) in endothelial cells, *J. Clin. Invest.*, **106**, 579-587, doi: 10.1172/JCI9075.
408. Wei, M. M., Zhou, Y. C., Wen, Z. S., Zhou, B., Huang, Y. C., Wang, G. Z., Zhao, X. C., Pan, H. L., Qu, L. W., Zhang, J., Zhang, C., Cheng, X., and Zhou, G. B. (2016) Long non-coding RNA stabilizes the Y-box-binding protein 1 and regulates the epidermal growth factor receptor to promote lung carcinogenesis, *Oncotarget*, **7**, 59556-59571, doi: 10.18632/oncotarget.10006.
409. Ban, Y., Tan, P., Cai, J., Li, J., Hu, M., Zhou, Y., Mei, Y., Tan, Y., Li, X., Zeng, Z., Xiong, W., Li, G., Li, X., Yi, M., and Xiang, B. (2020) LNCAROD is stabilized by m6A methylation and promotes cancer progression via forming a ternary complex with HSPA1A and YBX1 in head and neck squamous cell carcinoma, *Mol Oncol*, **14**, 1282-1296, doi: 10.1002/1878-0261.12676.
410. Tang, L., Wei, D., Xu, X., Mao, X., Mo, D., Yan, L., Xu, W., and Yan, F. (2021) Long non-coding RNA MIR200CHG promotes breast cancer proliferation, invasion, and drug resistance by interacting with and stabilizing YB-1, *NPJ Breast Cancer*, **7**, 94, doi: 10.1038/s41523-021-00293-x.
411. Su, W., Feng, S., Chen, X., Yang, X., Mao, R., Guo, C., Wang, Z., Thomas, D. G., Lin, J., Reddy, R. M., Orringer, M. B., Chang, A. C., Yang, Z., Beer, D. G., and Chen, G. (2018) Silencing of Long Noncoding RNA MIR22HG Triggers Cell Survival/Death Signaling via Oncogenes YBX1, MET, and p21 in Lung Cancer, *Cancer Res.*, **78**, 3207-3219, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0222.
412. He, X., Wang, S., Li, M., Zhong, L., Zheng, H., Sun, Y., Lai, Y., Chen, X., Wei, G., Si, X., Han, Y., Huang, S., Li, X., Liao, W., Liao, Y., and Bin, J. (2019) Long noncoding RNA GAS5 induces abdominal aortic aneurysm formation by promoting smooth muscle apoptosis, *Theranostics*, **9**, 5558-5576, doi: 10.7150/thno.34463.
413. Liu, Y., Zhao, J., Zhang, W., Gan, J., Hu, C., Huang, G., and Zhang, Y. (2015) lncRNA GAS5 enhances G1 cell cycle arrest via binding to YBX1 to regulate p21 expression in stomach cancer, *Sci Rep*, **5**, 10159, doi: 10.1038/srep10159.
414. Su, W., Wang, L., Zhao, H., Hu, S., Zhou, Y., Guo, C., Wu, B., Li, L., Yang, Z., Beer, D. G., and Chen, G. (2020) LINC00857 Interacting with YBX1 to Regulate Apoptosis and Autophagy via MET and Phosphor-AMPKa Signaling, *Mol Ther Nucleic Acids*, **22**, 1164-1175, doi: 10.1016/j.omtn.2020.10.025.
415. Wu, Q. N., Luo, X. J., Liu, J., Lu, Y. X., Wang, Y., Qi, J., Liu, Z. X., Huang, Q. T., Liu, Z. K., Lu, J. B., Jin, Y., Pu, H. Y., Hu, P. S., Zheng, J. B., Zeng, Z. L., Ju, H. Q., Xie, D., Zhao, Q., and Xu, R. (2021) MYC-Activated LncRNA MNX1-AS1 Promotes the Progression of Colorectal Cancer by Stabilizing YB1, *Cancer Res.*, **81**, 2636-2650, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-3747.
416. Zheng, X., Zhang, J., Fang, T., Wang, X., Wang, S., Ma, Z., Xu, Y., Han, C., Sun, M., Xu, L., Wang, J., and Yin, R. (2020) The long non-coding RNA PIK3CD-AS2 promotes lung adenocarcinoma progression via YBX1-mediated suppression of p53 pathway, *Oncogenesis*, **9**, 34, doi: 10.1038/s41389-020-0217-0.
417. Kosnopfel, C., Sinnberg, T., and Schitteck, B. (2014) Y-box binding protein 1--a prognostic marker and target in tumour therapy, *Eur. J. Cell Biol.*, **93**, 61-70, doi: 10.1016/j.ejcb.2013.11.007.
418. Law, J. H., Li, Y., To, K., Wang, M., Astanehe, A., Lambie, K., Dhillon, J., Jones, S. J., Gleave, M. E., Eaves, C. J., and Dunn, S. E. (2010) Molecular decoy to the Y-box binding protein-1 suppresses the growth of breast and prostate cancer cells whilst sparing normal cell viability, *PLoS One*, **5**, doi: 10.1371/journal.pone.0012661.
419. Shiota, M., Itsumi, M., Yokomizo, A., Takeuchi, A., Imada, K., Kashiwagi, E., Inokuchi, J., Tatsugami, K., Uchiumi, T., and Naito, S. (2014) Targeting ribosomal S6 kinases/Y-box binding protein-1 signaling improves cellular sensitivity to taxane in prostate cancer, *Prostate*, **74**, 829-838, doi: 10.1002/pros.22799.



420. Holzmuller, R., Mantwill, K., Haczek, C., Rognoni, E., Anton, M., Kasajima, A., Weichert, W., Treue, D., Lage, H., Schuster, T., Schlegel, J., Gansbacher, B., and Holm, P. S. (2011) YB-1 dependent virotherapy in combination with temozolomide as a multimodal therapy approach to eradicate malignant glioma, *Int. J. Cancer*, **129**, 1265-1276, doi: 10.1002/ijc.25783.
421. Rognoni, E., Widmaier, M., Haczek, C., Mantwill, K., Holzmuller, R., Gansbacher, B., Kolk, A., Schuster, T., Schmid, R. M., Saur, D., Kaszubiak, A., Lage, H., and Holm, P. S. (2009) Adenovirus-based virotherapy enabled by cellular YB-1 expression in vitro and in vivo, *Cancer Gene Ther.*, **16**, 753-763, doi: 10.1038/cgt.2009.20.
422. Kostova, Y., Mantwill, K., Holm, P. S., and Anton, M. (2015) An armed, YB-1-dependent oncolytic adenovirus as a candidate for a combinatorial anti-glioma approach of virotherapy, suicide gene therapy and chemotherapeutic treatment, *Cancer Gene Ther.*, **22**, 30-43, doi: 10.1038/cgt.2014.67.
423. Syed, D. N., Adhami, V. M., Khan, N., Khan, M. I., and Mukhtar, H. (2016) Exploring the molecular targets of dietary flavonoid fisetin in cancer, *Semin. Cancer Biol.*, **40-41**, 130-140, doi: 10.1016/j.semcancer.2016.04.003.
424. Khan, N., Afaq, F., Syed, D. N., and Mukhtar, H. (2008) Fisetin, a novel dietary flavonoid, causes apoptosis and cell cycle arrest in human prostate cancer LNCaP cells, *Carcinogenesis*, **29**, 1049-1056, doi: 10.1093/carcin/bgn078.
425. Inder, S., Bates, M., Ni Labhrai, N., McDermott, N., Schneider, J., Erdmann, G., Jamerson, T., Flores, A. N., Prina-Mello, A., Thirion, P., Manecksha, P. R., Cormican, D., Finn, S., Lynch, T., and Marignol, L. (2019) Multiplex profiling identifies clinically relevant signalling proteins in an isogenic prostate cancer model of radioresistance, *Sci Rep*, **9**, 17325, doi: 10.1038/s41598-019-53799-7.
426. Hasegawa, M., Matsushita, Y., Horikawa, M., Higashi, K., Tomigahara, Y., Kaneko, H., Shirasaki, F., Fujimoto, M., Takehara, K., and Sato, S. (2009) A novel inhibitor of Smad-dependent transcriptional activation suppresses tissue fibrosis in mouse models of systemic sclerosis, *Arthritis Rheum.*, **60**, 3465-3475, doi: 10.1002/art.24934.
427. Higashi, K., Tomigahara, Y., Shiraki, H., Miyata, K., Mikami, T., Kimura, T., Moro, T., Inagaki, Y., and Kaneko, H. (2011) A novel small compound that promotes nuclear translocation of YB-1 ameliorates experimental hepatic fibrosis in mice, *J. Biol. Chem.*, **286**, 4485-4492, doi: 10.1074/jbc.M110.151936.
428. Bobkova, N. V., Lyabin, D. N., Medvinskaya, N. I., Samokhin, A. N., Nekrasov, P. V., Nesterova, I. V., Aleksandrova, I. Y., Tatarnikova, O. G., Bobylev, A. G., Vikhlyantsev, I. M., Kukharsky, M. S., Ustyugov, A. A., Polyakov, D. N., Eliseeva, I. A., Kretov, D. A., Guryanov, S. G., and Ovchinnikov, L. P. (2015) The Y-Box Binding Protein 1 Suppresses Alzheimer's Disease Progression in Two Animal Models, *PLoS One*, **10**, e0138867, doi: 10.1371/journal.pone.0138867.
429. Yu, J., Hecht, N. B., and Schultz, R. M. (2001) Expression of MSY2 in mouse oocytes and preimplantation embryos, *Biol. Reprod.*, **65**, 1260-1270, doi: 10.1095/biolreprod65.4.1260.
430. Xu, M., and Hecht, N. B. (2008) MSY2 and polypyrimidine tract binding protein 2 stabilize mRNAs in the mammalian testis, *Int J Androl*, **31**, 457-461, doi: 10.1111/j.1365-2605.2008.00885.x.
431. Yang, J., Medvedev, S., Reddi, P. P., Schultz, R. M., and Hecht, N. B. (2005) The DNA/RNA-binding protein MSY2 marks specific transcripts for cytoplasmic storage in mouse male germ cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 1513-1518, doi: 10.1073/pnas.0404685102.
432. Yang, J., Morales, C. R., Medvedev, S., Schultz, R. M., and Hecht, N. B. (2007) In the absence of the mouse DNA/RNA-binding protein MSY2, messenger RNA instability leads to spermatogenic arrest, *Biol. Reprod.*, **76**, 48-54, doi: 10.1095/biolreprod.106.055095.
433. Yu, J., Hecht, N. B., and Schultz, R. M. (2003) Requirement for RNA-binding activity of MSY2 for cytoplasmic localization and retention in mouse oocytes, *Dev. Biol.*, **255**, 249-262, doi: 10.1016/s0012-1606(02)00094-5.

434. Kohno, Y., Matsuki, Y., Tanimoto, A., Izumi, H., Uchiumi, T., Kohno, K., Shimajiri, S., and Sasaguri, Y. (2006) Expression of Y-box-binding protein dbpC/contrin, a potentially new cancer/testis antigen, *Br. J. Cancer*, **94**, 710-716, doi: 10.1038/sj.bjc.6602987.
435. Consortium, G. T. (2013) The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project, *Nat. Genet.*, **45**, 580-585, doi: 10.1038/ng.2653.
436. Yang, J., Medvedev, S., Yu, J., Tang, L. C., Agno, J. E., Matzuk, M. M., Schultz, R. M., and Hecht, N. B. (2005) Absence of the DNA-/RNA-binding protein MSY2 results in male and female infertility, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 5755-5760, doi: 10.1073/pnas.0408718102.
437. Davies, H. G., Giorgini, F., Fajardo, M. A., and Braun, R. E. (2000) A sequence-specific RNA binding complex expressed in murine germ cells contains MSY2 and MSY4, *Dev. Biol.*, **221**, 87-100, doi: 10.1006/dbio.2000.9658.
438. Chowdhury, T. A., and Kleene, K. C. (2012) Identification of potential regulatory elements in the 5' and 3' UTRs of 12 translationally regulated mRNAs in mammalian spermatids by comparative genomics, *J Androl*, **33**, 244-256, doi: 10.2164/jandrol.110.012492.
439. Giorgini, F., Davies, H. G., and Braun, R. E. (2002) Translational repression by MSY4 inhibits spermatid differentiation in mice, *Development*, **129**, 3669-3679, doi: 10.1242/dev.129.15.3669.
440. Berghella, L., De Angelis, L., De Buyscher, T., Mortazavi, A., Biressi, S., Forcales, S. V., Sirabella, D., Cossu, G., and Wold, B. J. (2008) A highly conserved molecular switch binds MSY-3 to regulate myogenin repression in postnatal muscle, *Genes Dev.*, **22**, 2125-2138, doi: 10.1101/gad.468508.
441. Berkes, C. A., Bergstrom, D. A., Penn, B. H., Seaver, K. J., Knoepfler, P. S., and Tapscott, S. J. (2004) Pbx marks genes for activation by MyoD indicating a role for a homeodomain protein in establishing myogenic potential, *Mol. Cell*, **14**, 465-477, doi: 10.1016/s1097-2765(04)00260-6.
442. De Angelis, L., Balasubramanian, S., and Berghella, L. (2015) Akt-mediated phosphorylation controls the activity of the Y-box protein MSY3 in skeletal muscle, *Skelet Muscle*, **5**, 18, doi: 10.1186/s13395-015-0043-9.
443. Coles, L. S., Diamond, P., Occhiodoro, F., Vadas, M. A., and Shannon, M. F. (2000) An ordered array of cold shock domain repressor elements across tumor necrosis factor-responsive elements of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promoter, *J. Biol. Chem.*, **275**, 14482-14493, doi: 10.1074/jbc.275.19.14482.
444. Coles, L. S., Lambrusco, L., Burrows, J., Hunter, J., Diamond, P., Bert, A. G., Vadas, M. A., and Goodall, G. J. (2005) Phosphorylation of cold shock domain/Y-box proteins by ERK2 and GSK3beta and repression of the human VEGF promoter, *FEBS Lett.*, **579**, 5372-5378, doi: 10.1016/j.febslet.2005.08.075.
445. Buchert, M., Darido, C., Lagerqvist, E., Sedello, A., Cazeveille, C., Buchholz, F., Bourgaux, J. F., Pannequin, J., Joubert, D., and Hollande, F. (2009) The symplekin/ZONAB complex inhibits intestinal cell differentiation by the repression of AML1/Runx1, *Gastroenterology*, **137**, 156-164, 164 e151-153, doi: 10.1053/j.gastro.2009.03.037.
446. Balda, M. S., Garrett, M. D., and Matter, K. (2003) The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density, *J. Cell Biol.*, **160**, 423-432, doi: 10.1083/jcb.200210020.
447. Sourisseau, T., Georgiadis, A., Tsapara, A., Ali, R. R., Pestell, R., Matter, K., and Balda, M. S. (2006) Regulation of PCNA and cyclin D1 expression and epithelial morphogenesis by the ZO-1-regulated transcription factor ZONAB/DbpA, *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 2387-2398, doi: 10.1128/MCB.26.6.2387-2398.2006.
448. Nie, M., Aijaz, S., Leefa Chong San, I. V., Balda, M. S., and Matter, K. (2009) The Y-box factor ZONAB/DbpA associates with GEF-H1/Lfc and mediates Rho-stimulated transcription, *EMBO Rep*, **10**, 1125-1131, doi: 10.1038/embor.2009.182.

449. Balda, M. S., and Matter, K. (2000) The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression, *EMBO J.*, **19**, 2024-2033, doi: 10.1093/emboj/19.9.2024.
450. Frankel, P., Aronheim, A., Kavanagh, E., Balda, M. S., Matter, K., Bunney, T. D., and Marshall, C. J. (2005) RalA interacts with ZONAB in a cell density-dependent manner and regulates its transcriptional activity, *EMBO J.*, **24**, 54-62, doi: 10.1038/sj.emboj.7600497.
451. Balda, M. S., and Matter, K. (2009) Tight junctions and the regulation of gene expression, *Biochim. Biophys. Acta*, **1788**, 761-767, doi: 10.1016/j.bbame.2008.11.024.
452. Lima, W. R., Parreira, K. S., Devuyst, O., Caplanusi, A., N'Kuli, F., Marien, B., Van Der Smissen, P., Alves, P. M., Verroust, P., Christensen, E. I., Terzi, F., Matter, K., Balda, M. S., Pierreux, C. E., and Courtoy, P. J. (2010) ZONAB promotes proliferation and represses differentiation of proximal tubule epithelial cells, *J Am Soc Nephrol*, **21**, 478-488, doi: 10.1681/ASN.2009070698.
453. David, J. J., Subramanian, S. V., Zhang, A., Willis, W. L., Kelm, R. J., Jr., Leier, C. V., and Strauch, A. R. (2012) Y-box binding protein-1 implicated in translational control of fetal myocardial gene expression after cardiac transplant, *Exp Biol Med (Maywood)*, **237**, 593-607, doi: 10.1258/ebm.2012.011137.
454. Skabkina, O. V., Skabkin, M. A., Popova, N. V., Lyabin, D. N., Penalva, L. O., and Ovchinnikov, L. P. (2003) Poly(A)-binding protein positively affects YB-1 mRNA translation through specific interaction with YB-1 mRNA, *J. Biol. Chem.*, **278**, 18191-18198, doi: 10.1074/jbc.M209073200.
455. Wakiyama, M., Futami, T., and Miura, K. (1997) Poly(A) dependent translation in rabbit reticulocyte lysate, *Biochimie*, **79**, 781-785, doi: 10.1016/s0300-9084(97)86937-4.
456. Dmitriev, S. E., Terenin, I. M., Rubtsova, M. P., and Shatskii, I. N. (2003) [Minor secondary-structure variation in the 5'-untranslated region of the beta-globin mRNA changes the concentration requirements for eIF2], *Mol Biol (Mosk)*, **37**, 494-503,
457. Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., and Zhang, F. (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system, *Nat Protoc*, **8**, 2281-2308, doi: 10.1038/nprot.2013.143.
458. Glukhova, K. F., Marchenkov, V. V., Melnik, T. N., and Melnik, B. S. (2017) Isoforms of green fluorescent protein differ from each other in solvent molecules 'trapped' inside this protein, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **35**, 1215-1225, doi: 10.1080/07391102.2016.1174737.
459. Eliseeva, I., Vasilieva, M., and Ovchinnikov, L. P. (2019) Translation of Human beta-Actin mRNA is Regulated by mTOR Pathway, *Genes (Basel)*, **10**, doi: 10.3390/genes10020096.
460. Seki, M., Carninci, P., Nishiyama, Y., Hayashizaki, Y., and Shinozaki, K. (1998) High-efficiency cloning of Arabidopsis full-length cDNA by biotinylated CAP trapper, *Plant J.*, **15**, 707-720, doi: 10.1046/j.1365-313x.1998.00237.x.
461. Imamachi, N., Tani, H., Mizutani, R., Imamura, K., Irie, T., Suzuki, Y., and Akimitsu, N. (2014) BRIC-seq: a genome-wide approach for determining RNA stability in mammalian cells, *Methods*, **67**, 55-63, doi: 10.1016/j.ymeth.2013.07.014.
462. Dmitriev, S. E., Pisarev, A. V., Rubtsova, M. P., Dunaevsky, Y. E., and Shatsky, I. N. (2003) Conversion of 48S translation preinitiation complexes into 80S initiation complexes as revealed by toeprinting, *FEBS Lett.*, **533**, 99-104, doi: 10.1016/s0014-5793(02)03776-6.
463. Presolski, S. I., Hong, V. P., and Finn, M. G. (2011) Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Click Chemistry for Bioconjugation, *Curr Protoc Chem Biol*, **3**, 153-162, doi: 10.1002/9780470559277.ch110148.
464. Gerashchenko, M. V., and Gladyshev, V. N. (2014) Translation inhibitors cause abnormalities in ribosome profiling experiments, *Nucleic Acids Res.*, **42**, e134, doi: 10.1093/nar/gku671.
465. McGlincy, N. J., and Ingolia, N. T. (2017) Transcriptome-wide measurement of translation by ribosome profiling, *Methods*, **126**, 112-129, doi: 10.1016/j.ymeth.2017.05.028.

466. Tenenbaum, S. A., Carson, C. C., Lager, P. J., and Keene, J. D. (2000) Identifying mRNA subsets in messenger ribonucleoprotein complexes by using cDNA arrays, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 14085-14090, doi: 10.1073/pnas.97.26.14085.
467. Danan, C., Manickavel, S., and Hafner, M. (2016) PAR-CLIP: A Method for Transcriptome-Wide Identification of RNA Binding Protein Interaction Sites, *Methods Mol Biol*, **1358**, 153-173, doi: 10.1007/978-1-4939-3067-8\_10.
468. Martin, M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from highthroughput sequencing reads, *EMBnet J*, **17**, 10-12,
469. Meyer, L. R., Zweig, A. S., Hinrichs, A. S., Karolchik, D., Kuhn, R. M., Wong, M., Sloan, C. A., Rosenbloom, K. R., Roe, G., Rhead, B., Raney, B. J., Pohl, A., Malladi, V. S., Li, C. H., Lee, B. T., Learned, K., Kirkup, V., Hsu, F., Heitner, S., Harte, R. A., et al. (2013) The UCSC Genome Browser database: extensions and updates 2013, *Nucleic Acids Res.*, **41**, D64-69, doi: 10.1093/nar/gks1048.
470. Harrow, J., Frankish, A., Gonzalez, J. M., Tapanari, E., Diekhans, M., Kokocinski, F., Aken, B. L., Barrell, D., Zadissa, A., Searle, S., Barnes, I., Bignell, A., Boychenko, V., Hunt, T., Kay, M., Mukherjee, G., Rajan, J., Despacio-Reyes, G., Saunders, G., Steward, C., et al. (2012) GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project, *Genome Res.*, **22**, 1760-1774, doi: 10.1101/gr.135350.111.
471. Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T. R. (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner, *Bioinformatics*, **29**, 15-21, doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.
472. Dunn, J. G., and Weissman, J. S. (2016) Plastid: nucleotide-resolution analysis of next-generation sequencing and genomics data, *BMC Genomics*, **17**, 958, doi: 10.1186/s12864-016-3278-x.
473. Robinson, M. D., McCarthy, D. J., and Smyth, G. K. (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data, *Bioinformatics*, **26**, 139-140, doi: 10.1093/bioinformatics/btp616.
474. Korotkevich, G., Sukhov, V., Budin, N., Shpak, B., Artyomov, M. N., and Sergushichev, A. (2021) Fast gene set enrichment analysis, 060012, doi: 10.1101/060012 %J bioRxiv.
475. Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., and Mesirov, J. P. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 15545-15550, doi: 10.1073/pnas.0506580102.
476. de Melo Neto, O. P., Standart, N., and Martins de Sa, C. (1995) Autoregulation of poly(A)-binding protein synthesis in vitro, *Nucleic Acids Res*, **23**, 2198-2205,
477. Spirin, A. S. (1978) Eukaryotic messenger RNA and informosomes. Omnia mea mecum porto, *FEBS Lett*, **88**, 15-17,
478. Eliseeva, I. A., Ovchinnikov, L. P., and Lyabin, D. N. (2012) Specific PABP effect on translation of YB-1 mRNA is neutralized by polyadenylation through a "mini-loop" at 3' UTR, *RNA Biol*, **9**, 1473-1487, doi: 10.4161/rna.22711.
479. Moraes, K. C., Quaresma, A. J., Maehnss, K., and Kobarg, J. (2003) Identification and characterization of proteins that selectively interact with isoforms of the mRNA binding protein AUF1 (hnRNP D), *Biol. Chem.*, **384**, 25-37, doi: 10.1515/BC.2003.004.
480. Duning, K., Buck, F., Barnekow, A., and Kremerskothen, J. (2008) SYNCRIP, a component of dendritically localized mRNPs, binds to the translation regulator BC200 RNA, *J. Neurochem.*, **105**, 351-359, doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.05138.x.
481. Gorlach, M., Burd, C. G., and Dreyfuss, G. (1994) The mRNA poly(A)-binding protein: localization, abundance, and RNA-binding specificity, *Exp. Cell Res.*, **211**, 400-407, doi: 10.1006/excr.1994.1104.
482. Mizutani, A., Fukuda, M., Iyata, K., Shiraishi, Y., and Mikoshiba, K. (2000) SYNCRIP, a cytoplasmic counterpart of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R, interacts with

- ubiquitous synaptotagmin isoforms, *J. Biol. Chem.*, **275**, 9823-9831, doi: 10.1074/jbc.275.13.9823.
483. Fukuda, T., Ashizuka, M., Nakamura, T., Shibahara, K., Maeda, K., Izumi, H., Kohno, K., Kuwano, M., and Uchiumi, T. (2004) Characterization of the 5'-untranslated region of YB-1 mRNA and autoregulation of translation by YB-1 protein, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 611-622, doi: 10.1093/nar/gkh223.
484. Wang, J. Z., Zhu, H., You, P., Liu, H., Wang, W. K., Fan, X., Yang, Y., Xu, K., Zhu, Y., Li, Q., Wu, P., Peng, C., Wong, C. C., Li, K., Shi, Y., Zhang, N., Wang, X., Zeng, R., Huang, Y., Yang, L., et al. (2022) Upregulated YB-1 protein promotes glioblastoma growth through a YB-1/CCT4/mLST8/mTOR pathway, *J. Clin. Invest.*, **132**, doi: 10.1172/JCI146536.
485. Eagle, H., and Levine, E. M. (1967) Growth regulatory effects of cellular interaction, *Nature*, **213**, 1102-1106, doi: 10.1038/2131102a0.
486. Levine, E. M., Becker, Y., Boone, C. W., and Eagle, H. (1965) Contact Inhibition, Macromolecular Synthesis, and Polyribosomes in Cultured Human Diploid Fibroblasts, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **53**, 350-356, doi: 10.1073/pnas.53.2.350.
487. Leontieva, O. V., Demidenko, Z. N., and Blagosklonny, M. V. (2014) Contact inhibition and high cell density deactivate the mammalian target of rapamycin pathway, thus suppressing the senescence program, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**, 8832-8837, doi: 10.1073/pnas.1405723111.
488. Liu, G. Y., and Sabatini, D. M. (2020) mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21**, 183-203, doi: 10.1038/s41580-019-0199-y.
489. Hsieh, A. C., Liu, Y., Edlind, M. P., Ingolia, N. T., Janes, M. R., Sher, A., Shi, E. Y., Stumpf, C. R., Christensen, C., Bonham, M. J., Wang, S., Ren, P., Martin, M., Jessen, K., Feldman, M. E., Weissman, J. S., Shokat, K. M., Rommel, C., and Ruggero, D. (2012) The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis, *Nature*, **485**, 55-61, doi: 10.1038/nature10912.
490. Thoreen, C. C. (2017) The molecular basis of mTORC1-regulated translation, *Biochem. Soc. Trans.*, **45**, 213-221, doi: 10.1042/BST20160072.
491. Berman, A. J., Thoreen, C. C., Dedeic, Z., Chettle, J., Roux, P. P., and Blagden, S. P. (2021) Controversies around the function of LARP1, *RNA Biol*, **18**, 207-217, doi: 10.1080/15476286.2020.1733787.
492. Thoreen, C. C., Chantranupong, L., Keys, H. R., Wang, T., Gray, N. S., and Sabatini, D. M. (2012) A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation, *Nature*, **485**, 109-113, doi: 10.1038/nature11083.
493. Avni, D., Shama, S., Loreni, F., and Meyuhas, O. (1994) Vertebrate mRNAs with a 5'-terminal pyrimidine tract are candidates for translational repression in quiescent cells: characterization of the translational cis-regulatory element, *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 3822-3833, doi: 10.1128/mcb.14.6.3822-3833.1994.
494. Dorrello, N. V., Peschiaroli, A., Guardavaccaro, D., Colburn, N. H., Sherman, N. E., and Pagano, M. (2006) S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth, *Science*, **314**, 467-471, doi: 10.1126/science.1130276.
495. Yang, H. S., Jansen, A. P., Komar, A. A., Zheng, X., Merrick, W. C., Costes, S., Lockett, S. J., Sonenberg, N., and Colburn, N. H. (2003) The transformation suppressor Pcd4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation, *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 26-37, doi: 10.1128/MCB.23.1.26-37.2003.
496. Andreev, D. E., Dmitriev, S. E., Zinovkin, R., Terenin, I. M., and Shatsky, I. N. (2012) The 5' untranslated region of Apaf-1 mRNA directs translation under apoptosis conditions via a 5' end-dependent scanning mechanism, *FEBS Lett.*, **586**, 4139-4143, doi: 10.1016/j.febslet.2012.10.010.
497. Rubio, C. A., Weisburd, B., Holderfield, M., Arias, C., Fang, E., DeRisi, J. L., and Fanidi, A. (2014) Transcriptome-wide characterization of the eIF4A signature highlights plasticity in translation regulation, *Genome Biol*, **15**, 476, doi: 10.1186/s13059-014-0476-1.

498. Ptushkina, M., von der Haar, T., Vasilescu, S., Frank, R., Birkenhager, R., and McCarthy, J. E. (1998) Cooperative modulation by eIF4G of eIF4E-binding to the mRNA 5' cap in yeast involves a site partially shared by p20, *EMBO J.*, **17**, 4798-4808, doi: 10.1093/emboj/17.16.4798.
499. Miloslavski, R., Cohen, E., Avraham, A., Iluz, Y., Hayouka, Z., Kasir, J., Mudhasani, R., Jones, S. N., Cybulski, N., Ruegg, M. A., Larsson, O., Gandin, V., Rajakumar, A., Topisirovic, I., and Meyuhas, O. (2014) Oxygen sufficiency controls TOP mRNA translation via the TSC-Rheb-mTOR pathway in a 4E-BP-independent manner, *J Mol Cell Biol*, **6**, 255-266, doi: 10.1093/jmcb/mju008.
500. Wang, T., Birsoy, K., Hughes, N. W., Krupczak, K. M., Post, Y., Wei, J. J., Lander, E. S., and Sabatini, D. M. (2015) Identification and characterization of essential genes in the human genome, *Science*, **350**, 1096-1101, doi: 10.1126/science.aac7041.
501. Lee, A. S., Kranzusch, P. J., Doudna, J. A., and Cate, J. H. (2016) eIF3d is an mRNA cap-binding protein that is required for specialized translation initiation, *Nature*, **536**, 96-99, doi: 10.1038/nature18954.
502. Meyuhas, O., and Kahan, T. (2015) The race to decipher the top secrets of TOP mRNAs, *Biochim. Biophys. Acta*, **1849**, 801-811, doi: 10.1016/j.bbagr.2014.08.015.
503. Yoon, J. H., De, S., Srikantan, S., Abdelmohsen, K., Grammatikakis, I., Kim, J., Kim, K. M., Noh, J. H., White, E. J., Martindale, J. L., Yang, X., Kang, M. J., Wood, W. H., 3rd, Noren Hooten, N., Evans, M. K., Becker, K. G., Tripathi, V., Prasanth, K. V., Wilson, G. M., Tuschl, T., et al. (2014) PAR-CLIP analysis uncovers AUF1 impact on target RNA fate and genome integrity, *Nat Commun*, **5**, 5248, doi: 10.1038/ncomms6248.
504. Lahr, R. M., Fonseca, B. D., Ciotti, G. E., Al-Ashtal, H. A., Jia, J. J., Niklaus, M. R., Blagden, S. P., Alain, T., and Berman, A. J. (2017) La-related protein 1 (LARP1) binds the mRNA cap, blocking eIF4F assembly on TOP mRNAs, *Elife*, **6**, doi: 10.7554/eLife.24146.
505. Marintchev, A. (2013) Roles of helicases in translation initiation: a mechanistic view, *Biochim. Biophys. Acta*, **1829**, 799-809, doi: 10.1016/j.bbagr.2013.01.005.
506. Liberman, N., Gandin, V., Svitkin, Y. V., David, M., Virgili, G., Jaramillo, M., Holcik, M., Nagar, B., Kimchi, A., and Sonenberg, N. (2015) DAP5 associates with eIF2beta and eIF4AI to promote Internal Ribosome Entry Site driven translation, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 3764-3775, doi: 10.1093/nar/gkv205.
507. Peter, D., Weber, R., Kone, C., Chung, M. Y., Ebertsch, L., Truffault, V., Weichenrieder, O., Igreja, C., and Izaurralde, E. (2015) MexTL proteins use both canonical bipartite and novel tripartite binding modes to form eIF4E complexes that display differential sensitivity to 4E-BP regulation, *Genes Dev.*, **29**, 1835-1849, doi: 10.1101/gad.269068.115.
508. Rom, E., Kim, H. C., Gingras, A. C., Marcotrigiano, J., Favre, D., Olsen, H., Burley, S. K., and Sonenberg, N. (1998) Cloning and characterization of 4EHP, a novel mammalian eIF4E-related cap-binding protein, *J. Biol. Chem.*, **273**, 13104-13109, doi: 10.1074/jbc.273.21.13104.
509. Coots, R. A., Liu, X. M., Mao, Y., Dong, L., Zhou, J., Wan, J., Zhang, X., and Qian, S. B. (2017) m(6)A Facilitates eIF4F-Independent mRNA Translation, *Mol. Cell*, **68**, 504-514 e507, doi: 10.1016/j.molcel.2017.10.002.
510. Slobodin, B., Han, R., Calderone, V., Vrieling, J., Loayza-Puch, F., Elkon, R., and Agami, R. (2017) Transcription Impacts the Efficiency of mRNA Translation via Co-transcriptional N6-adenosine Methylation, *Cell*, **169**, 326-337 e312, doi: 10.1016/j.cell.2017.03.031.
511. Consortium, F., the, R. P., Clst, Forrest, A. R., Kawaji, H., Rehli, M., Baillie, J. K., de Hoon, M. J., Haberle, V., Lassmann, T., Kulakovskiy, I. V., Lizio, M., Itoh, M., Andersson, R., Mungall, C. J., Meehan, T. F., Schmeier, S., Bertin, N., Jorgensen, M., Dimont, E., et al. (2014) A promoter-level mammalian expression atlas, *Nature*, **507**, 462-470, doi: 10.1038/nature13182.
512. Kanamori-Katayama, M., Itoh, M., Kawaji, H., Lassmann, T., Katayama, S., Kojima, M., Bertin, N., Kaiho, A., Ninomiya, N., Daub, C. O., Carninci, P., Forrest, A. R., and Hayashizaki,

- Y. (2011) Unamplified cap analysis of gene expression on a single-molecule sequencer, *Genome Res.*, **21**, 1150-1159, doi: 10.1101/gr.115469.110.
513. Carninci, P., Sandelin, A., Lenhard, B., Katayama, S., Shimokawa, K., Ponjavic, J., Semple, C. A., Taylor, M. S., Engstrom, P. G., Frith, M. C., Forrest, A. R., Alkema, W. B., Tan, S. L., Plessy, C., Kodzius, R., Ravasi, T., Kasukawa, T., Fukuda, S., Kanamori-Katayama, M., Kitazume, Y., et al. (2006) Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution, *Nat. Genet.*, **38**, 626-635, doi: 10.1038/ng1789.
514. Lyabin, D. N., Eliseeva, I. A., and Ovchinnikov, L. P. (2014) YB-1 protein: functions and regulation, *Wiley Interdiscip Rev RNA*, **5**, 95-110, doi: 10.1002/wrna.1200.
515. Mordovkina, D., Lyabin, D. N., Smolin, E. A., Sogorina, E. M., Ovchinnikov, L. P., and Eliseeva, I. (2020) Y-Box Binding Proteins in mRNP Assembly, Translation, and Stability Control, *Biomolecules*, **10**, doi: 10.3390/biom10040591.
516. Asakuno, K., Kohno, K., Uchiumi, T., Kubo, T., Sato, S., Isono, M., and Kuwano, M. (1994) Involvement of a DNA binding protein, MDR-NF1/YB-1, in human MDR1 gene expression by actinomycin D, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**, 1428-1435, doi: 10.1006/bbrc.1994.1390.
517. Tanaka, T., Ohashi, S., Saito, H., Wada, T., Aoyama, T., Ichimaru, Y., Miyairi, S., and Kobayashi, S. (2018) Indirubin 3'-oxime inhibits anticancer agent-induced YB-1 nuclear translocation in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **496**, 7-11, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.106.
518. Kishore, S., Jaskiewicz, L., Burger, L., Hausser, J., Khorshid, M., and Zavolan, M. (2011) A quantitative analysis of CLIP methods for identifying binding sites of RNA-binding proteins, *Nat. Methods*, **8**, 559-564, doi: 10.1038/nmeth.1608.
519. Kotake, Y., Arikawa, N., Tahara, K., Maru, H., and Naemura, M. (2017) Y-box Binding Protein 1 Is Involved in Regulating the G2/M Phase of the Cell Cycle, *Anticancer Res.*, **37**, 1603-1608, doi: 10.21873/anticancer.11490.
520. Wang, H., Sun, R., Gu, M., Li, S., Zhang, B., Chi, Z., and Hao, L. (2015) shRNA-Mediated Silencing of Y-Box Binding Protein-1 (YB-1) Suppresses Growth of Neuroblastoma Cell SH-SY5Y In Vitro and In Vivo, *PLoS One*, **10**, e0127224, doi: 10.1371/journal.pone.0127224.
521. Dooley, S., Said, H. M., Gressner, A. M., Floege, J., En-Nia, A., and Mertens, P. R. (2006) Y-box protein-1 is the crucial mediator of antifibrotic interferon-gamma effects, *J. Biol. Chem.*, **281**, 1784-1795, doi: 10.1074/jbc.M510215200.
522. Lindquist, J. A., and Mertens, P. R. (2018) Cold shock proteins: from cellular mechanisms to pathophysiology and disease, *Cell Commun Signal*, **16**, 63, doi: 10.1186/s12964-018-0274-6.
523. Fraser, D. J., Phillips, A. O., Zhang, X., van Roeyen, C. R., Muehlenberg, P., En-Nia, A., and Mertens, P. R. (2008) Y-box protein-1 controls transforming growth factor-beta1 translation in proximal tubular cells, *Kidney Int*, **73**, 724-732, doi: 10.1038/sj.ki.5002719.
524. Dong, J., Akcakanat, A., Stivers, D. N., Zhang, J., Kim, D., and Meric-Bernstam, F. (2009) RNA-binding specificity of Y-box protein 1, *RNA Biol*, **6**, 59-64, doi: 10.4161/rna.6.1.7458.
525. Siegel, P. M., and Massague, J. (2003) Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 807-821, doi: 10.1038/nrc1208.
526. Eliseeva, I. A., Sogorina, E. M., Smolin, E. A., Kulakovskiy, I. V., and Lyabin, D. N. (2022) Diverse Regulation of YB-1 and YB-3 Abundance in Mammals, *Biochemistry-Moscow+*, **87**, S48-S70, doi: 10.1134/S000629792214005x.
527. Lemm, I., and Ross, J. (2002) Regulation of c-myc mRNA decay by translational pausing in a coding region instability determinant, *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 3959-3969, doi: 10.1128/MCB.22.12.3959-3969.2002.
528. Chang, T. C., Yamashita, A., Chen, C. Y., Yamashita, Y., Zhu, W., Durdan, S., Kahvejian, A., Sonenberg, N., and Shyu, A. B. (2004) UNR, a new partner of poly(A)-binding protein, plays a key role in translationally coupled mRNA turnover mediated by the c-fos major coding-region determinant, *Genes Dev.*, **18**, 2010-2023, doi: 10.1101/gad.1219104.

529. Wu, J., and Bag, J. (1998) Negative control of the poly(A)-binding protein mRNA translation is mediated by the adenine-rich region of its 5'-untranslated region, *J. Biol. Chem.*, **273**, 34535-34542, doi: 10.1074/jbc.273.51.34535.
530. Ivanov, I. P., Loughran, G., Sachs, M. S., and Atkins, J. F. (2010) Initiation context modulates autoregulation of eukaryotic translation initiation factor 1 (eIF1), *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 18056-18060, doi: 10.1073/pnas.1009269107.
531. Ayala, Y. M., De Conti, L., Avendano-Vazquez, S. E., Dhir, A., Romano, M., D'Ambrogio, A., Tollervey, J., Ule, J., Baralle, M., Buratti, E., and Baralle, F. E. (2011) TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop, *EMBO J.*, **30**, 277-288, doi: 10.1038/emboj.2010.310.
532. Stavrovskaya, A., Stromskaya, T., Rybalkina, E., Moiseeva, N., Vaiman, A., Guryanov, S., Ovchinnikov, L., and Guens, G. (2012) YB-1 Protein and Multidrug Resistance of Tumor Cells, *Curr Signal Transd T*, **7**, 237-246, doi: Doi 10.2174/157436212802481592.



## БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарю всех, кто словом и делом, участием и сочувствием, критикой (чаще справедливой) и одобрением (чаще искренним) способствовал осуществлению сего исследования и появлению сей рукописи.

Я искренне благодарю своих родителей, брата и сестру за счастливое детство и отсутствие претензий на мое будущее, которое оказалось связано с Институтом белка РАН в Пущино.

Большую роль в моем образовании и решении испытать силы в Пущино сыграли преподаватели биологического факультета Красноярского государственного университета (ныне СФУ) и мои сокурсницы, за что я им весьма признателен.

Не хватит слов, чтобы выразить всю благодарность и почтение моему руководителю, учителю, наставнику и просто другу Льву Павловичу Овчинникову, без которого я бы не сформировался ни как ученый, ни как взрослый человек, без которого я бы не познал радости путешествий на байдарке и путешествий вообще.

Не последнее место в моем личностном и профессиональном становлении сыграли многие сотрудники Института белка да и сами стены Института. Первым я безмерно признателен, а вторым спасибо, что еще стоят.

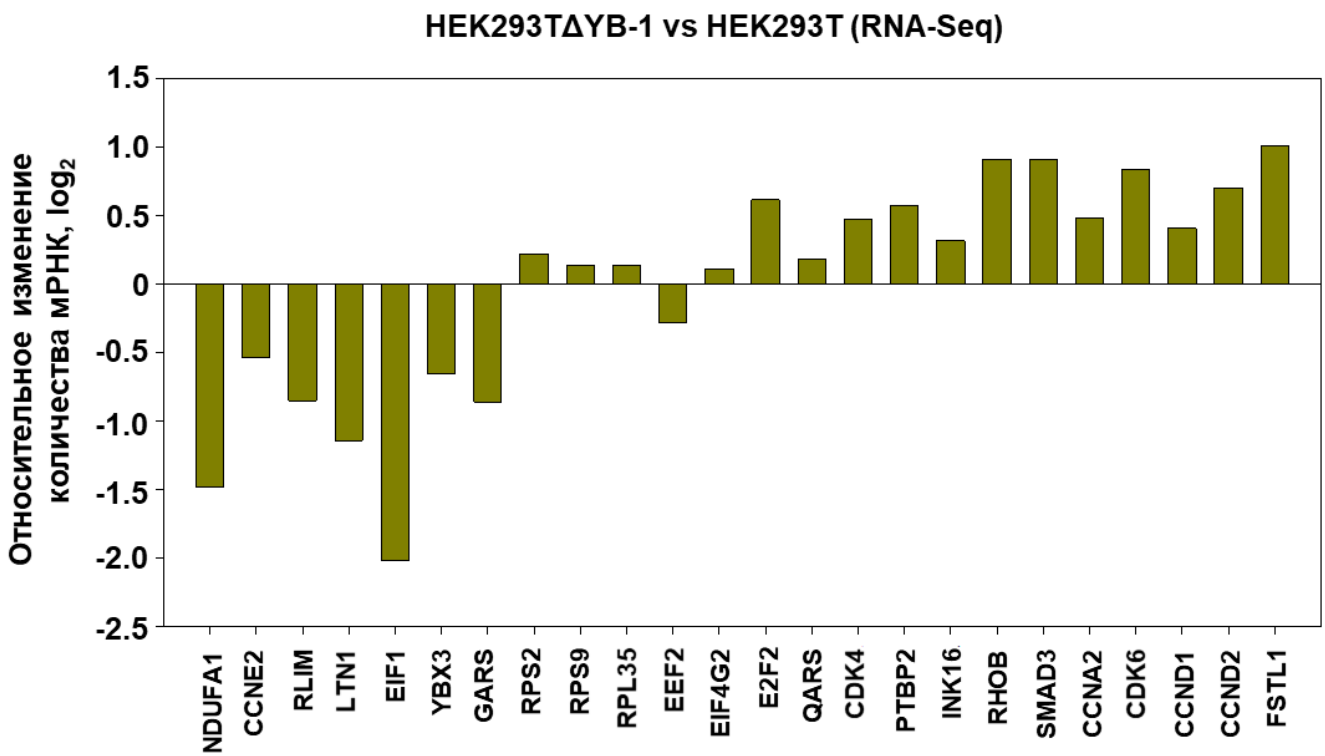
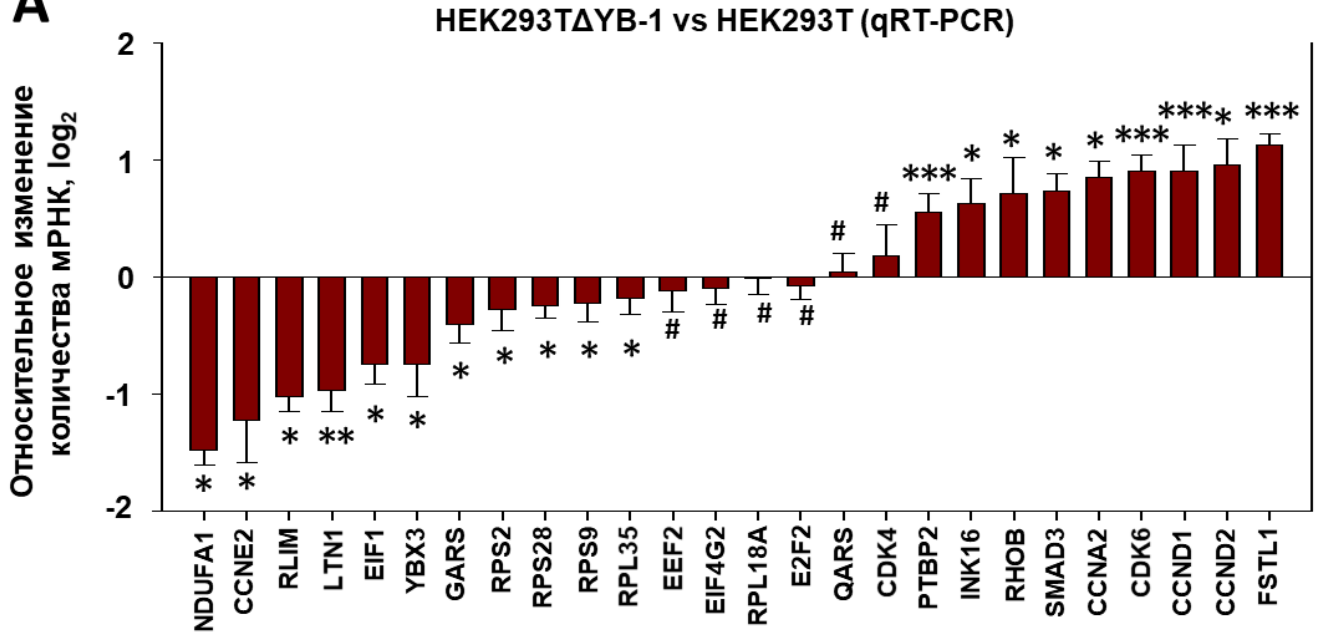
Спасибо всем сотрудникам группы регуляции биосинтеза белка, бывшим и нынешним, за создание неповторимой атмосферы свободы научного творчества, взаимовыручки и дружбы. Особенно я благодарен Ире Елисеевой, человеку, на которого всегда можно положиться и с которым можно обсудить любые идеи. Отдельных слов благодарности безусловно заслуживают наши «лабораторные мамы», Елена Алексеевна Соболева и Нина Михайловна Гришина, не только за постоянную заботу о лабораторном инвентаре и финансах, но за создание домашней обстановки в лаборатории. Я признателен Евгении Викторовне Серебровой за её титанический труд при корректуре и переводе многочисленных научных и околонучных опусов, производимых в нашей группе.

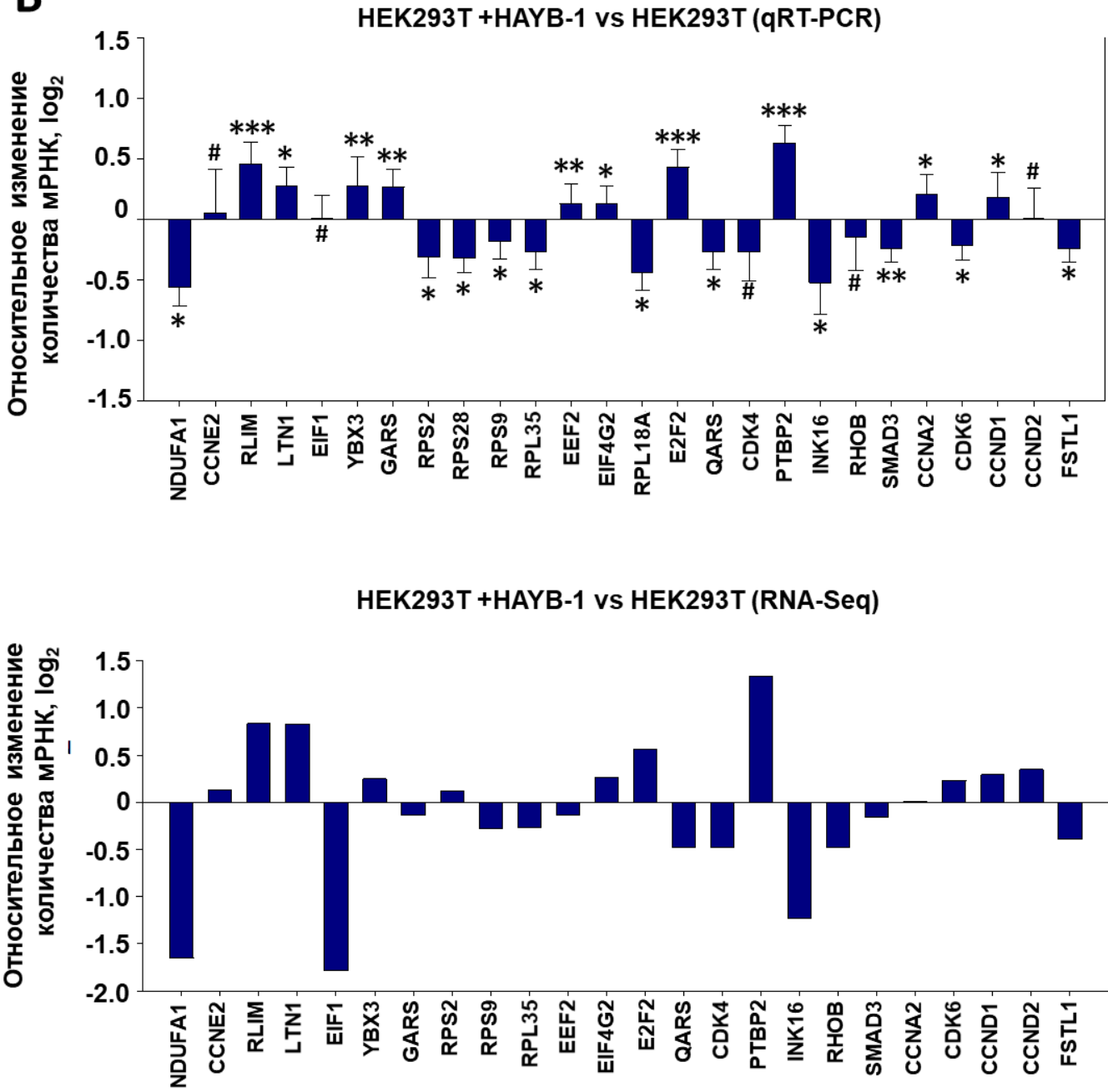
И, конечно, эта диссертационная работа никогда бы не состоялась без вдохновения, которое мне придает моя супруга и дети.

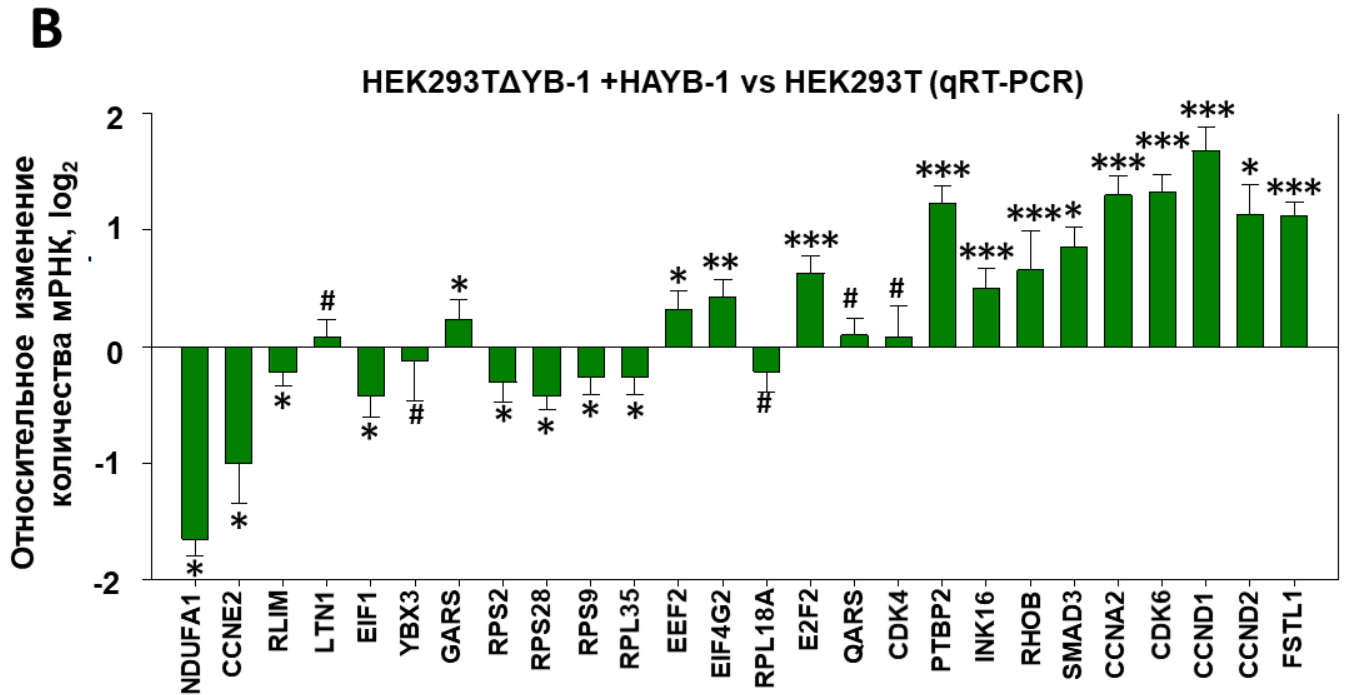
## **Приложение**

## 1. Верификация данных RNA-Seq и Ribo-Seq в экспериментах с клетками HEK293TΔYB-1 и с клетками HEK293T и HEK293TΔYB-1, оверэкспрессирующими YB-1

Ген *YBX3*, наряду с другими 25 генами, которые отличались по реакции на отсутствие YB-1 в клетках согласно данным RNA-Seq и Ribo-Seq, был выбран для верификации этих данных. Было проверено, как меняется количество соответствующих мРНК и их трансляционный статус. Выбранные гены отличались по реакции на отсутствие YB-1 в клетках. Среди них также были рассмотрены некоторые гены, ответственные за прохождение клеточного цикла (циклины, CDKs и ингибиторы CDKs), поскольку в клетках без YB-1 это прохождение замедляется. Для определения количества мРНК в клетках была выделена тотальная РНК и проведена ОТ-ПЦР в реальном времени с соответствующими праймерами (см. список праймеров в таблице 2 раздела 35 главы «Материалы и методы»). На рисунке 81 видно, что данные этого эксперимента практически полностью совпадают с данными, полученными в экспериментах RNA-Seq (за исключением, вероятно, генов *EEF2*, *E2F2* и *QARS*). Такое же сходство данных RNA-Seq и ОТ-ПЦР в реальном времени наблюдается и в случае клеток HEK293T и HEK293TΔYB-1 (Рис. 81Б и 81В), оверэкспрессирующих HA-YB-1 с плазмиды, за исключением генов *EIF1*, *EEF2*, *QARS*, *RHOB*, *CDKN2A* и, возможно, *CDK4*, *CCNE2*, *CCND2*, *CCND1* и *FSTL1* (в случае сравнения HEK293T и HEK293TΔYB-1+HA-YB-1) и генов *EEF2* и *SMAD3* (в случае сравнения HEK293T и HEK293T+HA-YB-1). Следует отметить, что можно было ожидать восстановления количества мРНК (в случае, если это количество изменялось в клетках HEK293TΔYB-1) до уровня в исходных клетках HEK293T при оверэкспрессии *YB-1* в клетках HEK293TΔYB-1. Однако это строго можно наблюдать в случае генов *YBX3*, *LTN1*, *RLIM*, *GARS* и, отчасти, *EIF1*. В случае гена *NDUFA1*, наблюдалось более значительное уменьшение количества мРНК при дополнительной экспрессии YB-1 в клетках HEK293TΔYB-1, что можно объяснить тем, что при значительной оверэкспрессии YB-1 в клетках накопление (синтез и/или стабильность) этой мРНК тоже уменьшается. Это подтверждается тем, что оверэкспрессия YB-1 в исходных клетках HEK293T также снижает количество мРНК *NDUFA1*. Подобное можно наблюдать и в случае мРНК *PTBP2*, однако в этом случае происходит увеличение количества мРНК.

**A**

**Б**



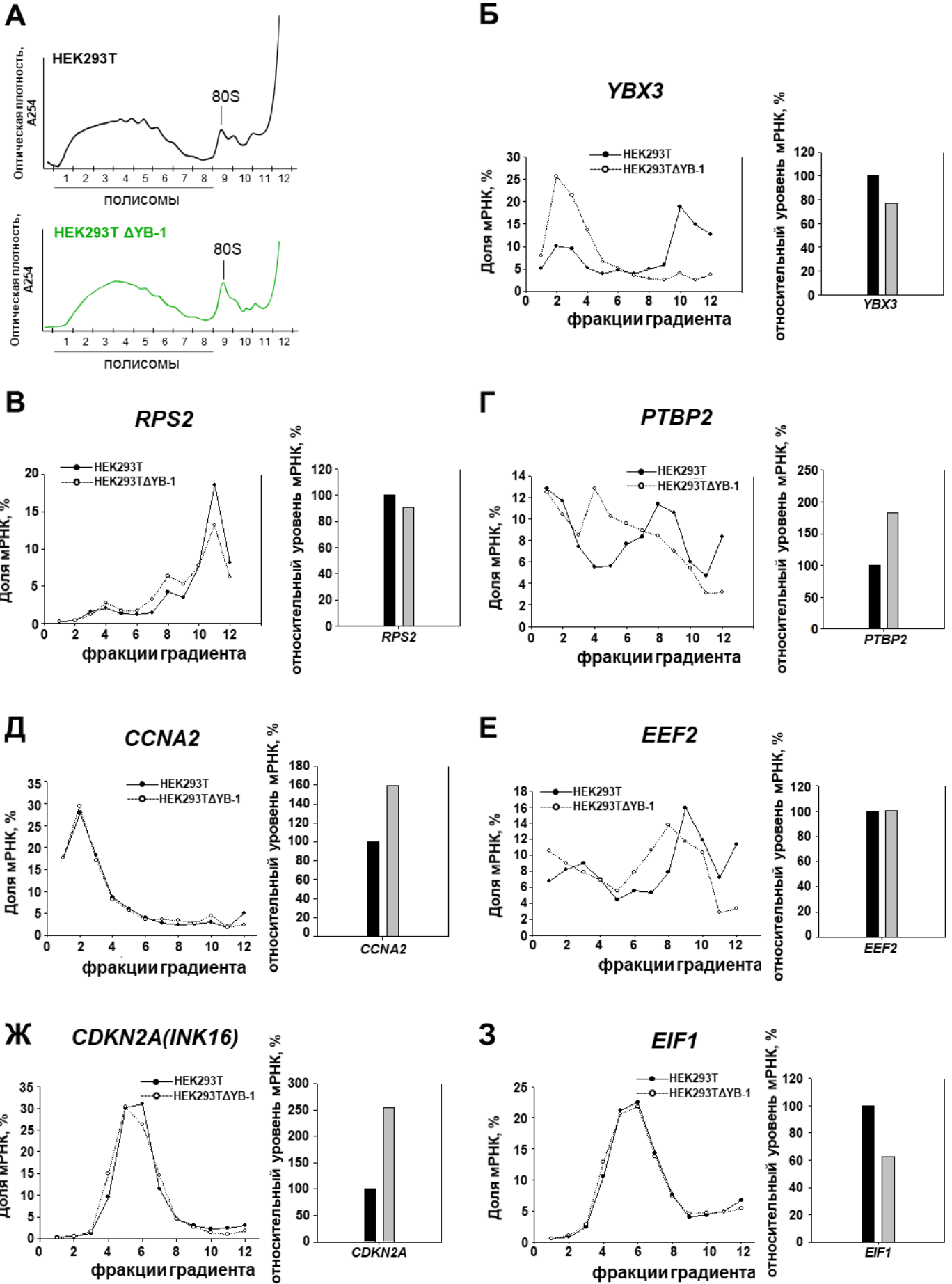
**Рисунок 81. Верификация данных RNA-Seq методом ОТ-ПЦР в реальном времени. А.** HEK293TΔYB-1 по сравнению с HEK293T; **Б.** HEK293T+HAYB-1 против HEK293T. **В.** HEK293TΔYB-1+HAYB-1 по сравнению с HEK293T. Верхняя панель - результаты ОТ-ПЦР в реальном времени (5 повторов, ошибки – стандартное отклонение, \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,005$ , # - недостоверно). Нижняя панель – данные RNA-Seq (среднее из двух биологических повторов).

В случае генов рибосомных белков (*RPS2*, *RPS28*, *RPS9*, *RPL35* и *RPL18A*) можно видеть слабые изменения количества соответствующих мРНК (хоть и достоверное в ряде случаев) как при выключении экспрессии YB-1, так и при его оверэкспрессии в клетках. Для генов циклинов и циклин-зависимых киназ (*CCNE2*, *CCND1*, *CCND2*, *CDK4*, *CDKN2A*) и некоторых других можно отметить, что по данным ОТ-ПЦР в реальном времени количество этих мРНК возрастает в не экспрессирующих YB-1 клетках HEK293T, но слабо реагирует на оверэкспрессию HA-YB-1 как в клетках HEK293T, так и в клетках HEK293TΔYB-1. Это может означать, что изменения в экспрессии этих генов не связаны напрямую с экспрессией белка YB-1, а, возможно, являются адаптивными в клетках HEK293TΔYB-1. Однако по данным RNA-Seq такой вывод в отношении этих генов и генов *FASTL1* и *RHOB* сделать нельзя. Количество соответствующих мРНК возрастает в отсутствие экспрессии YB-1 и уменьшается при оверэкспрессии YB-1 в клетках HEK293T. Тем не менее, эти данные не являются статистически достоверными.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что данные RNA-Seq в целом являются репрезентативными. Однако стоит отметить, что, вероятно, некоторые изменения в количестве мРНК в клетках, не экспрессирующих YB-1, не напрямую вызваны отсутствием белка YB-1, а являются следствием более сложных изменений, зависящих не только от YB-1.

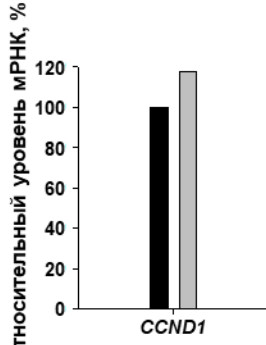
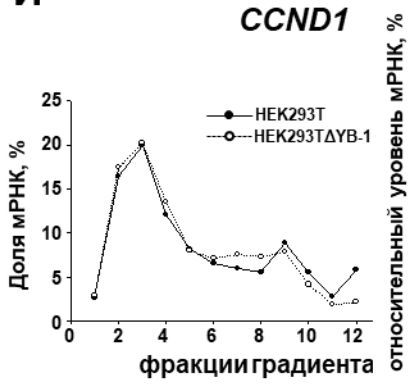
Для определения трансляционного статуса исследуемых мРНК проводили ультрацентрифугирование лизатов клеток, полученных из клеток НЕК293Т и НЕК293ТΔУВ-1 в градиенте концентрации сахарозы с последующим выделением РНК из фракций градиента и определением относительного количества исследуемых мРНК методом ОТ-ПЦР в реальном времени. На рисунке 82 представлены результаты этого эксперимента. Наиболее значительное изменение в распределении мРНК между полисомами и свободными мРНК, а следовательно и в трансляции, можно заметить для мРНК *УВ-3*. Видно, что при подавлении экспрессии УВ-1 практически вся мРНК *УВ-3* перераспределяется в полисомы. Из тех мРНК, что, по данным RiboSeq, показали изменения в трансляции (занятость рибосомами), меньшую, чем ожидалось, тенденцию к перераспределению в зону полисом показали мРНК *EE2F*, *QARS*, *RPS2*, *RPS28*, *RPS9*, а мРНК *RPL35* и *RPL18A* и вовсе не изменили своего распределения. Значительное перераспределение в зону полисом показали мРНК *PTBP2* и *RHOВ*, что было видно в RiboSeq экспериментах, но в том случае данные оказались недостоверным после статистической обработки. Остальные мРНК не показали никаких изменений в трансляции, что было видно и в экспериментах Ribo-Seq. При этом на панелях справа от каждого градиента можно видеть изменения в количестве мРНК, полученные из данных ОТ-ПЦР в реальном времени, фракций градиента, которые практически полностью соответствуют данным RNA-Seq и ОТ-ПЦР в реальном времени тотальной мРНК.

В целом, проведенные эксперименты подтверждают данные Ribo-Seq: происходящие при нокауте УВ-1 изменения в трансляции небольшого набора мРНК в большинстве случаев обусловлены изменениями в количестве мРНК, а не изменениями её транскрируемости.

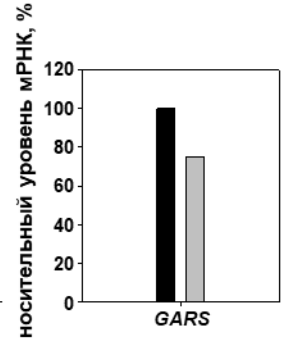
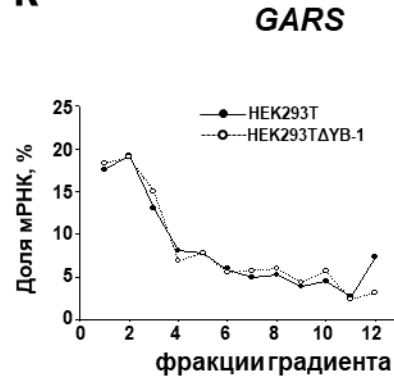




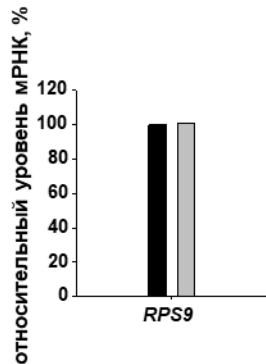
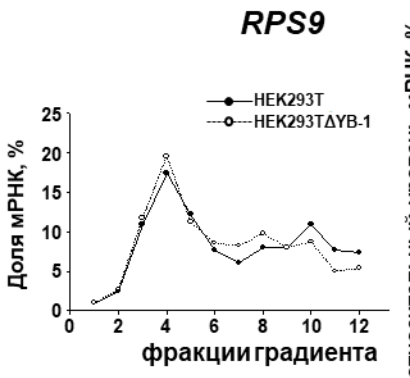
И



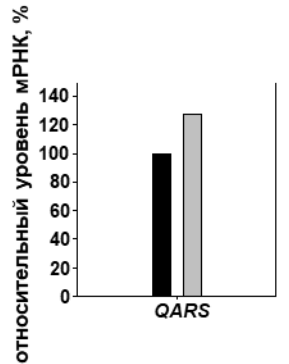
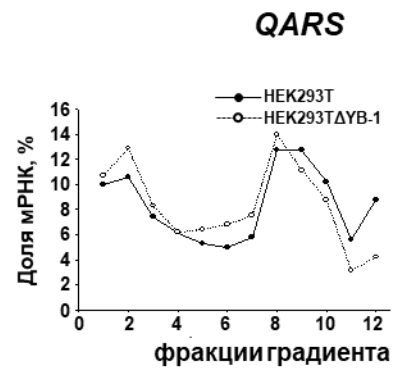
К



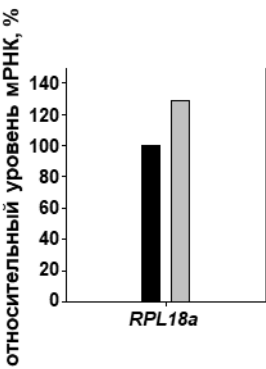
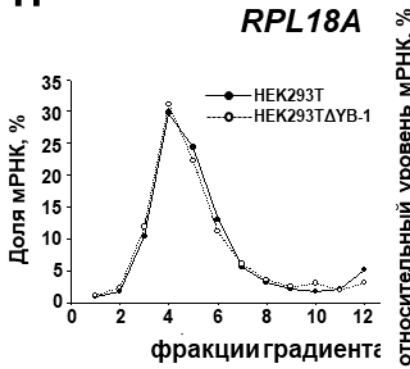
Л



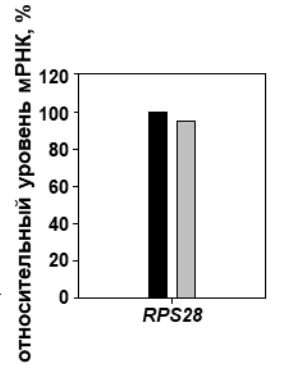
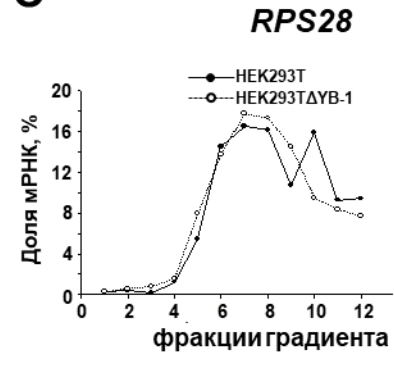
М



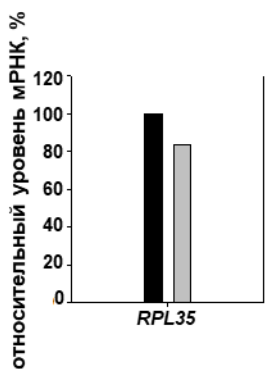
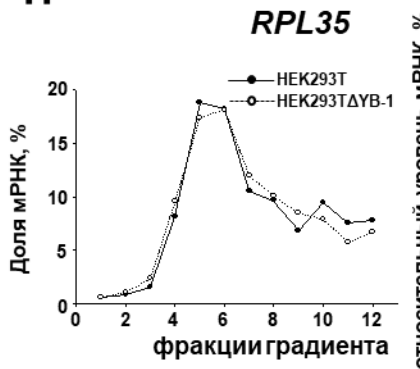
Н



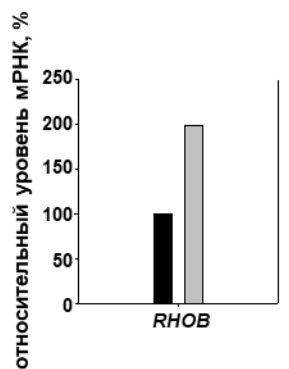
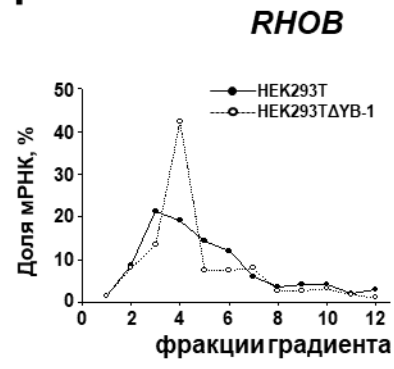
О

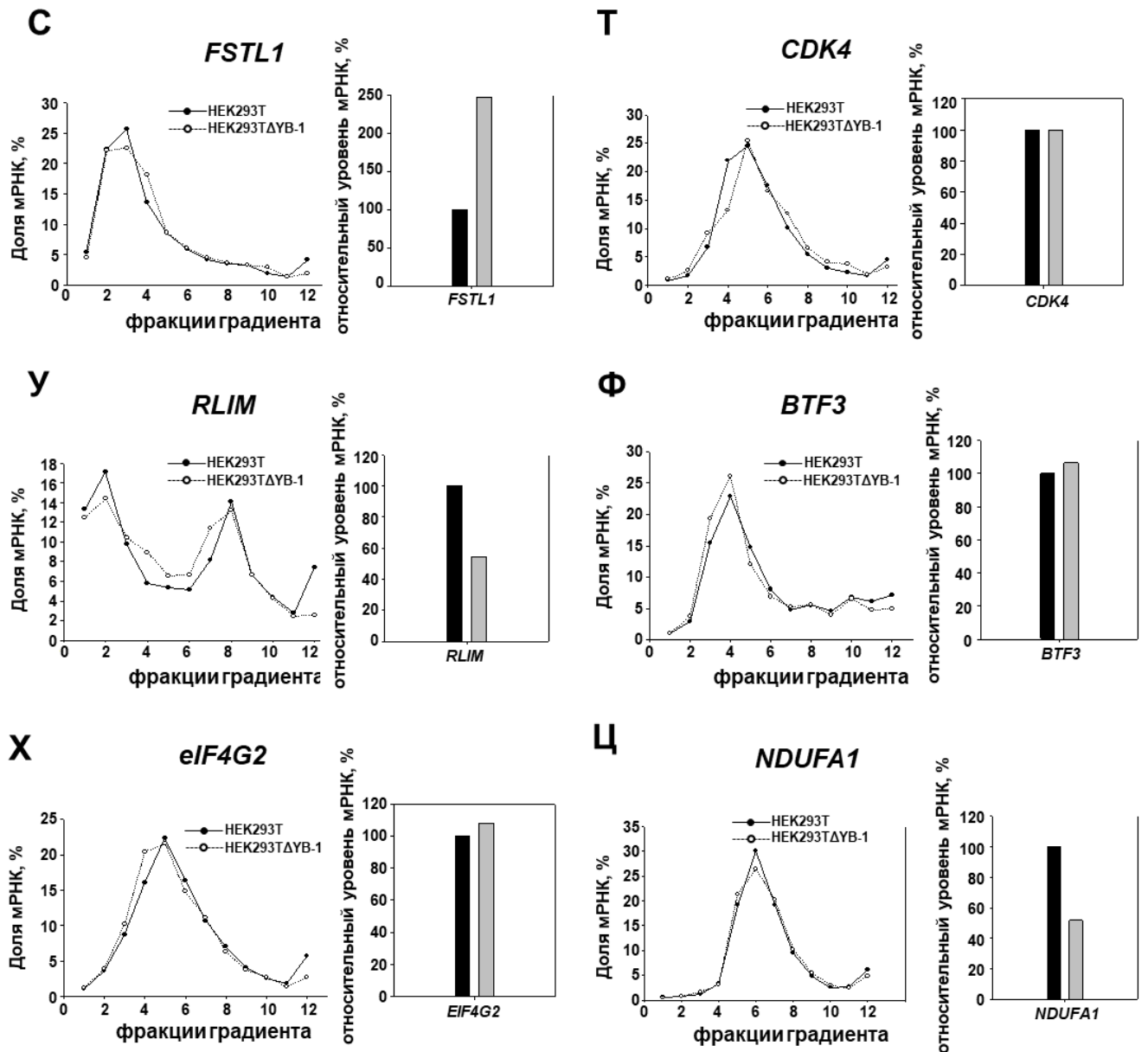


П



Р

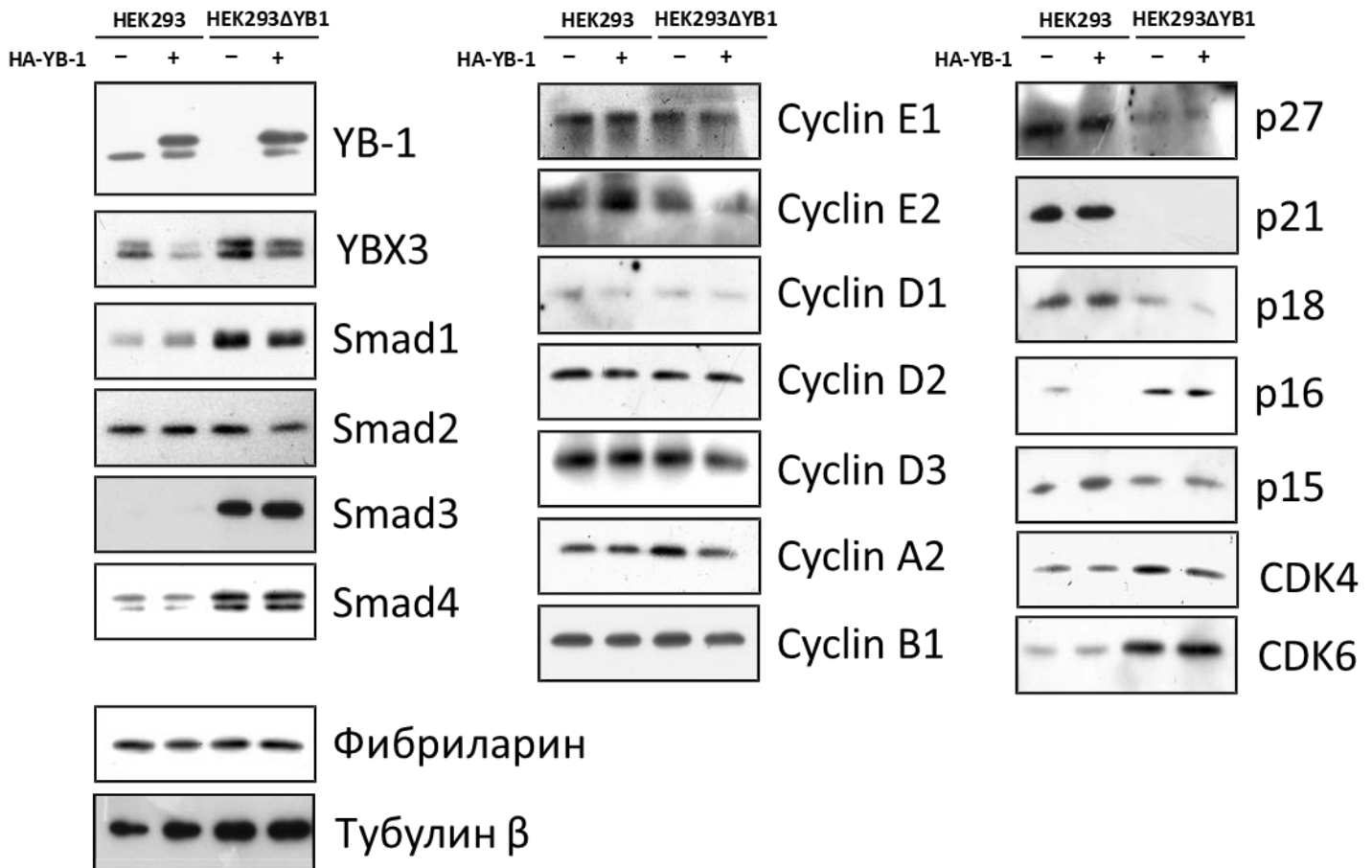




**Рисунок 82.** Верификация данных Ribo-Seq с помощью анализа распределения мРНК между фракциями полисом и свободных мРНК. Лизаты клеток HEK293T и HEK293TΔYB-1 подвергали центрифугированию в линейном градиенте сахарозы (15 до 45%) в течение 1 ч при 45000 об/мин в роторе SW-60. мРНК детектировали в каждой фракции градиента методом ОТ-ПЦР в реальном времени. А-У. Левая панель – распределение мРНК по фракциям градиента сахарозы, правая панель – относительное количество мРНК (%) в клетках HEK293T и HEK293TΔYB-1 на градиент (сумма фракций), количество мРНК в клетках HEK293T принято за 100%.

Наконец, для некоторых из генов (антитела против которых имелись) методом иммуноблоттинга было исследовано, как изменяется количество белка в клетках HEK293T, не экспрессирующих YB-1 или сверхэкспрессирующих YB-1. В первую очередь, интерес вызывал белок YB-3, чей синтез наиболее зависим от количества YB-1 по всем проведенным тестам. На рисунке 83 можно видеть, что количество белка YB-3, в полном соответствии с данными RNA-Seq, RiboSeq и центрифугирования, увеличивается в отсутствие YB-1 и уменьшается при сверхэкспрессии НА-YB-1 в клетках HEK293T (за счет изменения трансляции мРНК). Такую же

закономерность можно наблюдать в случае белков, циклина A2 и Smad1 (за счет изменения количества мРНК) и CDK4. Случай с CDK4 интересен тем, что по RT-PCR не наблюдается изменений количества этой мРНК, а по ультрацентрифугированию не видно изменений и в транскрируемости мРНК. В тоже время, данные иммуноблоттинга прекрасно соотносятся с данными RNA-Seq и Ribo-Seq.

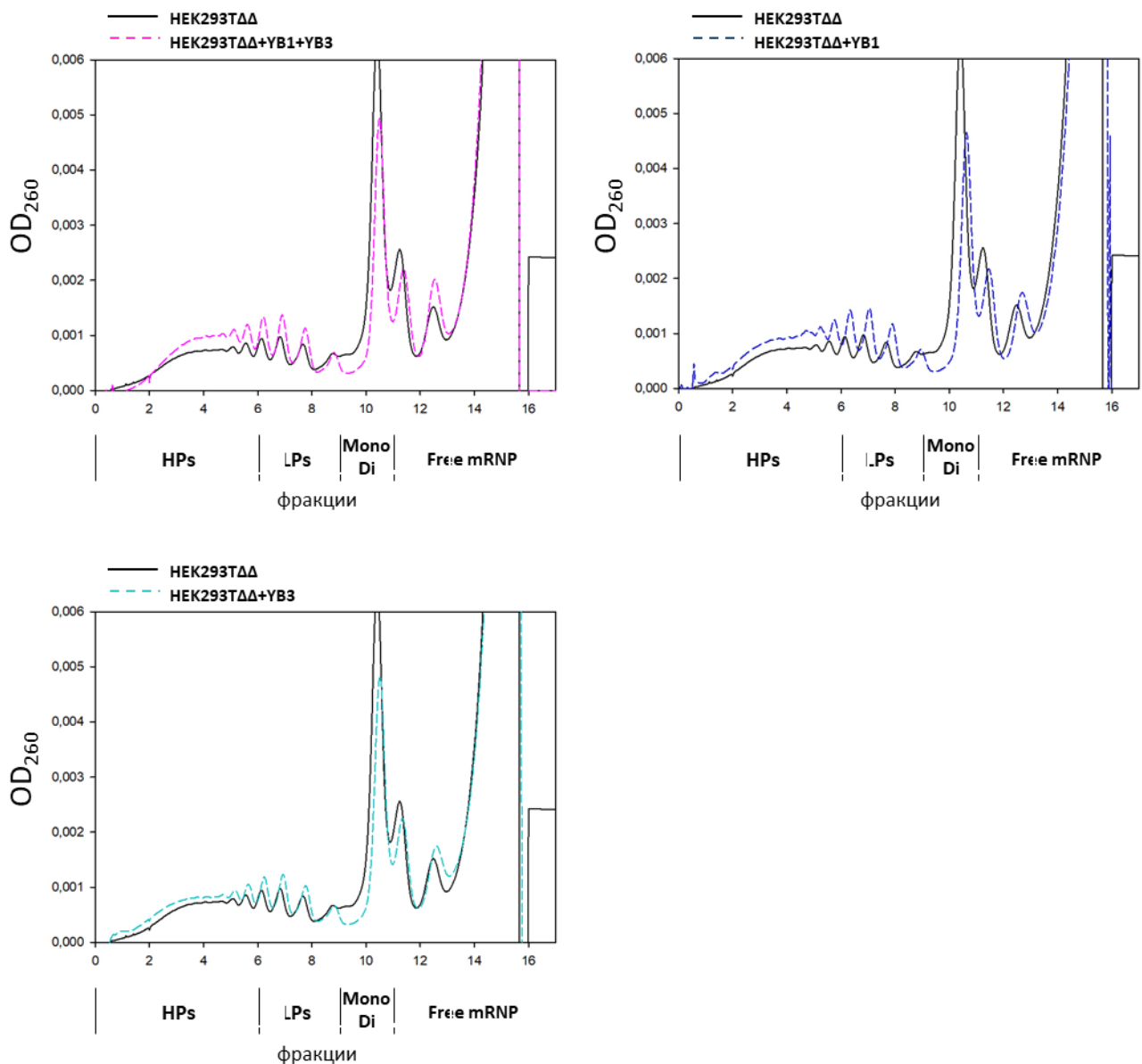


**Рисунок 83.** Анализ лизатов клеток HEK293T и HEK293TΔYB-1, экспрессирующих и не экспрессирующих HA-YB-1 с плазмиды, методом иммуноблоттинга. Фибрилларин и тубулин β использовались в качестве контроля.

В остальных случаях либо не наблюдается никаких изменений (Cyclin E1, Cyclin D1, Cyclin D2, Cyclin B1, p15, Smad2, Fibrillarin, Calnexin, Tubulin beta), и, за исключением Cyclin D1 и Cyclin D2, эти данные соответствуют RNA-Seq и Ribo-Seq, либо изменения происходят только в клетках HEK293TΔYB-1, что было видно по RNA-Seq и Ribo-Seq, но не зависят от оверэкспрессии HA-YB-1 (Smad3, Smad4, Rab5, Cyclin E2, CDK6, p27, p21, p16, p18), хотя по RNA-Seq и Ribo-Seq такая зависимость наблюдается. Возможно, это связано с другим фактором, влияющим на количество белка, таким как его стабильность.

## 2. Верификация данных RNA-Seq и Ribo-Seq в экспериментах с клетками НЕК293ТΔУВ-1ΔУВ-3 и НЕК293ТΔУВ-1ΔУВ-3 с восстановленным синтезом белка УВ-1, или УВ-3, или обоих УВ-белков

Для проверки данных, полученных в экспериментах по рибосомному профайлингу, было исследовано распределение между фракциями полисом, моносом и свободных мРНК для нескольких мРНК, показавших наибольшие изменения в эффективности трансляции в Ribo-Seq. Для этого лизаты клеток НЕК293ТΔУВ-1ΔУВ-3 (НЕК293ТΔΔ), НЕК293ТΔΔ+УВ-1, НЕК293ТΔΔ+УВ-3, НЕК293ТΔΔ+УВ-1+УВ-3 центрифугировали в градиенте плотности сахарозы (15%-45%) и затем собирали по 16 фракций каждого градиента.



**Рисунок 84.** Полисомные профили клеток НЕК293ТΔΔ, НЕК293ТΔΔ+УВ-1, НЕК293ТΔΔ+УВ-3, НЕК293ТΔΔ+УВ-1+УВ-3.

На рисунке 84 можно видеть полисомные профили исследованных лизатов. Можно отметить, что в клеточной линии НЕК293ТΔΔ по сравнению с остальными линиями менее выражена полисомная фракция и более выражена фракция моносом (80S). Интересно также, что наиболее сильно от линии НЕК293ТΔΔ отличаются линии НЕК293ТΔΔ+УВ-1 и НЕК293ТΔΔ+УВ-1+УВ-3, а клетки НЕК293ТΔΔ+УВ-3 занимают промежуточное положение. Возможно, экспрессия *УВ-3* восстанавливает уровень полисом не в полной мере из-за того, что в отсутствие *УВ-1* экспрессия гена *УВХ3* не контролируется, а это обуславливает повышенный синтез *УВ-3*. В больших же количествах *УВ-3* выступает как ингибитор трансляции.

Для упрощения последующего анализа 16 фракции были разделены на 4 группы: фракции 1-6 объединялись как фракция тяжелых полисом (HPs); 7-9 – как фракция легких полисом (LPs); 10-11 – как фракция моносом (и дисом); 12-16 – как фракция свободных мРНК (Рис. 84).

В каждую новую фракцию было добавлено одинаковое количество (1,5 фмоль) мРНК *люциферазы Fluc* как внутренний контроль. Далее из фракций была выделена РНК с помощью набора Direct-zol RNA miniprep (Zymo Research) в объеме 50 мкл. Таким образом, было получено 16 образцов (по 4 фракции от 4 клеточных лизатов). 10 мкл из каждого образца использовали при проведении реакции обратной транскрипции с использованием набора Maxima H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Sciences). Затем методом ПЦР в реальном времени проводили детекцию избранных мРНК и мРНК *Fluc* в каждом образце на приборе DTlite 4 (ДНК-Технологии) с помощью набора qPCRmix-HS SYBR+LowROX (Евроген) и специфических праймеров. Последовательность праймеров для qPCR бралась из открытых источников (сайт фирмы Origen <https://www.origene.com/category/gene-expression/qpcr-primer-pairs>) и дополнительно проверялась на отсутствие сторонних мишеней с помощью онлайн-ресурса Primer-BLAST (см. список праймеров в таблице 2 раздела 35 главы «Материалы и методы»).

Относительное количество мРНК в каждой фракции нормализовали на внутренний контроль (мРНК *Fluc*, которая добавлялась во фракции градиента перед выделением РНК). Долю (%) мРНК во фракции рассчитывали как отношение количества мРНК во фракции к количеству мРНК во всех фракциях. Результаты эксперимента представлены на рисунке 85. На каждом графике для сравнения указаны данные об изменении трансляционной эффективности мРНК, полученные в экспериментах Ribo-Seq, а также длина мРНК. Последнее важно, поскольку для коротких мРНК наблюдается переход из легких полисом (или даже моно- и дисом) в свободные мРНК или наоборот, а для длинных меняется распределение между тяжелыми полисомами и моносомами (или свободными мРНК). По сводной таблице результатов (Таблица 3) можно сделать вывод о том, что в большинстве случаев изменения в

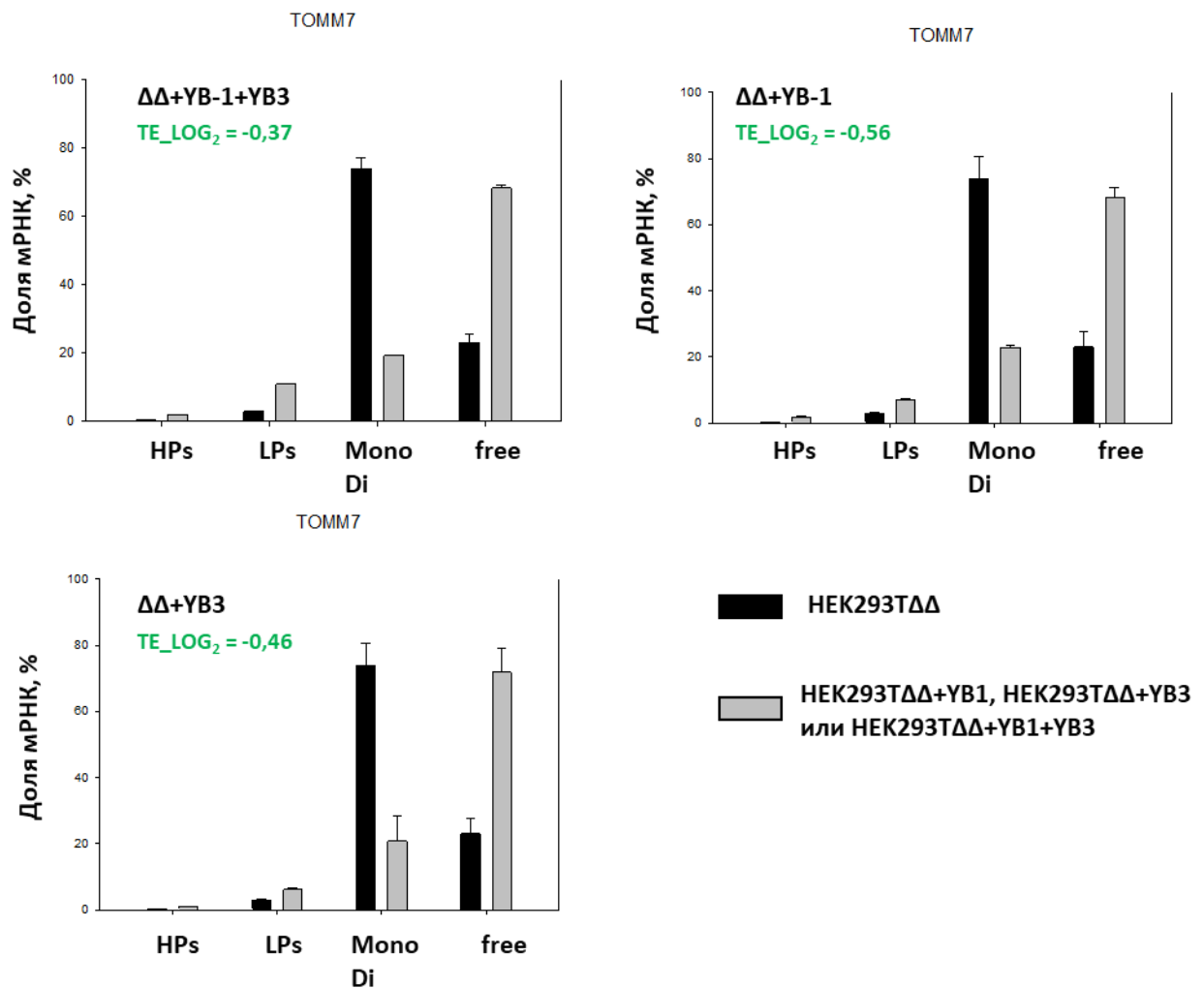
рибосомном профиле мРНК хорошо коррелируют с данными Ribo-Seq. Это позволяет говорить о достоверности данных, полученных методом Ribo-Seq.

## TOMM7

Длина мРНК (кодирующей области) = 434 (168) н

$TE_{LOG_2}$  = - статистически значимые изменения (RiboSeq)

$TE_{LOG_2}$  = статистически не значимые изменения (RiboSeq)



**Рисунок 85. Верификация результатов Ribo-Seq анализа клеток HEK293TΔΔ, HEK293TΔΔ+YB-1, HEK293TΔΔ+YB-3, HEK293TΔΔ+YB-1+YB-3 с помощью анализа распределения мРНК между фракциями полисом и свободных мРНК. На каждом графике распределение мРНК для клеточных линий HEK293TΔΔ+YB-1, HEK293TΔΔ+YB-3, HEK293TΔΔ+YB-1+YB-3 (серая гистограмма) дано по сравнению с линией HEK293TΔΔ (черная гистограмма). HPs – тяжелые полисомы, LPs – легкие полисомы, MonoDi – моносомы и дисомы, free – свободные мРНК. Для каждого случая приведены результаты, полученные в эксперименте Ribo-Seq.**

## CCNA2

Длина мРНК (кодирующей области) = 2748 (1299) н

$TE_{LOG_2} =$  - статистически значимые изменения (RiboSeq)

$TE_{LOG_2} =$  - статистически не значимые изменения (RiboSeq)

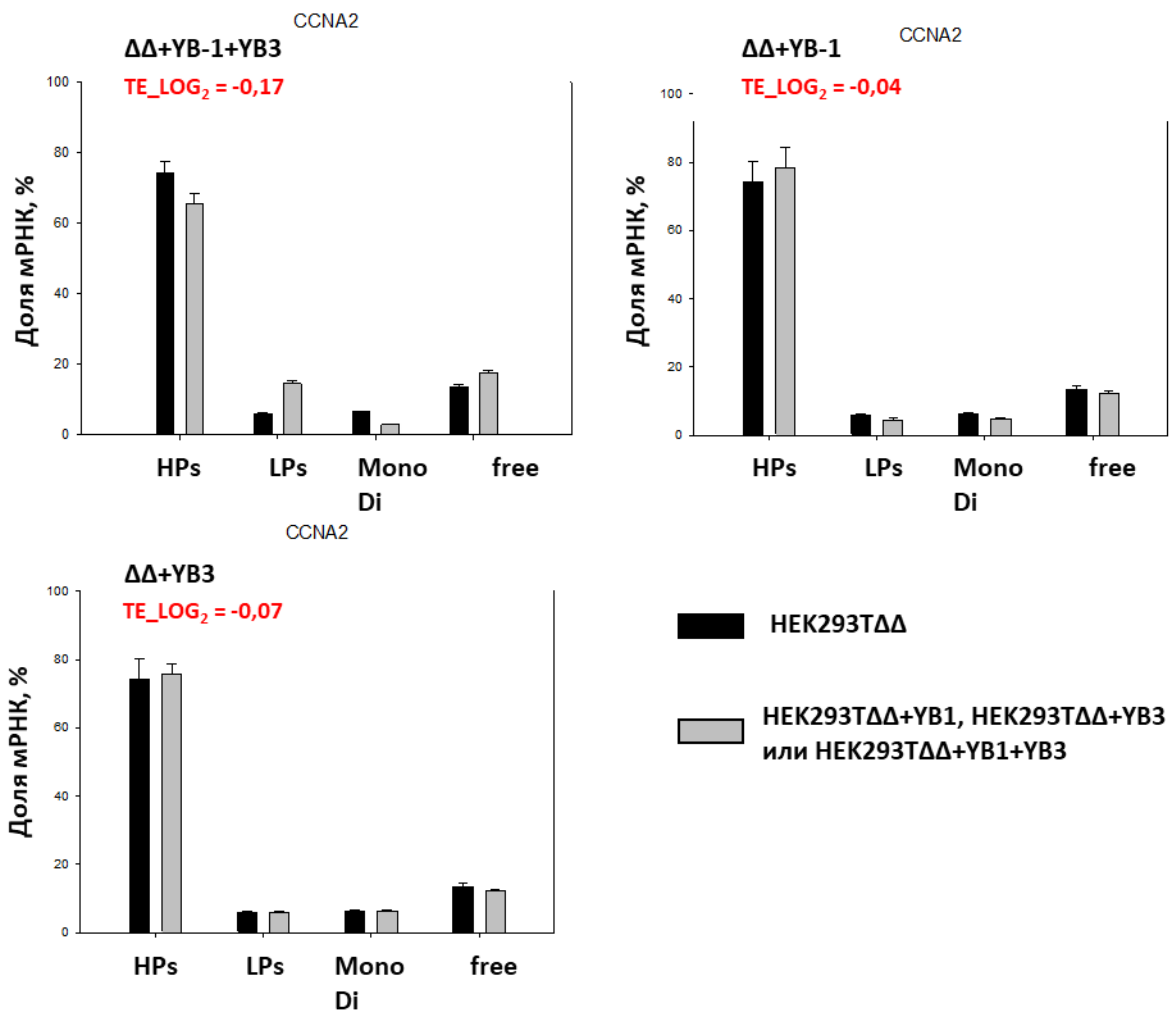


Рисунок 85 (продолжение).

## BCL2

Длина мРНК (кодирующей области) = 1595 (618) н

$TE_{LOG_2} =$  - статистически значимые изменения (RiboSeq)

$TE_{LOG_2} =$  - статистически не значимые изменения (RiboSeq)

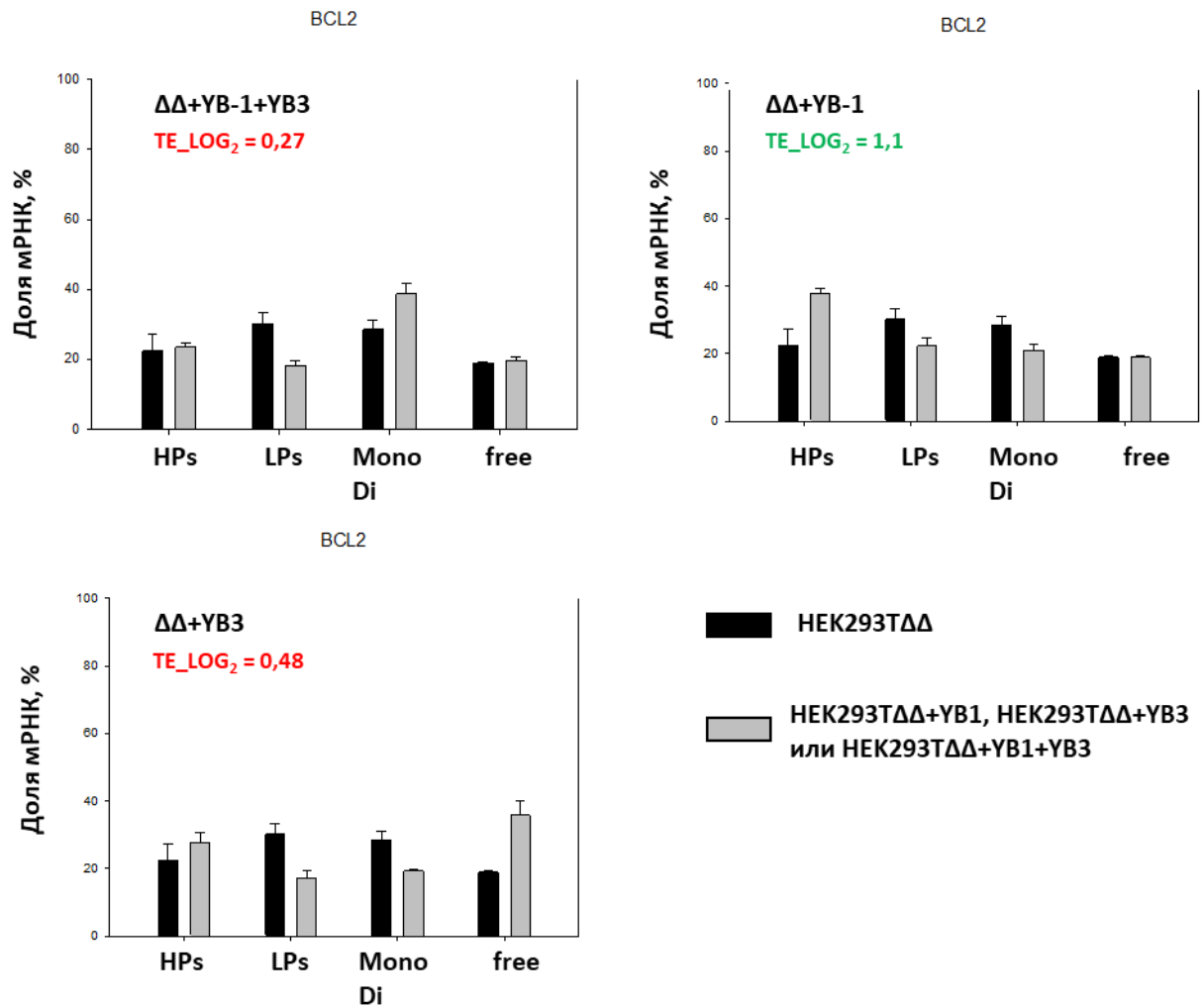


Рисунок 85 (продолжение).



## RPS2

Длина мРНК (кодирующей области) = 945 (882) н

$TE_{LOG_2} =$  - статистически значимые изменения (RiboSeq)

$TE_{LOG_2} =$  - статистически не значимые изменения (RiboSeq)

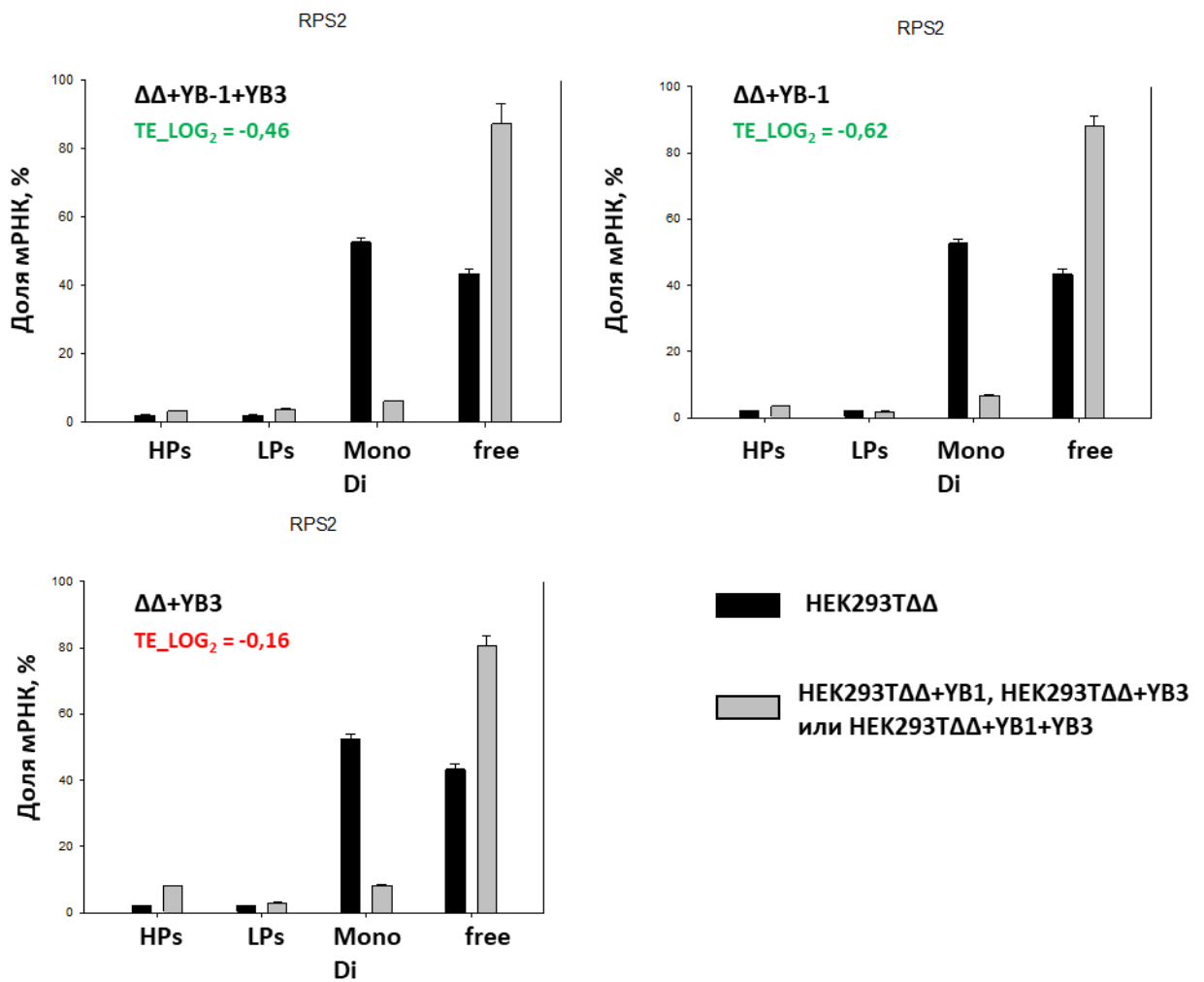


Рисунок 85 (продолжение).

## ADGRB1

Длина мРНК (кодирующей области) = 6020 (4755) н

**TE<sub>LOG<sub>2</sub></sub> =** - статистически значимые изменения (RiboSeq)

**TE<sub>LOG<sub>2</sub></sub> =** - статистически не значимые изменения (RiboSeq)

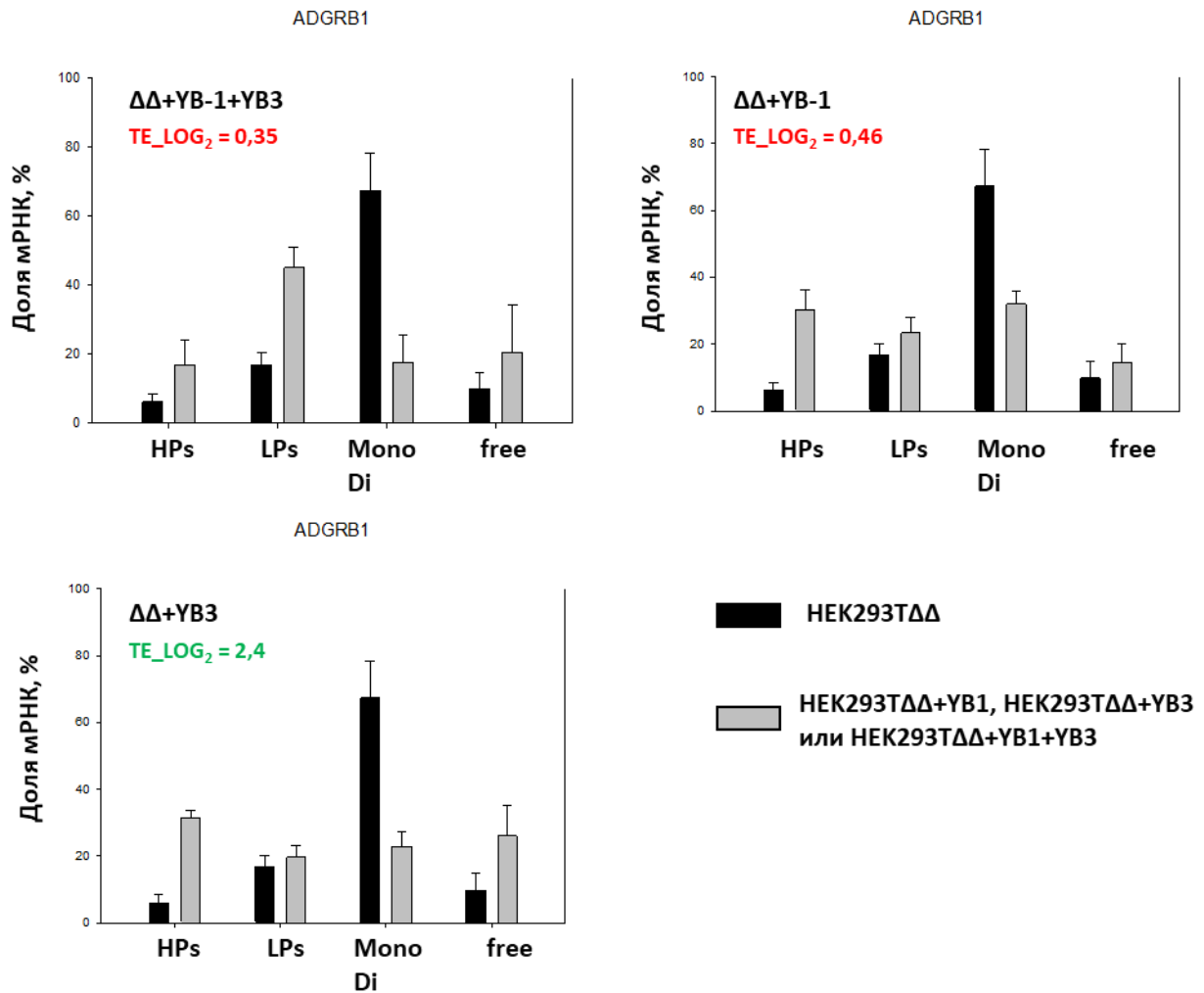


Рисунок 85 (продолжение).

## BCLAF1

Длина мРНК (кодирующей области) = 7491 (2763) н

$TE_{LOG_2} = -$  - статистически значимые изменения (RiboSeq)

$TE_{LOG_2} = +$  - статистически не значимые изменения (RiboSeq)

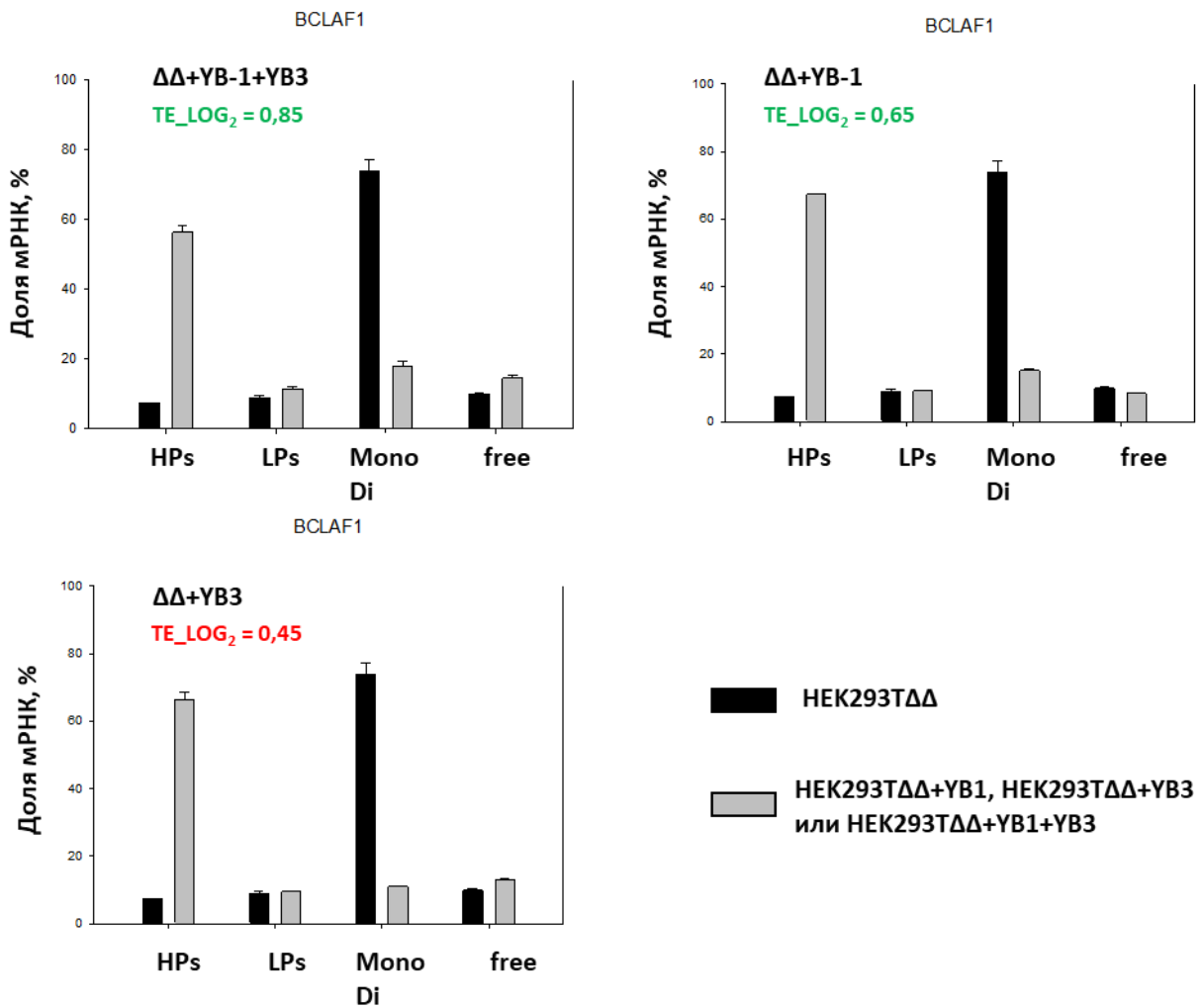


Рисунок 85 (продолжение).

## FTL

Длина мРНК (кодирующей области) = 871 (528) н

$TE_{LOG_2} =$  - статистически значимые изменения (RiboSeq)

$TE_{LOG_2} =$  - статистически не значимые изменения (RiboSeq)

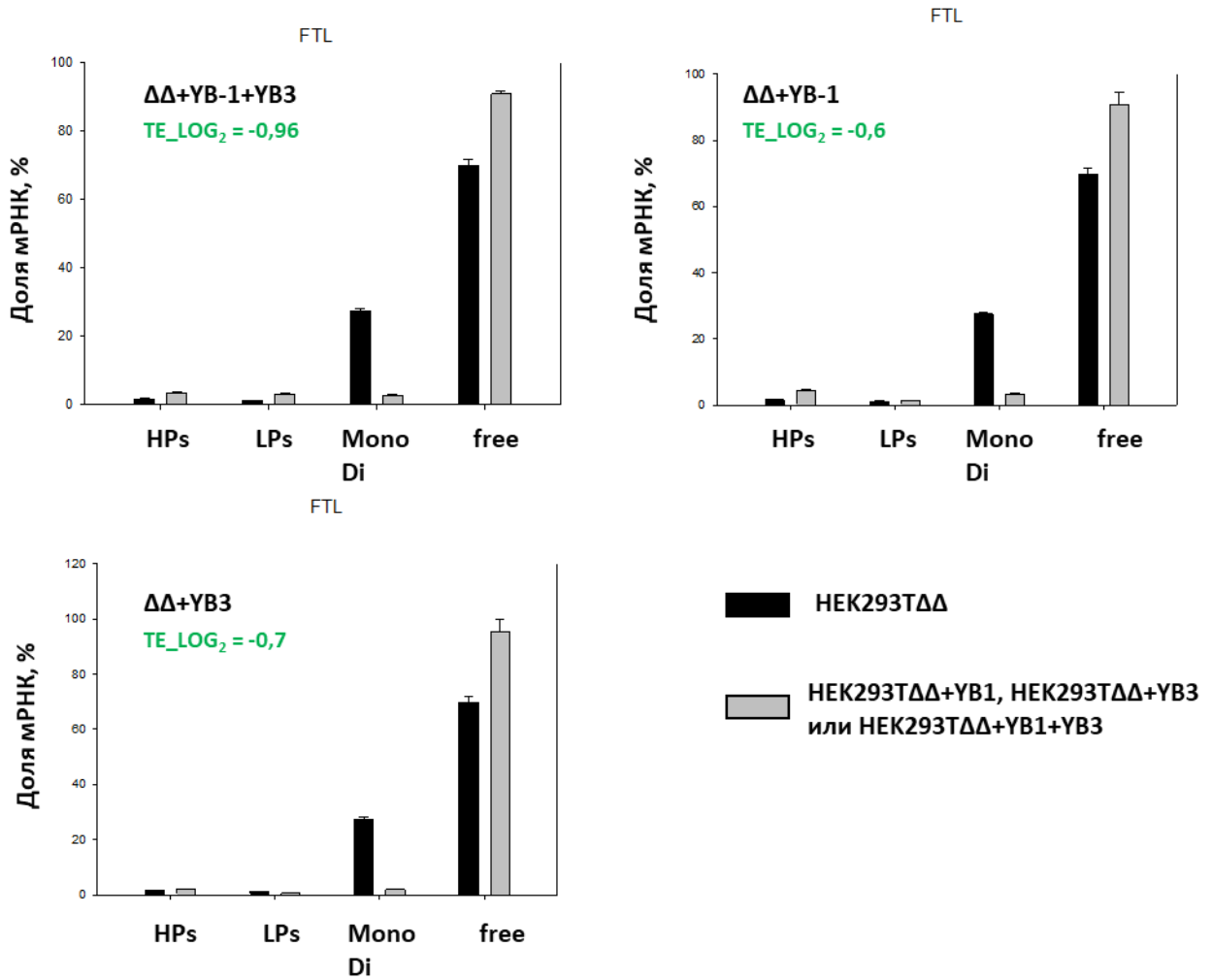


Рисунок 85 (продолжение).

## OBSCN

Длина мРНК (кодирующей области) = 20518 (19863) н

$TE_{LOG_2} =$  - статистически значимые изменения (RiboSeq)

$TE_{LOG_2} =$  - статистически не значимые изменения (RiboSeq)

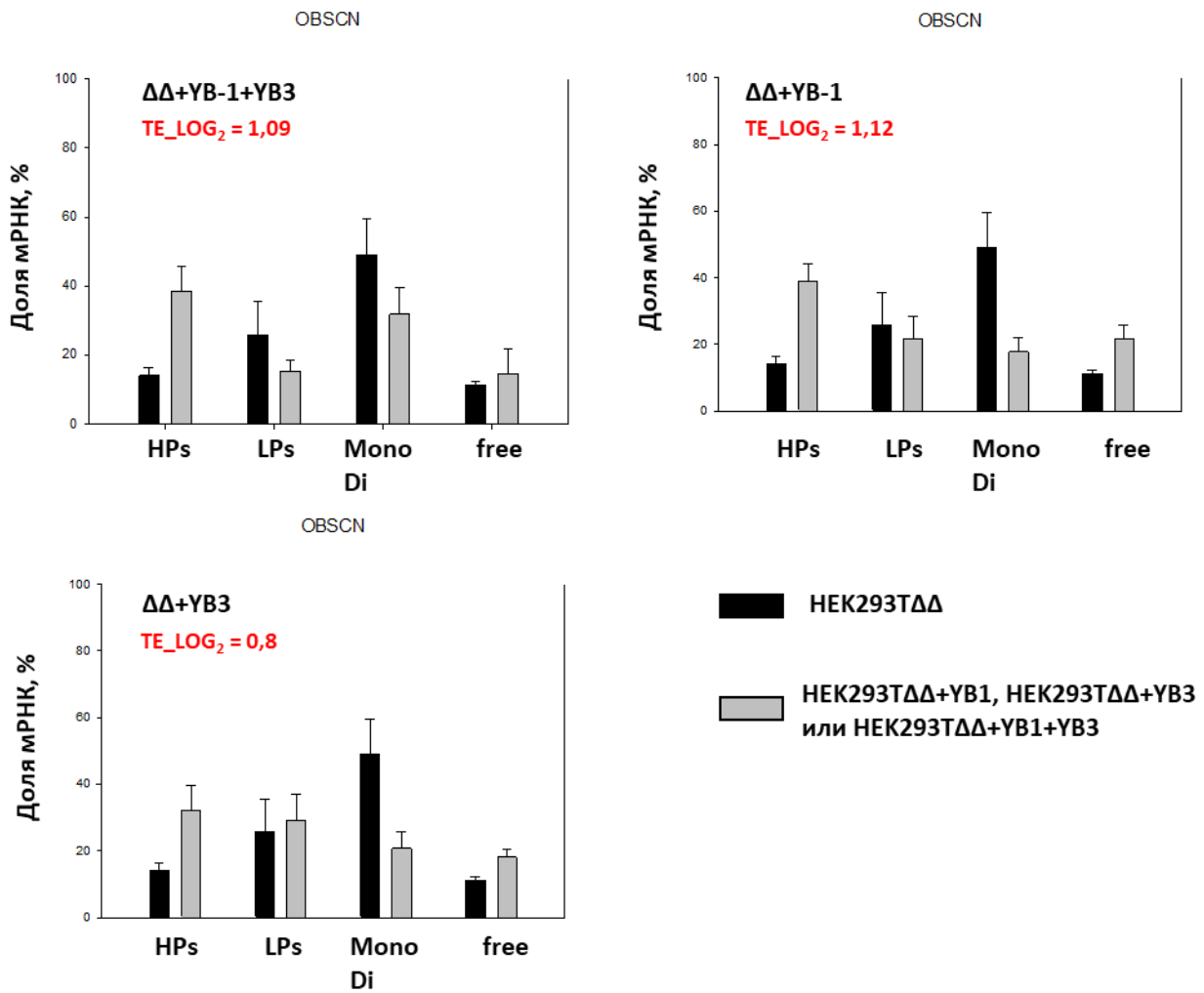


Рисунок 85 (продолжение).

## MT-CYB

Длина мРНК (кодирующей области) = (1141) н

**TE<sub>LOG<sub>2</sub></sub>** = - статистически значимые изменения (RiboSeq)

**TE<sub>LOG<sub>2</sub></sub>** = - статистически не значимые изменения (RiboSeq)

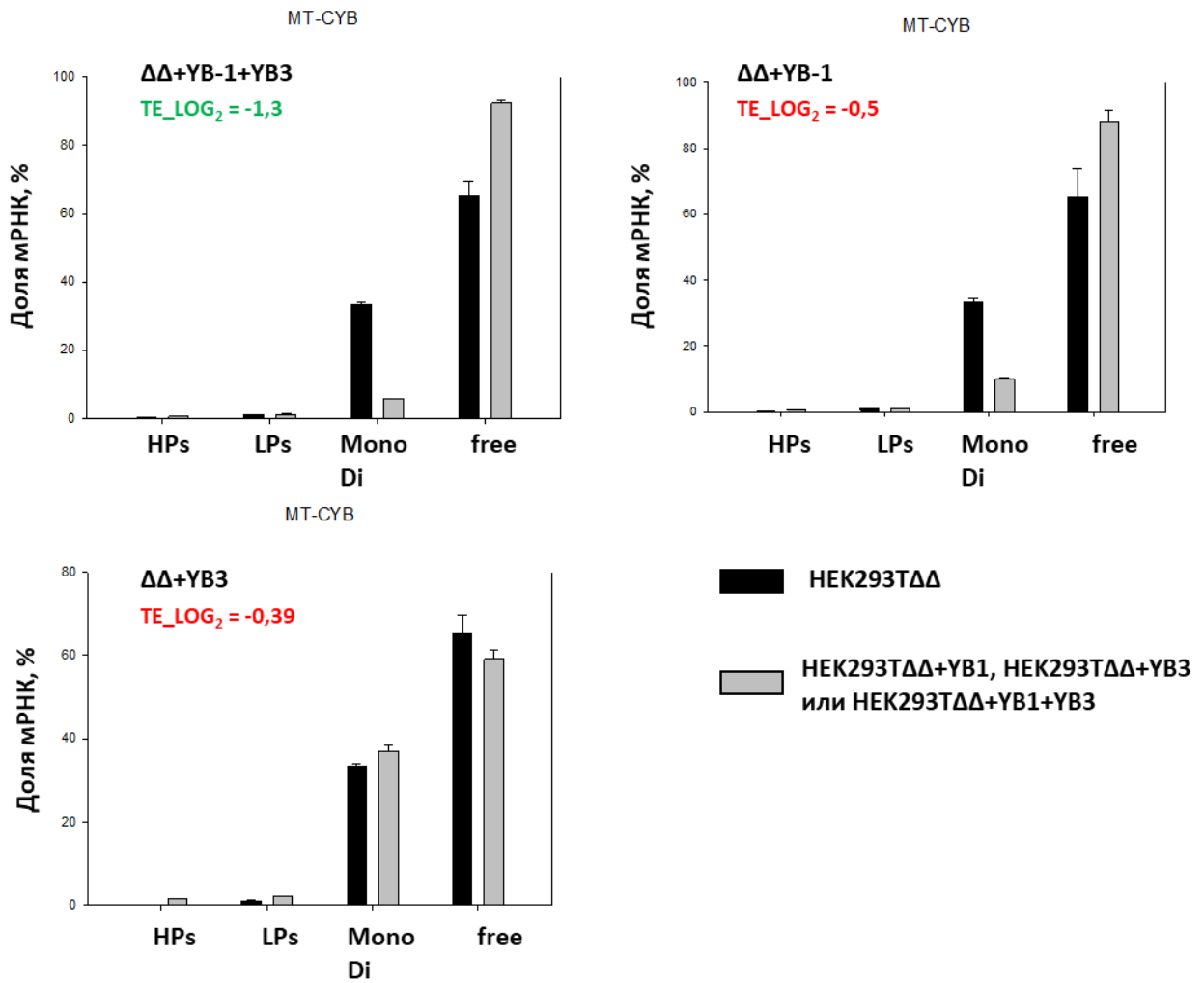


Рисунок 85 (продолжение).

## EIF5B

Длина мРНК (кодирующей области) = 5741 (3663) н

$TE_{LOG_2}$  = - статистически значимые изменения (RiboSeq)

$TE_{LOG_2}$  = - статистически не значимые изменения (RiboSeq)

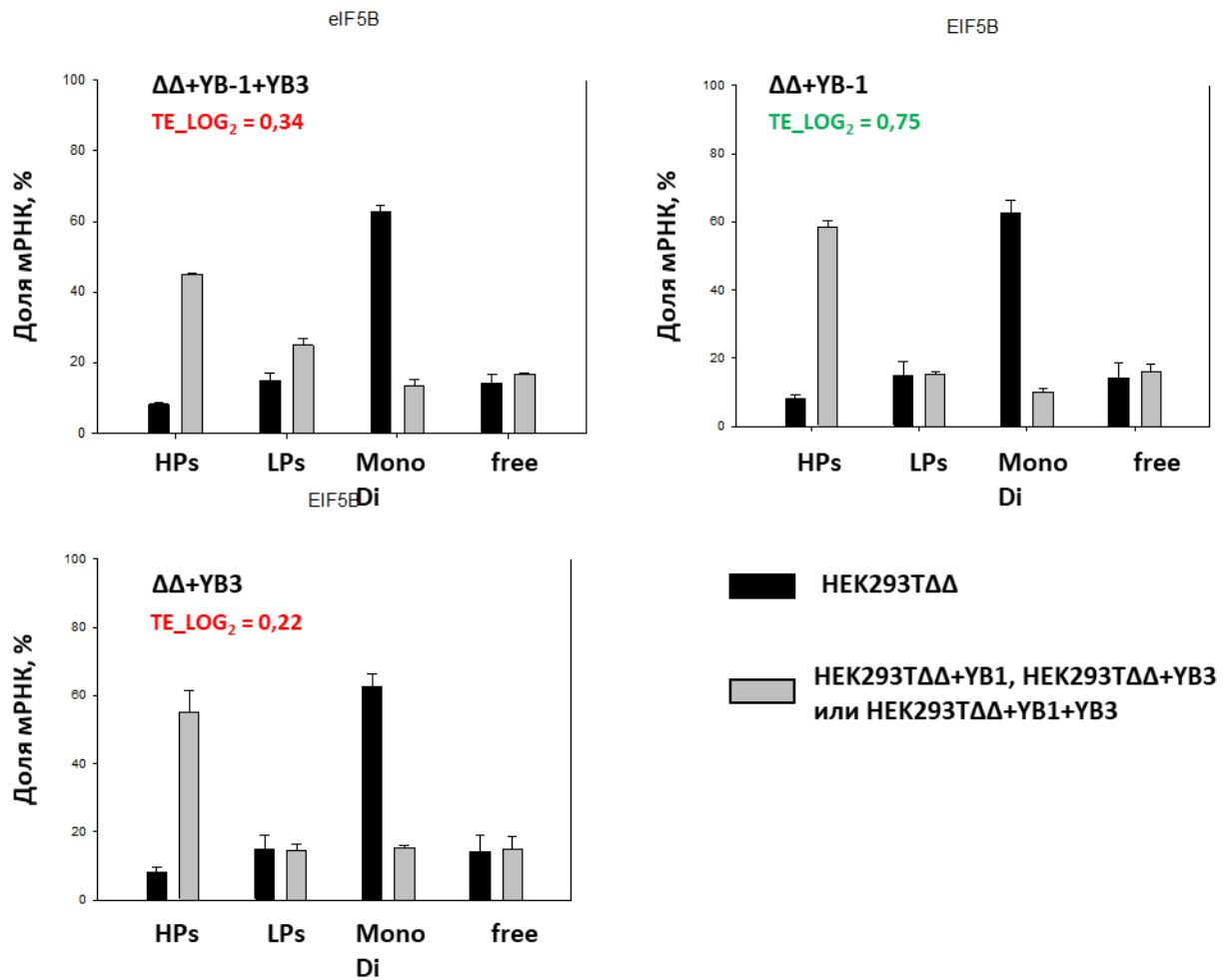


Рисунок 85 (продолжение).

## EVL

Длина мРНК (кодирующей области) = 1834 (1257) н

$TE_{LOG_2}$  = - статистически значимые изменения (RiboSeq)

$TE_{LOG_2}$  = - статистически не значимые изменения (RiboSeq)

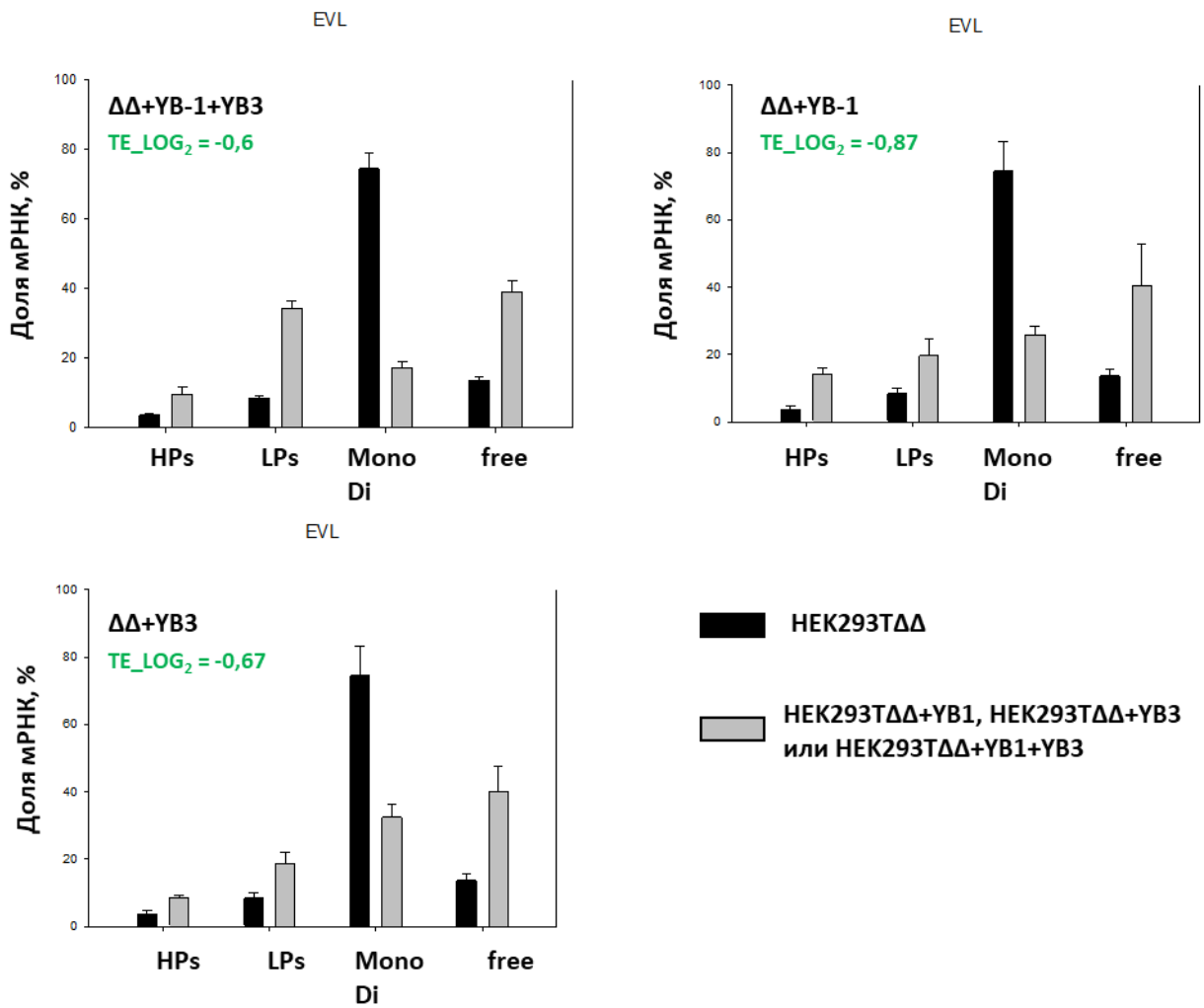


Рисунок 85 (продолжение).



## AGO4

Длина мРНК (кодирующей области) = 7272 (2586) н

$TE_{LOG_2} =$  - статистически значимые изменения (RiboSeq)

$TE_{LOG_2} =$  - статистически не значимые изменения (RiboSeq)

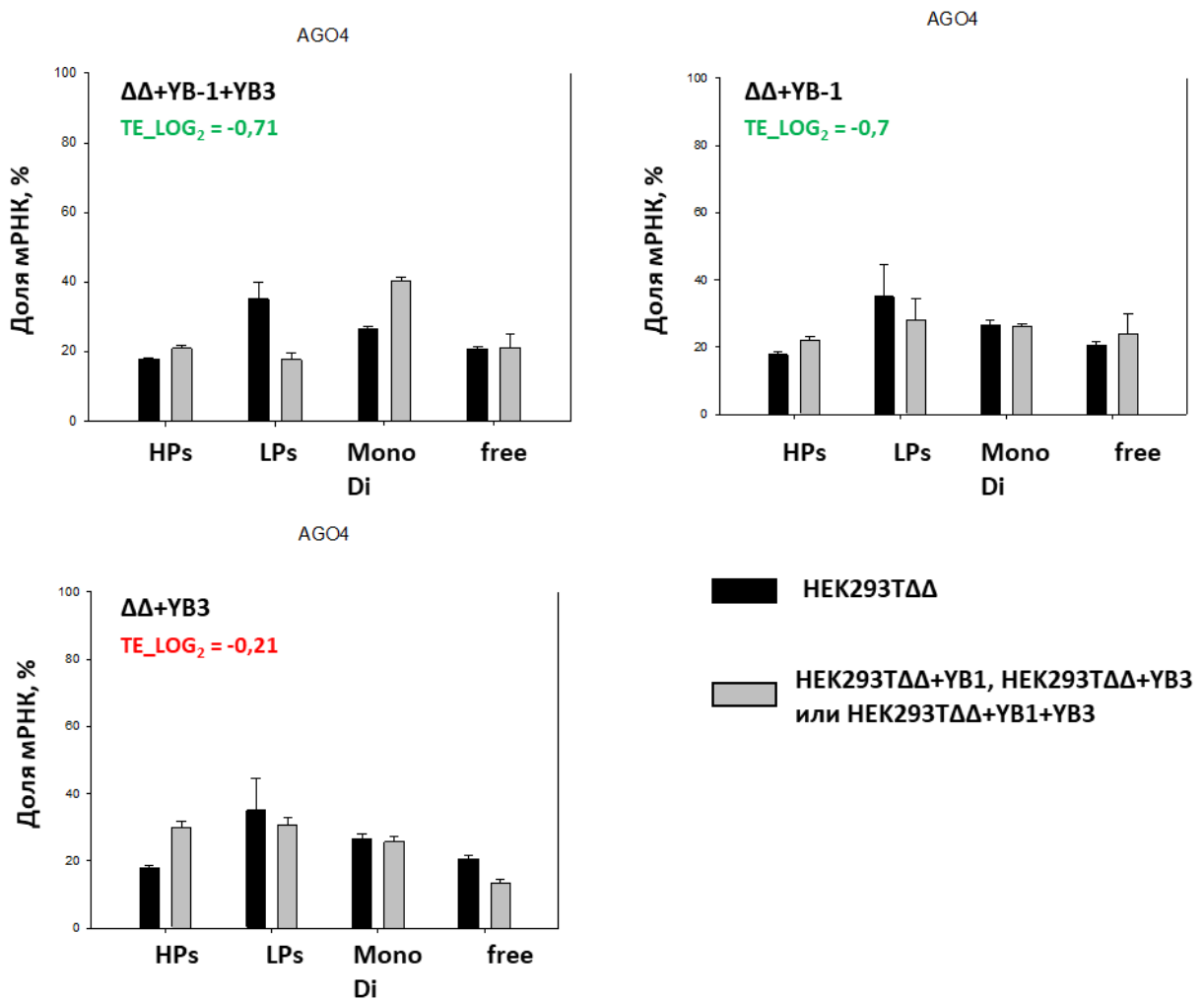


Рисунок 85 (продолжение).

## HOXB2

Длина мРНК (кодирующей области) = 1682 (1071) н

**TE<sub>LOG<sub>2</sub></sub> =** - статистически значимые изменения (RiboSeq)

**TE<sub>LOG<sub>2</sub></sub> =** - статистически не значимые изменения (RiboSeq)

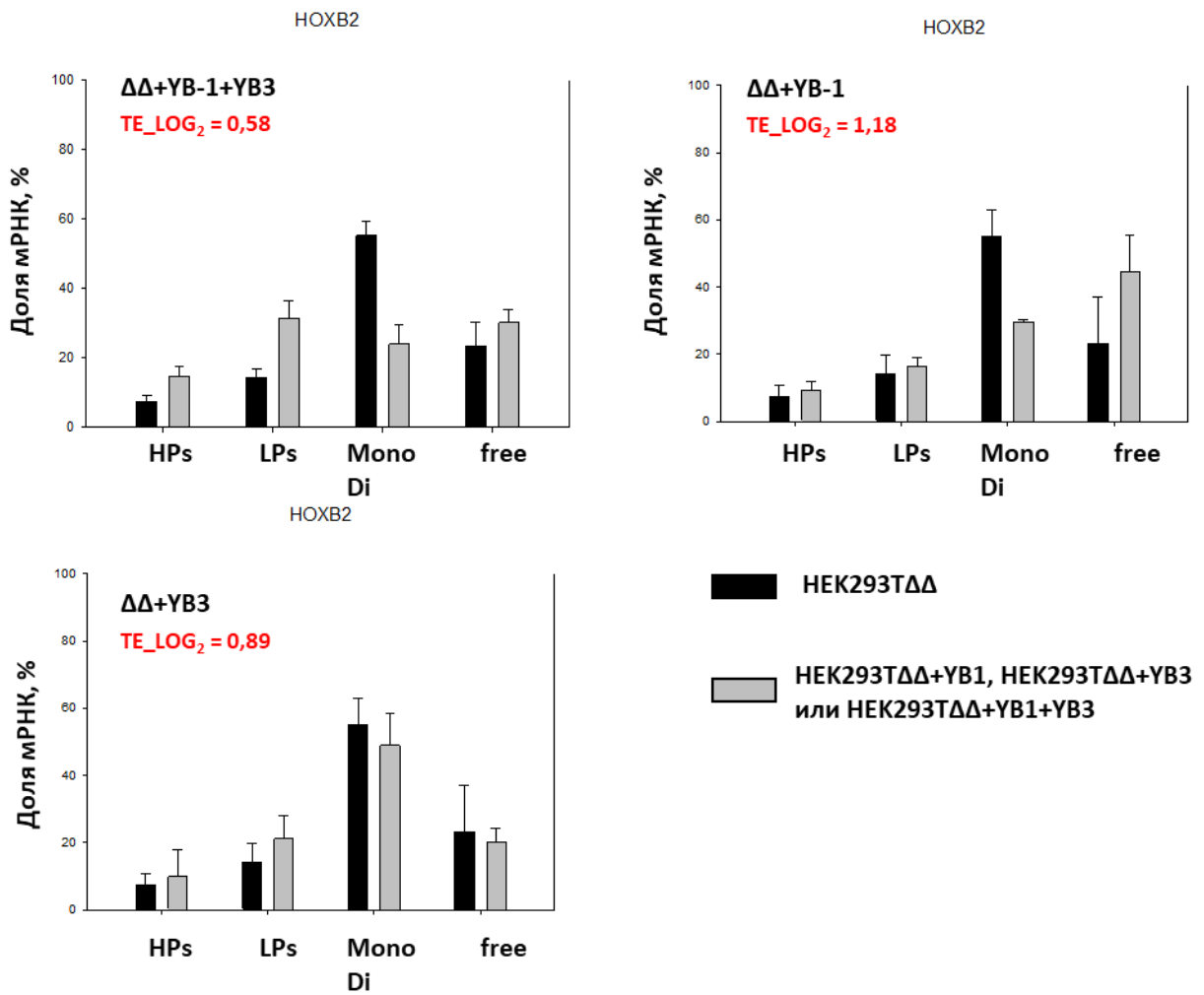


Рисунок 85 (продолжение).

## LYSMD4

Длина мРНК (кодирующей области) = 2770 (891) н

$TE_{LOG_2} =$  - статистически значимые изменения (RiboSeq)

$TE_{LOG_2} =$  - статистически не значимые изменения (RiboSeq)

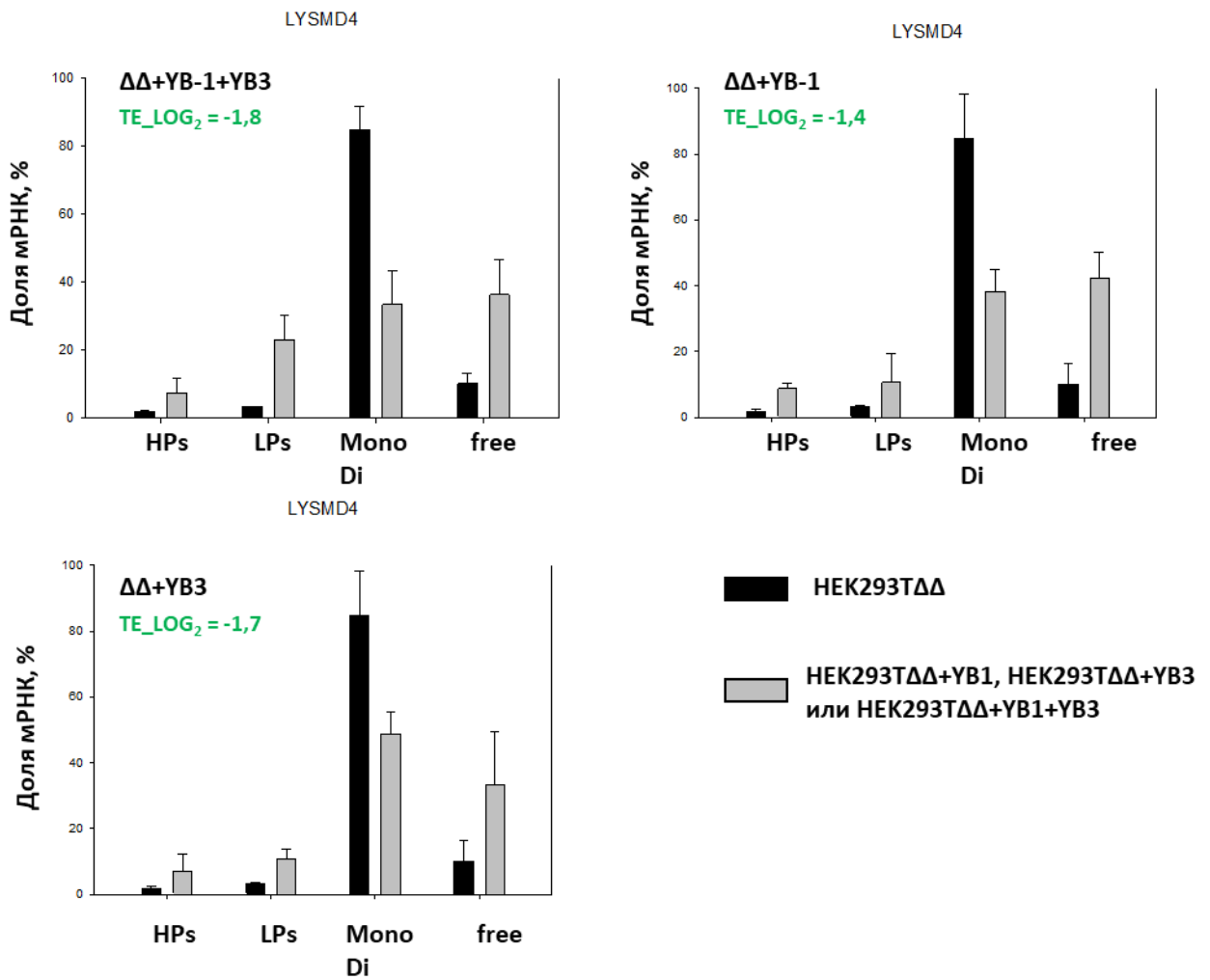


Рисунок 85 (продолжение).

**Таблица 3. Результаты сравнения данных анализа распределения мРНК в градиенте плотности сахарозы с данными RiboSeq.**

+ - изменения по RiboSeq соответствует данным анализа распределения мРНК в градиенте плотности сахарозы и статистически достоверны (21)

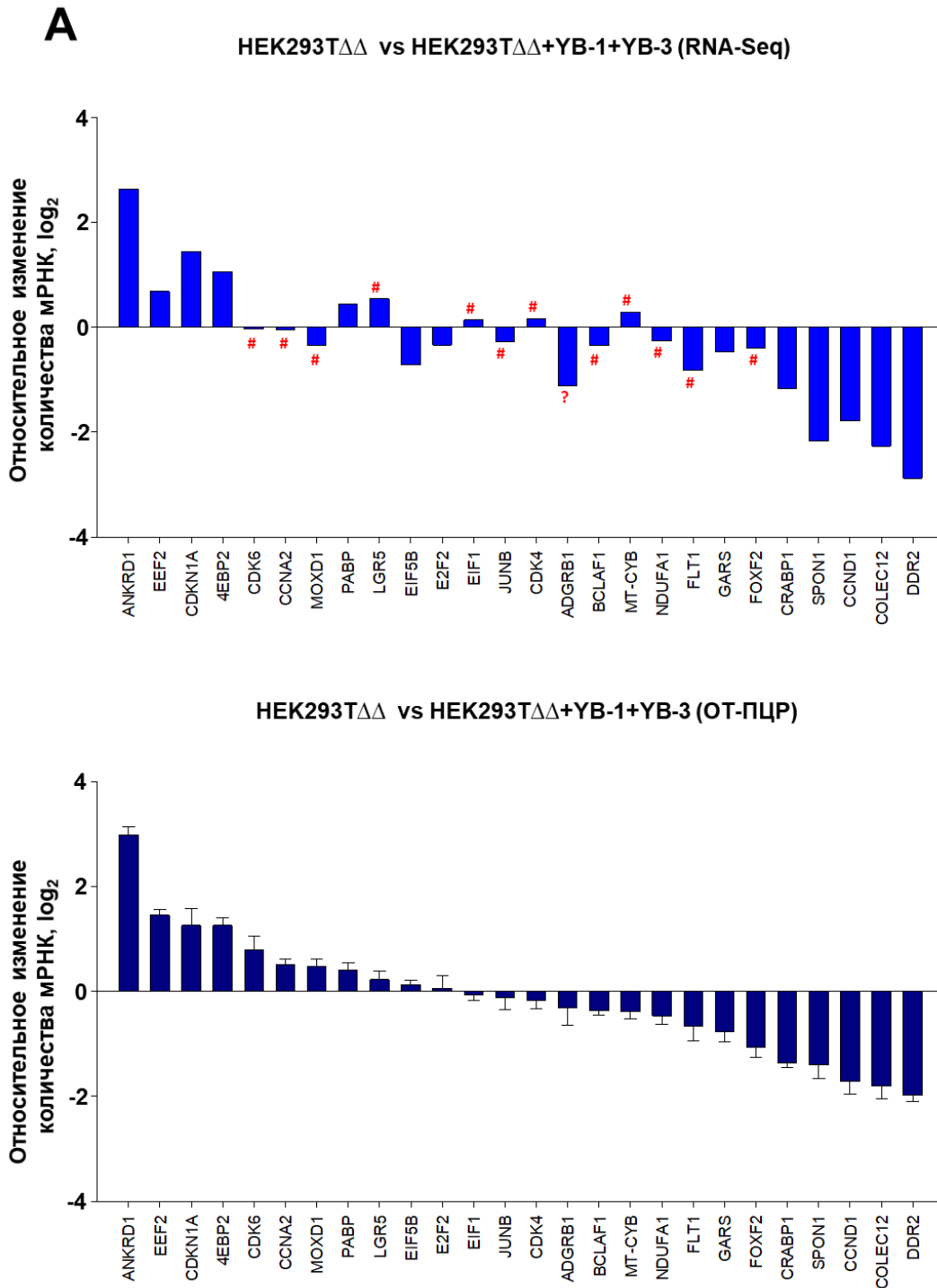
+? – изменения по RiboSeq соответствует данным анализа распределения мРНК в градиенте плотности сахарозы, но статистически не достоверны (10)

– - изменения по RiboSeq не соответствует данным анализа распределения мРНК в градиенте плотности сахарозы (5)

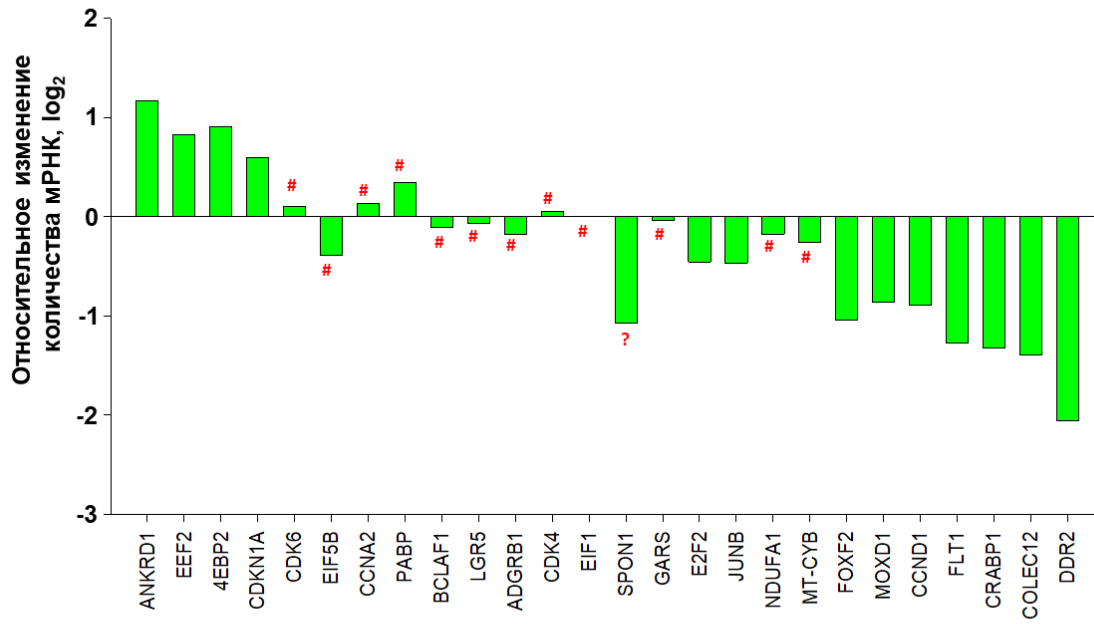
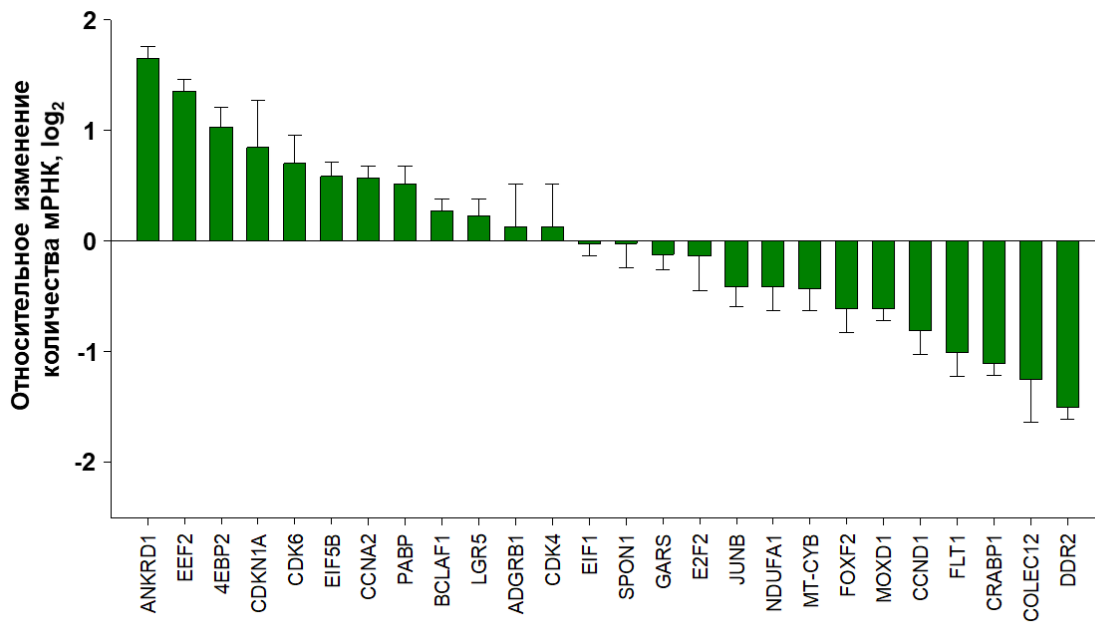
? – трудно интерпретировать данные градиента (6)

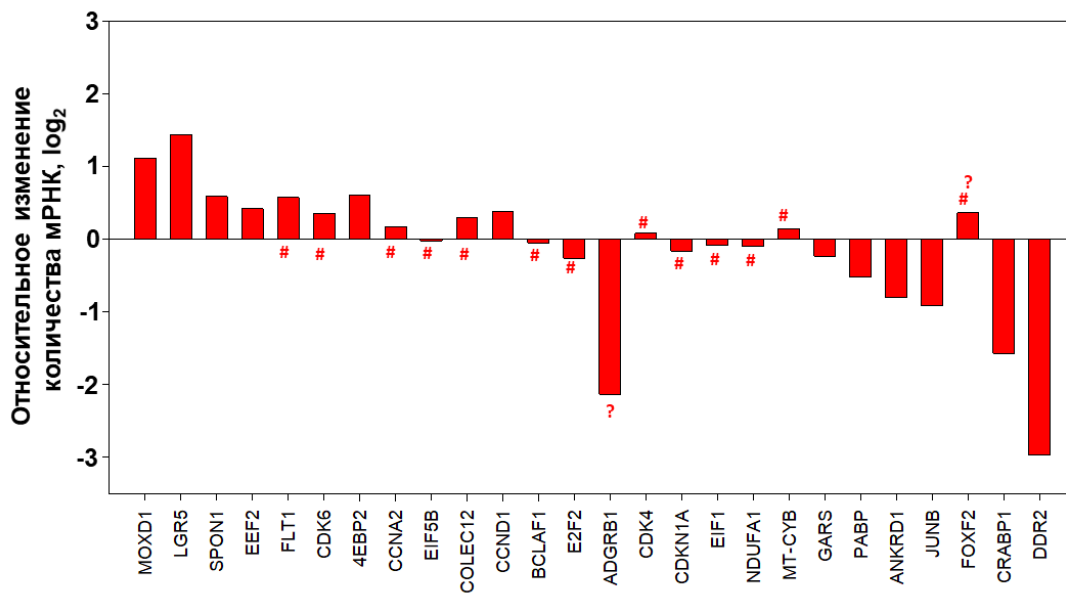
	+YB-1 +YB-3	+YB-1	+YB-3
RPS2	+	+	-
BCL2	+	+	+
ARGBN1	+?	+?	+
BCLF1	+?	+	+
FTL	+	+	+
OBSCN	+?	+?	+?
MT-CYB	+?	+	+
EIF5B	+	+?	+?
TOMM7	+	+	+
EVL	?	?	?
AGO4	-	-	+
HOXB2	+?	-	-
LYSMD4	?	?	?
CCNA2	+	+	+

Для верификации данных RNA-Seq была выделена тотальная РНК из 4 клеточных линий (НЕК293ТΔΔ, НЕК293ТΔΔ+УВ-1, НЕК293ТΔΔ+УВ-3 и НЕК293ТΔΔ+УВ-1+УВ-3). По 1 мкг выделенной тотальной РНК и 1 нг мРНК *люциферазы Fluc* (в качестве внутреннего контроля) было использовано в реакции обратной транскрипции. Далее полученная кДНК была использована для определения относительного количества нескольких избранных на основании анализа данных RNA-Seq мРНК методом ПЦР в реальном времени. Расчёт дифференциальной экспрессии мРНК проводили с помощью программы REST2009. В качестве референсных мРНК использовали мРНК *BTF3* и *TOMM7* (согласно RNA-Seq эти мРНК не показали изменений в количестве в любой линии по сравнению с линией НЕК293ТΔΔ) и мРНК *Fluc*. Как видно на рисунке 8б, данные qPCR (нижняя панель) хорошо соотносятся с данными RNA-Seq (верхняя панель). Необходимо отметить, что в случае некоторых мРНК, изменения количества были значительно больше согласно RNA-Seq, чем по qPCR. В частности, это наблюдается для мРНК *SPON1* в клетках НЕК293ТΔΔ+УВ-1 по сравнению с клетками НЕК293ТΔΔ, для мРНК *ADGRB1* в клетках НЕК293ТΔΔ+УВ-3 и НЕК293ТΔΔ+УВ-1+УВ-3 по сравнению с клетками НЕК293ТΔΔ и для мРНК *FOXF2* в клетках НЕК293ТΔΔ+УВ-3 по сравнению с клетками НЕК293ТΔΔ (в этом случае эффект даже противоположный). Однако же, в целом, можно говорить о достоверности данных, полученных методом RNA-Seq.



**Рисунок 86. Верификация данных RNA-Seq методом ОТ-ПЦР в реальном времени для клеток HEK293T $\Delta\Delta$ , HEK293T $\Delta\Delta$ +YB-1, HEK293T $\Delta\Delta$ +YB-3, HEK293T $\Delta\Delta$ +YB-1+YB-3. А. HEK293T $\Delta\Delta$ +YB-1+YB-3 по сравнению с HEK293T $\Delta\Delta$ ; Б. HEK293T $\Delta\Delta$ +YB-1 по сравнению с HEK293T $\Delta\Delta$ . В. HEK293T $\Delta\Delta$ +YB-3 по сравнению с HEK293T $\Delta\Delta$ . Верхняя панель – данные RNA-Seq (среднее из двух биологических повторностей). Нижняя панель – результаты ОТ-ПЦР в реальном времени (5 повторов, ошибки – стандартное отклонение, \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,005$ , # - недостоверно).**

**Б****HEK293T $\Delta\Delta$  vs HEK293T $\Delta\Delta$ +YB-1 (RNA-Seq)****HEK293T $\Delta\Delta$  vs HEK293T $\Delta\Delta$ +YB-1 (OT-ПЦР)**

**B****HEK293T $\Delta\Delta$  vs HEK293T $\Delta\Delta$ +YB-3 (RNA-Seq)****HEK293T $\Delta\Delta$  vs HEK293T $\Delta\Delta$ +YB-3 (OT-ПЦР)**