

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

На правах рукописи

Шестакова Екатерина Дмитриевна

**Роль eIF4G2 в регуляции кэп-зависимой трансляции
у человека**

Специальность 1.5.3. — «Молекулярная биология»

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

д. х. н. Шатский Иван Николаевич,
к. х. н. Теренин Илья Михайлович

Москва – 2024

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	8
Поставленные задачи	9
Научная новизна и практическая значимость работы	9
Положения, выносимые на защиту.....	10
Личный вклад соискателя.....	10
Степень достоверности и апробация результатов.....	11
Структура и объем диссертации	11
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1. Канонический механизм инициации трансляции у эукариот	12
2. Регуляция канонической инициации трансляции в клетках животных.....	17
3. Роль предшествующих открытых рамок считывания в 5'НТО	21
4. Неканонические механизмы инициации трансляции в эукариотических клетках.....	23
4.1. IRES-зависимая инициация трансляции у вирусов в клетках эукариот	23
4.2. Кэп-независимая инициация трансляции у цитоплазматических мРНК...26	
4.3. Инициация трансляции клеточных мРНК с участием СІТЕ	27
5. eIF4G2 как гомолог eIF4G1	27
6. Структура eIF4G2	29
7. Трансляция мРНК eIF4G2	31
8. Роль eIF4G2 в жизни клетки.....	33
8.1. Роль eIF4G2 в апоптозе	33
8.2. Роль eIF4G2 в клеточной дифференцировке	34
9. Участие eIF4G2 в трансляции некоторых мРНК.....	36
10. Взаимодействие eIF4G2 с факторами трансляции и другими белками	38
11. Предполагаемые механизмы участия eIF4G2 в инициации трансляции	41
11.1. eIF4G2 и кэп-независимая инициация трансляции	41
11.2 Неканонические механизмы кэп-зависимой инициации трансляции с участием eIF4G2	44
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	48
1. Валидация мРНК мишеней eIF4G2	48
2. Участие eIF4G2 в eIF4E/кэп-зависимой трансляции	50
2.1. Участие eIF4G2 в трансляции А-кэпированных мРНК	50
2.2. Роль eIF3d в трансляции eIF4G2-зависимых мРНК.....	52
3. uORF в 5'НТО как важный фактор зависимости трансляции от eIF4G2	55

4. Сканирование через транслируемую uORF может сделать дальнейшее движение рибосом eIF4G2-зависимым	60
5. Необходимость в eIF4G2 определяется последовательностями, окружающими uORF, а также свойствами самой uORF	64
6. eIF4G1 и eIF4G2 могут функционально замещать друг друга в процессе сканирования.....	70
7. Модель участия eIF4G2 в пропускающем сканировании	75
8. Роль eIF4G2 в сканировании 5'НТО эукариотической бицистронной мРНК POLG/POLGARF	78
8.1. eIF4G2 участвует в трансляции POLG и POLGARF	80
8.2. мРНК POLG/POLGARF транслируется eIF4E-зависимо	82
8.3. Роль uAUG и POLGARF стартовых кодонов в трансляции POLG	83
8.4. Наличие uORF вносит основной вклад в зависимость трансляции мРНК POLG/POLGARF от eIF4G2	87
8.5. Роль eIF4G2 в пропускающем сканировании и в реинициации на мРНК POLG/POLGARF	90
9. Роль eIF4G2 в пропускающем сканировании и в реинициации на мРНК Stard7, Maf1 и UCP2	98
10. Модель участия eIF4G2 в кэп-зависимой трансляции.....	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	104
ВЫВОДЫ	108
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	109
1. Получение молекулярно-генетических конструкций.....	109
2. Приготовление компетентных клеток.....	110
3. <i>In vitro</i> транскрипция	111
4. Транфекции siRNA и мРНК.....	112
5. siRNA.....	113
6. Вестерн-блоттинг	115
7. Статистический анализ	116
БЛАГОДАРНОСТИ	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	118
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	142
Приложение 1. Распределение GC-богатых областей в исследуемых 5'НТО мРНК ..	142
Приложение 2. 5'НТО исследуемых репортерных мРНК.....	146
Приложение 3. Олигонуклеотиды, использованные в работе	151

Список сокращений

- 293T – клеточная линия human embryonic kidney 293T
- 4E-ВР – eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein (или eIF4E-ВР) – eIF4E-связывающий белок
- 5MP – eIF5-mimic protein
- а. о. – аминокислотный остаток
- АТФ – аденозинтрифосфат
- ГТФ – гуанозинтрифосфат
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДСН – додецилсульфат натрия
- ДТТ – дитиотреитол
- дцРНК – двуцепочечная РНК
- кДНК – комплементарная ДНК
- мРНК – матричная (информационная) РНК
- Мет-тРНК_и^{Met} – инициаторная метионил-тРНК
- МЭСК – эмбриональные стволовые клетки мыши
- нт – нуклеотид(ы)
- НТО – нетранслируемая область
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- Трис – трис(гидроксиметил)аминометан
- тРНК – транспортная РНК
- ААG1 – Aging-associated protein 1 (альтернативное название DAP5, eIF4G2, NAT1)
- АКТ2 – RAC-beta serine/threonine-protein kinase – киназа, ответственная за поглощение глюкозы и дифференцировку скелетных мышц
- АРАF1 – apoptotic protease activating factor 1
- АТF4 – Activating transcription factor 4 – активирующий транскрипционный фактор 4
- АТF5 – Activating transcription factor 5 – активирующий транскрипционный фактор 5
- ВQCV – Black queen cell virus – вирус черного маточника
- САGE – cap analysis gene expression – кэп-анализ экспрессии генов
- ССN1 – cyclin I – циклин I
- CDK1 – cyclin-dependent kinase 1 – циклин-зависимая киназа 1
- СDС – coding sequence – основная открытой рамки считывания – кодирующая область

CITE – cap-independent translation enhancer – энхансер кэп-независимой инициации трансляции

CFTR – Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator – Регулятор трансмембранной проводимости при муковисцидозе

CrPV – Cricket paralysis virus – вирус паралича сверчка

DAP5 – death-associated protein 5

DMEM – Dulbecco's modified Eagle medium

ECL – enhanced chemiluminescence – усиленная хемилюминесценция

eIF – eukaryotic initiation factor – эукариотический фактор инициации

EMCV – encephalomyocarditis virus – вирус энцефаломиокардита

EST – expressed sequence tags – экспрессирующиеся маркерные Последовательности

EPAS1 – Endothelial PAS domain-containing protein 1 – hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2 α)

Fluc – firefly luciferase – люцифераза светлячка

FMDV – foot-and-mouth disease virus – вируса ящура

FMR1 – Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1

FXR – Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1

GAPDH – glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

GCN4 – General control transcription factor – ортолог ATF4 у дрожжей

GWIPS-viz – геномный браузер для визуализации данных рибосомного профайлинга

HCV – hepatitis C virus – вирус гепатита С

HEAT-домен – структурный домен, названный в честь следующих белков: хангтинтина (Huntingtin), фактора элонгации 3 (EF3), фосфатазы 2A (PP2A) и дрожжевой киназы TOR1

HERC1 – Probable E3 ubiquitin-protein ligase

HEPES – (2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid

HIV1 – human immunodeficiency virus 1 – вирус иммунодефицита человека первого типа

hnRNPK – heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K

HRI – Heme-regulated eIF2 α kinase – киназа 1 eIF2 α (EIF2AK1)

HSPA2 – Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 2

Huh7 – линия клеток печени человека (гепатокарцинома)

IFRD1 – Interferon-related developmental regulator 1 – регулятор развития 1, связывающий интерферон

IRES – Internal Ribosome Entry Site – участок внутренней посадки рибосомы

IQR – Interquartile range – интерквартильный размах
m⁷G-кэп – 7-метилгуанозиновый кэп мРНК
Maf1 – repressor of RNA polymerase III transcription MAF1 homolog
Map3k3 – mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3 – митоген-активируемая киназа киназы киназы 3
MDM2 – E3 ubiquitin-protein ligase Mouse double minute 2 (протоонкоген MDM2)
МЕК – Mitogen-activated protein kinase kinase (МАРК2) – митоген-активируемая киназа киназы белков
MNK1 – MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 1
mTOR – mammalian target of rapamycin – мишень рапамицина млекопитающих
MYC – c-MYC протоонкоген, bHLH transcription factor – транскрипционный фактор c-MYC
MYCBP2 – MYC binding protein 2 – MYC-связывающий белок 2
NAT1 – Novel APOBEC1 Target 1
Nluc – NanoLuc® – Nanoluciferase – нанолуцифераза® (Promega)
ORF – open reading frame – открытая рамка считывания
РАВР – poly(A)-binding protein – поли(А)-связывающий белок
РАИР1 – Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1 – изоформа 1 белка, взаимодействующего с РАВР
РАК1 – p21-activated kinase – киназа, активируемая белком p21
PARN – Poly(A)-specific ribonuclease – деаденилаза
PBS – phosphate buffered saline – натрий-фосфатный буфер с рН 7.4
PCBP1 – poly(rC)-binding protein 1 – поли(С)-связывающий белок 1
PCBP2 – poly(rC)-binding protein 2 – поли(С)-связывающий белок 2
P_i – неорганический фосфат (ортофосфат)
PHD2 – prolyl hydroxylase domain-containing protein 2 – Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 2 (HIF-PH2) – Egl nine homolog 1(EGLN1)
PKR – Protein kinase RNA-activated – protein kinase R (PKR) – interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase – киназа 2 eIF2 α (EIF2AK2)
POLG – DNA polymerase subunit gamma – ДНК-полимераза гамма (γ)
POLGARF – POLG Alternative Reading Frame
PP242 – torkinib – торкиниб – ингибитор mTOR
PPFIA4 – Liprin-alpha-4 – PTPRF interacting protein alpha 4
PRRC2A-C – Proline Rich Coiled-Coil 2A-C
PTV – porcine teschovirus – тешовирус А свиней
PV – poliovirus – полиовирус

RDG – ribosome decision graph – граф принятия решений рибосомами

RNA – ribonucleic acid – рибонуклеиновая кислота

RKO – линия клеток карциномы прямой кишки человека

siRNA – small interfering RNA – малая интерферирующая РНК

SARS-CoV2 – severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2

SMAD1 – Transforming Growth Factor-Beta Signaling Protein 1 – переносчик сигнала от рецептора TGF β

SOB – среда Super Optimal Broth

Stard7 – StAR-related lipid transfer domain protein 7 – переносчик фосфатидилхолина между слоями мембраны

TBDMS – tert-butyldimethylsilyl ether – трет-бутилдиметилсилиловый эфир

TBST – Tween-20 Tris-buffered saline

TGF β 1 – Transforming growth factor beta 1 – трансформирующий ростовой фактор бета-1

TNF α – tumor necrosis factor α – фактор некроза опухоли α

TP53 – tumor protein p53

TUBA1B – Tubulin Alpha 1b – изоформа 1b α -тубулина

UCP2 – Mitochondrial uncoupling protein 2 – митохондриальный разобщающий белок 2

uAUG – upstream AUG – AUG кодон, расположенный внутри 5'-НТО и предшествующий основному стартовому кодону

uORF – upstream open reading frame – открытая рамка считывания, расположенная внутри 5'-НТО и предшествующая основной

VPg – viral protein genome-linked

WT – wild-type – дикий тип

Введение

Регуляция экспрессии генов на посттранскрипционном уровне позволяет клетке быстро регулировать активности многих белков не только за счет их посттрансляционных модификаций и/или деградации, но и посредством регуляции трансляции и/или стабильности соответствующих мРНК.

Контроль экспрессии генов на трансляционном уровне, как правило, происходит на стадии инициации. Для большинства цитоплазматических мРНК эукариот – если не для всех них – характерен кэп-зависимый способ инициации трансляции, при котором мРНК “активируются” посредством взаимодействия с эукариотическим фактором инициации трансляции (*eIF*, *eukaryotic initiation factor*) eIF4F. eIF4F состоит из кэп-связывающего белка eIF4E, РНК-хеликазы eIF4A и eIF4G1, выполняющего “каркасную” функцию. В составе eIF4F комплекса eIF4G1 может быть заменен гомологичным ему фактором eIF4G3, однако гораздо менее представленным в клетке.

В 1997 году у высших эукариот был открыт другой гомолог eIF4G1, известный сейчас как эукариотический фактор инициации трансляции 4G2 (eIF4G2, p97, NAT1, AAG1). eIF4G2 гомологичен С-концевой части eIF4G1 и тоже имеет участки связывания eIF4A и eIF3, но не способен связывать РАВР и eIF4E.

Ген *eIF4G2* критически важен для высших эукариот: эмбрионы мышей с нокаутом *eIF4G2* нежизнеспособны, поскольку в них не происходит гастрюляция. Также описаны роли eIF4G2 в апоптозе и дифференцировке. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе наблюдаемых эффектов на сегодняшний день изучены плохо и недостаточно подробно.

За последние два десятилетия было опубликовано множество работ, содержащих противоречивые сведения о роли eIF4G2 в различных организмах. С самого момента его идентификации исследователи предполагали, что eIF4G2 участвует в неканонических механизмах инициации трансляции, поскольку белок не способен связывать eIF4E, и, как казалось, не может из-за этого участвовать в обычной кэп-зависимой трансляции. Большая часть опубликованных по этой теме работ была посвящена изучению роли eIF4G2 во внутренней инициации трансляции на клеточных мРНК. Впоследствии оказалось, что распространенные в то время методы изучения IRES-элементов ненадежны и приводят к артефактам; примерно в то же время появились свидетельства вовлечения eIF4G2 в кэп-зависимую инициацию трансляции. В результате было предложено несколько возможных механизмов работы eIF4G2, различающихся тем, какой белок ответственен за связывание с кэпом мРНК и за привлечение eIF4G2: деаденилаза PARN или eIF3d.

К настоящему времени с помощью рибосомного профайлинга идентифицировано множество мРНК, трансляция которых зависит от eIF4G2, причем часть этих результатов была затем подтверждена с помощью репортерных мРНК. Все выявленные мРНК-мишени транслировались кэп-зависимо. Среди них много генов, вовлеченных в дифференцировку, апоптоз и регуляцию метаболической активности клетки. Неясно, однако, почему трансляция одних мРНК требует eIF4G2, а других нет. Целью данной работы являлось изучение роли белка eIF4G2 в кэп-зависимой инициации трансляции в клетках человека и установление механизма, лежащего в основе зависимости трансляции от eIF4G2.

Поставленные задачи

1. Верификация некоторых потенциальных мРНК-мишеней методом РНК-трансфекции репортерных конструкций, содержащих исследуемые 5'НТО.
2. Изучение роли eIF4G2 в кэп-зависимой трансляции.
3. Изучение детерминант зависимости трансляции от eIF4G2.
4. Изучение взаимодействия eIF4G1 и eIF4G2 в инициации трансляции.

Научная новизна и практическая значимость работы

В настоящей работе с помощью метода РНК-трансфекции верифицированы новые мРНК-мишени eIF4G2. Показано, что на этих мРНК eIF4G2 участвует в канонической кэп-зависимой трансляции, в которой роль кэп-связывающего белка выполняет именно eIF4E, а не eIF3d.

Впервые выявлены факторы, определяющие зависимость трансляции некоторых мРНК от eIF4G2. Обнаружено, что во многих случаях наличие в 5'НТО предшествующих открытых рамок считывания (*uORFs*, *upstream open reading frames*) делает трансляцию мРНК eIF4G2-зависимой.

Подробно изучен фундаментальный механизм, благодаря которому наличие uORF приводит к потребности трансляции в eIF4G2. Чтобы добраться до основного стартового кодона в этом случае, сканирующий комплекс должен либо пропустить стартовый кодон uORF (пропускающее сканирование, *leaky scanning*), либо возобновить сканирование после ее трансляции (реинициация). Нами убедительно продемонстрировано, что пропускающее сканирование и реинициация не являются взаимоисключающими и происходят на одной мРНК с разным вкладом каждого механизма. Нами охарактеризована роль eIF4G2 в канонической кэп-зависимой трансляции: показано, что eIF4G2 может способствовать и пропускающему сканированию, и реинициации на одной и той же мРНК.

В настоящей работе подробно исследована инициация трансляции уникальной бицистронной мРНК POLG/POLGARF человека, кодирующей каталитическую субъединицу митохондриальной ДНК-полимеразы и функциональный пептид POLGARF. В результате нами показано, как в случае этой мРНК наличие uORF, инициация трансляции рамки POLGARF с эффективного за счет примыкающей шпильки стартового кодона CUG (но не AUG) и трансляция с участием eIF4G2 обеспечивают физиологически адекватный уровень синтеза обоих белков POLG и POLGARF в условиях кэп-зависимой трансляции.

Таким образом, результаты исследования значительно дополняют наши знания о механизме регуляции трансляции при участии eIF4G2. Полученные в ходе исследования результаты могут иметь важное значение для понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе многих патологических процессов или нарушений клеточной дифференцировки при эмбриогенезе.

Положения, выносимые на защиту

1. В исследованных случаях eIF4G2 участвует в кэп-зависимой трансляции, в которой роль кэп-связывающего белка выполняет eIF4E, а не eIF3d, как предполагалось ранее.
2. Зависимость трансляции мРНК AKT2, SMAD1, MYCBP2, PHD2, UCP2 и POLG/POLGARF от eIF4G2 определяется их 5'НТО.
3. Наличие предшествующей открытой рамки считывания (*upstream ORF*, *uORF*) в 5'НТО является важнейшим фактором, определяющим зависимость трансляции мРНК от eIF4G2.
4. eIF4G2 участвует как в пропускающем сканировании, так и в реинициации при трансляции мРНК Maf1, Stard7, UCP2 и POLG/POLGARF.
5. Наличие uORF, инициация трансляции POLGARF с эффективного из-за примыкающей шпильки стартового кодона CUG (но не AUG) и трансляция с участием eIF4G2 обеспечивают физиологически адекватный уровень синтеза обоих белков POLG и POLGARF с природной бицистронной мРНК.

Личный вклад соискателя

Личный вклад автора состоит в анализе литературы, планировании и проведении большинства экспериментов, обработке и анализе полученных данных и подготовке публикаций. Основные результаты, представленные в данной работе, получены самим автором. Илья Михайлович Теренин, Виктория Владимировна Смирнова, Полина Андреевна Мищенко и Роман Сергеевич Тумбинский участвовали в изготовлении

некоторых генетических конструкций и выполняли отдельные повторности некоторых трансфекций. Клетки RKO с нокаутом *eIF4G3* получены ранее В.В. Смирновой. Тимофей Сергеевич Зацепин и Татьяна Александровна Приказчикова осуществляли подбор последовательностей и синтез siRNA, а также получали готовые липосомные частицы с siRNA. Репортерные конструкции с 5'НТО POLG и POLGARF дикого типа были предоставлены Дмитрием Евгеньевичем Андреевым.

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты работы получены современными общепризнанными методами исследования регуляции трансляции и на современном оборудовании. Эксперименты проведены со всеми необходимыми контролями, с большим количеством биологических повторностей. Результаты статистически достоверны и воспроизводимы. Результаты, полученные на двух разных клеточных линиях человека с использованием двух разных siRNA против eIF4G2, согласуются друг с другом.

Основные положения и выводы работы изложены в 4 статьях в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных WoS, Scopus, RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.3 – «молекулярная биология». Результаты работы прошли апробацию на заседании отдела химии и биохимии нуклеопротеидов НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова и на заседании ученого совета факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова по результатам защиты научно-квалификационной работы по окончании аспирантуры.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 160 страницах и включает следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Результаты и их обсуждение, Заключение, Выводы, Материалы и методы, Список литературы, Приложения. Диссертация содержит 45 рисунков и 3 таблицы. Библиография включает 283 литературных источника.

Обзор литературы

1. Канонический механизм инициации трансляции у эукариот

С момента открытия эукариотического фактора инициации трансляции eIF4G2 (*eukaryotic initiation factor 4G2*) было очевидно, что этот белок должен участвовать в специфических механизмах инициации трансляции, поскольку он лишь частично гомологичен фактору инициации eIF4G1, играющему важнейшую роль в каноническом пути инициации трансляции. В этой связи имеет смысл сначала вспомнить, как происходит инициация трансляции для большинства эукариотических мРНК, обсудить предложенные альтернативные механизмы инициации и только потом перейти к современным представлениям о функциях eIF4G2.

Основными принципами канонического механизма инициации трансляции у эукариот являются привлечение малой рибосомной субъединицы к 5'-концу мРНК и дальнейшее последовательное движение рибосом вдоль 5' нетранслируемой области (5'НТО) в направлении 3'-конца в поисках стартового кодона (процесс сканирования) (рис. 1, 6А). После распознавания стартового кодона происходит присоединение большой субъединицы рибосомы и начинается непосредственно синтез полипептидной цепи (элонгация трансляции). Все цитоплазматические мРНК эукариот имеют на своем 5'-конце модифицированный нуклеотид (5'-кэп) — 7-метилгуанозин (m^7G), соединенный 5',5'-трифосфатной связью с первым нуклеотидом. Метилирование также характерно для 2'-ОН групп рибоз первых двух нуклеотидных остатков мРНК. Рибосома рекрутируется на 5'-конец мРНК благодаря способности фактора инициации eIF4F связываться одновременно с m^7G -кэпом и с 43S предынициаторным комплексом, состоящим, в свою очередь, из 40S малой рибосомной субъединицы и некоторых других факторов инициации (см. недавние обзоры [Hinnebusch, 2014; Hinnebusch et al., 2016; Jackson et al., 2010; Shirokikh et al., 2018]).

Гетеротримерный комплекс eIF4F состоит из кэп-связывающего белка eIF4E, хеликазы eIF4A и каркасного белка eIF4G1, который также стимулирует хеликазную активность eIF4A [Grifo et al., 1982; Grifo et al., 1983]. eIF4G1 взаимодействует с eIF3, образованным у млекопитающих 13 различными полипептидами (субъединицы eIF3a-m) [Hinnebusch, 2006]. eIF3 в свою очередь связывается с 40S рибосомой, образуя 43S сканирующий комплекс, в который также входят eIF1, eIF1A, тройственный комплекс и, возможно, eIF5. Тройственный комплекс, состоящий из eIF2, инициаторной метионил-тРНК (Met-тРНК_и^{Met}) и ГТФ, обеспечивает доставку Met-тРНК_и^{Met} в Р-сайт рибосомы [Asano et al., 2001; Sokabe et al., 2012].

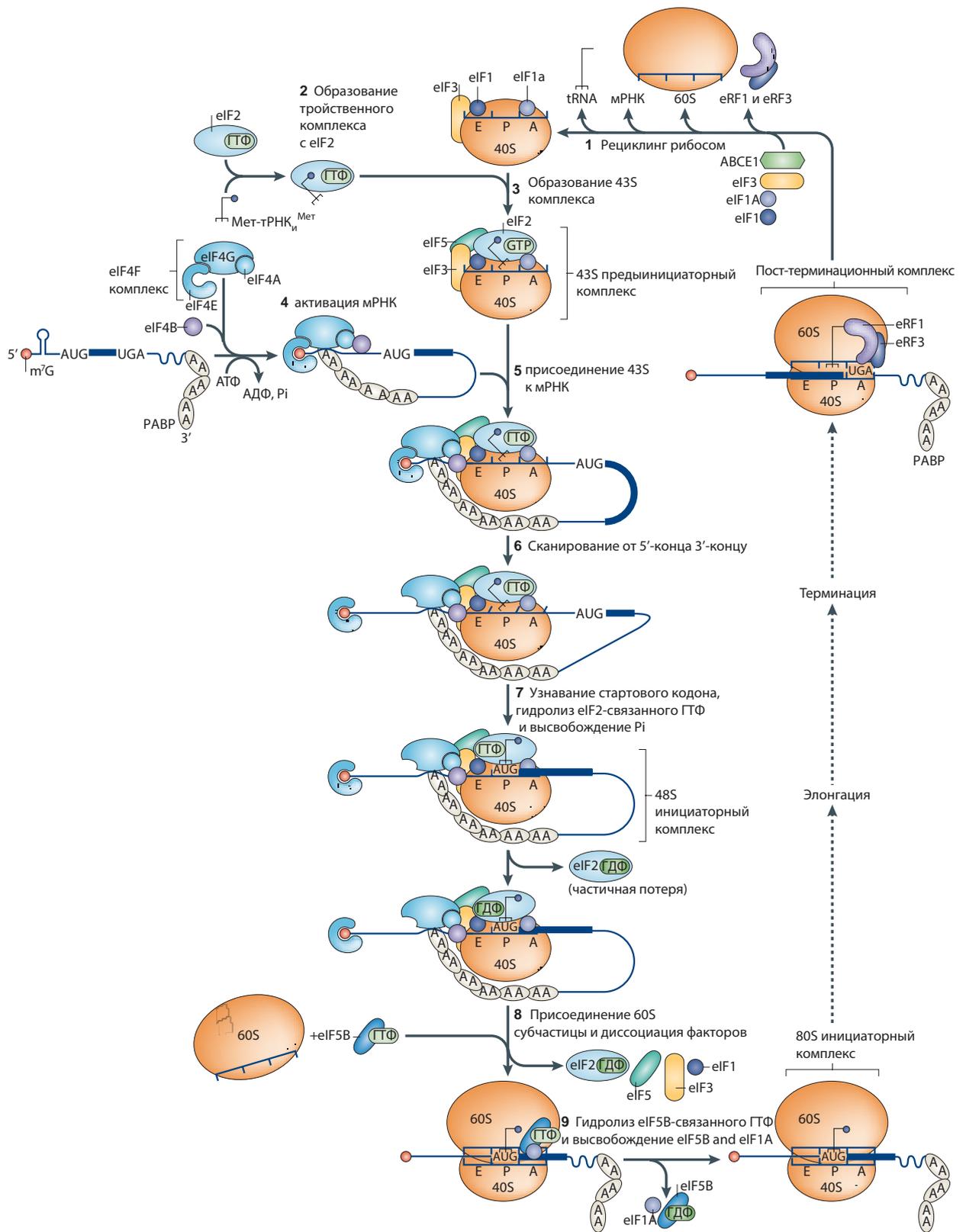


Рисунок 1. Модель канонического пути инициации трансляции у эукариот. Канонический путь инициации у эукариот представляет из себя восемь этапов (2-9), следующих за рециклингом посттерминационных комплексов (этап 1). Этими этапами являются: образование тройственного комплекса (eIF2)-ГТФ-Мет-тРНК^{Met} (этап 2); образование 43S предынициаторного комплекса, состоящего из 40S субъединицы рибосомы, eIF1, eIF1A, eIF3, тройственного комплекса и, возможно, eIF5 (этап 3); активация мРНК, во время которой 5'-концевая область мРНК расплетается

АТФ-зависимым образом под действием eIF4F с eIF4B (этап 4); присоединение 43S комплекса к этой области мРНК (этап 5); сканирование 43S комплексом 5'НТО в направлении от 5' к 3' (этап 6); распознавание стартового кодона и образование 48S инициаторного комплекса, который переходит в «закрытую» конформацию, в результате чего eIF1 смещается, обеспечивая eIF5-опосредованный гидролиз eIF2-связанного ГТФ и высвобождение P_i (этап 7); присоединение 60S субъединицы к 48S комплексу и сопутствующее вытеснение eIF2-ГДФ и других факторов (eIF1, eIF3, eIF4B, eIF4F и eIF5), опосредованное eIF5B (этап 8); гидролиз eIF5B-связанного ГТФ, высвобождение eIF1A и высвобождение eIF5B-ГДФ из собранных элонгационно-компетентных 80S рибосом (этап 9). В 80S инициаторном комплексе Met-тРНК_и^{Met} взаимодействует со стартовым кодоном в Р-сайте рибосомы. 80S рибосомы обеспечивают элонгацию, после терминации трансляции происходит разборка терминационных комплексов и высвобождение малых и больших субчастиц рибосомы в процессе рециклинга (этап 1). В изображенной модели не учитываются потенциальные взаимодействия замкнутой петли с участием поли(А)-связывающего белка (РАВР), эукариотического фактора высвобождения 3 (eRF3) и eIF4F во время рециклинга, а также не показан рециклинг eIF2-ГДФ с помощью eIF2B. Присутствует ли eRF3 на рибосомах на стадии рециклинга неизвестно. Заимствовано из [Mortensen et al., 2011; Vasudevan et al., 2007].

Таким образом, 40S субчастица рибосомы привлекается к 5'-концу мРНК через цепочку белок-белковых взаимодействий. Для последующего сканирования рибосоме требуется АТФ-зависимая активность хеликаз (eIF4A и, возможно, других), которые расплетают элементы вторичной структуры 5'НТО перед сканирующими комплексами [Heerma van Voss et al., 2017; Pestova et al., 2002; Shen et al., 2020]. Хеликазную активность eIF4A усиливают также eIF4B и eIF4H [Dmitriev et al., 2003; Ray et al., 1985; Richter et al., 1999; Richter-Cook et al., 1998; Rogers et al., 2001; Rogers et al., 1999; Rozen et al., 1990].

eIF1 и eIF1A поддерживают так называемую открытую конформацию рибосомного комплекса, необходимую для сканирования, а также влияют на распознавание стартового кодона, которое обеспечивается постоянной проверкой комплементарности сканируемой последовательности мРНК антикодону Met-тРНК_и^{Met}. Для большей вероятности его распознавания стартовый кодон должен находиться в соответствующем нуклеотидном контексте. Двумя наиболее важными нуклеотидами для узнавания потенциального стартового кодона являются пуриновые нуклеотиды в положениях -3 и +4. Для позвоночных контекст 5'-gccRccAUGG-3' (где R – пуриновый нуклеотид), обеспечивающий высокоэффективную инициацию трансляции, был найден Мэрилин Козак, и впоследствии был назван Козаковским контекстом [Kozak, 1987b]. Дальнейшие скрининги с помощью высокопроизводительного секвенирования подтвердили эффективную инициацию на мРНК с Козаковскими контекстами, но также обнаружили и другие не менее эффективные контексты, в том числе для стартовых кодонов, отличных от AUG [Diaz de Arce et al., 2018; Noderer et al., 2014]. Такие контексты принято называть «сильными». Взаимодействие факторов eIF2, eIF1, eIF1A и eIF5 обеспечивает корректное

распознавание стартового кодона: eIF1 дестабилизирует неоптимальные кодон-антикодоновые взаимодействия, тем самым способствуя правильному распознаванию, а eIF5 активирует ГТФазную активность eIF2 после распознавания стартового кодона. Именно высвобождение неорганического фосфата (P_i) из eIF2 делает гидролиз ГТФ необратимым и тем самым является критической стадией контроля для узнавания стартового кодона [Algire et al., 2005; Nanda et al., 2013].

Успешное распознавание стартового кодона приводит к образованию 48S инициаторного комплекса, конформационной перестройке Met-тРНК^{Met} и высвобождению eIF1 [Cheung et al., 2007; Llácer et al., 2018; Luna et al., 2013]. Это позволяет eIF5 завершить процесс гидролиза связанной с eIF2 молекулы ГТФ, то есть привести к высвобождению неорганического фосфата, что делает узнавание инициаторного кодона практически необратимым [Cheung et al., 2007; Nanda et al., 2013; Singh et al., 2012]. Цепь взаимодействий eIF1A-eIF5B-Met-тРНК^{Met} гарантирует, что инициаторные комплексы компетентны для присоединения большой субъединицы рибосомы. Присоединение 60S субчастицы запускает гидролиз связанного с eIF5B ГТФ, в процессе этого остальные инициаторные факторы диссоциируют, и начинается стадия элонгации синтеза полипептида [Pestova et al., 2000; Unbehau et al., 2004].

Динамика взаимодействия факторов инициации с рибосомой изучена довольно неплохо за одним важным исключением. До сих пор не совсем ясно, как долго eIF4F остается связанным с m⁷G-кэпом во время сканирования мРНК рибосомным комплексом. В случае длинных 5'НТО eIF4F, скорее всего, в какой-то момент должен перестать взаимодействовать с кэпом из-за стерических препятствий. В противном случае 5'НТО мог бы сканировать только один единственный рибосомный комплекс, а это должно значительно снижать эффективность инициации трансляции пропорционально длине 5'НТО [Bohlen et al., 2020]. Кроме того, при остановке элонгирующих 80S комплексов циклогексимидом с помощью электронной микроскопии можно наблюдать на одной мРНК несколько 40S субчастиц, предшествующих 80S рибосоме. Эти данные подтверждают, что сканирующий комплекс диссоциирует от m⁷G-кэпа по мере продвижения к стартовому кодону [Shirokikh et al., 2019].

Помимо eIF3, eIF4A и eIF4E, eIF4G1 взаимодействует с поли(А)-связывающим белком (*PABP*, *Poly(A) Binding Protein*) [Imataka et al., 1998; Le et al., 1997; Tarun et al., 1996]. В результате такого взаимодействия полиаденилированный 3'-конец мРНК оказывается сближенным с иницирующим комплексом на 5'-конце, и мРНК образует замкнутую петлю [Wells et al., 1998]. Функциональная роль взаимодействия eIF4G1 и PABP известна давно: m⁷G-кэп и поли(А)-хвост синергично усиливают трансляцию [Biziaev et al., 2022; Vicens et

al., 2018], однако лежащий в основе этого механизм понятен не вполне. Например, замкнутая петля по-разному влияет на трансляцию коротких и длинных мРНК в дрожжах [Amrani et al., 2008], а длина 5'НТО способна модулировать эффект от поли(А)-хвоста [Alekhina et al., 2020]. Также совершенно не изучена роль белка PAIP1 (*Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1*), гомолога eIF4G, связывающего PABP и неизвестным образом стимулирующего трансляцию [Craig et al., 1998; Martineau et al., 2008; Martineau et al., 2014]. Говоря о взаимодействии eIF4F и PABP, часто забывают, что PABP взаимодействует еще и с фактором терминации трансляции eRF3 (*Eukaryotic peptide release factor 3*) [Hoshino et al., 1999; Uchida et al., 2002], но динамика этого процесса не изучена.

Расщепление eIF4G1 вирусными протеазами приводит к нарушению его каркасной функции. Так, протеазы 2A и L некоторых пикорнавирусов отщепляют от центральной части eIF4G1 сайты связывания eIF4E и PABP и (рис. 2А), подавляя тем самым кэп-зависимую инициацию трансляции [Lamphear et al., 1995]. Образующийся протеолитический фрагмент eIF4G1, называемый p100, содержит сайты связывания для eIF4A и eIF3, и используется вирусами для кэп-независимой трансляции своих мРНК. Таким образом, вирусная протеаза одновременно подавляет трансляцию клеточных мРНК и стимулирует трансляцию вирусных мРНК.

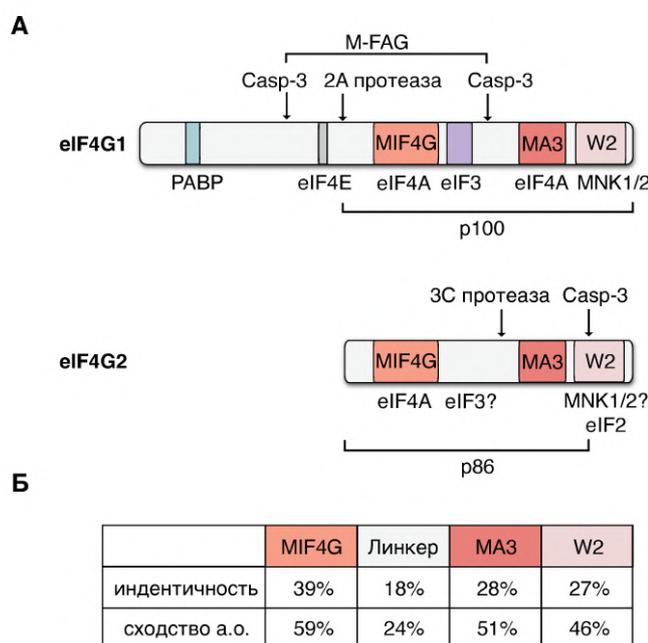


Рисунок 2. Сравнение eIF4G1 и eIF4G2 млекопитающих. (А) Схематичное изображение первичных структур eIF4G1 и eIF4G2 млекопитающих. Оба гомолога eIF4G обладают тремя HEAT-доменами: MIF4G, MA3 и W2. Домены с известными кристаллическими структурами обозначены внутри ячеек, а сайты связывания факторов инициации и MNK1/2 подписаны под схемами. Стрелками обозначены сайты расщепления для пикорнавирусных протеаз и для каспазы-3 (*casp-3*). Фрагменты M-FAG (eIF4G1₄₉₃₋₁₁₃₆) и p86 (eIF4G2₂₁₋₇₉₂) образуются под действием каспазы-3. Пикорнавирусная протеаза 2A отщепляет от eIF4G1 фрагмент p100, а eIF4G2 расщепляется пикорнавирусной

протеазой 3С. **(Б)** Сравнение первичных структур для доменов eIF4G1 и eIF4G2. Аминокислотные последовательности соответствующих доменов были попарно выравнены с помощью сервиса EMBL-EBI Needle (EMBOSS) со стандартными настройками алгоритма Нидлмана-Вунша. Указаны рассчитанные проценты одинаковых (идентичность) и сходных аминокислотных остатков (сходство а.о.). Под линкерным доменом понимается аминокислотная последовательность между MIF4G и MA3 доменами.

В трансляции участвуют несколько структурных гомологов eIF4G1, присутствующих в геномах млекопитающих: eIF4G2, eIF4G3, PAIP1, PDCD4 (*Programmed Cell Death 4*), CBP80 (*Cap binding protein 80*), CTIF (*Cap Binding Complex Dependent Translation Initiation Factor*) и SLIP1 (*Stem-Loop Binding Protein*)-interacting protein 1, или MIF4GD). Долгое время считалось, что eIF4G3 функционально идентичен eIF4G1, но недавно появилось сообщение о том, что он может специфически работать в комплексе с eIF4E2 в условиях гипоксии [Ho et al., 2016]. Другим ближайшим гомологом eIF4G1 является eIF4G2, изучению роли которого и посвящена настоящая работа.

2. Регуляция канонической инициации трансляции в клетках животных

Регуляция трансляции часто происходит на стадии инициации. РНК-связывающие белки и/или вторичные структуры РНК, присущие последовательностям многих 5'НТО, могут в значительной мере препятствовать сканированию. Еще одним барьером для сканирующей рибосомы являются предшествующие открытые рамки считывания (*upstream open reading frames, uORFs*) в 5'НТО. Чтобы добраться до основного стартового кодона в этом случае, сканирующий комплекс должен либо пропустить стартовый кодон uORF (пропускающее сканирование, *leaky scanning*), либо возобновить сканирование после ее трансляции (реинициация) (рис. 3). Таким образом, эффективность трансляции мРНК зависит от вероятности этих событий: пропускающего сканирования и реинициации [Hinnebusch et al., 2016]. Отметим, что в 5'НТО часто одновременно присутствуют несколько предшествующих AUG кодонов (*upstream AUG, uAUG*) и/или несколько uORF. Очевидно, что влияние различных препятствий на уровень трансляции для разных мРНК неодинаково и зависит как от длины их 5'НТО, так и от их первичной структуры. Для визуализации путей рибосом через uORF к основному стартовому кодону недавно была предложена концепция графов принятия решений рибосомами (*ribosome decision graph, RDG*). RDG представляет трансляцию как несколько путей рибосом через 5'НТО и позволяет отразить вклад обоих механизмов при трансляции одной мРНК [Tierney, J.S et al., 2023]. При описании трансляции на используемых в работе репортерных конструкциях будем пользоваться именно такими схемами (как на рис. 3В).

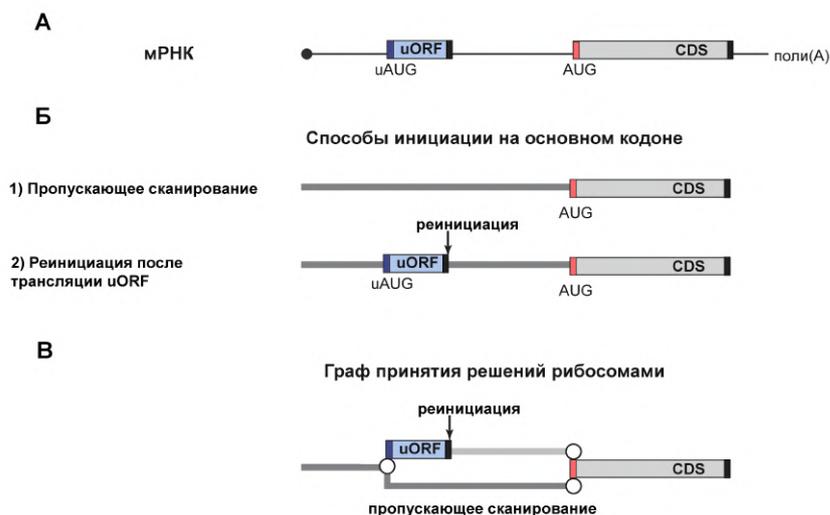


Рисунок 3. Способы инициации трансляции у эукариот при наличии uORF в 5'НТО мРНК. **(А)** Схематичное изображение мРНК с uORF в 5'НТО. Белок-кодирующая часть (CDS) обозначена серым. uORF показана синим прямоугольником, uAUG темно-синим, а основной AUG стартовый кодон — красным. Черным отмечены стоп-кодоны. **(Б)** Пути инициации трансляции на мРНК с uORF в 5'НТО. Рибосомы могут инициировать трансляцию только на uORF, реиницировать после трансляции uORF или пропускать uAUG, тем самым обеспечивая пропускающее сканирование для инициации трансляции на основном стартовом кодоне. **(В)** Граф принятия решений рибосомами (RDG, ribosome decision graph), представляющий трансляцию как несколько путей рибосом через 5'НТО с uORF. uORF показана синим прямоугольником, круги отражают точки бифуркации, в которых рибосома “принимает решение”, начинать трансляцию или нет. Путь пропускающего сканирования для инициации на ниже расположенном стартовом кодоне показан темно-серым цветом. После трансляции uORF терминировавшая рибосома может возобновлять сканирование для последующей инициации трансляции на основном стартовом кодоне. Последующее сканирование реиницировавшими рибосомами обозначено светло-серым (путь реинициации). Концепция визуализации движения рибосом по 5'НТО была взята из [Tierney, J.S et al., 2023].

Регуляция общего уровня трансляции осуществляется путем изменения активности двух факторов инициации: eIF2 и eIF4E. В стрессовых условиях происходит активация одной из четырех киназ eIF2 (HRI, GCN2, PKR, PERK), которые фосфорилируют eIF2 α (рис. 4А). Фосфорилирование eIF2 α , в свою очередь, приводит к образованию прочного комплекса eIF2 с eIF2B, что не дает eIF2B обменивать ГДФ на ГТФ в других молекулах eIF2, снижая таким образом его доступность, и, как следствие, эффективность инициации трансляции в целом (рис. 4Б) [Kimball et al., 1998].

При этом есть мРНК, трансляция которых относительно нечувствительна к ингибированию eIF2. Более подробно механизм устойчивости трансляции в условиях фосфорилирования eIF2 α обсуждается в Разделе 3, посвященном роли предшествующих открытых рамок считывания в 5'НТО.

(ингибитор хеликазы eIF4A), в результате чего PDCD4 убиквитинилируется и утилизируется клеткой [Dorrello et al., 2006], а также eIF4B и RPS6 (*Ribosomal protein S6*) с не вполне понятными последствиями. В отсутствие активной киназы mTOR LARP1 дефосфорилируется и связывается с так называемыми TOP мРНК, имеющими на 5'-конце олигопиримидиновый мотив (*5' terminal oligopyrimidines, 5'TOP*) [Hong et al., 2017; Lahr et al., 2017; Lahr et al., 2017; Tcherkezian et al., 2014]. В условиях, когда активный синтез белка не требуется клетке, это обеспечивает чрезвычайно эффективную репрессию TOP мРНК, кодирующих в основном рибосомные белки и факторы трансляции.

В свою очередь, ингибиторы mTOR (такие как рапамицин, торин1/2, торкиниб — PP242) хотя и оказывают значительное негативное воздействие на трансляцию большинства клеточных мРНК, но для некоторых мРНК блокируют ее значительно слабее, а то и не ингибируют вовсе [Gingras et al., 2001; Hsieh et al., 2012; Thoreen et al., 2012]. В теории, это может быть объяснено как сохранением некоторого количества свободных молекул eIF4E при инактивации mTOR (неполным ингибированием eIF4E с помощью 4E-BP), так и использованием такими мРНК альтернативных механизмов инициации трансляции, обходящимися без eIF4E. Как минимум отчасти это связано с кэп-связывающим белком eIF4E3, который не способен взаимодействовать с eIF4E-BP и потому не ингибируется при инактивации mTOR [Weiss et al., 2021]. В последние годы были обнаружены и другие киназы eIF4E-BP, что делает эту историю еще более сложной (более подробно рассмотрено в обзоре [Qin et al., 2016]).

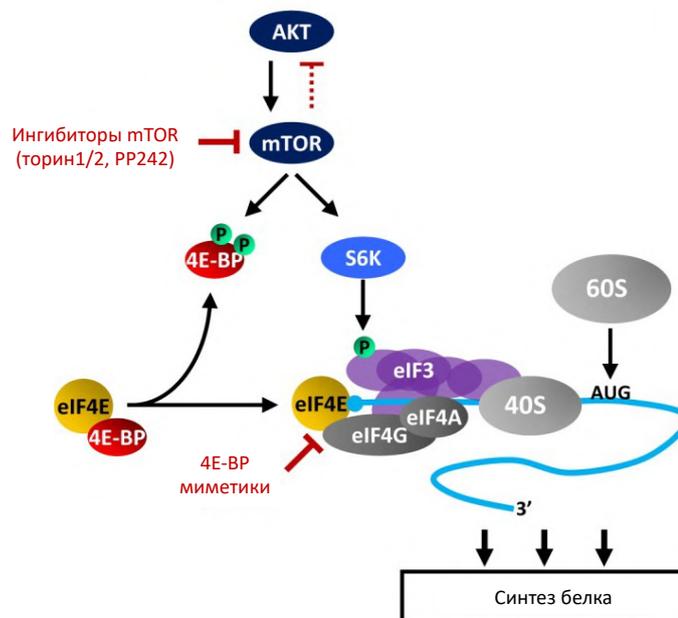


Рисунок 5. Регуляция инициации трансляции с помощью киназы mTOR. Нефосфорилированные 4E-BP имеют высокое сродство к eIF4E и препятствуют формированию eIF4F комплекса. 4E-BP, секвестрируя свободный eIF4E, препятствуют привлечению рибосомы к 7G-кэпу, что приводит к подавлению кэп-зависимой инициации трансляции. Заимствовано из [Martineau et al., 2014].

3. Роль предшествующих открытых рамок считывания в 5'НТО

Предшествующие открытые рамки считывания (uORF) встречаются у всех эукариот, при этом их число сильно возрастает по мере усложнения организма: если у дрожжей и трипаносом это 9% [Radio et al., 2020], то у человека потенциальные uORF были идентифицированы примерно в 50% всех белок-кодирующих генов [Calvo et al., 2009; Iacono et al., 2005; Johnstone et al., 2016; Ye et al., 2015]. В связи с важностью uORF для регуляции трансляции это направление активно развивается, поэтому мы сосредоточимся лишь на некоторых важных аспектах (с более детальным разбором можно ознакомиться в недавних обзорах [Dever et al., 2023; Dever et al., 2020; Hinnebusch et al., 2016; Young et al., 2016; Zhang et al., 2019]). Помимо влияния uORF собственно на трансляцию основной рамки, наличие uORF может заметно снижать время полужизни мРНК [Johnstone et al., 2016; Matsui et al., 2007], таким образом делая более эффективной регуляцию экспрессии на уровне транскрипции.

В случае мРНК с uORF рибосома может достигнуть инициаторного кодона основной рамки считывания двумя способами: “не заметить” uAUG кодон в силу его не самого лучшего контекста (пропускающее сканирование) или возобновить сканирование после терминации трансляции (реинициация). Считается, что при терминации значительная доля рибосом диссоциирует в раствор, а реиницирует лишь относительно небольшая их часть.

Эффективность реинициации сильно возрастает по мере увеличения расстояния между стоп-кодоном и лежащим дальше в мРНК стартом. При этом сканирование в сторону 5'-конца (*backward reinitiation*) хотя и наблюдалось в ряде работ [Li et al., 2022; Matsuda et al., 2006; Wang et al., 2022], но его эффективность очень быстро падает с расстоянием между стоп-кодоном и предшествующим ему AUG кодоном [Kozak, 1987a; Kozak, 2001b]. В случае реинициации в “нормальном” направлении, напротив, при удлинении межцистронной последовательности от 11 до 79 нуклеотидов эта эффективность увеличивается минимум в 7 раз [Kozak, 1987a]. Качественно этот же феномен наблюдали и в дрожжах [Grant et al., 1994]. Другим важнейшим фактором является длина открытой рамки считывания, после трансляции которой происходит реинициация: чем рамка длиннее, тем меньше способность рибосомы реиницировать [Hwang et al., 1998; Kozak, 2001b; Luukkonen et al., 1995; Rajkowitsch et al., 2004]. Обратную зависимость между длиной uORF и эффективностью реинициации принято объяснять постепенной диссоциацией факторов инициации из рибосомных комплексов по мере того, как они транслируют uORF: если ключевые факторы инициации остаются связанными с рибосомой, когда она завершает трансляцию uORF, то и реинициация происходит эффективно. Несколько фактов косвенно подтверждают эту модель. Во-первых, замедление скорости элонгации как

отдельно uORF, так и вообще, снижает эффективность реинициации [Dever et al., 2020; Kozak, 2001b; Lin et al., 2019; Rajkowitsch et al., 2004]. С другой стороны, медленно элонгирующие рибосомы также могут влиять на трансляцию основной открытой рамки считывания, препятствуя движению рибосом, пропустивших uAUG в ходе сканирования. Во-вторых, механизм инициации трансляции uORF влияет на реинициацию. В том случае, если uORF транслируется при помощи IRES-элемента, не требующего кэп-связывающего комплекса eIF4F (как в случае *CSFV*, *Classical swine fever virus*) или факторов инициации вообще (как в случае *CrPV*, *Cricket paralysis virus*), реинициация не происходит, но если соответствующий IRES-элемент использует для своей работы eIF4G1, то и реинициация имеет место [Pöyry et al., 2004; Russell et al., 2023]. В-третьих, было обнаружено, что eIF3 остается связанным с элонгирующими рибосомами в начале ORF [Bohlen et al., 2020; Lin et al., 2020; Wagner et al., 2020] и диссоциирует с “длиной полудиссоциации” приблизительно в 12 транслируемых кодонов [Bohlen et al., 2020]. В полном соответствии с этими данными, ассоциация eIF3 с uORF уменьшается по мере увеличения длины uORF [Mohammad et al., 2017].

Известны мРНК, трансляция которых относительно нечувствительна к ингибированию eIF2, и во всех этих случаях ключевую роль играют uORF. Наиболее изученный механизм, получивший название отложенной реинициации (*delayed reinitiation*), был впервые описан для мРНК транскрипционного фактора GCN4 в *S. cerevisiae* [Abastado et al., 1991], а затем для мРНК транскрипционных факторов ATF4 [Lu et al., 2004; Vattam et al., 2004] и ATF5 [Zhou et al., 2008] у высших эукариот. Трансляция этих мРНК должна продолжаться для обеспечения ответа на стресс. Существуют и другие случаи устойчивости трансляции к инактивации eIF2, связанные с uORF, но, вероятно, не основанные на реинициации: UCP2, IFRD1 [Andreev et al., 2015] и GADD34 ([Lee et al., 2009], однако соответствующие механизмы не вполне изучены.

Эффективность пропускающего сканирования также сильно зависит от конкретной мРНК. На то, проедет ли рибосома потенциальный стартовый кодон или нет, помимо очевидных факторов, таких как контекст инициаторного кодона и доступность eIF1 и eIF5, влияет также и длина 5'НТО. В том случае, если инициаторный кодон расположен слишком близко к 5'-концу мРНК, рибосома имеет склонность пропускать его [Johnstone et al., 2016; Kozak, 1991; Pestova et al., 2002; Stacey et al., 2000; Werten et al., 1999], и ответственным за дестабилизацию таких рибосомных комплексов является eIF1 [Pestova et al., 2002]. Однако из этого правила есть и исключение. Обнаруженный в 2008 году короткий мотив TISU (*Translation Initiator of Short 5' UTR*, SAASATGGCGGC, где S это C или G), характерный для мРНК репрессоров транскрипции YY1 с короткими 5'НТО (медианное значение

12 нуклеотидов) [Elfakess et al., 2008], обеспечивает эффективную трансляцию, не подверженную ингибированию посредством eIF1 [Elfakess et al., 2011].

Среди других факторов, влияющих на пропускающее сканирование, стоит отметить белок DHX29 (*DExH-box helicase 29*), который ослабляет потенциал сканирующих комплексов к пропуску инициаторных кодонов *in vitro* [Pisareva et al., 2016]. Однако аналогичных данных в живых клетках получено не было, и можно подозревать, что DHX29 влияет не на пропускающее сканирование, а препятствует слайдингу (*ribosome sliding*), т.е. препятствует возобновлению сканирования после узнавания AUG кодона и “проскальзыванию” к следующему AUG кодону [Terenin et al., 2016].

В заключение здесь стоит отметить, что механизмы как реинициации, так и пропускающего сканирования активно используются клеточными и вирусными мРНК.

4. Неканонические механизмы инициации трансляции в эукариотических клетках

4.1. IRES-зависимая инициация трансляции у вирусов в клетках эукариот

Помимо канонического кэп-зависимого способа инициации трансляции, существует механизм, использующий специфическую посадку рибосом на внутренние области мРНК, известные как участки (или сайты) внутренней посадки рибосомы (*IRES, Internal Ribosome Entry Site*) (рис. 6Б). В этом случае рибосома рекрутируется не на 5'-конец мРНК, а непосредственно к стартовому кодону или вблизи него. Впервые этот механизм был обнаружен для геномных РНК вирусов полиомиелита (*PV, poliovirus*) [Pelletier et al., 1988] и энцефаломиокардита (*EMCV, encephalomyocarditis virus*) [Jang et al., 1988]. Наличие IRES-элементов в вирусных РНК было впоследствии подтверждено для многих семейств РНК-вирусов. IRES-элементы имеют высокоспецифичные вторичные и третичные структуры, которые напрямую связывают факторы инициации, например, eIF4G1, eIF3 или даже саму рибосому [Mailliot et al., 2018; Sorokin et al., 2021; Yamamoto et al., 2017].

Вирусные IRES-элементы, за редчайшими исключениями, можно отнести к одному из четырех классов I-IV [Mailliot et al., 2018]. К I и II классам относят IRES-элементы некоторых пикорнавирусов, таких как вирусы ящура (*FMDV, Foot-and-mouth disease virus*), полиомиелита (*PV*), энцефаломиокардита (*EMCV*), риновирус человека (сем. *Picornaviridae*). IRES-элементы полиовируса и вируса энцефаломиокардита были открыты первыми и являются одними из наиболее изученных. Для инициации трансляции мРНК пикорнавирусов необходимы все факторы инициации, кроме eIF4E, а в случае инициации трансляции EMCV не нужны также eIF1 и eIF1A. Образование предынициаторного комплекса на таких мРНК возможно благодаря высокоаффинному связыванию eIF4G1

счет привлечения фактора *eIF4G1* J-K доменом IRES-элемента вируса энцефаломиокардита (EMCV). **(В)** CITE-опосредованная инициация трансляции. Третичная структура в мРНК или модификация нуклеотидов в мРНК привлекает фактор инициации, затем рекрутируется 40S рибосомный комплекс, и сканирование начинается с самого 5'-конца мРНК. В качестве примера изображено привлечение *eIF3* к N6-метиладенозину (m^6A) в 5'НТО мРНК.

Третий класс представлен IRES-элементами некоторых представителей семейств *Picornaviridae* и *Flaviviridae*. Поскольку из них наиболее изучен и наиболее известен открытый первым из них IRES-элемент вируса гепатита С (HCV, сем. *Flaviviridae*), это семейство также называют HCV-подобным. В случае таких IRES-элементов 40S субъединица рибосомы связывается с мРНК так, что ее Р-участок оказывается непосредственно рядом со старт-кодоном, и инициация требует участия лишь некоторых факторов (*eIF2*, *eIF3*, *eIF5* и *eIF5B*) [Pestova et al., 1998; Pestova et al., 2008; Terenin et al., 2008], причем такие IRES-элементы связывают *eIF3* и 40S субъединицу рибосомы независимо [Hashem et al., 2013; Pestova et al., 1998; Sizova et al., 1998].

IRES-элементы IV класса встречаются у представителей семейства *Dicistroviridae*, из которых наиболее известны вирус паралича сверчка (*CrPV*, *Cricket paralysis virus*) и вирус черного маточника (*BQCV*, *Black queen cell virus*). мРНК этих вирусов содержат два цистрона, трансляция каждого из которых направляется своим IRES-элементом. 5'-концевые IRES-элементы этих вирусов очень плохо охарактеризованы [Gross et al., 2017; Neupane et al., 2020; Terenin et al., 2005; Woolaway et al., 2001], а IRES-элементы IV класса расположены исключительно в межцистронном положении и способны самостоятельно связывать обе рибосомные субъединицы, не требуя ни факторов инициации, ни даже инициаторной $\text{Met-tRNA}_{\text{Met}}$. К тому же, в качестве инициаторных кодонов они как правило используют триплеты, отличные от AUG [Abeyrathne et al., 2016; Muhs et al., 2015; Murray et al., 2016; Wilson et al., 2000].

Таким образом, IRES-элементы имеют мало похожие структуры и механизмы функционирования, но все они обладают следующими специфическими чертами:

1. Это компактные структуры длиной в 200-400 нуклеотидных остатков.
2. Их способность функционировать не зависит от их положения в 5'НТО мРНК. Они могут располагаться на любом расстоянии от 5'-конца мРНК, и их активность не зависит от выше- или нижележащих нуклеотидных последовательностей. Более того, они могут функционировать и в кольцевых РНК.
3. В зависимости от типа IRES-элемента, инициация трансляции на стартовом кодоне не требует некоторых (или даже всех) канонических факторов инициации, или же, наоборот, в процесс могут быть вовлечены дополнительные белки (ITAF).

4. Сканирование, как правило, ограничено небольшими областями мРНК, а в некоторых случаях 40S рибосома направляется непосредственно на инициаторный кодон без какого-либо сканирования.

Изучение вирусных IRES-элементов особенно активно проводилось в 1990-х и начале 2000-х годов. Были выделены комплексы IRES-элементов с 40S рибосомами и определены их белковые составы. Наконец, для некоторых IRES элементов удалось собрать функциональные иницирующие комплексы *in vitro* из полностью очищенных компонентов. Фундаментальные выводы, сделанные на основе этих экспериментов, не претерпели с тех пор существенных изменений [Pestova et al., 2001].

4.2. Кэп-независимая инициация трансляции у цитоплазматических мРНК

При стрессе, апоптозе или при вирусной инфекции в эукариотической клетке как правило происходит подавление трансляции. Помимо упоминавшихся уже модификаций 4E-BP и eIF2, в дело могут вступать и протеолитические ферменты. Каспазы способны осуществлять ограниченный протеолиз eIF4B, eIF2 α , eIF3i, eIF4G1 и eIF4G2 [Clemens et al., 2000] с не вполне понятными функциональными последствиями. Кроме того, протеолизу подвергается и 4E-BP1: после удаления N-концевой части он теряет способность быть контролируемым киназами и превращается в доминант-негативный ингибитор трансляции [Tee et al., 2002]. Ожидаемо, трансляция вирусных мРНК, содержащих IRES-элементы, является кэп-независимой и поэтому нечувствительна к ингибированию кэп-зависимой трансляции. За последние три десятилетия во многих статьях сообщалось о слабой кэп-зависимости трансляции некоторых цитоплазматических мРНК или о сохранении трансляции этих мРНК в стрессовых условиях при ингибировании mTOR [Shatsky et al., 2010; Terenin et al., 2013]. Как правило, это наблюдали для мРНК, кодирующих регуляторы клеточного цикла, эмбриогенеза, апоптоза, обеспечивающих ответ на различные стрессы и т.д. В отсутствие других объяснений считалось, что такая кэп-независимая трансляция осуществляется за счет внутренней инициации. Однако такая точка зрения на данный момент является дискуссионной, поскольку методы, используемые обычно для демонстрации внутренней инициации, страдают от хорошо и давно описанных артефактов, что приводит к ложноположительным “открытиям” клеточных и иногда даже вирусных IRES-элементов. Надежная методология тестирования и верификации потенциальных IRES-элементов в клеточных мРНК была разработана относительно недавно (обзор проблем, связанных с исследованием клеточных IRES-элементов, см. в работах [Jackson, 2013; Terenin et al., 2017]), что, к слову, привело к снижению числа работ, посвященных “клеточным IRES-элементам”.

4.3. Инициация трансляции клеточных мРНК с участием CITE

Объяснение “нетипичного” поведения некоторых клеточных мРНК потребовало новых концепций, и в литературе появились альтернативные модели механизмов кэп-независимой инициации трансляции. Они основываются на так называемых энхансерах кэп-независимой трансляции (*Cap-Independent Translational Enhancers, CITEs*) (рис. 6B). Впервые CITE были обнаружены в мРНК вирусов растений (подробно описаны в обзоре [Truniger et al., 2017]). CITE, как и IRES-элементы, специфически связывают некоторые инициаторные факторы (такие как eIF3, eIF4G1, eIF4E) или даже сами рибосомные субчастицы. Однако, в отличие от IRES-элементов, они обеспечивают привлечение иницирующих комплексов только на самый 5'-конец мРНК для последующего сканирования 5'НТО. Таким образом, CITE способствуют кэп-независимой, но строго 5'-конец-зависимой инициации трансляции [Miras et al., 2017; Sorokin et al., 2021; Terenin et al., 2017]. Например, было показано, что eIF3, связываясь с N6-метилированными аденозинами (m⁶A), приводит в действие природный CITE и обеспечивает кэп-независимую, но 5'-конец-зависимую трансляцию мРНК Hsp70 [Meyer et al., 2015; Zhou et al., 2015]. Долгое время считалось, что мРНК Araf1 содержит IRES [Coldwell et al., 2000; Mitchell et al., 2001; Mitchell et al., 2003], но оказалось, что трансляция такой мРНК не является строго кэп-зависимой, но включает в себя 5'-конец зависимое сканирование 5'НТО, что может определяться наличием в этой мРНК CITE [Andreev et al., 2012; Terenin et al., 2013], хотя, строго говоря, это доказано не было.

5. eIF4G2 как гомолог eIF4G1

С момента открытия eIF4F механизм инициации трансляции с участием eIF4G1 рассматривался как основной. При этом eIF4G1 действительно жизненно важен для развития организмов [Contreras et al., 2008; Goyer et al., 1993], но его частичная деплеция в клетках дрожжей или млекопитающих, вопреки всем ожиданиям, не оказывает критического влияния на рост и жизнеспособность клеток в нормальных условиях [Badura et al., 2012; Bryant et al., 2018; Park et al., 2011; Ramírez-Valle et al., 2008]. Это свидетельствует о способности клетки поддерживать необходимый уровень синтеза белка и при пониженных концентрациях eIF4G1. В этой связи понятен интерес к роли гомологов eIF4G1 в инициации трансляции.

Белок eIF4G2, также известный под названиями DAP5, Nat1, AAG1 и p97, был открыт в 1997 году сразу четырьмя исследовательскими группами [Imataka et al., 1997a; Levy-Strumpf et al., 1997; Shaughnessy et al., 1997; Yamanaka et al., 1997]. В двух случаях белок был обнаружен при поиске факторов, ассоциированных с апоптозом, и получил

поэтому название DAP5 (*Death Associated Protein 5*) [Levy-Strumpf et al., 1997], и при поиске мишеней РНК-редактирующего белка APOBEC1, откуда берет свое другое название — NAT1 (*Novel APOBEC1 Target 1*) [Yamanaka et al., 1997]. Две другие работы были направлены на характеристику найденного с помощью биоинформатического анализа кДНК гомолога eIF4G1 человека [Imataka et al., 1997a; Shaughnessy et al., 1997]. Оказалось, что данный ген кодирует белок, гомологичный С-концевой части eIF4G1 массой около 100 кДа. Как и eIF4G1, eIF4G2 связывается с eIF4A и eIF3, но, в отличие от eIF4G1, не взаимодействует с кэп-связывающим белком eIF4E (рис. 2А) [Imataka et al., 1997a; Yamanaka et al., 1997].

Уже в середине 2000-ых годов было показано, что eIF4G2 ассоциирован с полисомами, что подтвердило его участие в трансляции [Lee et al., 2006; Nousch et al., 2007]. Впоследствии экспрессия eIF4G2 была количественно охарактеризована в различных клеточных линиях. Этот белок повсеместно экспрессируется на уровне, сопоставимом с уровнем eIF4G1, однако точное соотношение eIF4G1:eIF4G2 может варьировать от 2,4:1 [Schwanhäusser et al., 2011] до 1,4:1 [Itzhak et al., 2016] в клетках мыши NIH/3T3 или 1:4,5 в клетках человека HeLa [Nagaraj et al., 2011]. В совокупности эти данные позволили предположить, что eIF4G2 является вспомогательным белком, участвующим в необычных механизмах кэп-независимой инициации трансляции в стрессовых условиях, однако его роль в инициации трансляции при нормальных условиях до недавнего времени оставалась неустановленной.

Отдельно стоит остановиться на названии белка. В номенклатуре гомологов eIF4G1 наблюдается некоторая непоследовательность, осложняющая поиск и анализ литературы. Исторически первым белком был открыт eIF4G1 человека [Grifo et al., 1983], который в те времена называли просто eIF4G или eIF4 γ . Позже был обнаружен белок eIF4G3 [Gradi et al., 1998], получивший тогда название eIF4GII, а eIF4G стал eIF4GI. Гомологи eIF4G у дрожжей имеют названия eIF4G1 и eIF4G2, а у растений – eIF4G и eIF(iso)4G растений, но, по всей видимости, eIF4G2 и eIF(iso)4G нельзя считать ортологами eIF4G3 млекопитающих. В те же годы был открыт eIF4G2, который первоначально был назван DAP5, Nat1 и p97 и сохранил эти названия до настоящего времени. Однако примерно с 2005 года стали появляться работы, в которых DAP5/Nat1/p97 и eIF4GII начали называть eIF4G2 и eIF4G3 соответственно. Проблема здесь заключается в том, что eIF4G2 высших эукариот также не является ортологом eIF4G2 дрожжей, поэтому eIF4GII человека стали называть eIF4G3. Для избежания путаницы в настоящий момент научное сообщество, похоже, склоняется к тому, чтобы использовать названия eIF4G1-3 для обозначения ортологов eIF4G млекопитающих.

6. Структура eIF4G2

К настоящему времени структуры полноразмерного eIF4G1 (самая длинная изоформа состоит из 1599 аминокислотных остатков у человека) и eIF4G2 (907 аминокислотных остатков у человека) не разрешены, однако были получены кристаллические структуры их отдельных доменов. Оба белка имеют по три HEAT-домена: MIF4G, MA3 и W2, также называемые HEAT1, HEAT2 и HEAT3 (рис. 2А). В случае eIF4G1 рентгеноструктурные данные получены для всех трех HEAT-доменов, а также для сайта связывания eIF4E [Friedrich et al., 2022]. Для eIF4G2 получены структуры MIF4G (аминокислотные остатки eIF4G2₆₁₋₃₂₃) [Virgili et al., 2013], MA3 и W2 доменов (eIF4G2₅₄₀₋₈₉₇) (рис. 2А) [Fan et al., 2010; Liberman et al., 2008]. Максимальное сходство структур наблюдается между MIF4G-доменами eIF4G1 и eIF4G2 (39% идентичности последовательности, 59% сходства аминокислотных остатков; см. рис. 2Б, рис. 7А, рис. 8) [Virgili et al., 2013]. В особенности консервативны аминокислотные остатки, участвующие в связывании eIF4А. В то же время связывание eIF4А с MIF4G доменом eIF4G2 характеризуется заметно более высокой константой диссоциации по сравнению таковым в случае eIF4G1 [Virgili et al., 2013].

Внутри MA3 домена eIF4G1 находится второй сайт связывания eIF4А, но, несмотря на их высокое сходство (рис. 2Б, рис. 7Б) [Fan et al., 2010], MA3 домен eIF4G2 не способен связывать eIF4А [Imataka et al., 1997b]. Неизвестно, какую функцию выполняет этот домен, но примечательно, что eIF4G2 стимулирует хеликазную активность eIF4А в два раза менее эффективно, чем eIF4G1 [Virgili et al., 2013].

W2 домен eIF4G2 очень похож на аналогичный домен белков eIF5 и eIF2Bε (рис. 7В) и так же, как и в их случае, участвует во взаимодействии с eIF2β. Несмотря на очень высокую структурную гомологию W2 доменов eIF4G1 и eIF4G2 (рис. 7В), eIF4G1 не может связывать eIF2β. Для связывания eIF4G2 с eIF2β необходим консервативный отрицательно заряженный остаток глутамата E862 в W2 домене eIF4G2, в то время как соответствующий остаток в W2 домене eIF4G1 является положительно заряженным лизином [Liberman et al., 2008]. Кроме того, в MIF4G домене имеется специфичная для eIF4G2 положительно заряженная поверхность, которая, как предполагается, участвует в связывании РНК [Virgili et al., 2013]. При апоптозе eIF4G2 подвергается протеолизу каспазой-3 с образованием фрагмента p86. Сайт расщепления каспазой-3 DETD₇₉₂ (отмечен стрелкой на рис. 2А) расположен в неструктурированной петле eIF4G2 и отсутствует в W2 доменах других содержащих этот домен белках [Liberman et al., 2008].

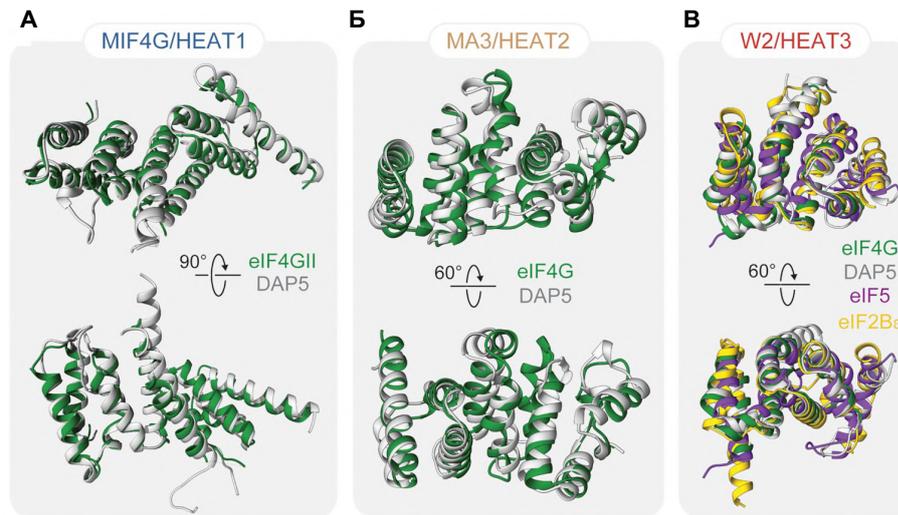


Рисунок 7. Структуры HEAT-доменов. Обозначения: eIF4G2 (серый), eIF4G3/eIF4G1 (зеленый), ε-субъединицы eIF2B (желтый) и eIF5 (фиолетовый). (А) Структура MIF4G/HEAT1. (Б) Структура MA3/HEAT2. (В) Структура W2/HEAT3. Структуры PDB: eIF4GII MIF4G/HEAT1 1hu3; DAP5 MIF4G/HEAT1 4iul; eIF4G MA3/HEAT2 1ug3; DAP5 MA3/HEAT2 3l6a; eIF4G W2/HEAT3 1ug3; DAP5 W2/HEAT3 3d3m; eIF5 W2/HEAT3 2iu1; eIF2Bε W2/HEAT3 3jui. Заимствовано из [Friedrich et al., 2022].

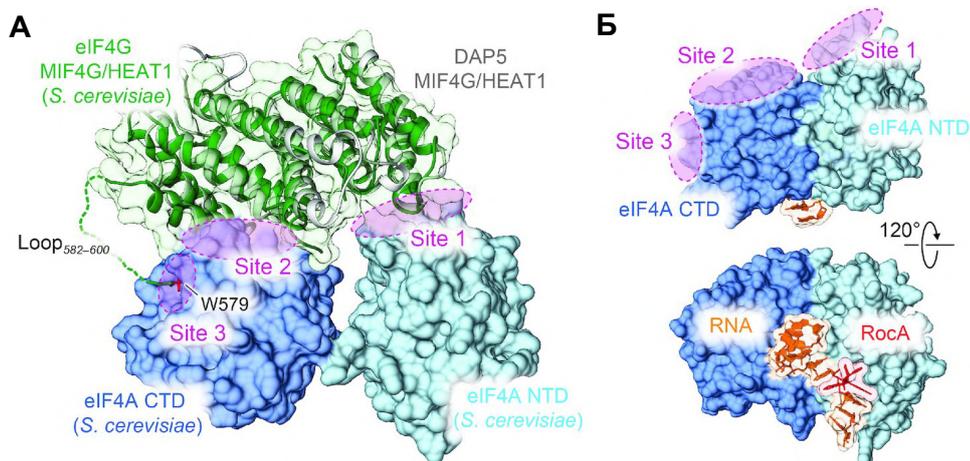


Рисунок 8. MIF4G домены eIF4G1 и eIF4G2 взаимодействуют с eIF4A схожим образом. (А) Кристаллическая структура комплекса MIF4G домена (зеленый) и eIF4A дрожжей (С-концевой домен — темно-синий, N-концевой домен — светло-синий) (PDB-код 2vso). Три сайта взаимодействия обозначены пурпурным цветом. Для петли 582-600 (пунктирная линия), связывающей аминокислотные остатки сайта 3 с MIF4G доменом электронная плотность отсутствует. Структура MIF4G домена eIF4G2 человека (серый, PDB-код 4iul) наложена на структуру MIF4G домена eIF4G1 дрожжей для моделирования взаимодействия. (Б) Кристаллическая структура eIF4A человека в комплексе с полиуриновой РНК (десять нуклеотидов, оранжевый), рокагламидом А (RocA, красный) и AMP-PNP (не показано) (PDB-код 5zc9). Пурпурным цветом обозначены участки взаимодействия с MIF4G доменом eIF4G, выявленные в структуре комплекса на рисунке (А). Заимствовано из [Friedrich et al., 2022].

7. Трансляция мРНК eIF4G2

Во всех известных случаях инициация трансляции на мРНК eIF4G2 происходит не на AUG кодоне: триплет GUG является стартовым кодоном в случае человека, мыши, *Danio rerio* и *Xenopus laevis*. Консервативность нуклеотидной последовательности мРНК eIF4G2 этих видов составляет 60-80% и 75-90% для кодируемой аминокислотной последовательности (рис. 9) [Takahashi et al., 2005]. Особенно консервативным является благоприятный контекст GUG кодона. Синтез гомолога eIF4G2 у дрозофилы (*dNAT1*) также начинается не с AUG кодона, но стартовый триплет до сих пор точно не определен [Takahashi et al., 2005]. Инициация трансляции мРНК eIF4G2, как и других мРНК с отличными от AUG стартовыми кодонами, может регулироваться белками, проверяющими силу контекста инициаторного кодона, например, eIF5 и 5MP (*eIF5-mimic protein* или BZW): оверэкспрессия eIF5 усиливает, а 5MP – ингибирует трансляцию репортерной мРНК, содержащей 5'НТО eIF4G2 и GUG кодон в качестве стартового (в клетках 293Т) [Tang et al., 2017]. Примечательно, что регуляторные белки eIF5, 5MP и eIF1 значительно сильнее влияют на инициацию трансляции на AUG кодоне, находящемся в плохом контексте, или на инициацию на не-AUG кодоне по сравнению с AUG кодоном, находящемся в хорошем контексте, что позволяет более эффективно регулировать инициацию трансляции [Ivanov et al., 2010; Loughran et al., 2012].

Homo1	ATTATTC TTTTGAAGATTC TTCGTTGTCAAGCCGCCAAAGTGGAGAGTGCCGATTGCAGAAGGGGGTGCTTCTCGTTTCAGTGCTTCCTTC
Homo2	ATTATTC TTTTGAAGATTC TTCGTTGTCAAGCCGCCAAAGTGGAGAGTGCCGATTGCAGAAGGGGGTGCTTCTCGTTTCAGTGCTTCCTTC
Homo3	ATTATTC TTTTGAAGATTC TTCGTTGTCAAGCCGCCAAAGTGGAGAGTGCCGATTGCAGAAGGGGGTGCTTCTCGTTTCAGTGCTTCCTTC
Mus1	ATTATTC TTTTGAAGATTC TTCGTTGTCAAGCCGCCAAAGTGGAGAGTGCCGATTGCAGAAGGGGGTGCTTCTCGTTTCAGTGCTTCCTTC
Mus2	ATTATTC TTTTGAAGATTC TTCGTTGTCAAGCCGCCAAAGTGGAGAGTGCCGATTGCAGAAGGGGGTGCTTCTCGTTTCAGTGCTTCCTTC
Rattus	ATTATTC TTTTGAAGATTC TTCGTTGTCAAGCCGCCAAAGTGGAGAGTGCCGATTGCAGAAGGGGGTGCTTCTCGTTTCAGTGCTTCCTTC
Danio	ATTATTC TTTTGAAGATTC TTCGTTGTCAAGCCGCCAAAGTGGAGAGTGATGATTGCAGAAGGGGGTGCTTCTCGTTTCAGTGCTTCCTTC
Xenopus	TTCTTTTTTTTCCCGAACATTC TTTATCAAGCCGCCAAAGTGGAGAGTGCCGATTGCAGAGGGGGTGCTTCTCGTTTCAGTGCTTCCTTC

Рисунок 9. Выравнивание фрагментов последовательности мРНК (записанной в виде кДНК), кодирующей eIF4G2 или его ортологов. Стартовый кодон (GTG) подчеркнут. В рамке выделен контекст стартового кодона. Фрагмент последовательности мРНК: Homo1 - варианта транскрипта eIF4G2 человека №1 (NM_001418.4), Homo2 – варианта транскрипта eIF4G2 человека №2 (NM_001042559.2), Homo3 – варианта транскрипта eIF4G2 человека №3 (NM_001172705.1), Mus1 – варианта транскрипта eif4g2 мыши №1 (NM_013507.3), Mus2 – варианта транскрипта eif4g2 мыши №2 (NM_001040131.2), Rattus – транскрипта eif4g2 крысы (NM_001017374.2), Danio – транскрипта eif4g2b *Danio rerio* (NM_001013443.2), Xenopus – транскрипта nat1 (*eIF4G-related protein NAT1*) *Xenopus laevis* (NM_001095550.1).

Было показано, что трансляция eIF4G2 и других мРНК со стартовыми кодонами, отличными от AUG, более устойчива к стрессу, вызываемому ингибированием элонгации трансляции. Предполагается, что в таком случае сканирующие рибосомы оказываются “в ловушке” вблизи стартового кодона из-за скопления сильно затормозивших элонгирующих рибосом, что повышает вероятность инициации [Kearse et al., 2019].

Происходит ли что-то подобное в более физиологических условиях, пока неизвестно. Кроме того, 5'НТО мРНК eIF4G2 содержит uORF, которая не ингибирует трансляцию основной рамки считывания в нормальных условиях, но может быть вовлечена в регуляцию при стрессовых условиях [Tang et al., 2017]. Таким образом, синтез белка eIF4G2 может специфически регулироваться в клетке в отличие от белков, трансляция которых начинается со стандартного AUG кодона. В то же время трансляция мРНК eIF4G2 может быть устойчива к определенным стрессам, которые снижают эффективность синтеза белка на подавляющем большинстве других мРНК. Эти свойства мРНК eIF4G2 позволяют предположить, что его экспрессия может быть связана с какими-то важными событиями в клетке.

Описаны случаи регуляции трансляции мРНК eIF4G2 посредством РНК-связывающих белков. 5'НТО мРНК eIF4G2 у всех млекопитающих и, по-видимому, у некоторых других таксонов содержит протяженную полипиримидиновую последовательность. Нами было ранее показано, что поли(rC)-связывающий белок 2 (*PCBP2, poly(rC)-binding protein*) связывается с этой частью 5'НТО и тем самым ингибирует трансляцию мРНК eIF4G2 [Смирнова, 2022]. Нами же было показано, что eIF4G2 участвует в трансляции мРНК с 5'НТО PCBP2, и таким образом, PCBP2 и eIF4G2 формируют взаимную петлю отрицательной обратной связи на уровне трансляции [Смирнова, 2022]. Эстрогеновый рецептор α (ER α) связывает 3'НТО мРНК eIF4G2 и способствует ее трансляции по еще не изученному механизму [Xu et al., 2021]. Сообщалось также, что на количество eIF4G2 в клетке влияют многочисленные микроРНК [Sanson et al., 2020; Tong et al., 2022]: в частности, miR-16 модулирует экспрессию eIF4G2 в аксонах симпатических нейронов крысы [Kar et al., 2013]. Процессинг мРНК eIF4G2 может сопровождаться пропуском экзонов, что наблюдается при развитии хрусталика у мышей [Srivastava et al., 2017]. Одни из первооткрывателей eIF4G2 еще в 1997 обнаружили в клетках печени редактирование мРНК eIF4G2 с помощью цитидиндеаминазы APOBEC1, которое приводит к возникновению множественных стоп-кодонов [Yamanaka et al., 1997], но физиологические последствия этой модификации до сих пор неизвестны. Все перечисленные способы регуляции трансляции мРНК eIF4G2 подчеркивают важность экспрессии этого белка в клетках.

8. Роль eIF4G2 в жизни клетки

Деплеция eIF4G2 часто снижает жизнеспособность клеток, уровень синтеза белка и скорость роста клеток в культуре, но не оказывает критического влияния на судьбу клеток при нормальных условиях культивирования [Lee et al., 2006; Lewis et al., 2008; Marash et al., 2008; Ramírez-Valle et al., 2008; Thoreen et al., 2012]. В середине 2000-ых и 2010-ых еще бытовала уверенность в существовании клеточных IRES-элементов и была высказана мысль, что роль eIF4G2 в регуляции трансляции может быть более выражена в определенных условиях, таких как апоптоз, дифференцировка клеток или остановка клеток в определенной фазе клеточного цикла и т.д. когда, по распространенному мнению, происходит “переключение” с кэп-зависимой на кэп-независимую трансляцию. Стоит заметить, что идея эта, хотя и оказалась в какой-то мере забытой, но ни разу не была опровергнута и вполне может оказаться верной.

8.1. Роль eIF4G2 в апоптозе

Исследовательская группа Ади Кимчи была одной из групп, открывших eIF4G2 [Levy-Strumpf et al., 1997]. Ученые из этой лаборатории в дальнейшем показали, что при апоптозе в клетках SKW6.4 (В-клетках человека) происходит расщепление eIF4G2 по сайту DETD₇₉₂ с образованием фрагмента размером 86 кДа (p86; eIF4G2₁₋₇₉₂), а ингибиторы каспаз предотвращают этот процесс [Henis-Korenblit et al., 2000]. При индукции апоптоза в клетках острого промиелоцитарного лейкоза человека NB4 также образуется фрагмент p86, а нокдаун *eIF4G2* снижает уровень апоптоза [Ozpolat et al., 2007]. По некоторым данным, p86 специфически стимулирует экспрессию проапоптотических белков, таких как c-Myc, XIAP, Araf1 и самого eIF4G2 [Henis-Korenblit et al., 2000; Henis-Korenblit et al., 2002; Nevins et al., 2003], однако авторы связывают эти эффекты со специфическим участием p86 в IRES-опосредованной трансляции соответствующих мРНК (проблемы с методикой идентификации IRES-элементов в клеточных мРНК обсуждались выше).

Протеолиз eIF4G2 происходит не только при апоптозе. Обработка клеток человека 293Т тапсигаргином (ингибитором кальциевого насоса) или туникамицином (ингибитором гликозилирования белков), вызывающими стресс эндоплазматического ретикулума (стресс ЭПР), также приводит к ограниченному каспазозависимому протеолизу eIF4G2 [Warnakulasuriyarachchi et al., 2004], при этом общий уровень белка eIF4G2 в клетках повышается [Lewis et al., 2008]. Трансляция проапоптотического белка HIAP2 индуцируется стрессом ЭПР в клетках с деплецией eIF4G2 в меньшей степени, чем в контрольных клетках [Lewis et al., 2008], поэтому предполагается, что eIF4G2 может быть вовлечен в трансляционный ответ на стресс ЭПР.

Относительно недавно группа Роберта Шнайдера показала, что повышенная экспрессия eIF4G2 сильно коррелирует с повышенной метастатической способностью клеток тройного негативного рака молочной железы TNBC (наиболее агрессивное новообразование молочной железы, клетки которого не содержат рецепторов эстрогена (*ER, estrogen receptor*), прогестерона (*PR, progesterone receptor*) и HER2/neu (*human epidermal growth factor receptor 2*)), а нокдаун *eIF4G2* в клетках TNBC избирательно подавляет трансляцию мРНК, кодирующих белки, участвующие в эпителиально-мезенхимальном переходе, метастазировании клеток и обеспечивающих устойчивость к аноикису (апоптозу при потере связи клетки с межклеточным матриксом) [Alard et al., 2023].

Если приведенные выше факты говорят о проапоптотической функции eIF4G2, то другие исследования свидетельствуют о прямо противоположной роли этого белка в апоптозе. Было показано, что в клетках HeLa с деплецией eIF4G2 экспрессия антиапоптотических белков BCL2 (*B-cell lymphoma 2*) и CDK1 (*Cyclin-dependent kinase 1*) снижается, а уровень проапоптотического BAX (взаимодействующего с BCL2), наоборот, значительно возрастает. Позже в нашей лаборатории было показано, что трансляция мРНК с 5'НТО BCL2 действительно зависит от eIF4G2 [Смирнова, 2022], а с 5'НТО CDK1 – нет (см. рис. 13А, 14А в разделе Результаты и их обсуждение). В отсутствие eIF4G2 остановка клеток в М-фазе (но не в S-фазе) повышает активность каспаз [Lieberman et al., 2008; Marash et al., 2008], что свидетельствует об участии eIF4G2 в противодействии апоптозу. Оверэкспрессия обеих изоформ eIF4G2 (p97 или p86) ослабляет индуцированный цисплатином апоптоз [Gao et al., 2012]. Также известно, что eIF4G2 в меньшей степени подвержен деградации в протеасомах по сравнению с eIF4G1, а деплеция eIF4G2 снижает выживаемость клеток в условиях окислительного стресса, что также свидетельствует об антиапоптотической функции eIF4G2 [Alard et al., 2019]. Однако в приведенных данных нет противоречия. Во-первых, хорошо известно, что на начальных стадиях развития апоптотической реакции клетка еще не “принимает окончательного решения” о своей судьбе, и начало экспрессии антиапоптотических белков может обратить ответ на стресс. А во-вторых, нет ничего удивительного в том, что один и тот же белок может участвовать в трансляции разных мРНК, кодирующих анти- и проапоптотические белки.

8.2. Роль eIF4G2 в клеточной дифференцировке

Группа Синьи Яманаки получила гомозиготные эмбриональные стволовые клетки мыши (МЭСК), нокаутированные по гену *eIF4G2*, но не смогла получить гомозиготных нокаутных *eIF4G2*^{-/-} мышей, поскольку у таких эмбрионов не формировалась мезодерма [Yamanaka et al., 2000]. В то же время гомозиготные *eIF4G2*^{-/-} МЭСК

не дифференцировались после обработки индуктором дифференцировки ретиноевой кислотой и не образовывали мезодермальных тканей при имплантации в мышей. Позднее та же исследовательская группа продемонстрировала, что *eIF4G2*^{-/-} МЭСК имеют профили экспрессии, сходные с профилями экспрессии клеток дикого типа, которые становятся неспособными к дифференцировке после обработки ингибиторами киназ Erk (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*) и Gsk3b (*Glycogen synthase kinase-3 beta*) [Sugiyama et al., 2017]. Эта же группа изучала ортолог *eIF4G2* (*dNAT1*) у разных видов *Drosophila* и показала, что делеция домена W2 у этого белка, приводящая к образованию аналогичного описанному выше апоптотическому фрагменту p86, является летальной, поскольку приводит к аномальному вытягиванию зародышевой полоски [Yoshikane et al., 2007]. Кроме того, при нокауте *eIF4G2* примерно у четверти эмбрионов *Danio rerio* также не развивалась мезодерма [Nousch et al., 2007]. При этом было показано, что оверэкспрессия *eIF4G2* в эмбриональных стволовых клетках мыши вызывает их спонтанную дифференцировку [Takahashi et al., 2005].

Индукцированная ретиноевой кислотой дифференцировка клеток острого промиелоцитарного лейкоза человека NB4 приводила к повышению уровня экспрессии белка *eIF4G2* [Harris et al., 2004; Ozpolat et al., 2007], а его нокаун подавлял дифференцировку этих клеток [Ozpolat et al., 2008]. Эмбриональные стволовые клетки человека с деплецией *eIF4G2* также не дифференцировались должным образом при обработке ретиноевой кислотой: наблюдался повышенный уровень экспрессии генов плюрипотентности и снижение уровня экспрессии маркеров дифференцировки. Аналогичная картина наблюдалась и для эмбрионидных тел (трехмерных агрегатов, образуемых в суспензии плюрипотентными стволовыми клетками), которые в норме подвергались спонтанной дифференцировке, но при деплеции *eIF4G2* продолжали экспрессировать гены плюрипотентности даже на 21-й день. Кроме того, эмбрионидные тела не демонстрировали гистологических признаков дифференцировки, таких как образование псевдоэпителия и характерных полостей [Yoffe et al., 2016].

eIF4G2 принимает участие и в дальнейшей дифференцировке уже частично специализированных клеток. Недавно было показано, что *eIF4G2* необходим для искусственной дифференцировки наивных Т-лимфоцитов в регуляторные Т-клетки [Volta et al., 2021]. Экспрессия *eIF4G2* усиливается во время миогенной дифференцировки, а его нокаун подавляет образование миотубов из культивируемых миобластов [Sanson et al., 2020], что объясняется исследователями наблюдаемым снижением трансляции мРНК *Usmg5* (*Up-regulated during skeletal muscle growth protein 5*; белок, ассоциированный с АТФ-синтазой и регулирующий ее количество в митохондриях). Другая группа исследователей

также наблюдала снижение трансляции USMG5 при нокдауне *eIF4G2* в плюрипотентных стволовых клетках человека [Yoffe et al., 2016]. BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) стимулирует транскрипцию мРНК *eIF4G2* в нейронах [Seo et al., 2019], а нокдаун *eIF4G2* в симпатических нейронах крысы приводит к снижению экспрессии белков β -актина, HIF-1 α (*Hypoxia-inducible factor 1 alpha*, транскрипционного фактора-регулятора ответа на гипоксию) и COX IV (*Cytochrome c oxidase subunit 4*) в аксонах, а также ухудшению их роста [Kar et al., 2013].

Позже исследователями из группы Маттиаса Громейера было продемонстрировано, что *eIF4G2* регулирует количество HIF-1 α не напрямую, а за счет обеспечения трансляции мРНК PHD2 (*Prolyl Hydroxylase Domain Protein 2*) [Bryant et al., 2018]. Физиологический ответ на гипоксию регулируется гидроксилированием HIF-1 α с помощью пролил-гидроксилазы PHD2 и последующим убиквитинилированием и деградацией. При гипоксии в целом происходит значительная репрессия трансляции, однако *eIF4G2* опосредует синтез PHD2, таким образом участвуя в защитном механизме ответа на гипоксию.

Также было показано, что во время оплодотворения ооцитов морского ежа некоторые мРНК, в том числе мРНК *eIF4G2*, активно транслируются и детектируются в полисомах, тогда как мРНК, кодирующие канонические факторы трансляции *eIF4E1*, *eIF4A*, *eIF4G1*, PABP и 4E-BP, в них не обнаруживаются [Chassé et al., 2019]. Это косвенно подтверждает необходимость *eIF4G2* для процессов эмбрионального развития, в том числе дифференцировки.

Таким образом, можно с уверенностью утверждать, что *eIF4G2* необходим для дифференцировки клеток и формирования мезодермы в процессе развития многих организмов. Однако остается неясным, является ли это основной функцией *eIF4G2* (если таковая вообще существует) и каков соответствующий молекулярный механизм".

9. Участие *eIF4G2* в трансляции некоторых мРНК

В поисках зависящих от *eIF4G2* процессов и условий, в которых этот фактор может быть активирован (а согласно бытовавшей до недавнего времени концепции в нормальных условиях белок не участвует в трансляции), были опробованы различные подходы: иммунопреципитация, секвенирование мРНК из полисом (то есть секвенирование фракции транслирующихся мРНК после центрифугирования в градиенте плотности сахарозы — полисомный профайлинг) [Mašek et al., 2011] и рибосомный профайлинг (секвенирование фрагментов мРНК, защищенных рибосомой) [Ingolia et al., 2009]. Данные методы были использованы для выявления мРНК, трансляция которых специфически зависит от *eIF4G2*, и поиска того, что их объединяет.

Исследователи из группы Ади Кимчи иммунопреципитировали оверэкспрессированный FLAG-p86 из клеток 293Т. Коиммунопреципитированные мРНК превращали в меченые кДНК и гибридизовали с чипом, содержащим кДНК около 200 генов человека, связанных с клеточным циклом и апоптозом. Так были выявлены 13 мРНК, для которых сигнал в опытном образце был как минимум в 2 раза выше, чем в контрольном. Эти мРНК принадлежали к семейству TNF или кодировали белки-участники сигнальных каскадов NF-κB и IGF. Одной из идентифицированных мРНК оказалась CDK1, связывание которой с eIF4G2 было в дальнейшем подтверждено и другими методами [Marash et al., 2008].

Сейчас понятно, что более информативным способом идентификации генов, трансляция которых требует определенного белка, является количественное секвенирование транскрибируемых мРНК в контрольных клетках и клетках с деплецией целевого белка в нормальных и/или стрессовых условиях (полисомный профайлинг). Такой подход позволяет выявить мРНК, эффективность трансляции которых существенно изменяется при снижении количества исследуемого белка. Исследователи из группы Ади Кимчи произвели полисомный профайлинг эмбриональных стволовых клеток человека дикого типа и с нокаутированным геном *eIF4G2* [Yoffe et al., 2016]). Ими были обнаружены 122 мРНК, эффективность трансляции которых снизилась при нокауте *eIF4G2* в полтора раза и более. Среди них были мРНК, кодирующие митохондриальные белки (в частности, компоненты комплексов электрон-транспортной цепи); белки, участвующие в трансляции, включая многие рибосомные белки и факторы сплайсинга мРНК, а также белки, вовлеченные в регуляцию эмбриогенеза и дифференцировки (HMGN3, ANAPC5, ZDHHC4). Позднее в группе Синъи Яманаки просеквенировали мРНК, которые коиммунопреципитировали за нативный eIF4G2 [Takahashi et al., 2020] и сравнили полученные ими результаты с результатами коиммунопреципитации мРНК с eIF4G2 с УФ-сшивкой [Yoffe et al., 2016]. Данные между этими двумя исследованиями пересекаются слабо: среди 122 мРНК мишеней [Yoffe et al., 2016] и 559 [Takahashi et al., 2020] общими оказались только 3 транскрипта, такие как MFF (*Mitochondrial fission factor*), MYCBP (*MYC Binding Protein*) и WWP1 (*WW Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 1*).

Группа исследователей под руководством Роберта Шнайдера при помощи секвенирования мРНК из полисом показала, что около 10% мРНК транскрибируются значительно хуже при индуцированном нокауте *eIF4G2* в клетках рака молочной железы человека MDA-MB-231 [de la Parra et al., 2018]. Эти гены в основном связаны с процессами клеточной гибели и выживания, клеточной подвижностью и репарацией ДНК.

Рибосомный профайлинг является заметно более точной, воспроизводимой и чрезвычайно информативной модификацией метода секвенирования мРНК из полисомной фракции после ультрацентрифугирования клеточного лизата в градиенте плотности сахарозы. При этом подходе полисомы обрабатываются рибонуклеазой, поэтому остаются неповрежденными и затем секвенируются только те фрагменты мРНК, которые защищены рибосомами. Таким образом, можно не только более точно определить эффективность трансляции мРНК, но и выявить распределение рибосом вдоль транскрипта. Это очень важно для изучения трансляционного контроля посредством uORF, поскольку трансляция uORF и основной рамки считывания могут регулироваться по-разному. Например, если трансляция uORF не зависит от eIF4G2 и является эффективной, то эта мРНК будет обнаруживаться в полисомной фракции, несмотря на снижение инициации трансляции на основной рамке считывания. Упомянутая уже группа Синъи Яманаки использовала рибосомный профайлинг для анализа МЭСК дикого типа и с нокаутом *eIF4G2* [Sugiyama et al., 2017]. В результате ими для дальнейшего анализа были отобраны 14 мРНК, трансляция которых значительно снижалась в отсутствие eIF4G2 (в том числе Map3k3 и Sos1), и 4 мРНК со значительно повышенной эффективностью трансляции (в том числе Sorbs2, Хаf1). При этом оверэкспрессия в *eIF4G2*^{-/-} МЭСК одной из трансляционных мишеней eIF4G2 — Map3k3 — приводила к дифференцировке клеток, что согласуется с приведенными выше данными о роли eIF4G2 в этом процессе. Впоследствии в нашей лаборатории была верифицирована зависимость трансляции мРНК с 5'НТО Map3k3 от eIF4G2 с использованием репортерной конструкции на основе мРНК люциферазы светлячка и трансфекции такой мРНК в клетки человека 293Т, Huh7 и мыши NIH/3T3 с нокаутом и нокдауном *eIF4G2* [Смирнова, 2022].

10. Взаимодействие eIF4G2 с факторами трансляции и другими белками

Для понимания механизма работы eIF4G2 важно знать, с какими белками он взаимодействует. Как и eIF4G1, eIF4G2 связывает обе изоформы eIF4A (eIF4A1 и eIF4A2) [Henis-Korenblit et al., 2000; Imataka et al., 1997a; Lee et al., 2006; de la Parra et al., 2018; Virgili et al., 2013], eIF3 [Henis-Korenblit et al., 2000; Imataka et al., 1997a; Liberman et al., 2008; de la Parra et al., 2018; Sugiyama et al., 2017], хорошо известные РНК-связывающие белки FXR1/2 [Bukhari et al., 2016; de la Parra et al., 2018; Sugiyama et al., 2017] и FMR1 [de la Parra et al., 2018; Sugiyama et al., 2017], но, в отличие от eIF4G1 (или значительно сильнее, чем eIF4G1), связывает eIF2 через его β -субъединицу [Bryant et al., 2018; Lee et al., 2006; Liberman et al., 2008; de la Parra et al., 2018], а также потенциальные считыватели

модифицированного N⁶-метиладенозина (m⁶A) – белки PRRC2A-C и IGF2BP1 [de la Parra et al., 2018; Sugiyama et al., 2017; Wu et al., 2019]. Остается неясным, связывается ли eIF4G2 с MAP-киназами MNK1 и MNK2: в ранних работах исследователи показали существование комплекса eIF4G2-MNK1 [Pyronnet et al., 1999], однако в более поздних работах воспроизвести это не удалось [Bryant et al., 2018]. Возможные роли некоторых из этих уникальных для eIF4G2 партнеров будут обсуждены ниже.

Связывание eIF2 важно для работы eIF4G2. Замена W2 домена eIF4G2 на W2 домен eIF4G1 приводит к нарушению функционирования eIF4G2 [Weber et al., 2022], а точечная мутация (E862K), препятствующая связыванию eIF2, делает eIF4G2 функционально неактивным [Bryant et al., 2018]. Взаимодействие eIF4G2 и eIF2 β коррелирует с активацией киназ MEK1/2 или CDK1 и фосфорилированием eIF4G2 (T508), а обработка ингибиторами MEK1/2 предотвращает как фосфорилирование eIF4G2, так и его связывание с eIF2. При этом мутантные варианты eIF4G2 (T508A или T508E) по-прежнему образуют комплекс с eIF2 β MEK1/2-зависимым образом, то есть взаимосвязь фосфорилирования eIF4G2 и его взаимодействия с eIF2 сложнее, чем можно было бы подумать [Bryant et al., 2018].

При анализе недавно полученной структуры 48S рибосомного комплекса (рис. 10) [Querido et al., 2020] может показаться, что взаимодействие eIF4G2 и eIF2 β стерически невозможно. Однако, в данном комплексе разрешена лишь часть eIF4G1 (а именно только его MIF4G домен), которая находится довольно далеко от межсубъединичной поверхности, с которой в свою очередь связывается eIF2. Логично предположить, что MIF4G домен eIF4G2 находится в 48S комплексе в положении, аналогичном таковому eIF4G1. При этом N-концевая часть eIF2 β , взаимодействующая с eIF4G2 [Lee et al., 2006], и линкерная последовательность между MIF4G и MA3 доменами eIF4G2, как предполагается, являются внутренне неупорядоченными и потенциально могут охватывать значительное расстояние вокруг 40S субъединицы. Таким образом, полученная структура 48S комплекса не противоречит возможности взаимодействия между eIF4G2 и eIF2 β в составе инициаторного комплекса, однако вопрос этот остается открытым.

Значительное сходство структур eIF4G1 и eIF4G2 предполагает, что они должны взаимодействовать с eIF3 одновременно. Уменьшение количества комплексов eIF4G1-eIF3 при ингибировании mTOR [Harris et al., 2006; Thoreen et al., 2012] и одновременное увеличение связывания eIF4G2 с eIF3 [Thoreen et al., 2012] согласуются с этим предположением. Кроме того, eIF4G1 связывает с, е и d субъединицы eIF3 [LeFebvre et al., 2006; Villa et al., 2013], а eIF4G2 также может быть сшит с eIF3d (сшиваются ли другие субъединицы eIF3 с eIF4G2, не проверяли) [de la Parra et al., 2018]. Положение разрешенной части eIF4G1 (MIF4G домена) в 48S инициаторном комплексе человека подтверждает ранее

полученные биохимические данные [Querido et al., 2020]. В частности, N-концевой домен eIF3d действительно находится вблизи MIF4G домена eIF4G1, в то время как основная часть eIF3d расположена на значительном расстоянии от этого места, а именно вблизи выхода мРНК из канала 40S субчастицы [Kratz et al., 2021; Querido et al., 2020].

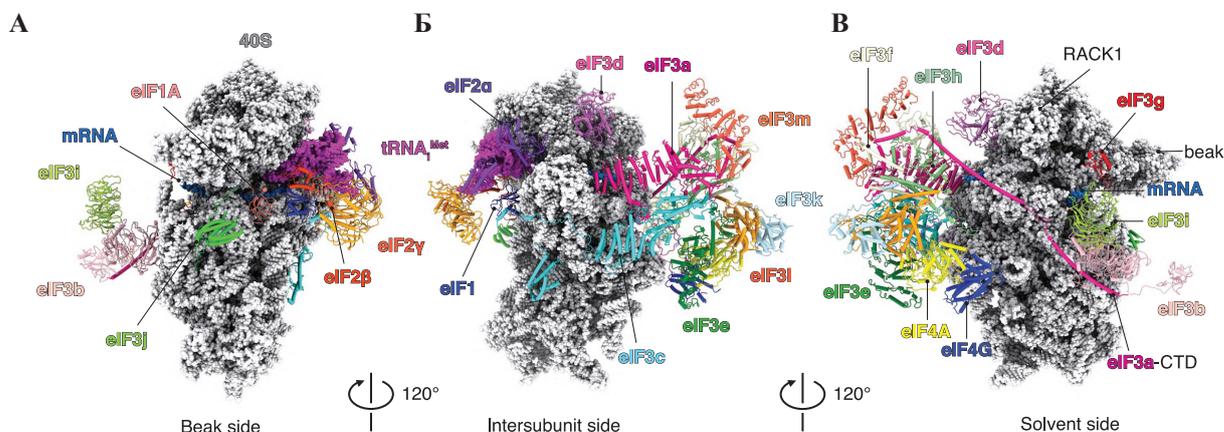


Рисунок 10. Структура 48S инициаторного комплекса человека в различных ориентациях. (А) Вид со стороны клюва. (Б) Вид со стороны межсубъединичной поверхности. (В) Вид со стороны поверхности, обращенной в раствор. eIF показаны в упрощенном виде вторичных структур. Мет-тРНК_i^{Met} и 40S представлены в виде пурпурной и серой сфер. Сахарофосфатный остов мРНК показан темно-синей поверхностью. CTD — С-концевой домен. В случае eIF4G1 разрешен только MIF4G домен. Заимствовано из [Querido et al., 2020].

Фактически, все предложенные механизмы действия eIF4G2 предполагают взаимоисключающие взаимодействия eIF4G1 и eIF4G2 с рибосомными комплексами, но необходимо отметить, что это никогда не было показано напрямую и не должно восприниматься как доказанный факт. В качестве контраргументов можно вспомнить, что неструктурированный линкер между MIF4G и MA3 доменами, взаимодействующий с eIF3e в случае eIF4G1 [LeFebvre et al., 2006], довольно слабо консервативен между eIF4G1 и eIF4G2 (рис. 2Б), и поэтому eIF4G2 может взаимодействовать с eIF3 другим образом. Кроме того, другой гомолог eIF4G, PAIP1 (*Poly(A)-Binding Protein-Interacting Protein 1*), связывается с eIF3g [Martineau et al., 2008]. Как и eIF3d, eIF3g растянут по поверхности малой субъединицы рибосомы, и его фрагменты связываются как с 40S вблизи места входа мРНК в канал (рис. 10В) [Querido et al., 2020; Simonetti et al., 2016], так и с eIF3i вблизи позиции MIF4G домена eIF4G1 [Simonetti et al., 2016]. В результате этого PAIP1 может образовывать тройственные комплексы PAIP1-eIF3-eIF4G1 [Martineau et al., 2008]. Таким образом, как координируется взаимодействие различных белков, обладающих MIF4G доменами, с eIF3, остается в настоящий момент неясным.

11. Предполагаемые механизмы участия eIF4G2 в инициации трансляции

К настоящему времени предложено четыре различных механизма участия eIF4G2 в инициации трансляции. Первые две модели предполагают, что eIF4G2 принимает участие в кэп-независимой трансляции, когда eIF4G2 сам связывается с мРНК и обеспечивает работу IRES-элемента или CITE соответственно. Две другие модели постулируют участие eIF4G2 в кэп-зависимой трансляции. При этом одни исследователи полагают, что eIF4G2 использует кэп-связывающие белки, отличные от eIF4E. В нашей же лаборатории было показано, что eIF4G2 может помогать eIF4G1 в канонической кэп-зависимой инициации.

11.1. eIF4G2 и кэп-независимая инициация трансляции

В самых первых работах, посвященных открытию eIF4G2, было высказано предположение, что белок участвует в кэп-независимой и, в частности, во внутренней инициации трансляции. Поразительное сходство eIF4G2 с С-концевым фрагментом eIF4G1, образующимся под действием 2А протеаз пикорнавирусов (так называемым фрагментом р100) (рис. 2А), а также невозможность “вылавливания” eIF4G2 из лизатов клеток посредством m^7G -сефарозы [Lieberman et al., 2008; Tcherkezian et al., 2014], как казалось, уверенно указывали на верность гипотезы об участии eIF4G2 в IRES-опосредованной трансляции клеточных мРНК (рис. 11А): протоонкогенного белка c-MYC [Henis-Korenblit et al., 2000], антиапоптотического белка XIAP [Henis-Korenblit et al., 2002; Hundsdorfer et al., 2005], инициатора апоптоза APAF1 [Henis-Korenblit et al., 2002; Lieberman et al., 2015; Nevins et al., 2003], самого eIF4G2 [Hundsdorfer et al., 2005; Lewis et al., 2008; Lieberman et al., 2015; Nevins et al., 2003], антиапоптотического белка c-IAP1 (HIAP2) [Hundsdorfer et al., 2005; Lewis et al., 2008], антиапоптотического белка BCL-2 [Lieberman et al., 2015; Marash et al., 2008], циклин-зависимой киназы CDK1 [Marash et al., 2008], протоонкогена p53 [Haizel et al., 2020; Weingarten-Gabbay et al., 2014], фактора роста фибробластов FGF-9 [Haizel et al., 2020], HMGN3 [Yoffe et al., 2016], uORF в мРНК C9ORF72 [Spijker van 't et al., 2022], ингибитор кальциневрин-NFAT сигналинга DSCR1.4 [Seo et al., 2019]. В большинстве описанных случаев, для изучения потенциальных IRES-элементов использовали трансфекцию бицистронных плазмид [Henis-Korenblit et al., 2000; Henis-Korenblit et al., 2002; Lewis et al., 2008; Marash et al., 2008; Nevins et al., 2003; Warnakulasuriyarachchi et al., 2004; Weingarten-Gabbay et al., 2014], однако ошибочность такого подхода, приводящая к артефактам и ложноположительным результатам, тогда еще не была полностью осознана, и поэтому выводы, сделанные на основании таких экспериментов, нельзя считать убедительными [Jackson, 2013; Andreev et al., 2009; Kozak,

2001a; Terenin et al., 2017]. В нашей лаборатории 5'НТО некоторых из перечисленных генов были протестированы гораздо более адекватным методом РНК-трансфекции – и наличие IRES-элементов в них не подтвердилось. Тем не менее, eIF4G2 действительно участвует в инициации трансляции по крайней мере некоторых из этих мРНК — ARAF1 и BCL2 [Смирнова, 2022].

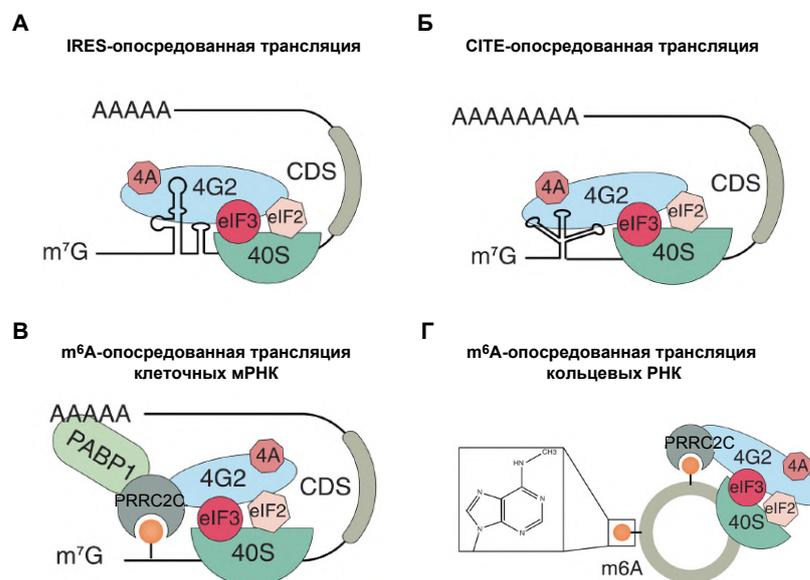


Рисунок 11. Предполагаемые механизмы участия eIF4G2 в кэп-независимой инициации трансляции. (А) Инициация трансляции, опосредованная IRES. eIF4G2 связывается с IRES-элементами, расположенными в 5'НТО мРНК-мишени. За счет взаимодействия eIF4G2-eIF4-40S, 43S предынициаторный комплекс рекрутируется вблизи стартового кодона основной открытой рамки считывания (CDS), иницируя трансляцию. (Б) Инициация трансляции, опосредованная CITE. eIF4G2 связывается с элементами CITE и затем через eIF3 рекрутирует 40S субчастицу к 5'НТО вблизи m7G-кэпа. Предынициаторный комплекс 43S сканирует 5'-конец мРНК в поисках стартового кодона CDS. (В) m6A-опосредованная инициация трансляции мРНК. К m6A в 5'НТО мРНК привлекается «читатель» этой модификации мРНК (m6A-ридер, предположительно, PRRC2C), который связывает eIF4G2 и PABP1, иницируя процесс трансляции. (Г) eIF4G2 и m6A-«читатель» узнают кольцевую РНК через m6A, модулируя ее трансляцию. Сокращения: CDS, кодирующая последовательность; 4G2, eIF4G2; m7G, N7-метилгуанозин; m6A, N6-метиладенозин, PABP1, поли(A)-связывающий белок 1. Заимствовано из [Liu et al., 2023].

Возможная роль eIF4G2 в IRES-опосредованной трансляции вирусных мРНК тоже не вполне ясна. Известно, что связывание домена V IRES-элемента полиовируса с eIF4G1 характеризуется константой диссоциации $K_D = 75$ нМ [Avanzino et al., 2018], а весь IRES-элемент близкородственного ему вируса Коксаки В3 (CBV3, *Coxsackie B virus*) связывается с eIF4G1 с $K_D = 2$ нМ и с eIF4G2 с $K_D = 10$ нМ [Dave et al., 2019]. В соответствии с этим, деплеция eIF4G2 снижает активность трансляции, опосредованной IRES-элементом CBV3 в клетках, и препятствует репликации вируса. Отражает ли это разницу в механизмах работы в остальном очень похожих IRES-элементов 1-го типа или какие-либо различия в

условиях эксперимента, пока не известно. Более того, 2А протеаза СBV3 вируса расщепляет не только eIF4G1 [Chau et al., 2007], но и eIF4G2 в районе G₄₃₄ аминокислотного остатка между MIF4G и MA3 доменами [Hanson et al., 2016], но физиологическая роль такого протеолиза к настоящему моменту не установлена. Стоит, однако, отметить, что деплеция eIF4G2 в клетках 293Т не приводит к подавлению трансляции близкородственного IRES-элемента полиовируса (наши неопубликованные данные).

Кроме того, исследователи постулировали участие eIF4G2 в IRES-опосредованной инициации трансляции на основании того, что нокдаун *eIF4G2* подавлял трансляцию моноцистронных репортеров, имеющих на 5'-конце стабильную шпильку, которая препятствует связыванию малой субчастицы рибосомы с 5'-концом мРНК [Yoffe et al., 2016]. Однако неспособность таких мРНК использовать традиционный механизм сканирования, зависящий от 5'-конца, считалась само собой разумеющейся и не проверялась напрямую путем сравнения с бицистронными мРНК-репортерами, поэтому однозначные выводы из этих данных сделать также нельзя.

Интересно, что и eIF4G2, и наличие m⁶A-модификации мРНК необходимы для трансляции по крайней мере некоторых кольцевых молекул РНК (рис. 11Г), которые, как кажется, могут транслироваться только через механизм внутренней инициации [Di Timoteo et al., 2020; Yang et al., 2017]. Действительно, посадка eIF4G1 [Chen et al., 2023; De Gregorio et al., 1999; Terenin et al., 2013] или eIF4G2 [Nousch et al., 2007] внутрь 5'НТО мРНК может приводить к довольно низкому, но, тем не менее, значимому уровню внутренней инициации, а несколько взаимодействующих с eIF4G2 белков, таких как FMR1, IGF2BP1 и PRRC2A, как недавно было показано, являются «читателями» m⁶A-модификации (m⁶A-ридерами) (рис. 11В) [Bohlen et al., 2023; Huang et al., 2018; Tan et al., 2023; Wu et al., 2019].

Если рассматривать кэп-независимую трансляцию моноцистронных клеточных мРНК, то прямое связывание eIF4G2, вероятно, должно приводить к CITE-опосредованной инициации (рис.11Б). Вполне возможно, что это случай мРНК DSCR1.4, трансляция которой в значительной мере является кэп-независимой и при этом требует eIF4G2 [Seo et al., 2019]. Многие другие мРНК непосредственно связывают eIF4G2 [David et al., 2022; Haizel et al., 2020; Marash et al., 2008; Seo et al., 2019; Weber et al., 2022; Weingarten-Gabbay et al., 2014; Yoffe et al., 2016], и в большинстве работ такое связывание интерпретируется как предпосылка для существования внутренней инициации при участии eIF4G2. В этой связи стоит отметить, что далеко не все мРНК, связывающие в описанных экспериментах eIF4G2, нуждаются в этом белке для своей трансляции, и не каждая требующая eIF4G2 для своей трансляции мРНК связывает eIF4G2 напрямую [David et al., 2022].

11.2 Неканонические механизмы кэп-зависимой инициации трансляции с участием eIF4G2

С приходом понимания того, что клеточные IRES-элементы вряд ли сильно распространены в мРНК млекопитающих, трансляционному сообществу пришлось переосмыслить и роль белков, которые, как считалось принимают участие в их работе. Были предложены два неканонических механизма кэп-зависимой инициации трансляции с участием eIF4G2. Первый из них был обнаружен в ходе изучения стимуляции трансляции некоторыми микроРНК (что само по себе удивительно, так как в норме микроРНК подавляют трансляцию) [Mortensen et al., 2011; Vasudevan et al., 2007]. Это происходит только в G₀-фазе клеточного цикла (или в G₀-подобных ооцитах на IV стадии созревания), когда кэп-зависимая инициация трансляции значительно подавлена из-за инактивации mTOR, а микроРНК индуцируют деаденилирование мРНК с помощью поли(А)-специфической рибонуклеазы (деаденилазы) PARN (*Poly(A)-specific ribonuclease*). Позже было установлено, что eIF4G2 входит в состав этого микроРНК-белкового комплекса вместе с белками FXR1 и AGO2 (ключевым белком РНК-интерференции) в покоящихся (G₀) клетках млекопитающих и в незрелых ооцитах лягушки *Xenopus laevis* [Bukhari et al., 2016]. При этом связывание m⁷G-кэпа в этом механизме осуществляется деаденилазой PARN (рис. 12А), тогда как в процессе РНК-интерференции микроРНК в комплексе с AGO2 обеспечивают ингибирование трансляции мРНК, а затем с помощью PARN происходит индукция распада мРНК по механизму деаденилирования и последующего декэпирования в Р-тельцах (*P-bodies*). Если подобный комплекс микроРНК-AGO2-PARN может стимулировать трансляцию, то, скорее всего, активность декэпирующих ферментов в этот момент должна быть выключена. Так ли это на самом деле и какой белок определяет судьбу комплекса микроРНК-AGO2-PARN-мРНК, пока не установлено. Поли(А)-хвост обратимо укорачивается одновременно с инактивацией mTOR в ходе суточного цикла дрозофилы, а деплеция eIF4G2 приводит к удлинению циркадного цикла у дрозофилы, вызванного уменьшением экспрессии белка PER (*Period*) [Bradley et al., 2012]. Эти результаты позволяют предположить, что eIF4G2 может обеспечивать эту регуляцию схожим образом.

Другим партнером eIF4G2 в обсуждаемом механизме является FXR1 (*Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1*). Примечательно, что FXR1 неоднократно детектировался в комплексе с eIF4G2 при поиске белков-партнеров, но то же самое характерно и для eIF4G1 [de la Parra et al., 2018; Sugiyama et al., 2017]. Более того, FXR1 является одним из основных компонентов стресс-гранул [Ivanov et al., 2019], а eIF4G1 и eIF4G2 также обнаруживаются в стресс-гранулах [Anders et al., 2018; Jain et al., 2016].

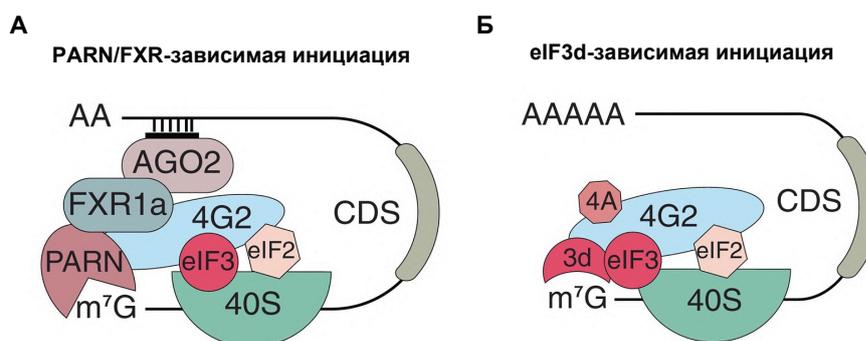


Рисунок 12. Предполагаемые механизмы неканонической кэп-зависимой инициации трансляции. (А) PARN/FXR-зависимая инициация трансляции, опосредованная микроРНК. МикроРНК индуцирует деаденилирование мРНК под действием деаденилазы PARN, которая также связывается с m^7G -кэпом и находится в комплексе с AGO2, FXR1 и eIF4G2. Предположительно, eIF4G2 облегчает дальнейшее сканирование. (Б) eIF3d-зависимая инициация трансляции. eIF3 взаимодействует со специальной структурой в 5'НТО мРНК, eIF3d субъединица специфически связывает m^7G -кэп и eIF4G2, который участвует в последующем сканировании. Сокращения: CDS, кодирующая последовательность; 4G2, eIF4G2; 3d, eIF3d; m^7G , N7-метилгуанозин. Заимствовано из [Liu et al., 2023].

Другой предполагаемый механизм – eIF3d-зависимое привлечение 40S рибосомной субъединицы к m^7G -кэпу (рис. 12Б). Известно, что eIF3 специфически связывается с некоторыми 5'НТО (например, мРНК JUN), а его субъединица eIF3d, возможно, связывается с m^7G -кэпом на 5'-конце этих мРНК [Lee et al., 2016]. Здесь стоит заметить, что напрямую это связывание никогда не было показано экспериментально. Этот случай принципиально отличается от канонической кэп-зависимой трансляции, в которой первичным актом является взаимодействие eIF4E с m^7G -кэпом и последующая сборка предынициаторного комплекса на 5'-конце мРНК. В данном случае первичным узнаванием, скорее всего, является не взаимодействие eIF3d с m^7G -кэпом, а взаимодействие целого eIF3 с 5'НТО мРНК JUN. Можно предположить, что в результате этого взаимодействия m^7G -кэп оказывается вблизи субъединицы eIF3d. Таким образом, инициация трансляции мРНК JUN оказывается кэп-зависимой [Lee et al., 2015], и поэтому соответствующий механизм не подходит под определение CITE. Тем не менее, когда в группе Роберта Шнайдера обнаружили, что eIF3d сшивается с eIF4G2 [de la Parra et al., 2018], возникла модель кэп-зависимой инициации трансляции, опосредованной eIF3d (рис. 12Б). Согласно этой модели, eIF3d распознает m^7G -кэп и приводит к нему eIF4G2, а не eIF4G1 [de la Parra et al., 2018]. В отличие от канонического механизма, когда eIF3 сначала связывается с 40S субъединицей рибосомы, в данном случае eIF4G2 и eIF3 могут образовывать рибонуклеопротеиновый комплекс, который специфически приносит малую субъединицу рибосомы к мРНК. Предложенная модель предполагает, что eIF3d/eIF4G2-зависимая инициация трансляции происходит при ингибировании eIF4E-зависимой трансляции. Например, двойной нокдаун

eIF4G2 и *eIF3d* на фоне оверэкспрессии конститутивно активного 4E-BP1 (что является не вполне физиологичным состоянием клетки) специфически снижает синтез некоторых клеточных белков (JUN, CDK12 и MMP1) в клетках рака груди человека MDA-MB-231 [de la Parra et al., 2018].

В дальнейшем та же группа ученых исследовала роль *eIF4G2* в дифференцировке регуляторных Т-клеток в условиях подавления *eIF4E*-зависимой трансляции, что является естественным состоянием этих клеток перед их активацией [Volta et al., 2021]. По сложившейся традиции, эти исследователи вновь предположили участие комплекса *eIF3d/eIF4G2* в инициации трансляции в этих условиях. Хотя вклад *eIF4G2* в трансляцию действительно увеличивается в условиях недостатка *eIF4G1* или при инактивации mTOR [Смирнова, 2022; Ramírez-Valle et al., 2008], точная роль *eIF3d* в этом процессе остается неясной. Тем не менее, данная работа доказывает необходимость *eIF4G2* для дифференцировки регуляторных Т-клеток и трансляции соответствующих специфических мРНК в условиях глобального подавления синтеза белка.

Недавно ученые из этой же группы показали, что нокдаун *eIF4G2* в клетках рака груди TNBC приводит к снижению количества белков, участвующих в эпителиально-мезенхимальном переходе (Vimentin, SNAIL1, SNAIL2, N-Cad, MMP1, ZEB1, TWIST1), в метастазировании клеток и обеспечивающих устойчивость к апоптозу [Alard et al., 2023]. Авторы интерпретируют наблюдаемые эффекты вовлечением комплекса *eIF4G2/eIF3d* в трансляцию соответствующих мРНК, однако строго не показывают роль *eIF3d* в этом процессе. Отметим, что нокдаун *eIF3d* в этих клетках приводит к снижению количества только SNAIL2, но не других перечисленных выше белков. Таким образом, учеными из этой группы найдено множество потенциальных мишеней *eIF4G2*, однако участие этого гомолога *eIF4G* в трансляции соответствующих мРНК еще предстоит подтвердить с помощью ортогональных подходов. Также необходимо охарактеризовать роль *eIF3d* в механизме кэп-зависимой инициации этих мРНК, так как предложенный механизм до сих пор является во многом умозрительным и основанным на предположениях, а не на прямых экспериментах.

Ранее в нашей лаборатории был произведен рибосомный профайлинг клеток NIH/3T3 с нокаутом *eIF4G2* и клеток 293T с нокдауном этого исследуемого гена [Смирнова, 2022]. Полученные данные мы сравнили с результатами, опубликованными другими исследователями [Sugiyama et al., 2017], и во многом случайным образом выбрали мРНК, трансляция которых падает в два и более раз при деpleции *eIF4G2*. С помощью репортерных конструкций, содержащих исследуемые 5'НТО, мы подтвердили зависимость трансляции некоторых из этих мРНК от *eIF4G2*. Таким образом, мы ранее верифицировали

следующие мРНК-мишени eIF4G2: APAF1, BCL-2, CES2, CCNI, PPFIA4 человека; Maf1, Map3k3, Pcbp2, Stard7 мыши. При этом большинство исследуемых мРНК транслируются кэп-зависимо при нокдауне *eIF4G2* в клетках человека 293Т и в принципе характеризуются высокой кэп-зависимостью [Смирнова, 2022], а также чувствительностью к инактивации eIF4E, вызванной PP242-опосредованным ингибированием киназы mTOR [Смирнова, 2022] или оверэкспрессией 4E-ВР1 [Weber et al., 2022]. Таким образом было показано, что eIF4G2 может участвовать в канонической eIF4E/кэп-зависимой трансляции, однако конкретная роль этого белка оставалась неясной.

Более того, степень зависимости трансляции мРНК от eIF4G2 не коррелирует с их чувствительностью к действию ингибитора mTOR — PP242. Большинство мишеней eIF4G2 оказались столь же чувствительными к PP242, сколь и контрольные репортеры, в то время как трансляция некоторых других мРНК (например, PPFIA4 и Maf1) ингибируется при инактивации mTOR слабо. Наблюдаемый феномен можно было бы объяснить привлечением малой субъединицы рибосомы к таким мРНК по механизму CITE. Однако даже если это так, то предполагаемые CITE в 5'НТО PPFIA4 и Maf1 взаимодействуют, скорее, с eIF4G1, а не с eIF4G2. В противном случае эти две мишени демонстрировали бы особенно сильное снижение трансляции при деплеции eIF4G2 в присутствии PP242, однако этого не наблюдалось [Смирнова, 2022].

В ходе данной работы мы предполагали подтвердить зависимость трансляции eIF4G2 потенциальных мРНК-мишеней, найденных с помощью рибосомного профайлинга, исследовать детерминанты зависимости трансляции этих мРНК от eIF4G2, а также более подробно изучить механистические детали кэп-зависимой трансляции исследуемых мРНК.

Результаты и их обсуждение

1. Валидация мРНК мишеней eIF4G2

Ранее в нашей лаборатории было показано, что трансляция мРНК с 5'НТО ARAF1, CCNI, PPFIA4 человека и Maf1, Map3k3, Pcbp2, Stard7 мыши в клетках 293Т зависит от eIF4G2 [Смирнова, 2022]. Для дополнительной валидации трансляционных мишеней eIF4G2 мы трансфицировали клетки гепатокарциномы человека Huh7 исследуемыми репортерными мРНК (рис. 13). мРНК, трансляция которых не зависела от наличия eIF4G2 в клетках 293Т, использовали в качестве контроля. Эти мРНК содержали 5'НТО β-глобина, β-актина, HSPA2, TGFβ1, PCBP1, обоих вариантов транскриптов hnRNPК, EPAS1 или 5'НТО из мРНК-вакцин Moderna и BioNTech против SARS-CoV2. Все исследуемые репортерные мРНК, которые ранее были чувствительны к деплеции eIF4G2 в клетках 293Т, оказались чувствительны к нокдауну этого белка и в клетках Huh7. На Рисунках 13 и 14 также представлены результаты для выявленных новых мРНК-мишеней eIF4G2 (AKT2, SMAD1, UCP2, MYCBP2, PHD2), речь о которых пойдет ниже.

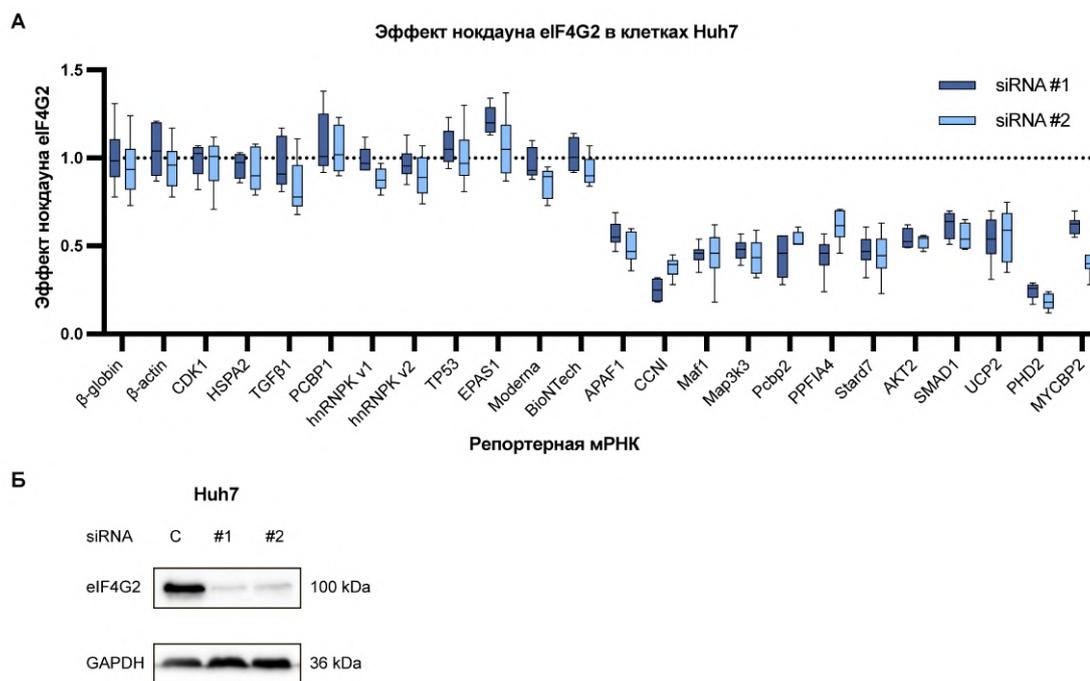


Рисунок 13. Валидация трансляционных мишеней eIF4G2 в клетках Huh7. Протестированы ранее обнаруженные нами eIF4G2-зависимые мРНК с 5'НТО ARAF1, CCNI, Maf1, Map3k3, Pcbp2, PPFIA4, Stard7. Верифицированы новые мишени eIF4G2: мРНК с 5'НТО AKT2, SMAD1, UCP2, PHD2, MYCBP2. (А) Репортерные мРНК с исследуемыми 5'НТО трансфицировали в клетки Huh7, обработанные контрольной siRNA или siRNA против eIF4G2. Все репортеры были котрансфицированы с референсной репортерной мРНК с 5'НТО β-глобина и кодирующей люциферазы Fluc или Nluc в зависимости от того, какую люциферазу кодировала исследуемая репортерная мРНК. Для всех мишеней eIF4G2, β-глобина и репортеров CDK1 число биологических повторностей превышает 10. Для eIF4G2-независимых мРНК $n \geq 5$. (Б) Вестерн-блот анализ нокдауна eIF4G2 в клетках Huh7, GAPDH детектирован как контроль нанесения.

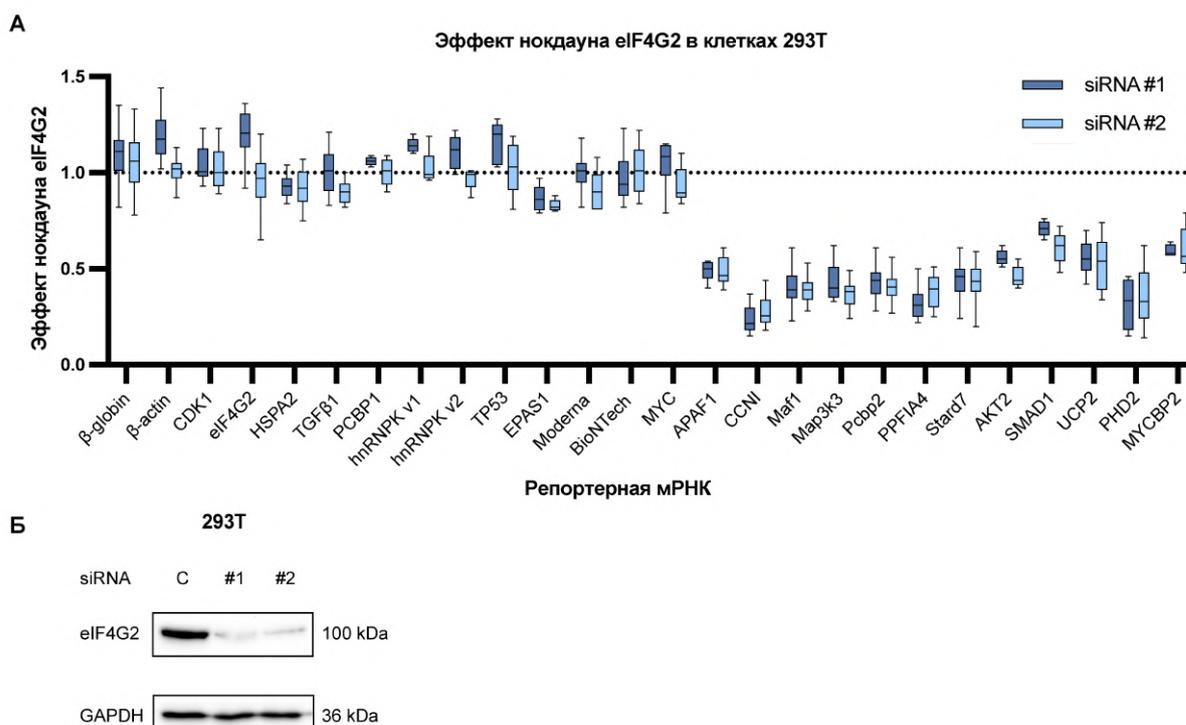


Рисунок 14. Валидация новых трансляционных мишеней eIF4G2 в клетках 293Т. В качестве положительного контроля показаны ранее обнаруженные нами eIF4G2-зависимые мРНК с 5'НТО APAF1, CCNI, Maf1, Map3k3, Pcbp2, PPFIA4, Stard7. Верифицированы новые мишени eIF4G2: AKT2, SMAD1, UCP2, PHD2, MYCBP2. (А) Репортерные m^7G -этированные и полиаденилированные мРНК с исследуемыми 5'НТО трансфицировали в клетки 293Т, обработанные контрольной siRNA или siRNA против eIF4G2. Данные представлены в виде отношения нормализованной экспрессии репортеров в клетках с нокдауном eIF4G2 к контрольным клеткам. В отличие от других рисунков, этот включает данные всех соответствующих экспериментов. Для всех мишеней eIF4G2, β -глобина и репортеров CDK1 число биологических повторностей превышает 15. Для eIF4G2-независимых мРНК $n \geq 5$. (Б) Вестерн-блот анализ нокдауна eIF4G2 в клетках 293Т, GAPDH детектирован как контроль нанесения.

Поскольку eIF4G2 участвует в трансляции лишь некоторых мРНК, необходимо было найти причины, определяющие потребность этих мРНК в eIF4G2. Мы продолжили поиск и валидацию новых мРНК-мишеней eIF4G2. Ранее методом количественной ПЦР было показано, что при нокдауне eIF4G2 в клетках HeLa уменьшается количество PHD2, а также что кодирующей этот белок мРНК становится меньше в полисомах, однако роль 5'НТО этой мРНК не была исследована [Bryant et al., 2018]. Также ранее было обнаружено, что мРНК MYCBP2 человека коиммунопреципитируется с eIF4G2 [Takahashi et al., 2020]. Поэтому было решено протестировать зависимость трансляции соответствующих репортерных мРНК от eIF4G2 в клетках 293Т. Действительно, эффективность трансляции репортерных мРНК с 5'НТО PHD2 и MYCBP2 значительно снижается при деплеции eIF4G2 (рис. 13, 14).

В литературе существуют данные о связывании eIF4G2 с предполагаемыми IRES-элементом в мРНК TP53 [Haizel et al., 2020; Weingarten-Gabbay et al., 2014], CDK1 [Marash

et al., 2008] и MYC [Henis-Korenblit et al., 2000] и обеспечении таким образом кэп-независимой трансляции этих мРНК. Трансфекция репортерными мРНК, а не плазмидными ДНК в настоящий момент является золотым стандартом изучения потенциальных IRES-элементов. С помощью трансфекции соответствующих мРНК, нами ранее было показано, что мРНК с 5'НТО TP53, CDK1 и MYC транслируются по кэп-зависимому механизму, так как эффективность их трансляции значительно снижается при ингибировании mTOR [Смирнова, 2022]. В настоящей работе мы тестировали эти мРНК на предмет зависимости их трансляции от eIF4G2 в клетках 293Т и Huh7. Мы показали, что мРНК с 5'НТО TP53, CDK1 и MYC не являются трансляционными мишенями eIF4G2 (рис. 13А, 14А).

Располагая достаточно обширным списком мРНК, трансляция которых чувствительна и нечувствительна к eIF4G2, мы проанализировали длину их 5'НТО, GC-состав и наличие uAUG кодонов (*upstream AUG*) (Приложение 1, рис. 45; Приложение 2). Бросается в глаза, что почти все мишени eIF4G2 содержат хотя бы один uAUG кодон, а многие из них являются GC-богатыми (GC>65%). Исключением является мРНК Pcbp2, чья 5'НТО очень обогащена GC-нуклеотидными остатками (73% GC: 55% C, 18% G), но не содержит uAUG кодонов. 5'НТО мРНК PHD2 является еще более GC-богатой (77% GC: 37% G; 40% C), но содержит три uAUG кодона. Дальнейшая работа была посвящена поиску детерминант зависимости трансляции мРНК от eIF4G2.

2. Участие eIF4G2 в eIF4E/кэп-зависимой трансляции

2.1. Участие eIF4G2 в трансляции А-кэпированных мРНК

В ранних работах высказывалось предположение, что eIF4G2 участвует в кэп-независимой и, в частности, во внутренней инициации трансляции. В таких экспериментах использовали А-кэпированные мРНК, на 5'-конце которых находится ArppG кэп-аналог, предотвращающий деградацию мРНК, однако не способный связывать eIF4E. Добавление eIF4G2 стимулировало трансляцию А-кэпированных моноцистронных мРНК *in vitro* в экстракте HeLa [Hundsdoerfer et al., 2005] или RRL [Lieberman et al., 2015]. Отметим, что все исследованные таким образом мРНК имели относительно длинные 5'НТО. Мы решили проверить, как влияет eIF4G2 на трансляцию А-кэпированных репортерных мРНК с различными 5'НТО, которые в m⁷G-кэпированной форме чувствительны к деплеции eIF4G2 (мРНК-мишени eIF4G2) или которые транслируются eIF4G2-независимо. Истинные трансляционные мишени eIF4G2 нуждаются в eIF4G2 вне зависимости от того, несут ли они нефункциональный А-кэп или полноценный m⁷G-кэп (рис. 15В, Г).

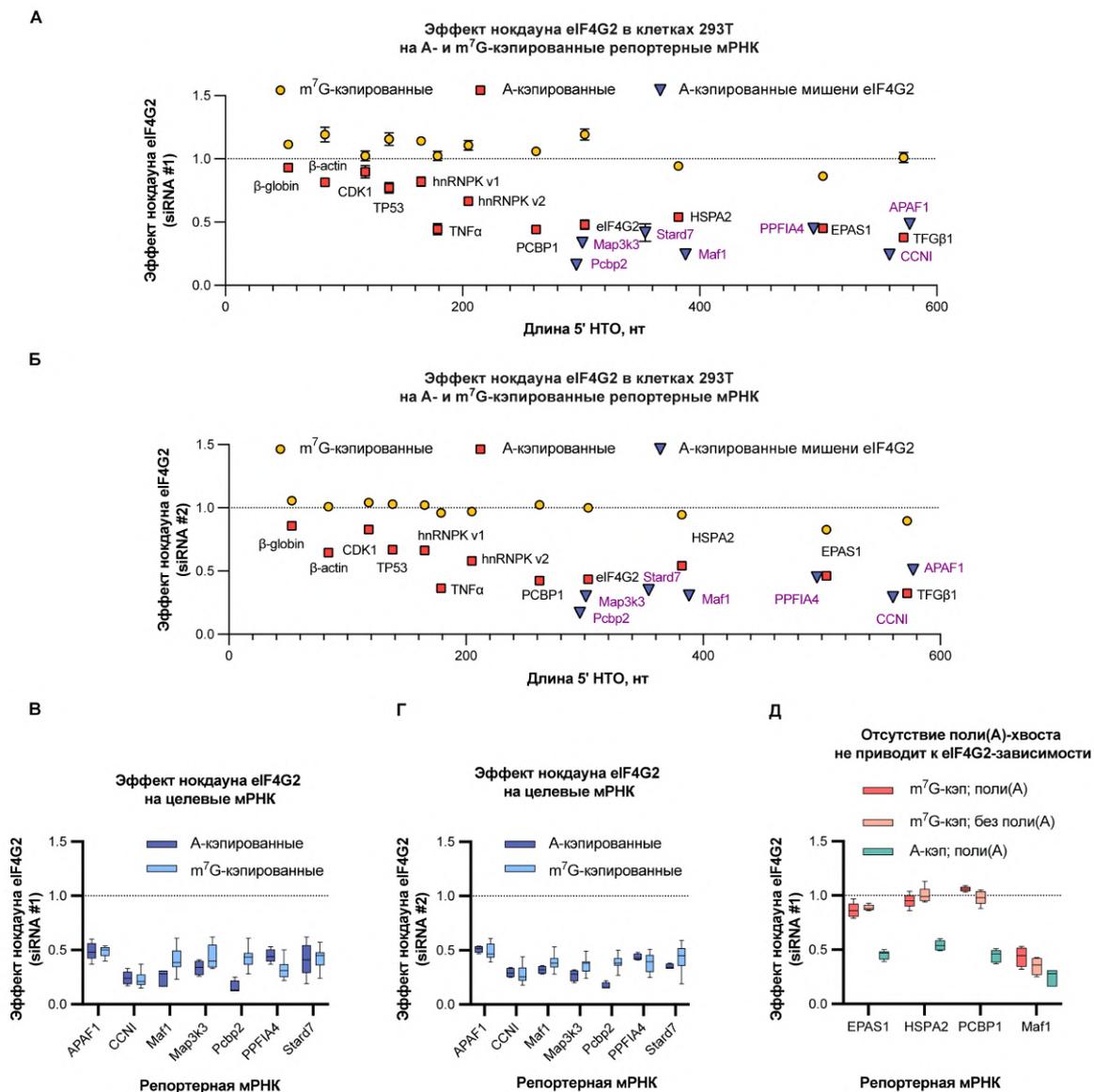


Рисунок 15. Отсутствие взаимодействия между m⁷G-кэпом и eIF4F делает трансляцию А-кэпированных мРНК с длинными 5'НТО eIF4G2-зависимой. (А) Клетки 293Т с деплецией eIF4G2 с помощью siRNA #1, трансфицировали указанными репортерными мРНК. Показан эффект нокдауна eIF4G2 в зависимости от длины 5'НТО. Желтые кружки — m⁷G-кэпированные мРНК, красные квадраты — А-кэпированные мРНК, темно-синие треугольники — А-кэпированные мРНК-мишени eIF4G2. В отличие от остальных рисунков, данные представлены в виде ящиков с усами в виде стандартной ошибки среднего для удобства восприятия. (Б) Панель Б аналогична панели А, но для нокдауна eIF4G2 использовали другую siRNA. (В) Сравнение эффекта нокдауна eIF4G2 (с помощью siRNA #1) на мРНК-мишени в А-кэпированной или m⁷G-кэпированной формах. Данные представлены в виде отношения нормализованной экспрессии репортеров в клетках с деплецией eIF4G2 к контрольным клеткам. (Г) Панель Г аналогична панели В, но для нокдауна eIF4G2 использовали другую siRNA. (Д) Неспособность мРНК образовать замкнутую петлю не приводит к необходимости использования eIF4G2 для инициации трансляции. Тестировали репортеры EPAS1, HSPA2 и PCBP1 с поли(А)-хвостом или без него, в А- и m⁷G-кэпированном виде в клетках 293Т с нокдауном eIF4G2 (siRNA #1) и в контрольных клетках. Данные представлены в виде отношения нормализованной экспрессии репортеров в клетках с деплецией eIF4G2 к нормализованной экспрессии в контрольных клетках.

При этом многие мРНК, которые в естественных условиях не нуждаются в eIF4G2 (TP53, hnRNPК (варианты v1 и v2), TNF α , PCBP1, eIF4G2, HSPA2, EPAS1, TGF β 1) начинают нуждаться в этом белке, будучи А-кэпированными (рис. 15А, Б). Наблюдаемый эффект не является следствием разрушения замкнутой петли мРНК, поскольку неполиаденилированные варианты соответствующих мРНК в m⁷G-кэпированном виде не ставились чувствительными к деплеции eIF4G2 (рис. 15Д). Таким образом, анализ А-кэпированных мРНК не является адекватным подходом при верификации трансляционных мишеней eIF4G2, которые, как и все другие мРНК, существуют в клетке в m⁷G-кэпированном виде. В то же время, трансляция моноцистронной m⁷G-кэпированной мРНК ARAF1 является eIF4G2-зависимой (рис. 15В, Г) и происходит кэп-зависимо [Смирнова, 2022], хотя исходно эта мРНК идентифицирована как мишень eIF4G2 именно на основании анализа А-кэпированных репортеров.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что вклад eIF4G2 в трансляцию своих мРНК-мишеней остается неизменным, независимо от того, несут они А-кэп или полноценный m⁷G-кэп (рис. 15В, Г). Если допустить, что некэпированные мРНК сканируются с 5'-конца [De Gregorio et al., 1999; Gunnery et al., 1997; Terenin et al., 2013], то следует заключить, что на А-кэпированных мРНК eIF4G2 работает во время сканирования, поскольку сама по себе длина 5'НТО, как кажется, не может определять способ привлечения рибосомы. Это указывает на то, что eIF4G2, вероятно, не участвует в привлечении рибосом к 5'-концу мРНК. Этот результат может объяснить, почему мРНК с более длинными 5'НТО (HIV1, TGF β 1, HSPA2) становятся восприимчивыми к деплеции eIF4G2 в условиях ингибирования mTOR [Смирнова, 2022].

2.2. Роль eIF3d в трансляции eIF4G2-зависимых мРНК

Большинство трансляционных мишеней eIF4G2 обладают высокой кэп-зависимостью [Смирнова, 2022], а также чувствительны к инактивации eIF4E при ингибировании киназы mTOR [Смирнова, 2022] или оверэкспрессии конститутивно активного мутанта 4E-BP1 [Weber et al., 2022]. Однако существуют данные, хотя и не вполне прямые, о том, что eIF3d также может связывать кэп [Lampert et al., 2020; Lee et al., 2016] и, в частности, обеспечивать кэп-зависимую трансляцию с участием eIF4G2 [de la Parra et al., 2018]. Для выяснения роли eIF3d в трансляции исследуемых мишеней eIF4G2 мы провели нокдаун *eIF3d* отдельно или вместе с eIF4G2 в клетках 293Т (рис. 16). На Рисунке 16 также приведены данные для мРНК с 5'НТО AKT2, SMAD1, и UCP2, трансляция которых, как было установлено позднее, зависит от eIF4G2. Зависимость трансляции от eIF4G2 не изменилась ни при деплеции eIF3d, ни при инактивации mTOR (рис. 16Б).

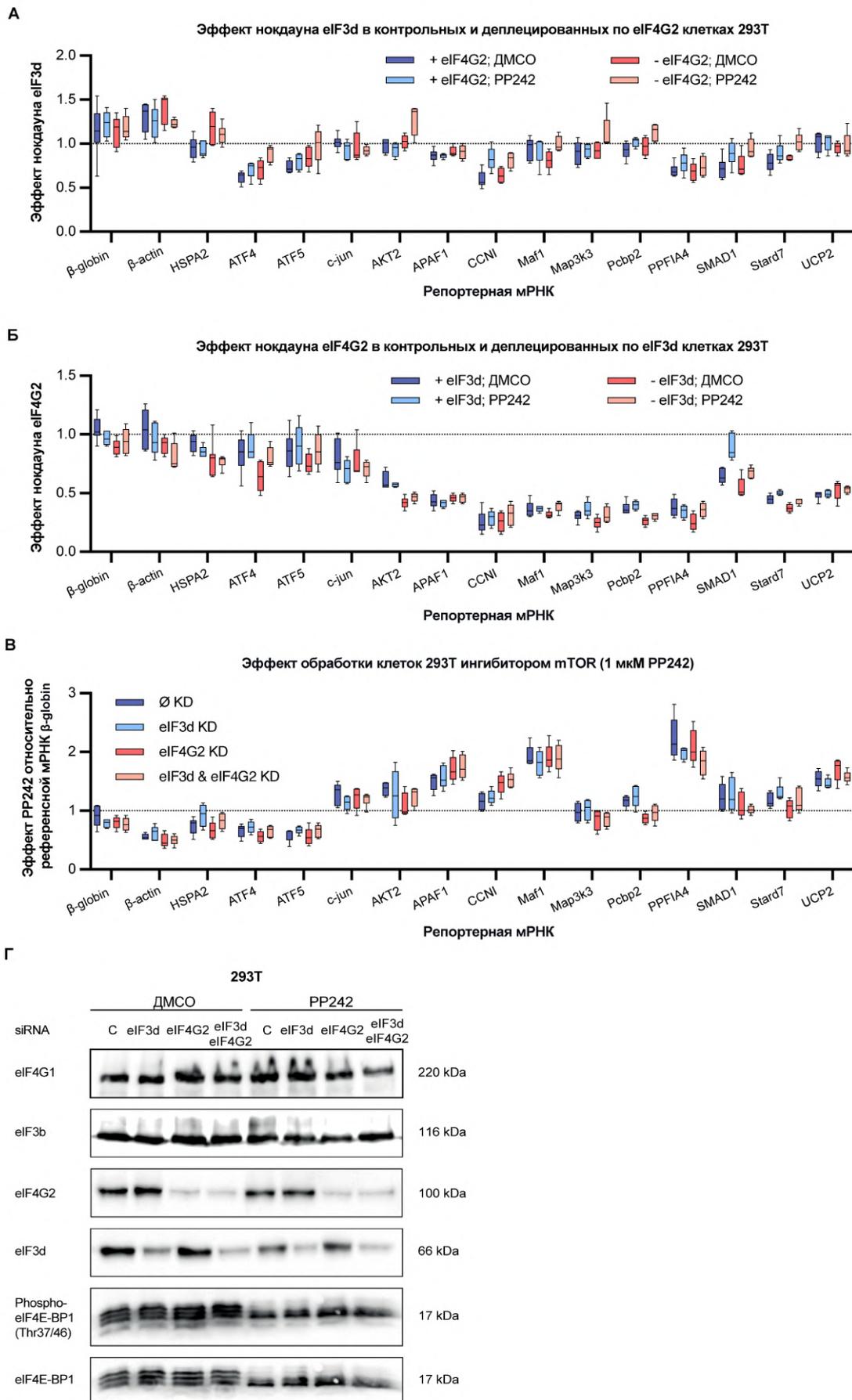


Рисунок 16. Нокдаун eIF3d и eIF4G2 в клетках 293Т. Деpleтировали eIF3d, или eIF4G2 (siRNA #2) или оба этих белка в клетках 293Т. Перед трансфекцией мРНК клетки

предварительно обрабатывали 1 мкМ PP242 или ДМСО. Пунктирная линия на отметке 1 соответствует ответу, идентичному поведению референсного репортера β -глобина (отсутствие эффекта нокдауна). (А) Эффект нокдауна *eIF3d* при наличии или при деплеции *eIF4G2*, а также при предварительной обработке клеток ингибитором *mTOR* (1 мкМ PP242) или ДМСО. Данные представлены в виде отношения нормализованной экспрессии репортеров в клетках с нокдауном *eIF3d* к контрольным клеткам (обозначены как «+ *eIF4G2*») и в клетках с двойным нокдауном *eIF3d* и *eIF4G2*, к контрольным клеткам (обозначены как «- *eIF4G2*») после обработки ДМСО или PP242. (Б) Эффект нокдауна *eIF4G2* при наличии или отсутствии *eIF3d*, а также при предварительной обработке клеток либо PP242, либо ДМСО. Как и на панели А, данные представлены в виде отношения нормализованной экспрессии репортера в клетках с нокдауном *eIF4G2* к контрольным клеткам (обозначены как «+ *eIF3d*») и в клетках с двойным нокдауном *eIF3d* и *eIF4G2* к контрольным клеткам (обозначены как «- *eIF3d*») при ДМСО или PP242. (В) Данные из панелей А и В были пересчитаны так, чтобы показать эффект обработки PP242 на эффективность трансляции репортерных мРНК в контрольных клетках (контрольный нокдаун обозначен \emptyset KD) и в клетках с деплецией *eIF3d* и *eIF4G2* (*eIF3d* KD, *eIF4G2* KD и двойной нокдаун *eIF3d* и *eIF4G2*). Делили нормализованную экспрессию репортеров в клетках, обработанных PP242, на экспрессию в клетках, обработанных ДМСО. Пунктирная линия на отметке 1 соответствует ответу, идентичному поведению референсного репортера β -глобина (ингибирование трансляции примерно в 3 раза). (Г) Вестерн-блот анализ контрольных клеток 293Т и клеток с деплецией *eIF3d*, *eIF4G2* (siRNA #2), или обоих белков. Клетки обработаны 1 мкМ PP242 или ДМСО. Воздействие PP242 привело к исчезновению фосфорилирования Thr37/Thr46 *eIF4E*-BP1, что является результатом ингибирования *mTOR*.

Большинство из протестированных мРНК не реагировали на нокдаун *eIF3d* ни при нормальных условиях (рис. 16А), ни при инактивации *mTOR*, когда *eIF4E*-зависимая трансляция сильно подавлена. Снижение эффективности трансляции репортера ATF4 при нокдауне *eIF3d*, вероятно, отражает участие *eIF3* в реинициации на этой 5'НТО [Hronová et al., 2017]. Таким образом, *eIF3d* специфически необходим для трансляции ATF4 не только в условиях стресса [Guan et al., 2017], но и в нормальных условиях (рис. 16А). Среди других репортерных мРНК, CCNI, PPF1A4 и SMAD1 также показали снижение эффективности трансляции при деплеции *eIF3d*. Однако при одновременном нокдауне *eIF3d* и *eIF4G2* эффект от деплеции *eIF4G2* явно преобладал над эффектом от деплеции *eIF3d* (рис. 16Б).

Ингибирование *mTOR* с помощью PP242 никак не сказывалось на эффекте нокдауна *eIF3d* (рис. 16А), и, наоборот, нокдаун *eIF3d* не изменял эффект ингибирования трансляции при обработке PP242 (рис. 16В). Это может быть связано с неполнотой нокдауна *eIF3d*. Возможно, что переключение на кэп-зависимую трансляцию, опосредованную *eIF3d*, требует (ин)активации других сигнальных каскадов [Lamper et al., 2020], чего не происходит в условиях наших экспериментов при относительно кратковременной обработке PP242 (2 часа). В анализируемых условиях *eIF3d*, таким образом, не является белком, который привлекает *eIF4G2* в сканирующие комплексы, а *eIF4G2* принимает участие в канонической *eIF4E*/кэп-зависимой трансляции.

3. uORF в 5'НТО как важный фактор зависимости трансляции от eIF4G2

Как мы уже отмечали выше, большинство мРНК-мишеней eIF4G2 содержат uORF (единственным подтвержденным на сегодняшний день исключением является *Rcbp2*). Мы решили проверить, связана ли eIF4G2-зависимость трансляции с наличием uORF в 5'НТО, поскольку именно они считаются основным препятствием для сканирующих комплексов на пути к стартовому кодону. Для начала мы заменили uAUG кодоны в 5'НТО *APAF1*, *Maf1*, *Stard7* и *MYCBP2* на стоп-кодон UAG (схематично показано на рис. 17Е). Выбор мишеней был продиктован небольшим количеством uAUG кодонов в этих 5'НТО (в зависимости от точного варианта 5'НТО у *CCNI* — 5, у *PPFIA4* — 6 uAUG кодонов). В 5'НТО *Stard7* и *MYCBP2* находится по одному uAUG кодону. В 5'НТО *APAF1* находятся 2 uAUG кодона, один из которых кодирует короткую uORF (9 аминокислотных остатка) примерно в середине 5'НТО, а второй открывает uORF, перекрывающуюся с основной рамкой. В случае мРНК *APAF1* заменяли только первый uAUG кодон на стоп-кодон, а второй оставляли интактным. В 5'НТО *Maf1* внутри uORF, кодирующей 39 аминокислотных остатка (а.о.), есть еще один стартовый кодон, расположенный в нуклеотидном контексте средней силы (CgtAUGG) и открывающий короткую uORF (7 закодированных а.о. не в рамке с первой uORF), поэтому в случае мРНК *Maf1* мутировали оба uAUG кодона.

Эти замены практически полностью снимали необходимость в eIF4G2 для *Maf1*, *Stard7* и *MYCBP2* – и в меньшей степени для *APAF1* (рис. 17А, В; рис. 18А, В; рис. 26Г, Е, рис. 27Г, Е). Кроме того, мутация uAUG кодонов значительно увеличивала эффективность трансляции репортеров *Maf1* и *Stard7*, но не *APAF1* (данные не показаны). Эта удивительная особенность uORF мРНК *APAF1* позволяет предположить, что либо она достаточно короткая (кодирует всего 9 а.о.), чтобы обеспечить эффективную реинициацию трансляции, либо uORF-опосредованная регуляция в данном случае более сложна, чем можно предположить. Наблюдаемое отсутствие какого-либо эффекта может быть просто совпадением: аналогично в случае с мРНК *iNOS* человека, удаление транслируемой uORF из ее 5'НТО не влияет на эффективность трансляции основной рамки [Gather et al., 2019].

В качестве комплементарного подхода мы ввели в длинные 5'НТО *HSPA2* и *TGFβ1* по одному uAUG кодону в хорошем контексте так, чтобы длина введенных uORF (завершенных стоп-кодонами, естественно присутствующими в этих 5'НТО) и расстояние между ними и основной ORF были близки к таковым как в 5'НТО *Stard7* (схематически показано на рис. 17Е). Введение uORF сделало мРНК *HSPA2* и *TGFβ1* чувствительными к нокдауну *eIF4G2* ($p < 0,001$) (рис. 17Б, Г; рис. 18Б, Г). Таким образом, одна uORF может обуславливать необходимость использования eIF4G2 в инициации трансляции. Из этого так

же следует, что eIF4G2 вступает в трансляцию после привлечения рибосомных комплексов к m⁷G-кэпу мРНК.

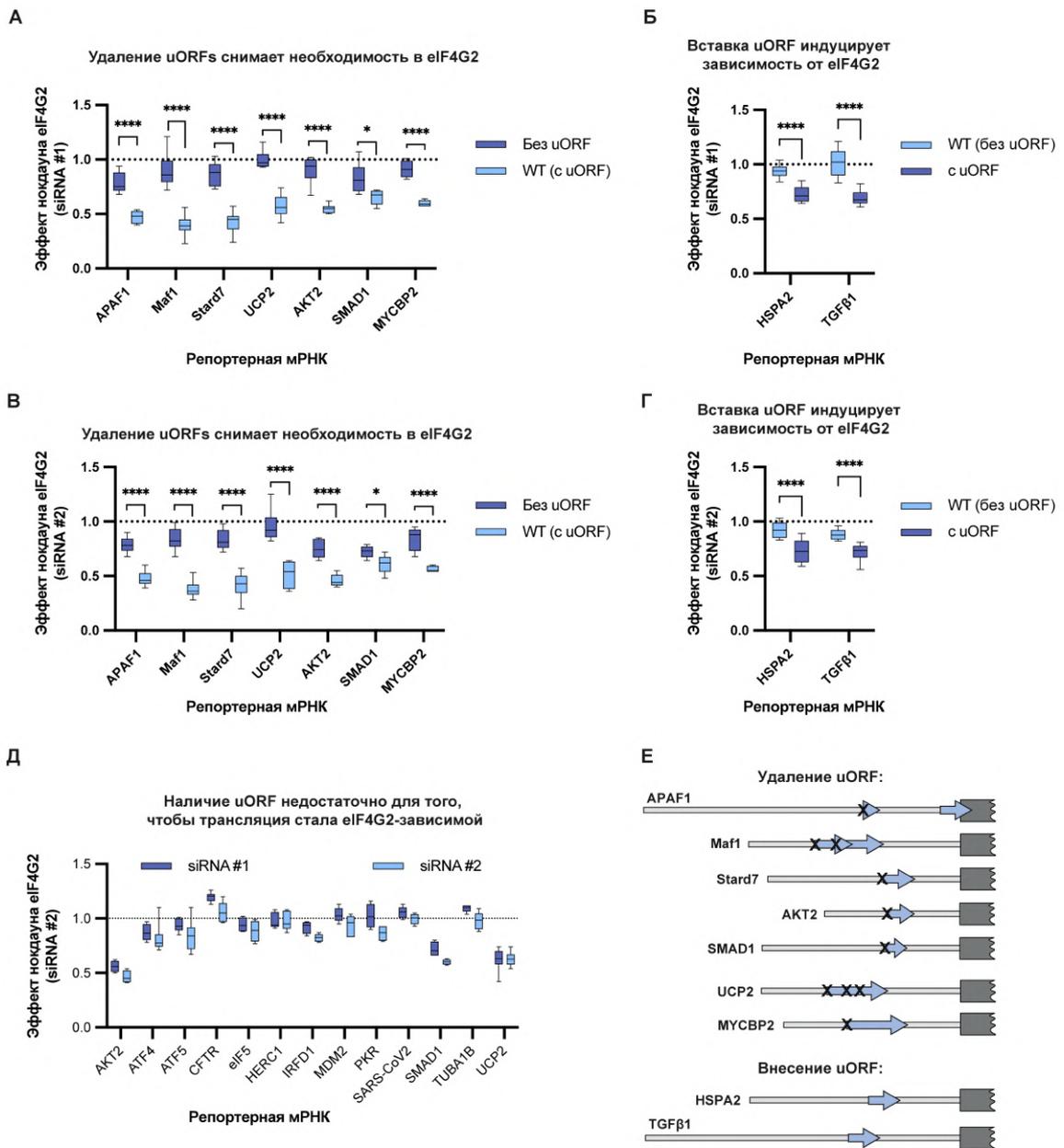


Рисунок 17. uORFs в значительной степени определяют eIF4G2-зависимость трансляции в клетках 293T. Данные представлены в виде отношения нормализованной экспрессии репортера в клетках с нокдауном eIF4G2 к контрольным клеткам. Статистическую значимость результатов определяли с помощью U-теста Манна-Уитни. (А) uAUG кодоны репортеров APAF1, Maf1, Stard7, AKT2, SMAD1, UCP2 и MYCBP2 были мутированы в стоп-кодона UAG для удаления uORF. Показан эффект нокдауна eIF4G2 (siRNA #1) в клетках 293T ($p < 0,0001$ в всех случаях, кроме SMAD1, для которого $p < 0,05$). (Б) В 5'НТО TGFβ1 и HSPA2 были введены uAUG так, чтобы образовавшиеся uORF имели такой же размер и примерно такое же положение относительно основного AUG, как в случае uORF Stard7. Оценивали эффект нокдауна eIF4G2 (siRNA #1) в клетках 293T ($p < 0,0001$ в обоих случаях). Панели В и Г аналогичны панелям А и Б соответственно, за исключением того, что использовали siRNA #2. (Д) Тестирование репортеров, в 5'НТО которых содержится uORF, регулирующая трансляцию при стрессе. Нокдаун eIF4G2 существенно снижал трансляцию только репортеров AKT2, SMAD1 и UCP2.

(Е) Схематичное изображение репортеров, проанализированных в панелях А-Г. Показаны 5'НТО и начало CDS люциферазы Fluc. Стрелками указаны uORF, крестиками – позиции uAUG, которые были заменены на стоп-кодоны.

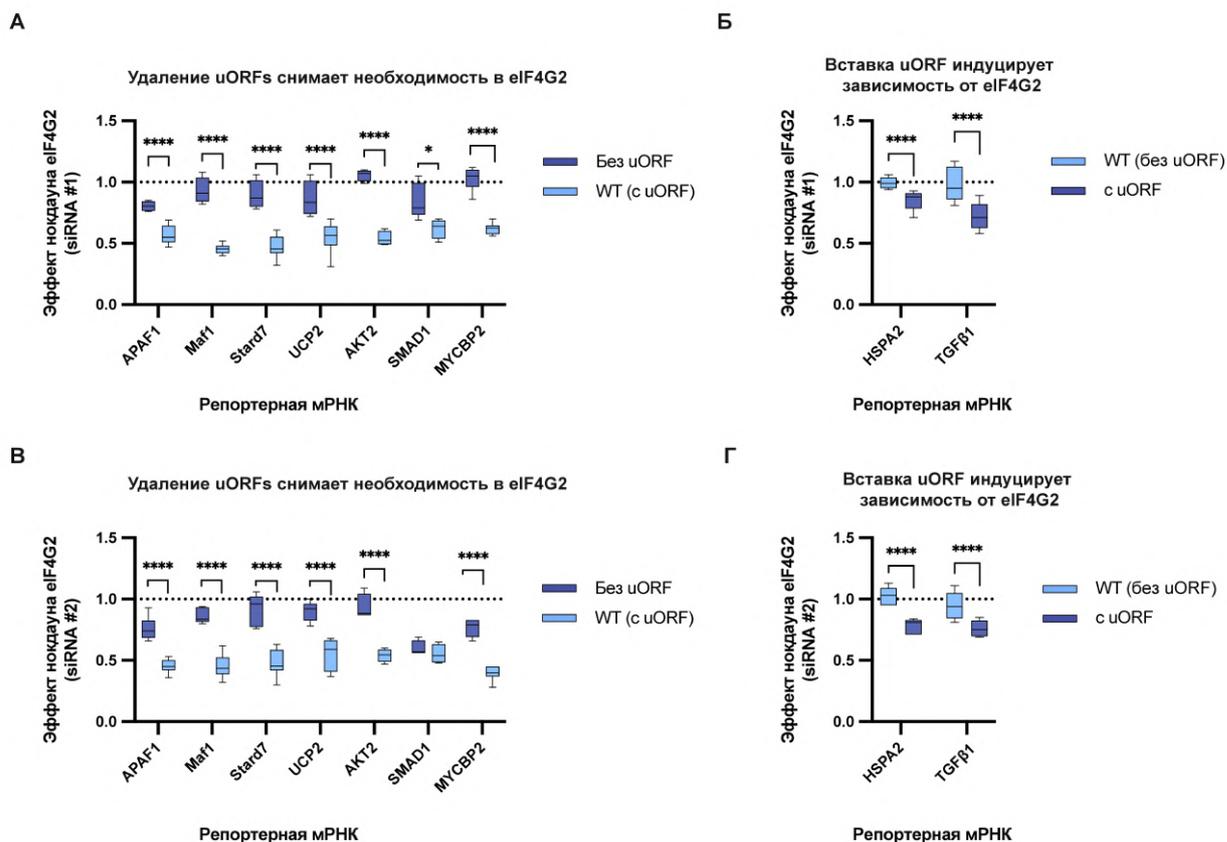


Рисунок 18. uORFs в значительной степени определяют eIF4G2-зависимость трансляции в клетках Huh7. Репортерные мРНК трансфицировали в контрольные клетки и клетки с нокдауном eIF4G2, вместе с репортерной мРНК β-глобина, кодирующей Nluc ($n \geq 10$). Данные представлены в виде отношения нормализованной экспрессии репортера в клетках с деплецией eIF4G2 к контрольным клеткам. Статистическую значимость результатов, определяли с помощью U-теста Манна-Уитни. (А) uAUG кодоны репортеров APAF1, Maf1, Stard7, AKT2, SMAD1, UCP2 и MYCBP2 были мутированы в стоп-кодоны UAG для удаления uORFs. Показан эффект нокдауна eIF4G2 (siRNA #1) в клетках Huh7 ($p < 0,0001$ в всех случаях, кроме SMAD1, для которого $p < 0,05$). (Б) В 5'НТО TGFβ1 и HSPA2 были введены uAUG кодоны таким образом, чтобы образовавшиеся uORF имели такой же размер и примерно такое же положение относительно основного AUG кодона, как в случае uORF Stard7. Оценивали эффект нокдауна eIF4G2 (siRNA #1) в клетках 293T ($p < 0,0001$ в обоих случаях). Панели В и Г аналогичны панелям А и Б соответственно, за исключением того, что для нокдауна eIF4G2 использовали siRNA #2.

uORF присутствуют примерно в половине мРНК человека и мыши [Calvo et al., 2009; Iacono et al., 2005; Johnstone et al., 2016; Ye et al., 2015], поэтому маловероятно, что одно лишь наличие uORF само по себе делает трансляцию мРНК зависящей от eIF4G2. Например, мРНК EPAS1 и eIF4G2 имеют по одной uORF в своих 5'НТО, но не реагируют на нокдаун eIF4G2 (рис. 13А, рис. 14А). Мы протестировали ряд мРНК, 5'НТО которых содержит uORF: например, AKT2 (*RAC-beta serine/threonine-protein kinase*), CFTR (*Cystic*

Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), eIF5, HERC1 (*Probable E3 ubiquitin-protein ligase*), IFRD1 (*Interferon-related developmental regulator 1*), MDM2 (*E3 ubiquitin-protein ligase Mouse double minute 2*), PKR (*Protein kinase RNA-activated*), SARS-CoV2 (*Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2*), SMAD1 (*Transforming Growth Factor-Beta Signaling Protein 1*), TUBA1B (*Tubulin Alpha 1b*) и UCP2 (*Mitochondrial uncoupling protein 2*), которые имелись в нашей лаборатории или были доступны у коллег. Известно, что uORF некоторых из перечисленных мРНК обеспечивают регуляцию трансляции основной рамки при определенных стрессовых условиях [Akulich et al., 2019; Andreev et al., 2015; Hurtaud et al., 2006; Vатtem et al., 2004; Zhou et al., 2008].

Среди перечисленных, только репортеры АКТ2, SMAD1 и UCP2 оказались зависящими от eIF4G2 (рис. 17Д). Как и ранее для мРНК Maf1 и Stard7, мы заменили uAUG в перечисленных 5'НТО стоп-кодонами UAG (рис. 17Е). В 5'НТО SMAD1 мутировали единственный uAUG кодон, а в 5'НТО UCP2 мутировали все три uAUG кодона, находящиеся в рамке друг с другом. В случае 5'НТО АКТ2 мутировали только один из uAUG кодонов, поскольку другой имеет очень плохой контекст и вряд ли способен значимо инициировать трансляцию.

Удаление uAUG избавило АКТ2 и UCP2 от eIF4G2-зависимой трансляции репортеров (рис. 17А, В; рис. 18А, В; рис. 26Г, Е; 27Г, Е). Случай UCP2 особенно интересен, поскольку находящаяся в этой 5'НТО uORF обеспечивает устойчивость этой мРНК к фосфорилированию eIF2 α [Andreev et al., 2015], и поэтому мы рассмотрим его подробнее дальше. Мутация uAUG SMAD1 не привела к существенному снижению вклада eIF4G2 (хотя уровень значимости падения составляет $p < 0.01$ в клетках 293Т и $p < 0.001$ в клетках Huh7 согласно U-тесту Манна-Уитни), что расширяет список случаев, когда необходимость трансляции мРНК в eIF4G2 определяется не только наличием uORF, но и другими факторами.

Другими необычными мРНК-мишенями eIF4G2 являются GC-богатые 5'НТО Pcbp2 и PHD2 (рис. 19). В 5'НТО PHD2 есть 3 uAUG: первый AUG находится в очень плохом нуклеотидном контексте, и открываемая им uORF не транслируется по данным рибосомного профайлинга элонгирующих рибосом (по данным геномного браузера GWIPS-viz); второй и третий uAUG открывают короткие рамки, кодирующие пептиды из трех аминокислотных остатков. В репортерах PHD2 «X2» и «X3» удалены uAUG2 или uAUG3 соответственно, а «плохой» uAUG1 сохранен (рис. 19Б). Удаление uAUG2 или uAUG3 из GC-богатой 5'НТО PHD2 никак не сказывается на зависимости трансляции этой мРНК от eIF4G2 (рис. 19А). 5'НТО Pcbp2, как мы уже упоминали, вообще не содержит uAUG кодонов, поэтому мы рассмотрели потенциальные uORF, начинающиеся с кодонов

AUU (CctAUUG) и GUG (CcaGUGA), расположенных в хороших нуклеотидных контекстах и намеки на инициацию на которых мы обнаружили при анализе данных рибосомного профайлинга. Замена этих потенциальных стартовых кодонов на стоп-кодон UAG (соответствующие репортеры обозначены «x-AUU», «x-GUG») также не оказала влияния на зависимость трансляции 5'НТО Pcbp2 от eIF4G2 (рис. 19А), поэтому причины, делающие сканирование этой мРНК требующим eIF4G2, остаются не вполне понятными. Известно, что GC-богатые области 5'НТО (а это случай и Pcbp2, и PHD2, и SMAD1) склонны к образованию вторичных структур, затрудняющих инициацию трансляции [Kozak, 2002], поэтому вероятно, что eIF4G2 в данном случае облегчает сканирование этих 5'НТО.

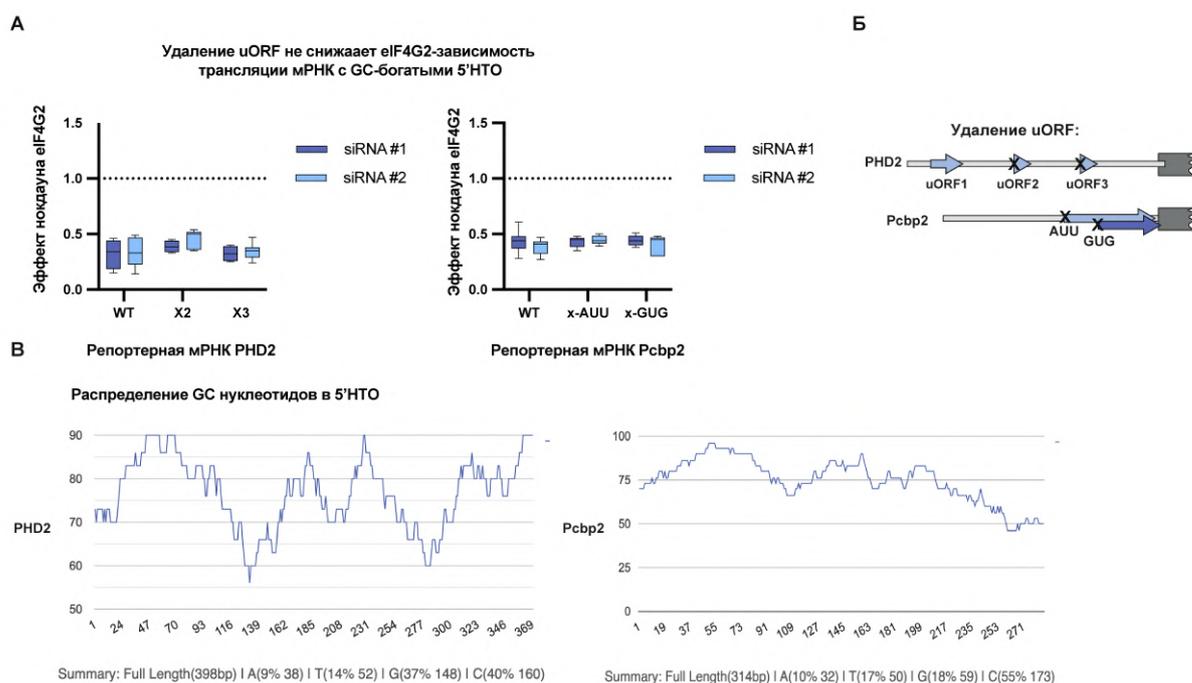


Рисунок 19. Удаление uORF не снижает eIF4G2-зависимость трансляции мРНК с GC-богатыми 5'НТО. (А) Репортерные мРНК PHD2 и Pcbp2 с 5'НТО дикого типа или с указанными мутациями трансфицировали в контрольные клетки 293Т и клетки с нокдауном eIF4G2, вместе с репортерной мРНК β-глобина, кодирующей Nluc ($n \geq 10$). Данные представлены в виде отношения нормализованной экспрессии репортера в клетках с деплецией eIF4G2 к контрольным клеткам. (Б) Схематичное масштабное изображение репортеров, проанализированных в панелях А. Показаны 5'НТО и начало CDS Fluc. Стрелками указаны uORF, крестиками – позиции потенциальных стартовых кодонов, которые были заменены на стоп-кодоны в соответствующих репортерах. В репортерах PHD2 «X2» и «X3» удалены uAUG2 или AUG3 соответственно, а uAUG первой uORF сохранен, поскольку находится в очень плохом нуклеотидном контексте (CgtAUGC). В случае репортеров Pcbp2 мутировали потенциальные uORF, начинающиеся с AUU (CctAUUG) и GUG (CcaGUGA) в хорошем нуклеотидном контексте. (В) Распределение GC-богатых областей в исследуемых 5'НТО мРНК. Получено с помощью ресурса <https://www.biologicscorp.com/tools/GCContent/> (шаг разбиения при подсчете 30 нт). В подписи указаны длина анализируемой 5'НТО (указана в bp для кДНК) и частота встречаемости каждого нуклеотида (%).

4. Сканирование через транслируемую uORF может сделать дальнейшее движение рибосом eIF4G2-зависимым

В случае мРНК с uORF рибосома может достигнуть основного AUG кодона двумя способами: либо сканирующий рибосомный комплекс пропускает uAUG кодон (пропускающее сканирование, *leaky scanning*), либо сканирование начинается заново после трансляции uORF (реинициация). Однако прежде, чем исследовать эти возможности, необходимо было понять, нужен ли eIF4G2 для трансляции самих uORF. Иными словами, если сканирующие комплексы в области uAUG уже несут eIF4G2, то и все дальнейшие этапы инициации очевидным образом должны зависеть от него. Для этого в репортерах APAF1, Maf1, Stard7 и UCP2 были удалены стоп-кодоны uORF, стартовый AUG кодон Fluc и последовательности между ними, при этом uORF оказались слитыми с кодирующей последовательностью люциферазы, в которой отсутствовал AUG кодон (схематично изображено на рис. 20B). Такой подход исключал какой-либо вклад пропускающего сканирования в результаты измерений.

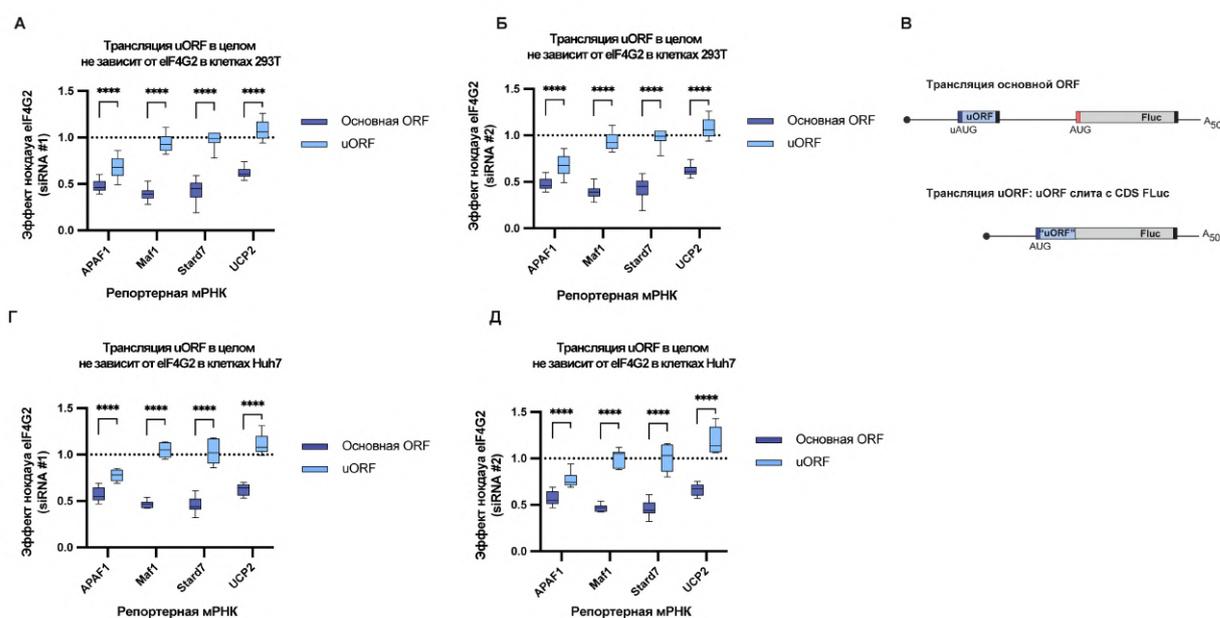


Рисунок 20. eIF4G2, как правило, не участвует в трансляции uORF. (А) Репортерные мРНК трансфицировали в контрольные клетки и клетки с деплецией eIF4G2, вместе с репортерной мРНК β-глобина, кодирующей Nluc ($n \geq 10$). Данные представлены в виде отношения нормализованной экспрессии репортера в клетках с нокдауном eIF4G2 к контрольным клеткам. uORF репортеров APAF1, Maf1, Stard7 и UCP2 были слиты с последовательностью Fluc для оценки участия eIF4G2 в трансляции uORF в клетках 293T. (Б) Панель Б аналогична панели А, за исключением того, что использовали siRNA #2. (В) Схематичное изображение тестируемых репортеров. Репортер с 5'НТО дикого типа отражает трансляцию основной рамки. uORF мРНК APAF1, Maf1, Stard7 и UCP2 были слиты с последовательностью Fluc для оценки трансляции uORF. Панели Г и Д аналогичны панелям А и Б соответственно, за исключением того, что деплетировали eIF4G2 в клетках Huh7.

Трансляция, инициируемая на AUG кодонах uORF 5'НТО Maf1, Stard7 и UCP2, происходит eIF4G2-независимо, тогда как случай APAF1 более сложен (рис. 20). Это убедительно свидетельствует о том, что в случае мРНК Maf1, Stard7 и UCP2 потребность в eIF4G2 возникает во время сканирования uORF или после трансляции uORF. Можно было бы предположить, что eIF4G2 является гипотетическим "специализированным ресканирующим фактором" (обеспечивающим сканирование после реинициации), существование которого давно обсуждается [Jackson et al., 2012]. Однако репортеры с 5'НТО ATF4 и ATF5, трансляция которых значительной степени зависит именно от реинициации, не чувствительны к деплеции eIF4G2 (рис. 17Д). Таким образом, даже если eIF4G2 способствует реинициации, его роль в этом процессе, вероятно, зависит от особенностей последовательности конкретной 5'НТО.

Тем не менее, мы все же решили проверить роль eIF4G2 в условиях ограниченного количества свободного eIF2, когда реинициация играет решающую роль в трансляции мРНК ATF4 и ATF5. Для этого мы индуцировали фосфорилирование eIF2 α с помощью обработки арсенитом натрия и изучили, как влияет нокдаун *eIF4G2* на трансляцию разных мРНК в этих условиях (рис. 21В, Г).

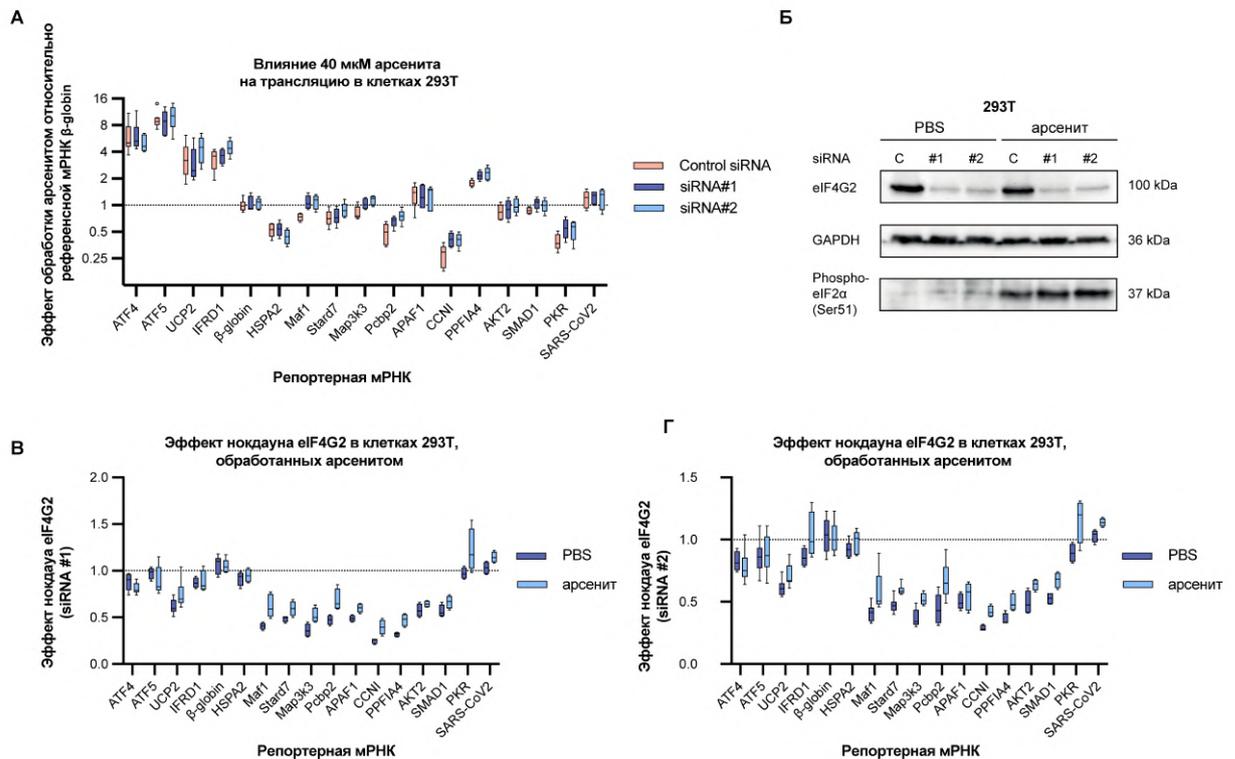


Рисунок 21. *eIF4G2* не является необходимым фактором, обеспечивающим трансляцию мРНК в условиях инактивации *eIF2*. (А) Контрольные клетки 293Т и клетки с нокдауном *eIF4G2* (siRNA #1) обрабатывали PBS или 40 мкМ арсенита натрия для индукции окислительного стресса, а затем трансфицировали указанными мРНК-репортерами вместе с референсной мРНК β -глобина ($n \geq 8$). Данные представлены в виде отношения нормализованной экспрессии (шкала \log_2) репортеров в клетках,

обработанных арсенитом, к клеткам, обработанным PBS. **(Б)** Вестерн-блот анализ контрольных клеток 293Т и клеток с деплецией eIF4G2 (siRNA #1 и #2), обработанных 40 мкМ арсенита натрия или PBS, GAPDH детектирован в качестве контроля загрузки. Обработка арсенитом натрия приводила к фосфорилированию eIF2 α . **(В)** Данные из панели А были пересчитаны, чтобы показать, изменяется ли ответ на нокдаун eIF4G2 при инактивации eIF2 (siRNA #1). Панель Г аналогична панели В за исключением того, что для деплеции eIF4G2 в клетках 293Т использовали siRNA #2.

Наряду с мРНК-мишенями eIF4G2 (теперь к ним добавились еще AKT2, SMAD1 и UCP2) мы проанализировали мРНК, которые, как известно, устойчивы к инактивации eIF2 (ATF4, ATF5, IFRD1, и та же UCP2) [Andreev et al., 2015; Vattem et al., 2004; Zhou et al., 2008]. Трансляция ATF4 не зависит от eIF4G2 при фосфорилировании eIF2 α , что согласуется с опубликованными данными [Guan et al., 2017]. Трансляция репортеров CCNI, PKR и Rcbp2 показала повышенную чувствительность к ингибированию eIF2, что согласуется с данными рибосомного профайлинга [Andreev et al., 2018; Paolini et al., 2018]. Примечательно, что все протестированные мишени eIF4G2 становились несколько менее зависимыми от eIF4G2 при ингибировании образования тройственного комплекса (рис. 21В, Г), однако, что это означает, мы пока не знаем. Подытоживая, можно сказать, что eIF4G2 не вносит вклад в обеспечение устойчивости трансляции к инактивации eIF2, основанной на механизме реинициации.

Чтобы изучить роль eIF4G2 в пропускающем сканировании, мы мутировали стоп-кодона uORF 5'НТО Stard7, Maf1 и UCP2 так, что удлинившиеся при этом uORF начали перекрываться не в рамке считывания с ORF люциферазы светлячка Fluc (схематично показано на рис. 22В). В этом случае рибосомы могут инициировать на AUG кодоне Fluc *только* путем пропускающего сканирования, поскольку реинициация «в обратном направлении» неэффективна [Kozak, 2001a; Loughran et al., 2012; Luukkonen et al., 1995; Vattem et al., 2004; Zhang et al., 1997; Zhou et al., 2008]. Примечательно, что зависимость трансляции этих мРНК от eIF4G2 во многом сохранилась, хотя и стала заметно меньше в случае Maf1 (рис. 22). Это означает, что на выбранных мРНК eIF4G2 способствует сканированию рибосом внутри и/или после uORF.

Более того, улучшение контекста первого uAUG кодона uORF Maf1 (контекст дикого типа GcuAUGUc “средней силы”) для соответствия последовательности Козак (AccAUGAg “сильный” контекст) подавляло трансляцию Fluc (в 11 \pm 3 раза, n=7) в клетках 293Т (данные не показаны) и лишь незначительно снижало потребность трансляции в eIF4G2. Таким образом, значительная часть рибосом, достигающих основного AUG кодона Maf1, делает это посредством eIF4G2-зависимого пропускающего сканирования.

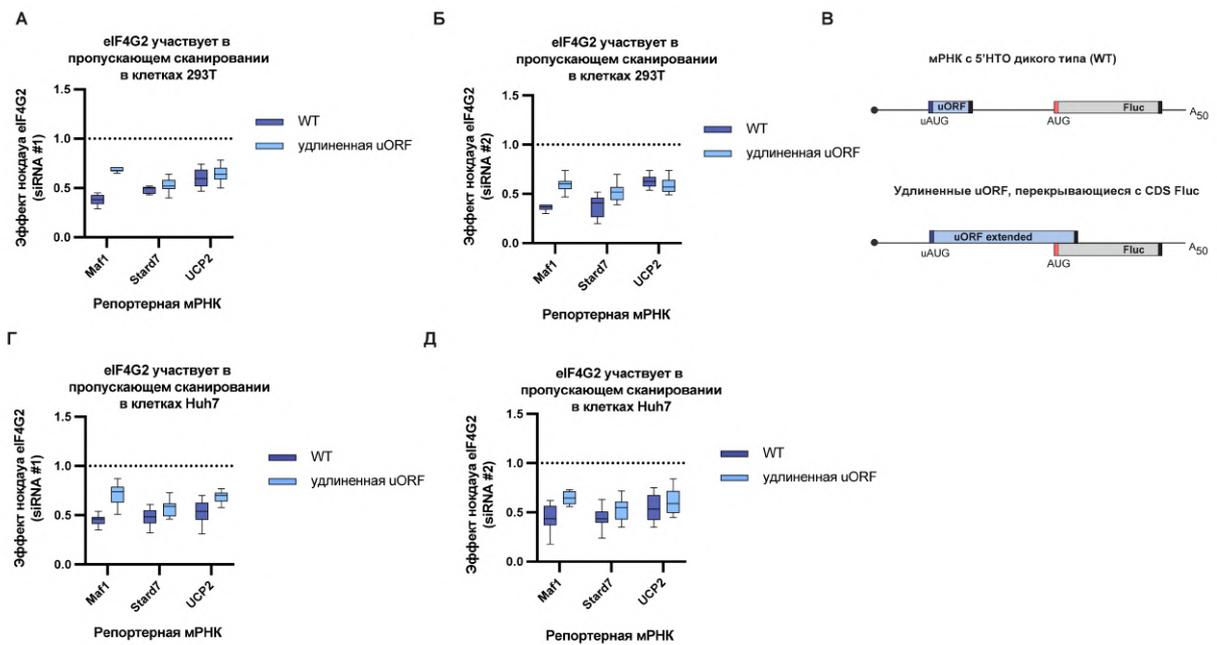


Рисунок 22. *eIF4G2* способствует сканированию внутри и/или после *uORF*. (А) Эффект нокдауна представляет собой отношение нормализованной экспрессии репортера в клетках 293Т с деплецией *eIF4G2* к нормализованной экспрессии в контрольных клетках ($n \geq 10$). (Б) Панель Б аналогична панели А, за исключением того, что использовали *siRNA* #2. (В) Схематичное изображение репортеров. Стоп-кодоны *uORF* в мРНК *Maf1*, *Stard7* и *UCP2* были мутированы так, что удлиненные *uORF* оказались перекрыты с CDS *Fluc*, чтобы исключить возможность реинициации трансляции. Панели Г и Д аналогичны панелям А и Б соответственно, за исключением того, что деплетировали *eIF4G2* в клетках Huh7.

Идея о том, что *eIF4G2* способствует сканированию после пропуска *uAUG* кодона, напоминает механизм, который был предложен для объяснения устойчивости трансляции *UCP2* к инактивации *eIF2*. Он предполагает уменьшение интерференции между рибосомами, транслирующими *uORF*, и теми, которые пропустили стартовый кодон *uORF* и продолжили сканирование [Andreev et al., 2015; Andreev et al., 2018]. Нокдаун *eIF4G2* не приводит к изменению ответ репортера *UCP2* на фосфорилирование *eIF2 α* (рис. 21А), а только снижает его эффективность трансляции (рис. 21В, Г). Это подтверждает идею о том, что *eIF4G2* является сканирующим фактором, который на некоторых мРНК с *uORF* обычно не принимает участие в трансляции до тех пор, пока сканирующая рибосома не достигнет транслируемой *uORF*.

Наши данные свидетельствуют о том, что в случае проанализированных мРНК-мишеней *eIF4G2* (*APAF1*, *Maf1*, *Stard7*, *UCP2*) пропускающее сканирование с участием *eIF4G2* играет важную роль в обеспечении трансляции основных ORF. Существует два не исключаящих друг друга объяснения того, как наличие *uORF* может привести к необходимости использования *eIF4G2*: *eIF4G2* может способствовать пропуску *uAUG* кодона, и/или последующему сканированию. Однако тот факт, что нокдаун *eIF4G2* не

усиливает трансляцию uORF Maf1, Stard7 и UCP2 (рис. 20), как кажется, совместим только с последним предположением.

Важно отметить, что полученные нами данные дают нам право утверждать, что eIF4G2 способствует пропускающему сканированию, но, строго говоря, не позволяют исключить возможность участия eIF4G2 в реинициации. Другие исследователи утверждают, что eIF4G2 способствует именно реинициации [Weber et al., 2022]. Вполне возможно, что eIF4G2 действительно способствует реинициации на одних мРНК и пропускающему сканированию на других. Во-вторых, Р. Вебер и соавторы изучали эффект нокаута *eIF4G2* на трансляцию мРНК, особенностью которых является наличие нескольких uORF. Однако, исследователи увеличивали длину uORF, расположенной ближе к 5'-концу, а остальные uAUG кодоны при этом оставались нетронутыми. Уменьшение эффективности трансляции мРНК с удлинёнными uORF в клетках с нокаутом *eIF4G2*, было объяснено участием eIF4G2 в реинициации, поскольку известно, что с ростом длины uORF значительно падает эффективность реинициации. Удлинение uORF1 при сохранении остальных uAUG кодонов может препятствовать трансляции uORF, расположенных ближе к основному кодону, и, следовательно, пропускающему сканированию через них. Таким образом, полученные исследователями результаты не противоречат возможному участию eIF4G2 в пропускающем сканировании на изучаемых ими мРНК. Мы вернемся к этому вопросу позднее.

5. Необходимость в eIF4G2 определяется последовательностями, окружающими uORF, а также свойствами самой uORF

Теоретически, uORF могут влиять на зависимость от eIF4G2 множеством способов, поэтому мы создали несколько вариантов репортеров, в которых соответствующие uORF были изменены так, чтобы кодировать пептиды длиной 3, 9, 18 и 37 аминокислотных остатка (а.о.). Мутировали uORF в следующих 5'НТО: Maf1 (uAUG1 кодон открывает рамку закодированного пептида длиной 40 а.о.; uAUG2 кодон при этом заменен на стоп-кодон), Stard7 (18 а.о.) и UCP2 (36 а.о. закодировано с первого uAUG кодона). При этом стартовые uAUG кодоны uORF оставались на своих аутентичных местах. Эти три 5'НТО совершенно по-разному реагировали на изменение размера uORF (рис. 23А, Г). В случае 5'НТО Stard7 все полученные репортерные мРНК с разной длиной uORF оказались чувствительны к нокауту *eIF4G2*, т.е. участие eIF4G2 в трансляции этой мРНК определяется не длиной uORF, а самим фактом ее наличия. Для 5'НТО Maf1 эффект нокаута *eIF4G2* постепенно снижался по мере укорачивания uORF, а укорачивание uORF

UCP2 с кодирования 36 до 18 а.о. привело к полной независимости трансляции от eIF4G2 (рис. 23А, Г).

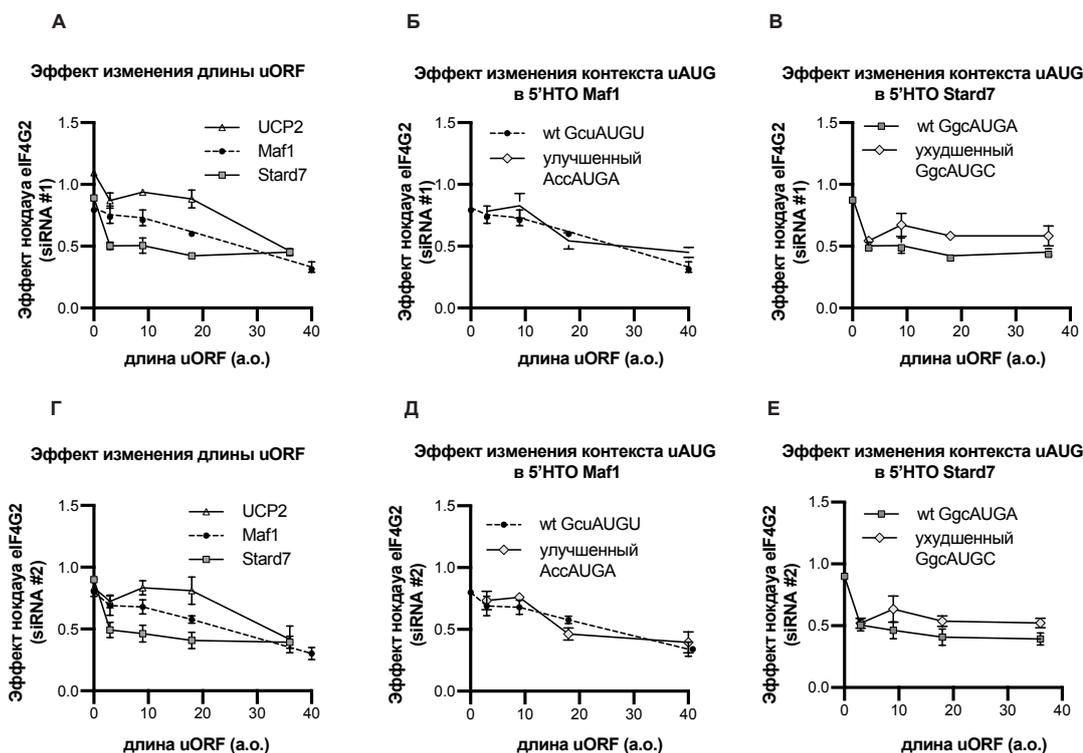


Рисунок 23. Эффект изменения длины uORF и контекста uAUG на зависимость трансляции от eIF4G2. Длина uORF мРНК-мишеней eIF4G2 была изменена таким образом, чтобы они кодировали 3, 9, 18 или 36 аминокислотных остатка (а.о.). uAUG кодоны оставались на своих местах. Природные uORF 5'НТО UCP2, Maf1 и Stard7 кодируют пептиды длиной 36, 40 и 18 а.о. соответственно. uORF длиной «0» а.о. соответствует замене uAUG на стоп-кодон UAG. Репортерные мРНК трансфицировали в контрольные и деплетированные по eIF4G2 клетки 293Т вместе с референсной мРНК β-глобина, кодирующей Nluc ($n \geq 8$). Данные представлены в виде отношения нормализованной экспрессии репортера в клетках с нокдауном eIF4G2 к контрольным клеткам. (А) Влияние изменения длины uORF на eIF4G2-зависимость трансляции репортеров Maf1, Stard7 и UCP2 (siRNA #1 для нокдауна eIF4G2). (Б) Влияние изменения контекста uAUG кодона на eIF4G2-зависимость репортеров Maf1 с различной длиной uORF (siRNA #1 для нокдауна eIF4G2). uAUG кодоны были расположены либо в контексте дикого типа (GcuAUGU), либо в улучшенном контексте (AccAUGA). (В) Влияние изменения контекста uAUG кодона на eIF4G2-зависимость репортеров Stard7 с различной длиной uORF (siRNA #1 для нокдауна eIF4G2). uAUG кодоны были расположены либо в контексте дикого типа (GgcAUGA), либо в ухудшенном контексте (GgcAUGC). Панели Г, Д и Е аналогичны панелям А, Б и В соответственно, за исключением того, что для деплеции eIF4G2 использовали siRNA #2.

Различия в контекстах uAUG кодонов (“средний” для Maf1 и “сильные” в случаях Stard7 и UCP2) не объясняют наблюдаемую разницу, поскольку улучшение контекста uAUG кодона Maf1 (GcuAUGUcg заменен на AccAUGAgc; вторая закодированная аминокислота при этом не изменяется) или ухудшение контекста uAUG кодона Stard7 (GgcAUGAagg заменен на GgcAUGCgg; вторая аминокислота также не изменяется) не влияли ни эффект нокдауна (рис. 23Б, В, Д, Е). Единственное обнаруженное нами

отличие заключалось в том, что репортер Stard7 стал чуть менее зависим от eIF4G2, что не является неожиданным, поскольку на его uAUG кодоне в таком случае иницируют меньше рибосом.

Случай UCP2 мы решили рассмотреть более подробно (рис. 24А). Дело в том, что в uORF этой мРНК есть три AUG кодона, находящиеся в одной рамке считывания. Мы укорачивали самую длинную uORF UCP2, которая начинается с первого uAUG кодона (uAUG1), а второй (uAUG2) и третий (uAUG3) uAUG кодоны в этих конструкциях были заменены на стоп-кодоны (схематично изображено на рис. 24Б). В связи с тем, что укорочение uORF UCP2 до кодирования 18 а.о. уже снимало трансляции потребность в eIF4G2, мы решили проверить, не связан ли этот эффект не с изменением длины рамки, а с отсутствием трансляции с uAUG2 или uAUG3. Мы дополнительно протестировали репортеры UCP2, в которых либо только первый uAUG («X1»), либо только второй и третий uAUG («X2,3») кодоны были заменены на стоп-кодоны UAG. Репортерная мРНК UCP2 «X1», в которой мутирован только первый uAUG кодон, транслировалась eIF4G2-зависимо, а мутация второго и третьего uAUG кодона полностью снимала потребность трансляции в eIF4G2 (рис. 24А). Таким образом, полная eIF4G2-независимость трансляции мРНК UCP2 с укороченной с 36 до 18 а.о. uORF объясняется не изменением длины, а тем, что в этой конструкции были удалены второй и третий uAUG кодоны, и именно они являются детерминантами зависимости трансляции этой мРНК от eIF4G2 (или один из них). Мы решили проверить, влияет ли на eIF4G2-зависимость, конкретная нуклеотидная последовательность uORF или аминокислотные остатки, которые она кодирует. Для этого нуклеотиды после uAUG3 кодона в uORF UCP2 (или кодирующие С-концевую часть пептида, если рассматривать от uAUG1 кодона) были случайным образом перемешаны, и получившаяся uORF стала кодировать последовательность пептида MIATPIVRVKRKWLEA (репортер «С-конц. KRK» на рис. 24Б) вместо исходной последовательности MIATGSFEERDTFREA.

Недавние исследования свидетельствуют, что длинные полиглицинаргининовые повторы и полипролиларгининовые повторы вызывают значительную остановку рибосом [Park et al., 2011; Radwan et al., 2020], за счет электростатических взаимодействий между положительно заряженным аргинин-богатым синтезируемым полипептидом и рРНК в выходном канале рибосомы [Love et al., 2014]. Описаны также множество случаев остановки рибосом на полилизиновых участках, кодируемых полиаденозиновой последовательностью [Kriachkov et al., 2023]. Поскольку при случайном перемешивании нуклеотидов в 5'-концевой части uORF UCP2 у нас получился закодированный пептид с положительно заряженными аминокислотными остатками на С-конце (KRK), мы сделали к

нему контрольную конструкцию, которая кодировала бы тот же самый пептид, но с заменой положительно заряженных аминокислотных остатков KRK на незаряженные AGL (MIATPIVRVAGLWLEA) (репортер «С-конц. AGL» рис. 24Б). Однако мутация «KRK» не привела к усилению eIF4G2-зависимости трансляции полученной репортерной мРНК, то же характерно и для мутации «AGL» (рис. 24А). Таким образом, зависимость трансляции основной рамки UCP2 от eIF4G2 определяется трансляцией uORF, открываемой либо вторым, либо третьим AUG кодоном, но похоже, не зависит от закодированного в этой рамке пептида.

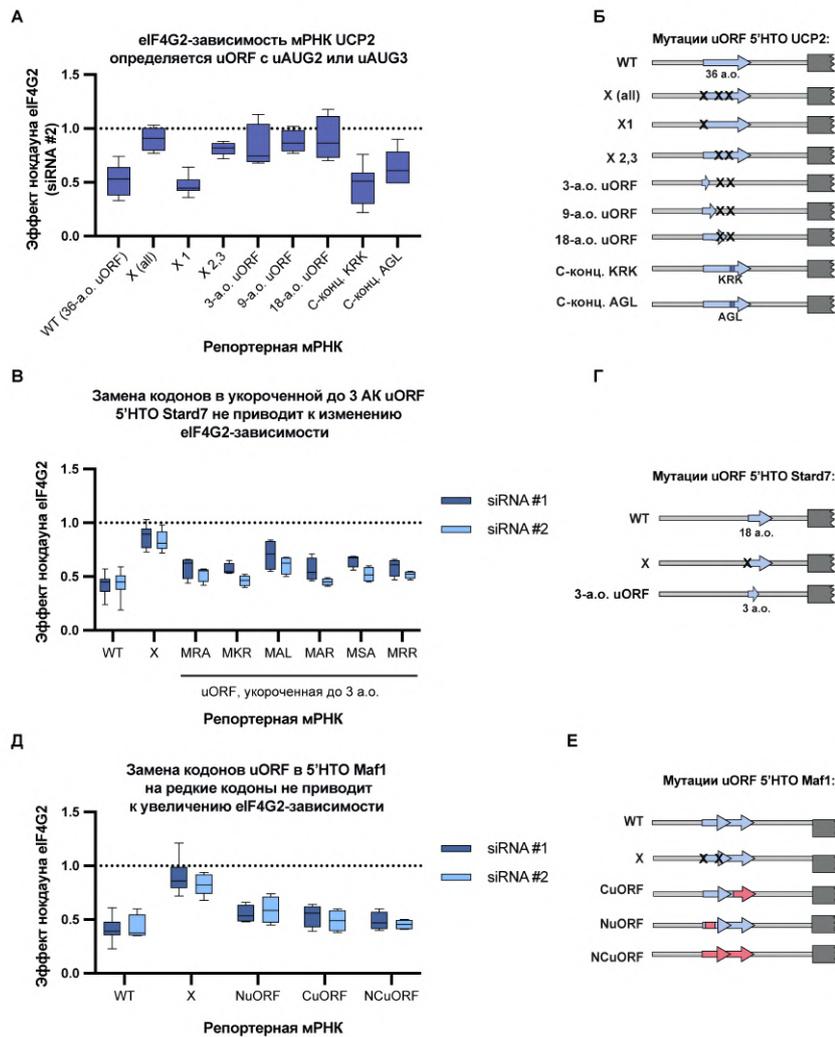


Рисунок 24. Мутации uORF в 5'HTO мРНК-мишеней eIF4G2 для поиска детерминант eIF4G2-зависимости трансляции. Репортерные мРНК трансфицировали в контрольные клетки 293T и клетки с деpleцией eIF4G2 вместе с репортерной мРНК β -глобулина, кодирующей Nluc ($n \geq 5$). Данные представлены в виде отношения нормализованной экспрессии репортера в клетках с нокдауном eIF4G2 к контрольным клеткам. (А) Мутировали uORF репортера UCP2. WT – 5'HTO дикого типа, содержит uORF, кодирующую 36 а.о., считая от первого uAUG кодона; X (all) – 5'HTO с заменой всех трех uAUG кодонов, находящихся в рамке друг с другом, на UAG стоп-кодона; X1 – 5'HTO с заменой только первого uAUG кодона на UAG стоп-кодон; X2,3 – 5'HTO с заменой только второго и третьего uAUG кодона на UAG стоп-кодон; 3-а.о., 9-а.о., 18-а.о. uORF – 5'HTO с укороченной uORF для кодирования 3, 9 и 18 а.о. соответственно, считая от первого

uAUG кодона (*AUG2* и *AUG3* при этом заменены на стоп-кодона); С-конц. *KRK* – нуклеотиды 3'-концевой части *uORF UCP2* были перемешаны случайным образом. В результате С-концевая последовательность пептида (пептида, начинающегося с *uAUG #3*) изменилась *MIATGSFEERDTFREA* → *MIATPIVRV**KRK**WLEA*. С-конц. *AGL* – нуклеотиды, кодирующие *KRK* в конструкции «С-конц. *KRK*» были заменены так, чтобы они кодировали а.о. *AGL* (*MIATGSFEERDTFREA* → *MIATPIVRV**AGL**WLEA*). Оценивали эффект нокдауна *eIF4G2* (*siRNA #2*) на трансляцию репортерных мРНК в клетках 293Т. **(Б)** Схематичное изображение репортеров *UCP2*. Показаны 5'НТО и начало *CDS Fluc*. Стрелками указаны *uORF* в 5'НТО. **(В)** Мутировали *uORF* репортера *Stard7*. *WT* – 5'НТО дикого типа; *X* – 5'НТО с заменой *uAUG* кодона на *UAG* стоп-кодон; *MRR, MRA, MKR, MRR, MAL, MSA*, – варианты *uORF Stard7*, укороченной до 3 а.о. Буквы обозначают аминокислотные остатки в однобуквенном коде. *MRR* соответствует репортеру *Stard7* 3-а.о. *uORF* на рис. 23. Оценивали эффект нокдауна *eIF4G2* на трансляцию репортерных мРНК в клетках 293Т. **(Г)** Схематичное изображение репортеров *Stard7*. **(Д)** Мутировали *uORF* репортера *Maf1*. *WT* – 5'НТО дикого типа; *X* – 5'НТО с заменой *uAUG* кодонов на *UAG* стоп-кодон; заменяли кодоны *uORF Maf1*, кодирующие либо N-концевые аминокислотные остатки пептида (*NuORF*), либо С-концевые аминокислотные остатки пептида (*CuORF*), либо одновременно (*NCuORF*) на соответствующие им более редкие кодоны. **(Е)** Схематичное изображение репортеров *Maf1*.

Случай мРНК *Stard7* особенно интересен, поскольку укорочение *uORF* в этой 5'НТО до 3 а.о. не снимает потребности в *eIF4G2* для трансляции основной рамки (рис. 23). Укороченная рамка кодирует пептид *MRR*, поэтому мы предположили, что рибосома может застревать на этой рамке по механизму, упомянутому выше. Мы решили проверить, как влияет последовательность закодированного пептида на *eIF4G2*-зависимость репортера *Stard7* с *uORF*, укороченной до кодирования 3 аминокислотных остатков («3-а.о. *uORF*»). Для этого нуклеотиды второго и третьего кодонов «3-а.о. *uORF*» были случайным образом перемешаны. *uORF* получившихся репортерных конструкций кодировали пептиды *MRA, MKR, MRR, MAL* и *MSA*, однако все они обладали чувствительностью к нокдауну *eIF4G2* (рис. 24В). Таким образом, зависимость трансляции основной рамки *Stard7* от *eIF4G2* определяется самим актом трансляции *uORF*.

Для изучения специфических свойств *uORF* 5'НТО *Maf1* заменяли кодоны в *uORF* на соответствующие им, но более редкие кодоны для того, чтобы вызвать замедление элонгации трансляции этой *uORF*: заменяли либо только N-концевые аминокислотные остатки пептида («*NuORF*»), либо только С-концевые аминокислотные остатки пептида («*CuORF*»), либо вводили обе мутации одновременно («*NCuORF*») (рис. 24Е). Ни одна из этих модификаций не привела к заметному изменению зависимости трансляции мРНК *Maf1* от *eIF4G2* (рис. 24Д).

Для того чтобы выяснить, может ли что-то еще, кроме *uORF*, влиять на потребность трансляции в *eIF4G2*, мы заменили последовательность перед *uORF Stard7* (209 нт) на фрагмент 5'НТО *HSPA2* или на целую 5'НТО *hnRNPК (v2)*, так что общая длина

химерной 5'НТО осталась примерно такой же (схематично изображено на рис. 25Б). Во всех случаях участие eIF4G2 в трансляции этих мРНК заметно снижалось, но не исчезало совсем (рис. 25А). Аналогично, замена аутентичной последовательности между uORF Stard7 и основной ORF на последовательности 5'НТО HSPA2 или hnRNPК той же длины (~100 нт) или на всю последовательность 5'НТО hnRNPК (v2) (~200 нт) также приводила к снижению вклада eIF4G2 в трансляцию таких репортерных мРНК (рис. 25А).

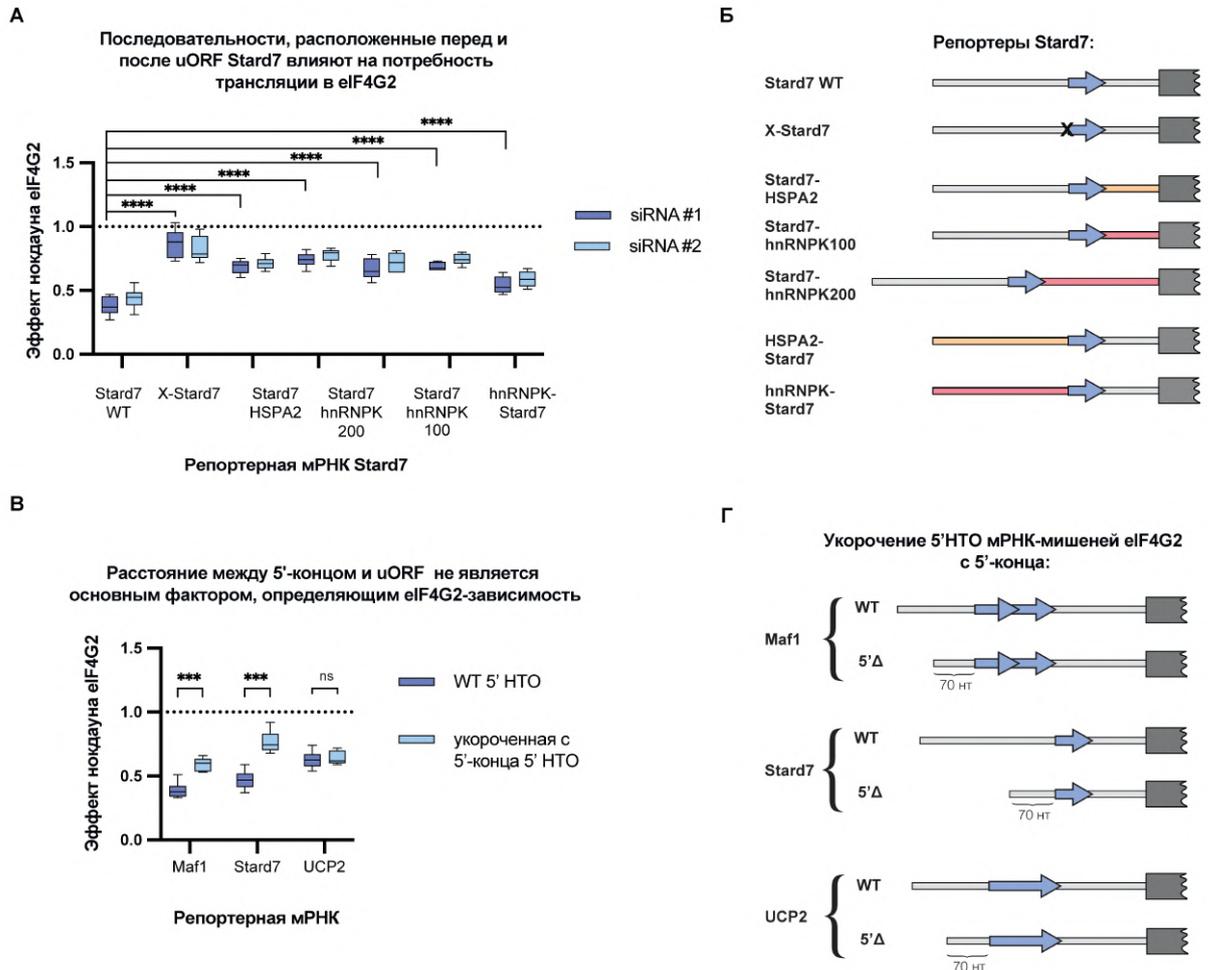


Рисунок 25. Необходимость в eIF4G2 для трансляции мРНК зависит от последовательностей, расположенных как перед, так и после uORF. Репортерные мРНК с мутированными 5'НТО или 5'НТО дикого типа трансфицировали в контрольные клетки 293Т и клетки с нокдауном eIF4G2, вместе с референсной β-глобиновой репортерной мРНК, кодирующей Nluc (n≥8). Эффект нокдауна рассчитан как отношение нормализованной экспрессии репортера в клетках с нокдауном eIF4G2 к контрольным клеткам. Статистическую значимость результатов определяли с помощью U-теста Манна-Уитни. (А) Последовательность, расположенная перед uORF Stard7, была заменена на целую последовательность 5'НТО hnRNPК (v2) или фрагмент последовательности 5'НТО HSPA2 так, чтобы общая длина 5'НТО оставалась примерно одинаковой («hnRNPК-Stard7» и «HSPA2-Stard7» соответственно). Последовательность между uORF Stard7 и CDS Fluc была заменена на целую 5'НТО HSPA2 («Stard7-HSPA2»), на целую или фрагмент 5'НТО hnRNPК (v2) («Stard7-hnRNPК200» и «Stard7-hnRNPК100» соответственно). Оценивали эффект нокдауна eIF4G2 в клетках 293Т в сравнении с 5'НТО дикого типа (WT) (p<0,0001 в всех случаях). (Б) Схематичное изображение в

масштабе репортеров *Stard7*, тестируемых в панели А. Показаны 5'НТО и начало CDS *Fluc*. Стрелками указаны uORF в 5'НТО. WT – 5'НТО дикого типа; X-*Stard7* – uAUG кодон заменен на UAG стоп-кодон; желтым показаны фрагменты, взятые из 5'НТО HSPA2, розовым показаны фрагменты из 5'НТО hnRNPК (v2). (В) Репортеры *Maf1*, *Stard7* и *UCP2* были укорочены с 5'-конца (5'Δ). Оценивали эффект нокдауна *eIF4G2* в клетках 293Т в сравнении с 5'НТО дикого типа (WT) ($p < 0,001$ для *Maf1* и *Stard7*, ns – статистически незначимо для *UCP2*). Для нокдауна использовали siRNA #1. (Г) Схематичное изображение в масштабе репортеров, тестируемых в панели В. WT – 5'НТО дикого типа; 5'Δ – укороченные 5'НТО мРНК-мишеней *eIF4G2* так, чтобы расстояние от 5'-конца до uORF составило ~70 нт. Показаны 5'НТО и начало CDS *Fluc*. Стрелками указаны uORF в 5'НТО.

Можно предположить, что uORF обеспечивает *eIF4G2*-зависимость трансляции, только если она находится на определенном расстоянии от 5'-конца мРНК. Для проверки этой гипотезы мы укоротили 5'НТО репортеров *Stard7*, *Maf1* и *UCP2* так, чтобы расстояние от 5'-конца до их uORF составило 60-70 нт (рис. 25Г). Отметим, что это расстояние достаточно велико для того, чтобы предотвратить пропускающее сканирование uAUG кодона, искусственно спровоцированное слишком короткой 5'НТО [Kozak, 1991; Matsuda et al., 2010]. Однако только укороченная с 5'-конца мРНК *Stard7* показала заметно сниженную зависимость от *eIF4G2*, что свидетельствует о том, что расстояние от 5'-конца до uORF не является основным фактором вовлечения *eIF4G2* в сканирование (рис. 25В). Полученные результаты, однако же наглядно демонстрируют, что различные 5'НТО сканируются с разной эффективностью комплексами на основе *eIF4G1* и *eIF4G2*, и что нуклеотидные последовательности как перед, так и после uORF влияют на вклад *eIF4G2* в сканирование. В совокупности эти данные позволяют предположить, что пока еще не выявленные свойства uORF и 5'НТО определяют зависимость трансляции от *eIF4G2*.

6. *eIF4G1* и *eIF4G2* могут функционально замещать друг друга в процессе сканирования

Чтобы лучше понять характер взаимоотношений между *eIF4G1* и *eIF4G2*, мы провели нокдаун *eIF4G1* в клетках 293Т. Поскольку у *eIF4G1* есть плохо охарактеризованный гомолог *eIF4G3* (также известный как *eIF4GII*), экспрессия которого может повышаться при нокдауне *eIF4G1* или он может иным образом участвовать в трансляции мишеней *eIF4G2*, мы также проверили эффект нокдауна *eIF4G1* в клетках RKO, в которых ген *eIF4G3* был нокаутирован с помощью нуклеазы AsCpf1 (линия клеток RKO *eIF4G3*^{-/-} была получена ранее В.В. Смирновой в нашей лаборатории). Оценивали эффект индивидуальных нокдаунов *eIF4G1*, *eIF4G2*, а также двойного нокдауна на трансляцию репортерных мРНК в клетках 293Т (рис. 26) и RKO *eIF4G3*^{-/-} (рис. 27). Данные

также были пересчитаны для непосредственного отображения эффектов одного из нокдаунов в условиях обеднения другого белка (рис. 28).

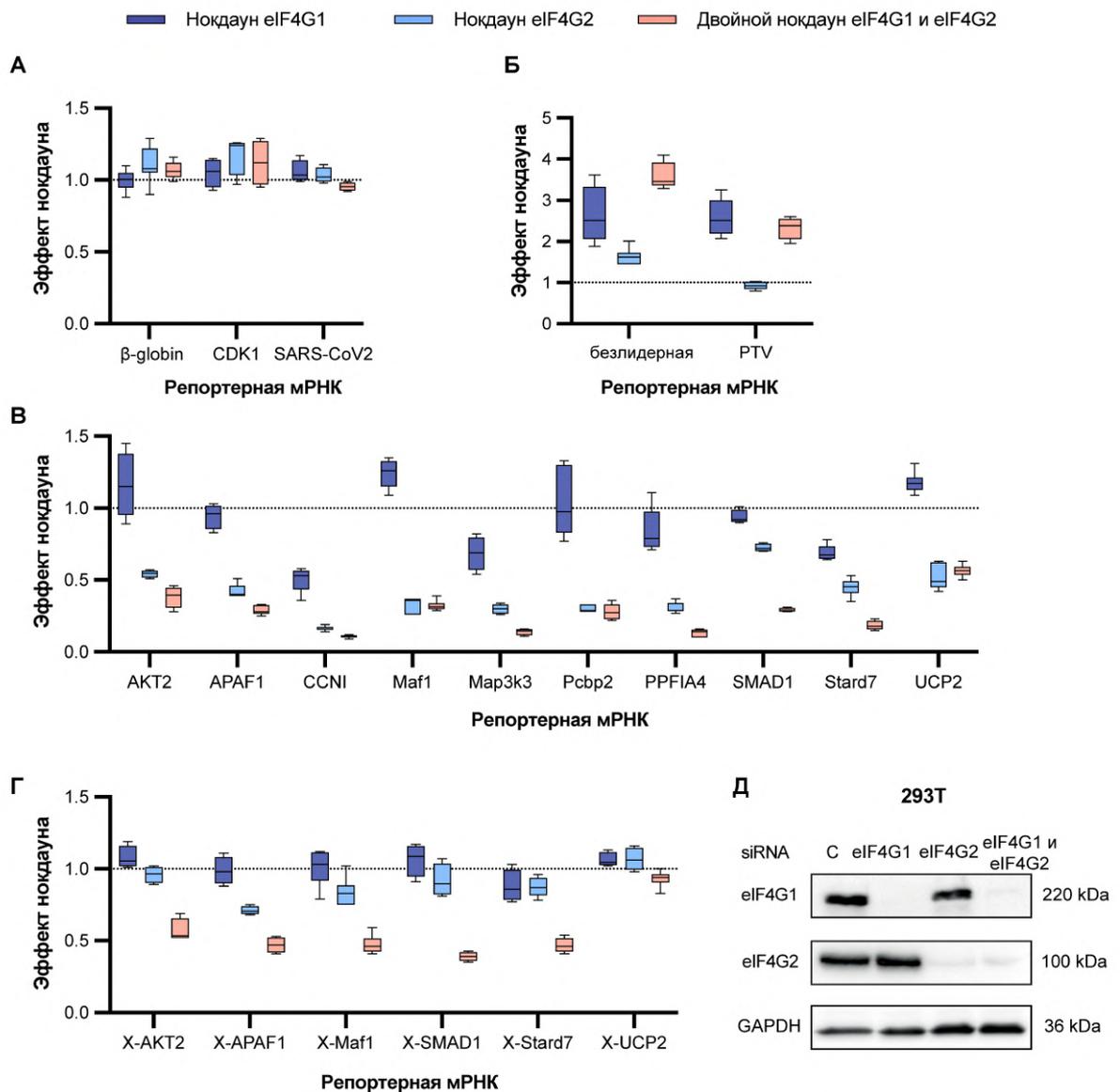


Рисунок 26. Нокдаун eIF4G1 и eIF4G2 в клетках 293T. Репортерные мРНК трансфицировали вместе с референсной мРНК β -глобина в контрольные клетки и клетки с нокдауном eIF4G1, eIF4G2 (siRNA #1) или обоих генов ($n \geq 8$). Данные представлены в виде отношения нормализованной экспрессии репортера в клетках с нокдауном eIF4G1, eIF4G2 или двойным нокдауном eIF4G1 и eIF4G2 к контрольным клеткам. Пунктирная линия на отметке 1 соответствует ответу, идентичному поведению репортерной мРНК с 5'НТО β -глобина. мРНК сгруппированы следующим образом: (А) репортерные мРНК, нечувствительные к нокдаунам, (Б) репортеры PTV и без 5'НТО (безлидерная мРНК), трансляция которых стимулируется нокдауном eIF4G1, (В) мРНК-мишени eIF4G2, (Г) мРНК-мишени eIF4G2, в которых мутированы uORF (uAUG заменены на стоп-кодона). (Д) Вестерн-блот анализ контрольных клеток 293T и клеток с нокдауном eIF4G1, eIF4G2 (siRNA #1) или обоих белков. GAPDH детектирован в качестве контроля загрузки.

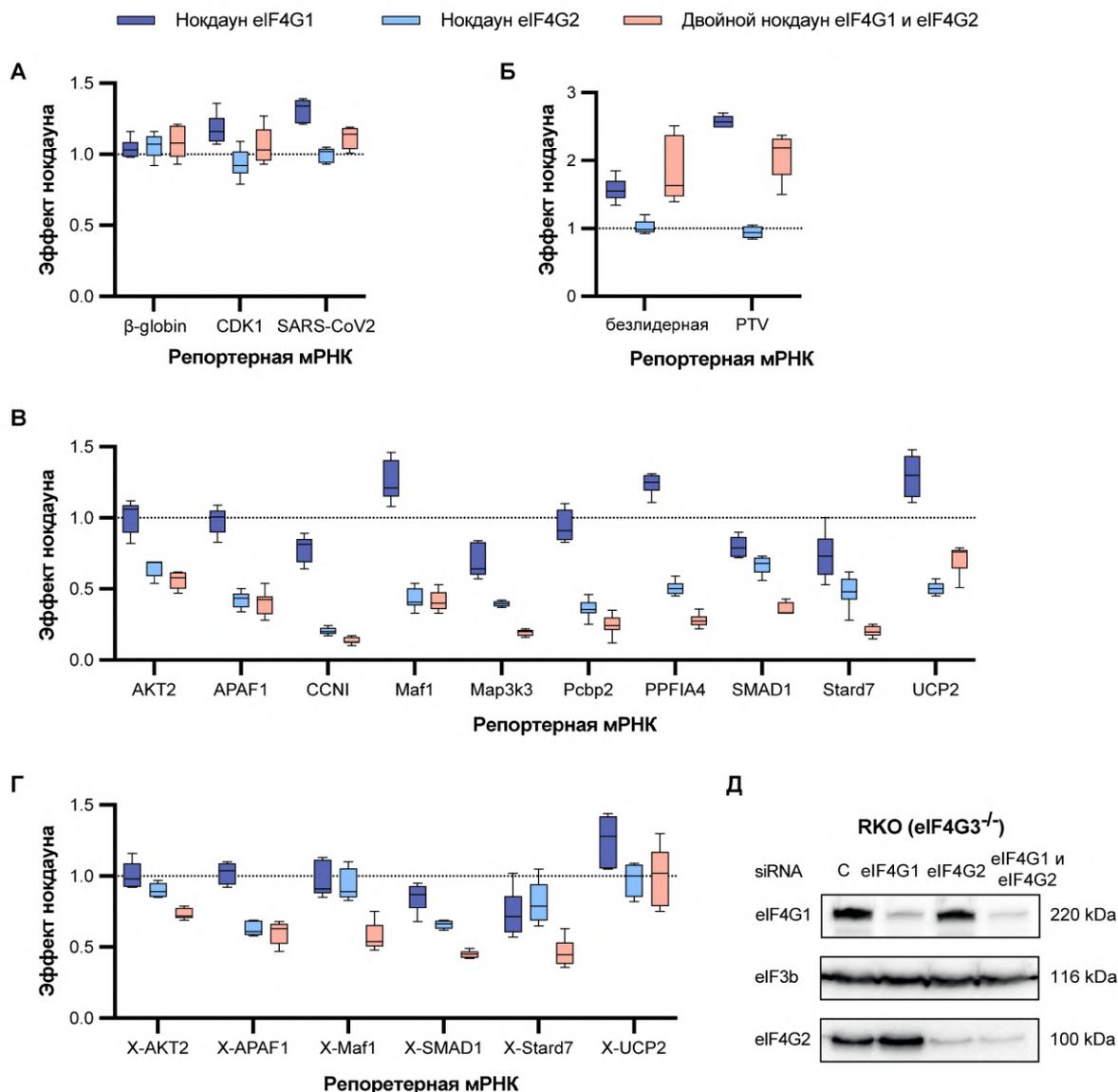


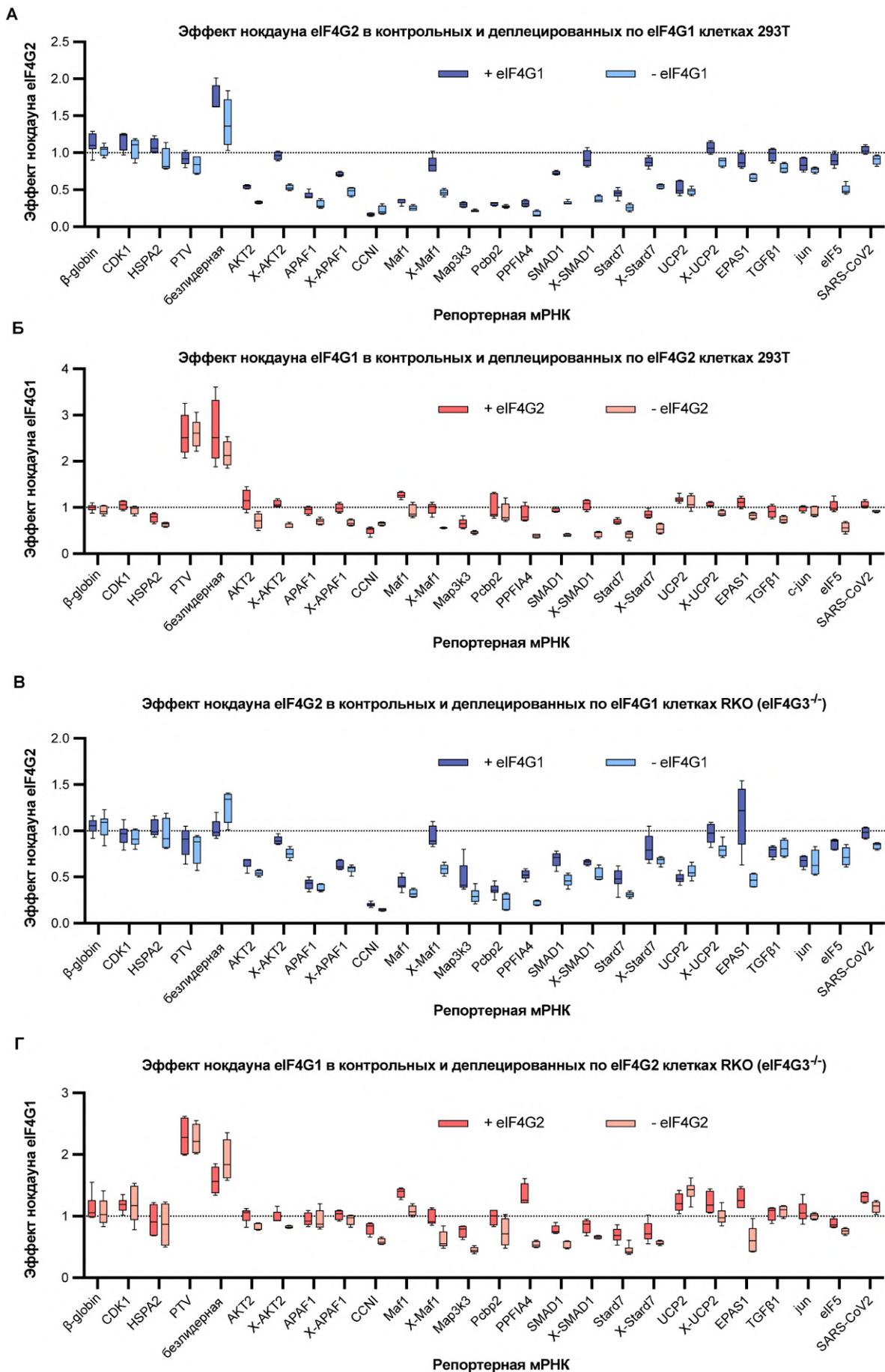
Рисунок 27. Нокдаун eIF4G1 и eIF4G2 в клетках RKO eIF4G3^{-/-}. Репортерные мРНК трансфицировали вместе с референсной мРНК β -глобина в контрольные клетки и клетки с нокдауном eIF4G1, eIF4G2 (siRNA #1) или обоих генов ($n \geq 8$). Данные представлены в виде отношения нормализованной экспрессии репортера в клетках с нокдауном eIF4G1, eIF4G2 или двойным нокдауном eIF4G1 и eIF4G2 к контрольным клеткам. Пунктирная линия на отметке 1 соответствует поведению, идентичному поведению репортера β -глобина. мРНК сгруппированы следующим образом: (А) репортерные мРНК, нечувствительные к нокдаунам, (Б) репортеры PTV и без 5'НТО (безлидерная мРНК), трансляция которых стимулируется нокдауном eIF4G1, (В) мРНК-мишени eIF4G2, (Г) мРНК-мишени eIF4G2, в которых мутированы uORF (uAUG заменены на стоп-кодона). (Д) Вестерн-блот анализ контрольных клеток 293Т и клеток с нокдауном eIF4G1, eIF4G2 (siRNA #1) или обоих белков. eIF3b детектирован в качестве контроля загрузки.

Нокдаун eIF4G1 в клетках 293Т не повлиял специфически (т.е. относительно репортера с 5'НТО β -глобина) на трансляцию большинства тестируемых мРНК (рис. 26), за исключением репортеров CCNI, Map3k3 и Stard7 (рис. 26В), трансляция которых уменьшилась в 1.5-2 раза. При этом эти репортеры отвечают на ингибирование mTOR так же, как и контрольная мРНК β -глобина (рис. 16В), то есть ответы на инактивацию eIF4G1

и eIF4E не коррелируют друг с другом. Мы склонны объяснять наблюдаемое снижение трансляции репортерных мРНК CCNI, Map3k3 и Stard7 повышенными требованиями к eIF4G1 во время их сканирования. Этот эффект также заметен, хотя и менее выражен, в клетках RKO *eIF4G3^{-/-}* (рис. 27B). Ранее нами было показано, что одновременный нокдаун *eIF4G1* и *eIF4G2* в клетках 293T заметно подавлял трансляцию ряда и других репортерных мРНК — EPAS1, eIF5, TGFβ1, которые не обладали какой-то чувствительностью к нокдауну eIF4G1 или eIF4G2 по отдельности [Смирнова, 2022]. При этом уровень трансляции *bona fide* мишеней eIF4G2 (APAF1, CCNI, PPFIA4, Maf1, Stard7, Pcbp2, Map3k3) при одновременном нокдауне *eIF4G1* и *eIF4G2* в клетках 293T был заметно ниже, чем при нокдауне одного только *eIF4G2* [Смирнова, 2022]. Трансляция новых верифицированных мишеней eIF4G2 SMAD1 и AKT2 также оказалась сильно чувствительной к нокдауну обоих гомологов в клетках 293T (рис. 26B) и RKO *eIF4G3^{-/-}* (рис. 27B).

Примечательно, что трансляция не зависящих от eIF4G2 мРНК с мутированными uORF (X-AKT2, X-APAF1, X-Maf1, X-SMAD1, X-Stard7), значительно снижается при одновременном нокдауне *eIF4G1* и *eIF4G2* и в клетках 293T (рис. 26Г). Другими словами, ограниченная доступность eIF4G1 делает трансляцию этих мРНК зависящей от eIF4G2 – и наоборот (рис. 28А, Б). Эффект проявлялся также в клетках RKO *eIF4G3^{-/-}*, но не столь значительно (рис. 27Г, рис. 28В, Г).

Мы показали, что eIF4G2 участвует в канонической кэп- и eIF4F-зависимой трансляции, в которой роль кэп-связывающего белка выполняет eIF4E, а не eIF3d. Наши данные убедительно дополняют полученные ранее результаты [Смирнова, 2022] и подтверждают, что eIF4G2 вступает в дело после распознавания кэпа и аккомодации рибосомных комплексов на мРНК. В совокупности представленные нами данные однозначно свидетельствуют о том, что сканирование требует участия eIF4G2 в условиях недостатка eIF4G1.



проанализированы по-другому. Репортерные мРНК трансфицировали вместе с референсной мРНК β -глобина в контрольные клетки и клетки с нокдауном *eIF4G1*, *eIF4G2* (siRNA #1) или двойным нокдауном обоих генов. Эффект нокдауна *eIF4G1* оценивали в отсутствие и в присутствии *eIF4G2* и наоборот. (А) Эффект нокдауна *eIF4G1* в контрольных клетках и клетках с деплецией *eIF4G2*. В отличие от других рисунков, данные представлены как отношения нормализованной экспрессии репортеров в клетках с нокдауном *eIF4G1* к контрольным клеткам (обозначены как «+ *eIF4G2*») и в клетках, одновременно обедненных *eIF4G1* и *eIF4G2*, к клеткам с нокдауном *eIF4G2* (обозначены как «- *eIF4G2*»). Префикс «X-» в названии репортерной мРНК соответствует замене *uAUG* кодонов на стоп-кодона. (Б) Эффект нокдауна *eIF4G2* в контрольных и обедненных *eIF4G1* клетках 293Т. Данные представлены в виде отношения нормализованной экспрессии репортера в клетках с нокдауном *eIF4G2* к контрольным клеткам (обозначены как «+ *eIF4G1*») и в клетках, одновременно обедненных *eIF4G1* и *eIF4G2*, к клеткам с нокдауном *eIF4G1* (обозначены как «- *eIF4G1*»). Панели В и Г аналогичны панелям А и Б соответственно, но результаты получены в клетках *RKO eIF4G3^(-/-)*.

7. Модель участия *eIF4G2* в пропускающем сканировании

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что зависимость трансляции от *eIF4G2* для тестируемых мишеней определяется наличием в них *uORF*, причем именно пропускающее сканирование с участием *eIF4G2* играет важную роль в обеспечении трансляции основных *ORF*. Единственное различие между 5'НТО дикого типа и с мутированными *uAUG* кодонами заключается в наличии рибосом, транслирующих *uORF* и препятствующих процессу сканирования. При этом приведенные данные (рис. 26, 27, 28) позволяют предположить, что вклад *eIF4G2* в трансляцию увеличивается при недостатке *eIF4G1*. Если принять во внимание эти два факта, то можно выдвинуть гипотезу, что интерференция рибосом приводит к потере сканирующими комплексами *eIF4G1*. *eIF4G2* не обнаруживается в комплексах с *eIF4E* и *eIF4G1* [de la Parra et al., 2018; Sugiyama et al., 2017]. Это также предполагает, что сканирующие комплексы с *eIF4G2*, не связаны с кЭпом.

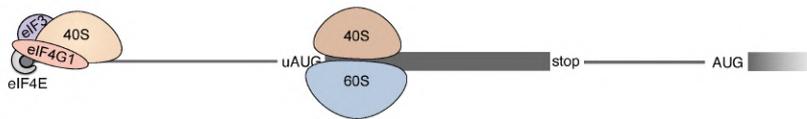
Поскольку мРНК-мишени *eIF4G2* продолжают транслироваться в отсутствие *eIF4G2*, по-видимому, не весь *eIF4G1* диссоциирует из сканирующего комплекса или может вновь связаться с ним. Скорее всего, *eIF4G1* привлекается обратно к m^7G -кЭпу, чтобы способствовать следующему раунду связывания с рибосомами. Таким образом, диссоциация *eIF4G1* из сканирующих комплексов может быть отличительной чертой *eIF4G2*-зависимой трансляции. Возможна спонтанная диссоциация-ассоциация *eIF4G1* при сканировании более длинных 5'НТО. В этом случае существуют две значимые детерминанты для реассоциации: наличие свободного *eIF4G1* и стерическая доступность.

Для объяснения того, как сканирование транслированной *uORF* приводит к необходимости использования *eIF4G2*, мы предложили модель, которую назвали "сменой лошадей". Она предполагает, что *eIF4G2* замещает *eIF4G1*, когда последний диссоциирует

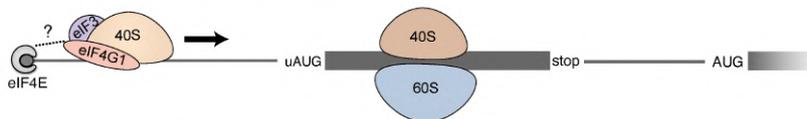
из сканирующего комплекса в результате столкновения сканирующего комплекса, пропустившего uAUG кодон, с иницирующей, транслирующей, или терминирующей 80S рибосомой (рис. 29). Действительно, в некоторых случаях для eIF4G2-зависимости трансляции достаточно uORF, кодирующей всего 3 аминокислотных остатка (рис. 23, 24B), но в других случаях eIF4G2-зависимость положительно коррелирует с длиной uORF (рис. 23). Эти данные показывают, что сканирующие рибосомы могут интерферировать с элонгирующими, но иницирующими или даже терминирующими рибосомами также могут служить важным фактором.

1. Кэп-зависимое eIF4F-опосредованное привлечение рибосомы к 5'-концу

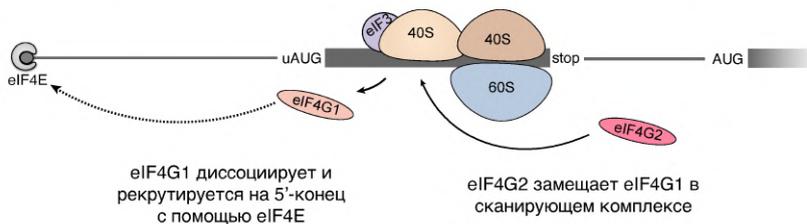
● m⁷G кэп



2. eIF4G1-опосредованное сканирование



3. eIF4G1 диссоциирует из-за столкновений между сканирующим комплексом и 80S на uORF



4. eIF4G2 участвует в пропускающем сканировании через транслируемую uORF

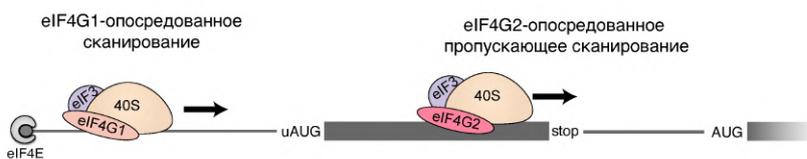


Рисунок 29. Предложенный механизм участия eIF4G2 в кэп-зависимой трансляции у эукариот для обеспечения пропускающего сканирования. Интерференция сканирующих комплексов с 80S рибосомами на uORF приводит к необходимости использования eIF4G2. (А) Малая субъединица рибосомы привлекается к 5'-концу мРНК посредством взаимодействия между m⁷G-кэпом и eIF4F. На рисунке изображена рибосома 80S, транслирующая uORF. (Б) eIF4G1 облегчает сканирование с самого 5'-конца мРНК. (В) Столкновение сканирующего комплекса с 80S рибосомой в пределах uORF приводит к частичной потере eIF4G1, который возвращается к m⁷G-кэпу благодаря взаимодействию с eIF4E. После этого роль хеликазы берет на себя eIF4G2-eIF4A. (Г) eIF4G1 участвует в сканировании с самого 5' конца мРНК, а eIF4G2 обеспечивает сканирование после потери eIF4G1 и таким образом опосредует пропускающее сканирование. Тройственный комплекс (eIF2, Мет-мРНК_и^{Met} и ГТФ), eIF1, eIF1A, eIF5, eIF4A и eIF4B для простоты не показаны.

По-видимому, трудности сканирования могут возникать, когда более быстрый рибосомный комплекс наталкивается на более медленную рибосому впереди или на другое препятствие. Наиболее вероятными препятствиями для сканирующего комплекса являются более медленные иницирующие или терминирующие рибосомы [Wang et al., 2022]. Возможны также столкновения между сканирующими и транслирующими рибосомами. Было показано, что сканирующие комплексы движутся быстрее, чем транслирующие рибосомы [Vassilenko et al., 2011]. Скорость элонгации оценивается около 5 кодонов в секунду [Gerashchenko et al., 2021], в то время как оценки скорости сканирования очень разнятся. Недавнее наблюдение чрезвычайно быстрого сканирования (более 100 нт/с) [Wang et al., 2022] позволяет предположить, что сканирующий комплекс потенциально может догонять рибосомы, транслирующие uORF. Со структурной точки зрения, eIF4G1 находится на периферии 48S инициаторного комплекса [Querido et al., 2022] и расположен равноудаленно от входа и выхода мРНК в канал рибосомы, поэтому удар с любой стороны от затормозившего инициаторного комплекса может заставить eIF4G1 диссоциировать.

Наблюдаемые эффекты в клетках с нокадауном обоих генов *eIF4G1* и *eIF4G2* также подтверждают идею о том, что eIF4G2 может замещать eIF4G1 в процессе сканирования (рис. 26, 27, 28). Ограниченная доступность eIF4G1 делает трансляцию в норме eIF4G2-независимых мРНК (в том числе мРНК-мишеней с удаленными uORF), по крайней мере, частично чувствительной к деплеции eIF4G2 и наоборот. Наши результаты согласуются с полученными ранее данными литературы, в которых сообщалось о синергизме при одновременной деплеции eIF4G1 и eIF4G2 [Ramírez-Valle et al., 2008]. Такой механизм замены одного eIF4G гомолога на другой, по крайней мере частично, способствует пропускающему сканированию через uORF, увеличивая тем самым число сканирующих комплексов, достигающих основного стартового кодона и высвобождая eIF4F для новых актов инициации. Это может иметь решающее значение для высших эукариот, мРНК которых богаты uAUG кодонами. Таким образом, именно eIF4G1/eIF4F обеспечивает загрузку предынициаторного комплекса на 5'-конец мРНК, а затем eIF4G2 участвует в сканировании нижележащих областей 5'НТО после распознавания m⁷G-кэпа. мРНК с короткими 5'НТО, в которых узнавание AUG происходит до того, как eIF4G1 успеет диссоциировать, не нуждаются в eIF4G2.

Конечно, uORF не являются единственными препятствиями на пути сканирующих рибосом, заставляющими eIF4G1 заменяться на eIF4G2. Например, мРНК *Pcbp2* не содержит uORF, но ее трансляция, тем не менее, сильно зависит от eIF4G2, а удаление uORF из GC-богатой 5'НТО мРНК *RHD2* также не снимает eIF4G2-зависимость ее трансляции (рис. 19A). В качестве таких препятствий для сканирующих комплексов

можно предложить вторичные структуры и мРНК-связывающие белки. Эти препятствия также могут быть причиной усиления зависимости трансляции от eIF4G2 при увеличении длины 5'НТО.

8. Роль eIF4G2 в сканировании 5'НТО эукариотической бицистронной мРНК POLG/POLGARF

Относительно недавно при участии сотрудников нашей лаборатории в мРНК каталитической субъединицы митохондриальной ДНК-полимеразы POLG (*DNA polymerase subunit gamma*) был обнаружен альтернативный сайт инициации трансляции: CUG кодон, обеспечивающий трансляцию консервативной открытой рамки считывания (260 триплетов), перекрывающейся с рамкой самой ДНК-полимеразы примерно на 20% (рис. 30А) [Khan et al., 2020; Loughran et al., 2020]. Этот белок получил название POLGARF (*POLG Alternative Reading Frame*). Он очень консервативен среди плацентарных млекопитающих с расшифрованными геномами. Несмотря на то, что стартовый CUG кодон POLGARF находится в контексте, не считающимся идеальным (CCAAGCUGGA), он обеспечивает эффективную инициацию за счет начинающейся в положении +17 стабильной шпильки (рис. 30А). Было показано, что POLGARF накапливается в ядрышке, но при определенных митогенных воздействиях секретируется из клетки. На расстоянии около 150 нуклеотидов от 5'-конца в общей для POLG и POLGARF 5'НТО располагается регуляторная uORF, открываемая uAUG кодоном в хорошем нуклеотидном контексте и транслируемая по данным рибосомного профайлинга (согласно геномному браузеру GWIPS-viz). Трансляция как POLGARF, так и POLG контролируется этой uORF, и поэтому как пропускающее сканирование, так и реинициация вносят свой вклад в экспрессию обоих белков [Loughran et al., 2020]. Инициация трансляции на стартовом кодоне POLG происходит в основном рибосомами, реиницировавшими после трансляции uORF, а в случае POLGARF реинициация и пропускающее сканирование вносят примерно равный вклад в инициацию на его CUG кодоне (рис. 30Г, Д).

Ген *POLG* – один из немногих ядерных генов, ассоциированных с нарушениями митохондриальной ДНК [Rahman et al., 2019], а удлинение полиглутаминового тракта POLG связывают с болезнью Паркинсона и другими нейропатологическими состояниями [Anvret et al., 2010; Eerola et al., 2010]. Сложная структура открытых рамок считывания в мРНК POLG/POLGARF и ее физиологическая значимость побудили нас проверить, не участвует ли в ее трансляции eIF4G2.

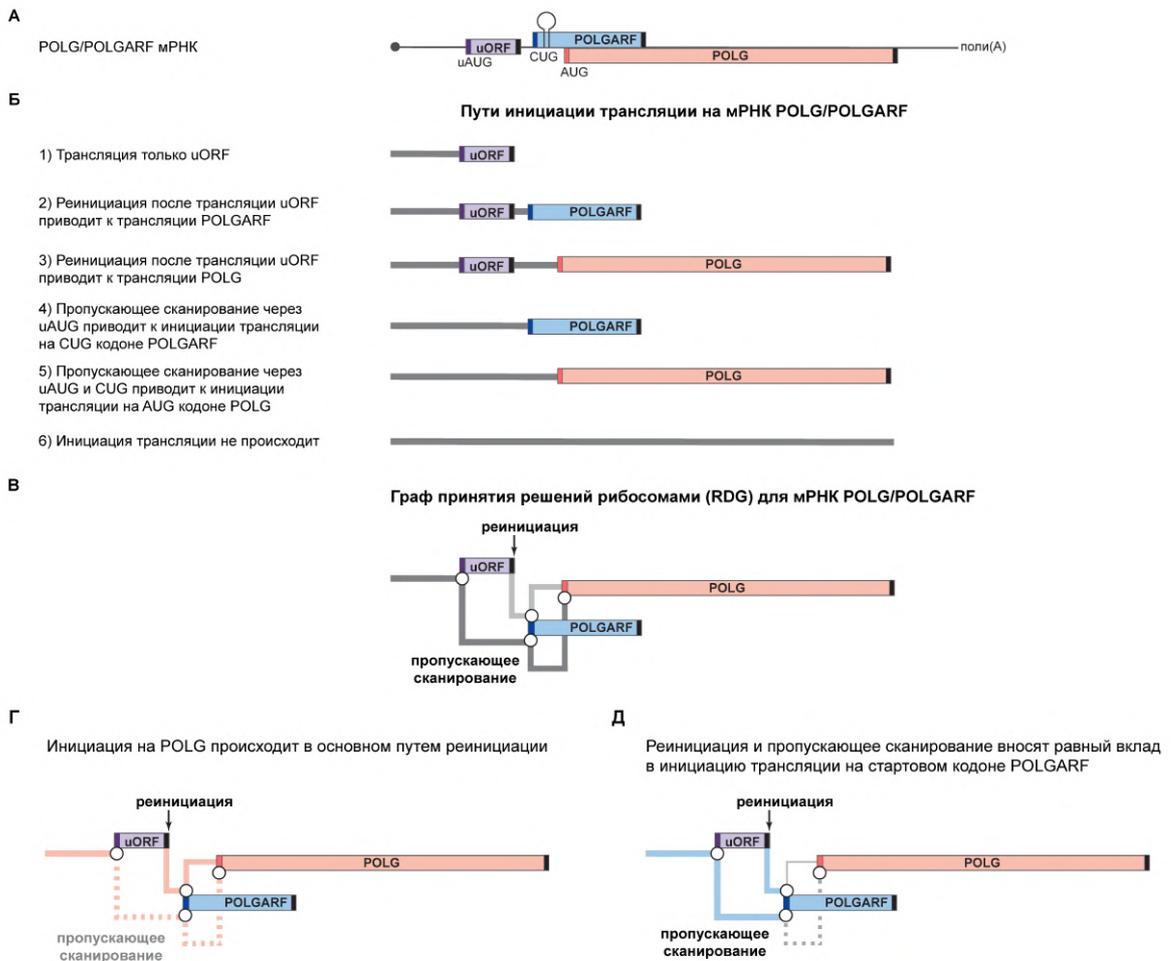


Рисунок 30. Особенности инициации трансляции эукариотической бицистронной мРНК POLG/POLGARF. Для удобства восприятия схема нарисована не в масштабе. **(А)** Схематичное изображение мРНК POLG/POLGARF. мРНК имеет GC-богатую (65% GC) 5'НТО длиной ~300 нт. Примерно в 150 нт от 5'-конца находится регуляторная uORF (фиолетовая рамка), кодирующая 24 а.о. Расстояние между стоп-кодоном uORF и стартовым кодоном POLGARF (обозначен темно-синим) составляет всего 11 нуклеотидов. CUG кодон открывает рамку POLGARF, которая перекрывается с рамкой POLG более чем на 20 % и кодирует высококонсервативный белок размером ~25 кДа. Рядом с CUG кодоном в мРНК формируется шпилька, обеспечивающая эффективную инициацию трансляции на этом стартовом кодоне. Расстояние между стартовыми кодонами POLGARF и POLG (обозначен красным) составляет всего 53 нуклеотида. Черным отмечены стоп-кодоны. **(Б)** Пути инициации трансляции на мРНК POLG/POLGARF. Рибосомы могут инициировать трансляцию только на uORF, реиницировать после трансляции uORF или пропускать uAUG, тем самым обеспечивая пропускающее сканирование для инициации трансляции на стартовых кодонах POLGARF и POLG. Реинициация и пропускающее сканирование указаны относительно uORF. Все рибосомы, начинающие трансляцию на AUG кодоне POLG, пропустили стартовый кодон POLGARF, независимо от их пути через uORF. **(В)** Граф принятия решений рибосомами, представляющий трансляцию как несколько путей рибосом через 5'НТО мРНК POLG/POLGARF. ORF показаны прямоугольниками, круги отражают точки бифуркации, в которых рибосома "принимает решение", начинать трансляцию или нет. Путь пропускающего сканирования для инициации на ниже расположенных стартовых кодонах показан темно-серым цветом. После трансляции uORF терминировавшая рибосома может возобновлять сканирование для последующей инициации трансляции на стартовых кодонах POLGARF или POLG (путь реинициации; обозначен светло-серым). **(Г)** Инициация

трансляции на стартовом кодоне POLG происходит в основном рибосомами, реиницировавшими после трансляции uORF. Пунктирная линия соответствует небольшому вкладу (около 15%) пропускающего сканирования в трансляцию POLG. (Д) Реинициация и пропускающее сканирование вносят примерно равный вклад в инициацию на CUG кодоне POLGARF. Серые линии отражают пути рибосом, продолжающих движения к AUG кодону POLG. Концепция визуализации движения рибосом по 5'НТО была взята из [Tierney, J.S et al., 2023].

8.1. eIF4G2 участвует в трансляции POLG и POLGARF

Во-первых, мы проверили, необходим ли eIF4G2 для трансляции POLG и/или POLGARF. Репортерные конструкции для изучения трансляции POLG и POLGARF были получены ранее в лаборатории [Loughran et al., 2020] и отличаются лишь одним нуклеотидом на стыке с последовательностью CDS люциферазы светлячка (Fluc), что и определяет, в рамке с POLG или POLGARF находится сама люцифераза (рис. 31Ж, 3). В случае репортеров POLGARF экспрессируется химерный белок, состоящий из 33 N-концевых аминокислотных остатков POLGARF, слитых с Fluc, а в случае POLG — из 15 N-концевых аминокислотных остатков POLG, слитых с Fluc. Для каждой из конструкций была получена пара, в которой uAUG кодон был заменен на UAG стоп-кодон (обозначены как «uAUGm») (рис. 31Ж, 3).

Все репортерные *in vitro* транскрибированные m⁷G-кэпированные и полиаденилированные мРНК, полученные с использованием перечисленных молекулярно-генетических конструкций, трансфицировали в клетки 293Т и Huh7 с нокдауном *eIF4G2*. В соответствии с нашими ожиданиями, трансляция POLG значительно зависела от eIF4G2, тогда как трансляция POLGARF — в несколько меньшей степени (рис. 31). Как и в случае большинства ранее подтвержденных нами мРНК-мишеней eIF4G2, eIF4G2-зависимость трансляции и POLGARF, и POLG определяется uORF (для обоих случаев $p < 0.0001$).

Для того, чтобы более подробно охарактеризовать особенности трансляции мРНК POLG/POLGARF с участием eIF4G2, нам необходимо было ответить на следующие вопросы: 1) если эта мРНК транслируется кэп-зависимо, то роль кэп-связывающего белка выполняет eIF4E или eIF3d; 2) вносит ли CUG стартовый кодон POLGARF дополнительный вклад в eIF4G2-зависимость трансляции POLG (недавняя работа продемонстрировала, что деплеция eIF4G2 может приводить к усилению трансляции с CUG-кодонов [She et al., 2023]); 3) важно ли наличие именно CUG, а не AUG кодона POLGARF для трансляции мРНК POLG; 4) какую роль играет инициаторная шпилька POLGARF в инициации трансляции на стартовом кодоне POLG. Постараемся разобраться со всеми перечисленными вопросами по порядку.

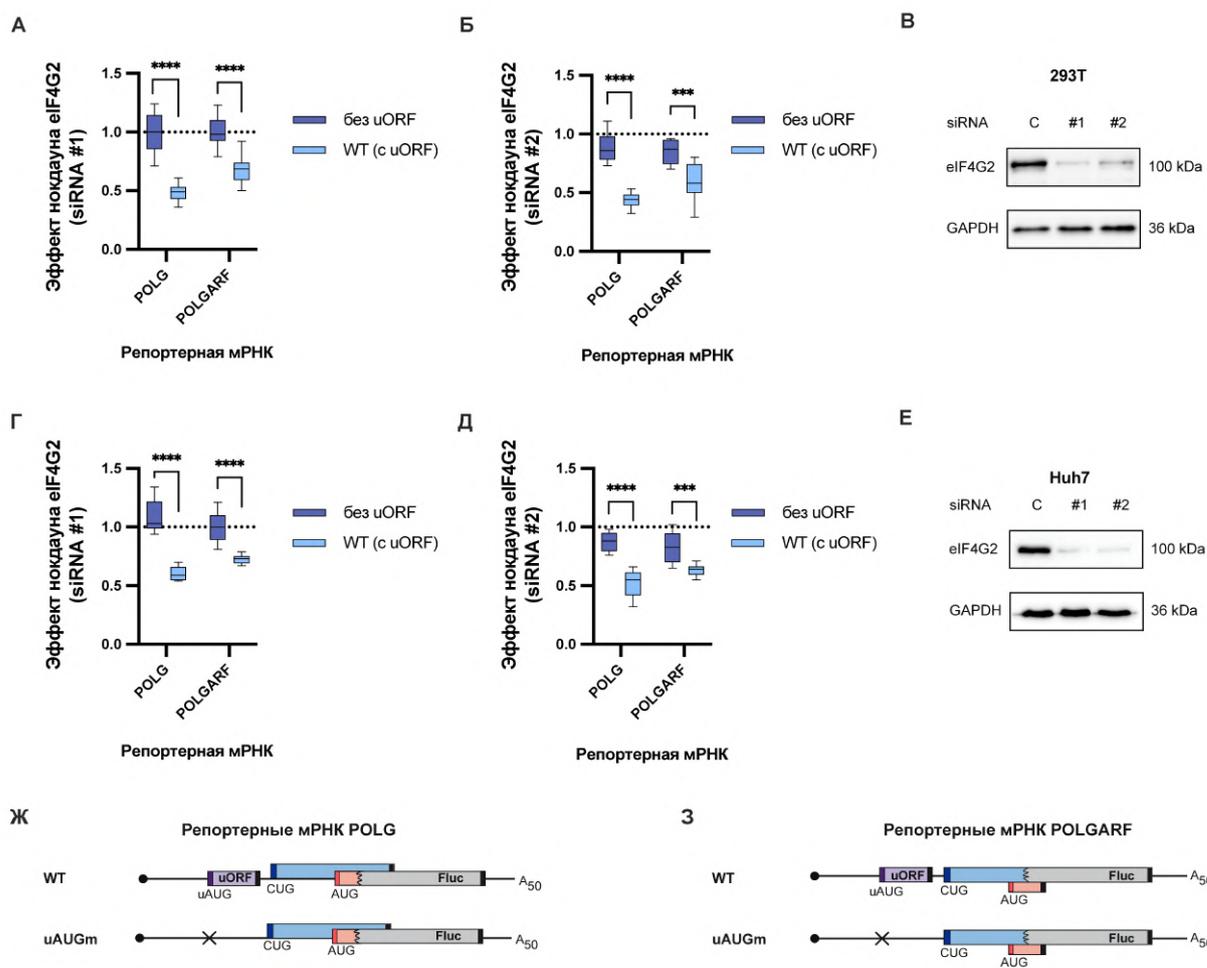


Рисунок 31. Наличие uORF делает трансляцию POLG и POLGARF eIF4G2-зависимой. (А) *In vitro* транскрибированные m^7G -кэпированные и полиаденилированные репортерные мРНК POLG или POLGARF с 5'НТО дикого типа или с мутированным стартовым кодоном uORF были трансфицированы в клетки 293Т с деpleцией eIF4G2 (siRNA #1) вместе с референсной мРНК β -глобина ($n \geq 15$). Эффект нокдауна рассчитан как отношение нормализованной экспрессии репортера в клетках с нокдауном eIF4G2 к контрольным клеткам. Статистическая значимость определена с помощью U-теста Манна-Уитни. Три звездочки и четыре звездочки соответствуют $p < 0,001$ и $p < 0,0001$. (Б) Панель Б аналогична панели А, за исключением того, что для нокдауна eIF4G2 использовали siRNA #2. (В) Вестерн-блот анализ нокдауна eIF4G2 в клетках 293Т, GAPDH детектирован как контроль нанесения. Панели Г, Д и Е аналогичны панелям А, Б и В соответственно, за исключением того, что нокдаун осуществляли в клетках Huh7 с использованием обеих siRNA. (Ж) Схематичное изображение репортеров POLG (не в масштабе). Стартовый AUG кодон POLG обеспечивает экспрессию репортерного белка, состоящего из 15 N-концевых аминокислотных остатков POLG (показаны розовым), слитых с люциферазой светлячка Fluc. CUG кодон находится вне рамки с Fluc и обеспечивает трансляцию пептида с 33 N-концевыми а.о. POLGARF. uORF показана фиолетовым, стартовые кодоны — соответствующими цветными полосами, а стоп-кодоны — черным. Крестиком отмечена позиция uAUG кодона, который был заменен на стоп-кодон в репортере «uAUGm». (З) Панель З аналогична панели Ж, за исключением того, что показаны репортерные мРНК POLGARF. Стартовый CUG кодон POLGARF (обозначен темно-синим) обеспечивает экспрессию репортерного белка, состоящего из 33 N-концевых аминокислотных остатков POLGARF (показаны голубым), слитых с Fluc. Стартовый кодон POLG находится вне рамки с Fluc и обеспечивает трансляцию пептида длиной 20 а.о. (показан розовым).

8.2. мРНК POLG/POLGARF транслируется eIF4E-зависимо

Изученные нами ранее мРНК-мишени eIF4G2 транслируются кэп-зависимо с участием eIF4E в качестве кэп-связывающего белка, а не eIF3d (рис. 16). Для того чтобы определить, является ли трансляция мРНК POLG и POLGARF eIF4E-зависимой, мы сначала обработали клетки 293Т ингибитором mTOR PP242. 1 мкМ PP242 ингибировал трансляцию POLG и POLGARF сопоставимо или даже сильнее, чем трансляцию других кэп- и eIF4E-зависимых репортерных мРНК. Полученные данные говорят о том, что eIF4E является основным кэп-связывающим белком для мРНК с 5'НТО POLG/POLGARF (рис. 32А). Во-вторых, нокадаун *eIF3d* в клетках 293Т не влиял на трансляцию POLG или POLGARF (рис. 32Б). Это также свидетельствует о том, что кэп-зависимая трансляция мРНК POLG/POLGARF осуществляется в первую очередь с участием eIF4E, а не eIF3d.

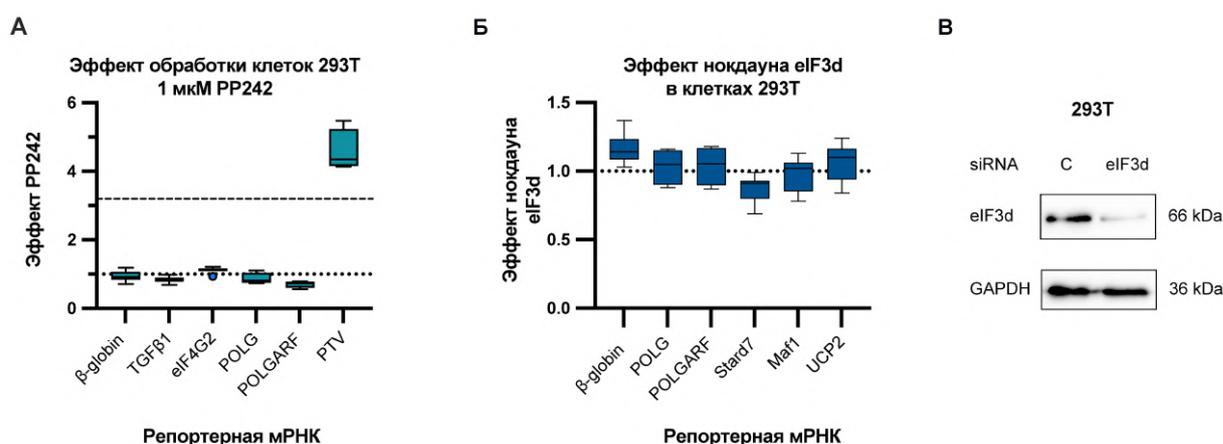


Рисунок 32. мРНК POLG/POLGARF транслируется по кэп-зависимому механизму с участием eIF4E, а не eIF3d. (А) Клетки 293Т обрабатывали либо 1 мкМ ингибитором mTOR (PP242), либо ДМСО для активации 4E-ВР. Затем клетки трансфицировали указанными мРНК-репортерами вместе с референсной мРНК с 5'НТО β-глобина и кодирующей N1uc ($n \geq 6$). Данные представлены как отношение нормализованной экспрессии репортеров в клетках, обработанных 1 мкМ PP242, к экспрессии в клетках, обработанных ДМСО. PP242 ингибирует трансляцию референсной репортерной мРНК β-глобина в ~3,2 раза (показано пунктирной линией). Пунктирная линия на отметке 1 соответствует такому же ингибированию трансляции, как для референсного репортера β-глобина. Известно, что трансляция мРНК с 5'НТО β-глобина, TGFβ1 и eIF4G2 является кэп-зависимой. Поведение мРНК с IRES-элементом PTV отражает полностью невосприимчивую к PP242 трансляцию, не зависящую от eIF4E. (Б) *In vitro* транскрибированные m^7G -кэпированные и полиаденилированные репортерные мРНК были трансфицированы в клетки 293Т с деpleцией eIF3d вместе с референсной мРНК β-глобина ($n \geq 10$). Данные представлены в виде отношения нормализованной экспрессии репортера в клетках с нокадауном eIF3d к контрольным клеткам. (В) Вестерн-блот анализ нокадауна eIF3d в клетках 293Т, GAPDH детектирован как контроль нанесения.

8.3. Роль uAUG и POLGARF стартовых кодонов в трансляции POLG

Ранее с использованием репортерных плазмидных ДНК были охарактеризованы некоторые особенности трансляции мРНК POLG и POLGARF: 1) удаление uORF стимулирует трансляцию POLGARF примерно в 2 раза и ингибирует трансляцию POLG примерно в 3 раза; 2) трансляция с CUG кодона POLGARF в нативном окружении происходит всего в ~1,7 раза хуже, чем при замене этого кодона на AUG; 3) необычно высокая эффективность трансляции с исследуемого кодона обусловлена наличием шпильки в положении +17 [Loughran et al., 2020]. Однако влияние мутаций CUG кодона и распаривания шпильки на трансляцию основной рамки POLG при этом изучено не было.

Мы отдельно мутировали uAUG или CUG стартовые кодоны, чтобы лучше понять, как uORF и POLGARF ORF контролируют экспрессию POLG (схемы репортеров представлены на Рисунках 33В и 33Г). Были получены репортерные конструкции мРНК POLG, в которых uAUG и/или CUG стартовый кодон POLGARF были заменены на стоп-кодон UAG (обозначены как «uAUGm», «CUGm», и «uAUGm & CUGm» соответственно). Так же были сконструированы репортеры POLG и POLGARF, в которых стартовый CUG кодон был заменен на AUG без изменения нуклеотидного контекста (обозначен как «CUG→AUG»). В каждую из имеющихся конструкций мы дополнительно ввели мутации, препятствующие образованию шпильки в начале CDS POLGARF так, чтобы при этом закодированная аминокислотная последовательность в начале пептида POLGARF оставалась неизменной (на всех рисунках ниже такие конструкции обозначены как «SL^{mut}»).

Полученные репортерные мРНК были трансфицированы в клетки 293Т для оценки относительной эффективности трансляции по сравнению с мРНК с 5'НТО дикого типа (рис. 33). Удаление uORF стимулировало трансляцию POLGARF в 2 раза (рис. 33Б) и сильно подавляло трансляцию POLG (в ~2,6 раза) (рис. 33А). При распаривании шпильки разнонаправленный эффект от удаления uORF пропадает: в таком случае удаление uORF значительно увеличивает эффективность трансляции как POLGARF (в 4 раза) (рис. 33Б), так и POLG (в 1,7 раза) (рис. 33А). По всей видимости, при разрушении шпильки инициаторные комплексы значительно хуже (в 2,7 раза) задерживаются на CUG кодоне POLGARF (рис. 34Б), и соответственно, в большей степени (в 2,8 раза) инициируют трансляцию на стартовом кодоне POLG (рис. 34А). Это согласуется с тем, что удаление стартового кодона POLGARF стимулирует трансляцию POLG в 3 раза при сохранении структуры шпильки интактной (рис. 33А). При этом такая мутация на фоне распаривания шпильки, ожидаемо, приводит лишь к незначительному усилению (всего в 1,2 раза) трансляции POLG (рис. 33А).

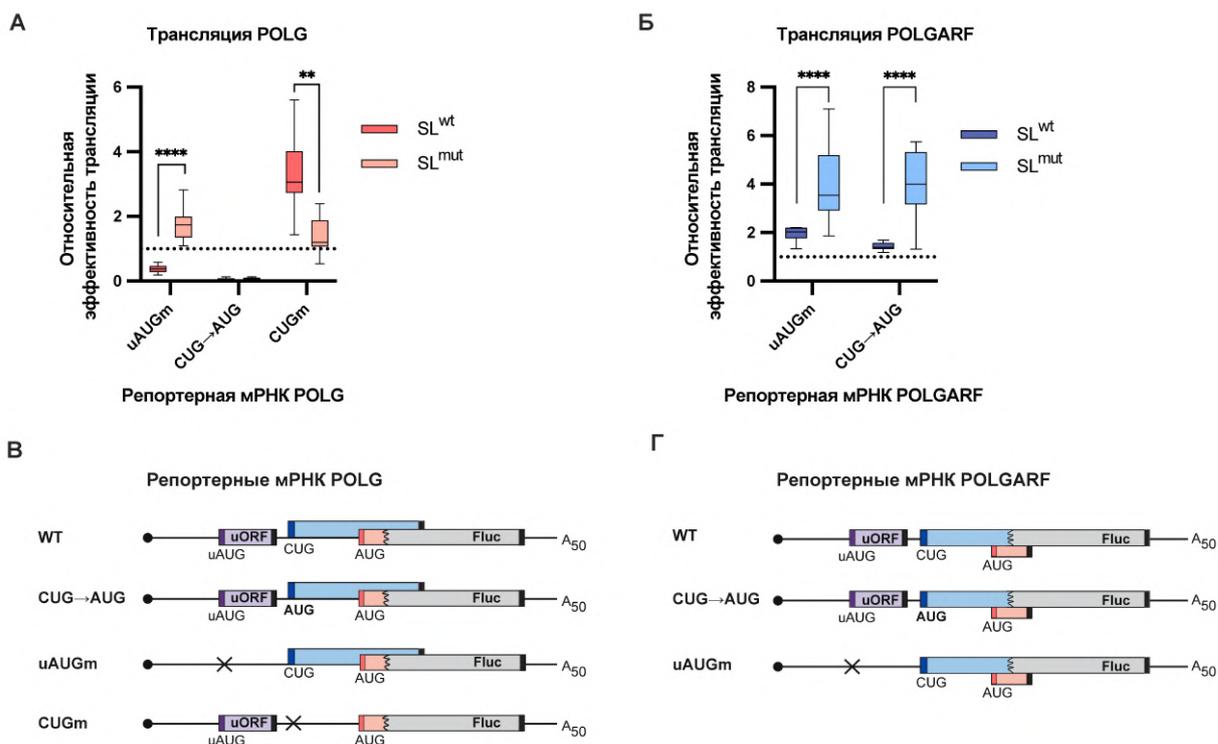


Рисунок 33. Мутация *uAUG* и *CUG* стартовых кодонов влияет на эффективность трансляции *POLG* и *POLGARF*. Все репортеры тестировали либо с интактной, либо с мутированной шпилькой *POLGARF* (обозначены «*SL^{wt}*» и «*SL^{mut}*» соответственно). Относительная эффективность трансляции представлена как отношение нормализованной экспрессии мутантного репортера к нормализованной экспрессии репортера с 5'НТО дикого типа. При использовании репортеров с распаренной шпилькой относительная эффективность трансляции показана по отношению к соответствующим конструкциям со стартовыми кодонами дикого типа и мутированной последовательностью области шпильки. Пунктирная линия на отметке 1 соответствует эффективности трансляции репортерной мРНК с 5'НТО дикого типа. (А) Результаты трансфекции репортерных мРНК *POLG*. Статистическая значимость определена с помощью U-теста Манна-Уитни. Четыре и две звездочки обозначают $p < 0,0001$ и $p < 0,01$ соответственно. (Б) Результаты трансфекции репортерной мРНК *POLGARF* (аналогично панели А). Четыре звездочки означают $p < 0,0001$. На панелях В и Г изображены схемы репортеров (не в масштабе) *POLG* и *POLGARF* соответственно. Крестиками отмечены позиции стартовых кодонов, которые были заменены на стоп-кодоны в соответствующих репортерах.

Замена стартового кодона *POLGARF* с *CUG* на *AUG* лишь незначительно (в ~1,4 раза) увеличивает эффективность инициации в случае, если инициаторная шпилька сохраняется интактной, но значительно (в ~4 раза) стимулирует трансляцию *POLGARF*, если ее мутировать (рис. 33Б). Это подтверждает, что именно инициаторная шпилька делает инициацию трансляции на *POLGARF* такой эффективной. Интересно, что при этом эта же мутация практически полностью ингибировала трансляцию *POLG* (~14-кратное снижение) независимо от наличия шпильки (рис. 33А), что свидетельствует о нелинейной взаимосвязи между силой стартового кодона и способностью рибосом “протекать” через него.

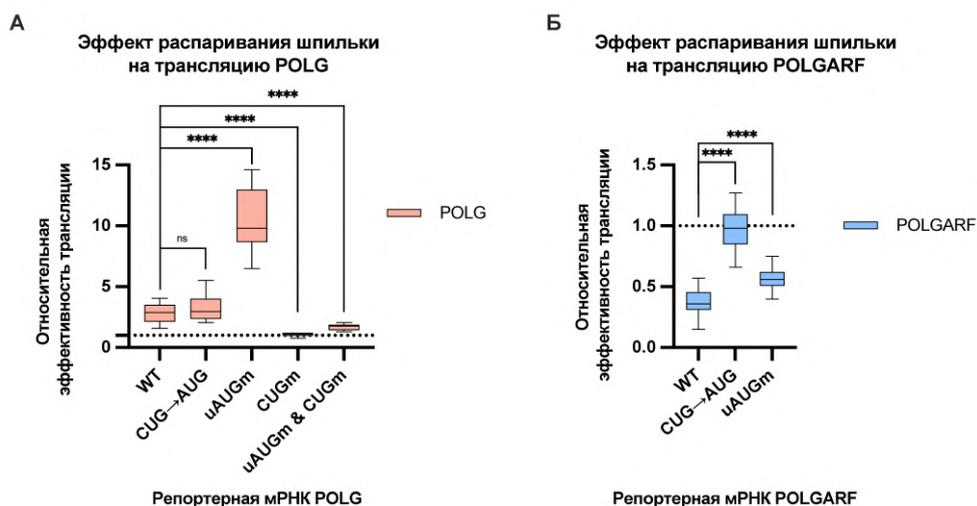


Рисунок 34. Разрушение инициаторной шпильки вблизи CUG кодона POLGARF влияет на эффективность трансляции POLG и POLGARF. Эффект распаривания шпильки показан как отношение нормализованной экспрессии мутантного репортера с мутантной последовательностью в области шпильки к нормализованной экспрессии соответствующего репортера с интактной шпилькой. Пунктирная линия на отметке 1 соответствует эффективности трансляции репортерной мРНК с 5'НТО дикого типа (WT). Статистическая значимость определена с помощью U-теста Манна-Уитни. Звездочки соответствуют $p < 0,0001$, ns – статистически незначимо. (А) Результаты трансфекции репортерных мРНК POLG. (Б) Результаты трансфекции репортерных мРНК POLGARF.

Наблюдаемый эффект напоминает случай регуляции трансляции у некоторых парамиксовирусов. В Р/С мРНК некоторых из них перед двумя AUG кодонами, открывающими рамки пептидов Р и С, соответственно, расположен ACG кодон в сильном контексте (GCCACGC), обеспечивающий эффективную трансляцию пептида С', представляющего собой удлиненный с N-конца пептид С. Мутация этого кодона в AUG лишь незначительно улучшает экспрессию пептида С', но сильно подавляет инициацию на стартовых кодонах С и Р [Boeck et al., 1992; Curran et al., 1988]. На самом деле, такой эффект легко объяснить математически. Если предположить, что половина сканирующих рибосом пропускает стартовый кодон, чтобы начать трансляцию на нижерасположенном стартовом кодоне, то удвоение вероятности инициации на первом стартовом кодоне, по сути, сводит инициацию на следующем стартовом кодоне к нулю.

В нашем случае мы не имеем возможности напрямую сравнивать эффективности инициации трансляции на стартовых кодонах POLGARF и POLG, поскольку с используемых репортерных конструкций хотя и синтезируется одна и та же люцифераза Fluc, но имеет она разные N-концевые довески, которые могут по-разному изменять кинетические параметры фермента. Однако тривиальные алгебраические выкладки для анализа взаимосвязи наблюдаемых эффектов мутаций кодонов и распаривания шпильки на трансляцию POLGARF и POLG, позволяют оценить соотношение актов инициации на CUG

кодоне POLGARF и стартовом кодоне POLG как 3:1. Результаты, полученные на мРНК, в которых CUG кодон заменен на AUG, математически согласуются с таким соотношением.

Независимо от лежащего в основе механизма, представленные данные демонстрируют, почему трансляция POLGARF инициируется консервативным кодоном, отличным от AUG: в противном случае уровень экспрессии POLG был бы крайне низким (едва ли не близким к нулю).

Такой механизм перераспределения реиницировавших рибосом к расположенному ниже стартовому кодону нередко встречается в человеческих мРНК, но, похоже, никогда не был концептуализирован. Когда короткая uORF предшествует двум стартовым кодонам, она, по-видимому, стимулирует трансляцию на более отдаленном стартовом кодоне и ослабляет трансляцию на ближайшем к ней стартовом кодоне, как это продемонстрировано для мРНК ATF4 [Lu et al., 2004; Vattam et al., 2004], ATF5 [Watatani et al., 2008; Zhou et al., 2008], SCL [Calkhoven et al., 2003], PTEN [Tzani et al., 2016], C/EBP α и C/EBP β [Calkhoven et al., 2000; Fernandez et al., 2023]. Эффективность реинициации после трансляции uORF зависит от расстояния между стоп-кодоном uORF и расположенным ниже по течению стартовым кодоном [Abastado et al., 1991; Grant et al., 1994; Kozak, 1987a; Luukkonen et al., 1995], и, как полагают, зависит от доступности тройственного комплекса eIF2-ГТФ-Мет-тРНК_и^{Met}. Согласно предложенной в литературе модели, чем дальше реиницировавший рибосомный комплекс сканирует, тем больше вероятность того, что он свяжет тройственный комплекс. Ранее предполагали, что этот механизм обеспечивает устойчивость трансляции перечисленных РНК в условиях фосфорилирования eIF2 α . Однако такое перераспределение происходит и в нормальных условиях и не требует инактивации eIF2 [Calkhoven et al., 2003; Calkhoven et al., 2000; Fernandez et al., 2023; Lu et al., 2004; Tzani et al., 2016; Vattam et al., 2004; Watatani et al., 2008; Zhou et al., 2008], что, вероятно, намекает на то, что eIF2-независимое сканирование является недооцененным, но при этом широко распространенным процессом [Dasso et al., 1990]. К тому же, репортерная мРНК POLG не проявила устойчивости к инактивации eIF2 при обработке тапсигаргином (ингибитором Ca²⁺-АТФазы SERCA), несмотря на явное сходство паттернов uORF в мРНК ATF4 и POLG (рис. 35). Это косвенно указывает на то, что роль сканирования без eIF2 в устойчивой к инактивации eIF2 трансляции требует переоценки.

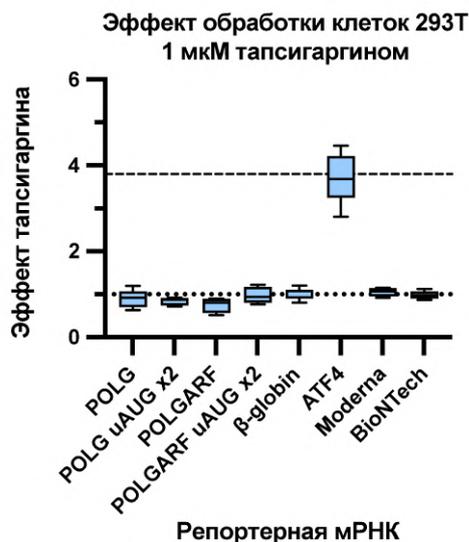


Рисунок 35. Трансляция *POLG* и *POLGARF* неустойчива к фосфорилированию *eIF2α*. Клетки 293Т обрабатывали либо PBS, либо 1 мкМ тапсигаргина, чтобы вызвать стресс ЭПР и последующее фосфорилирование *eIF2α*. Затем клетки трансфицировали указанными мРНК-репортерами вместе с референтной мРНК с 5'НТО β-глобина и кодирующей *Nluc* ($n \geq 6$). Данные представлены как отношение нормализованной экспрессии репортеров в клетках, обработанных 1 мкМ тапсигаргином, к экспрессии в клетках, обработанных PBS. Тапсигаргин ингибирует трансляцию референтной репортерной мРНК β-глобина в ~4 раза (показано пунктирной линией). Пунктирная линия на отметке 1 соответствует такому же ингибированию трансляции, как для референтного репортера β-глобина. Известно, что трансляция мРНК с 5'НТО *ATF4* является устойчивой к фосфорилированию *eIF2α*.

8.4. Наличие uORF вносит основной вклад в зависимость трансляции мРНК *POLG/POLGARF* от *eIF4G2*

Для изучения роли *eIF4G2* в трансляции *POLG* и *POLGARF* мы дополнительно протестировали все репортерные мРНК с мутированными uAUG, CUG стартовыми кодонами, а также соответствующие им мутанты, в которых инициаторная шпилька распарена («*SL^{mut}*») (рис. 36). Мы также дополнительно сконструировали репортер, в котором uORF слита с рамкой *POLG* и *Fluc* (обозначен «*fused*» на рис. 36Ж), для оценки роли *eIF4G2* в инициации трансляции мРНК *POLG/POLGARF* с самого 5'-конца до uAUG. Поскольку такая конструкция транслируется независимо от *eIF4G2* (рис. 36А, В, Д), можно с полной уверенностью говорить о том, что *eIF4G2* не присутствует в сканирующих комплексах с самого начала, а привлекается к рибосоме по ходу сканирования. Несмотря на сложную структуру изучаемой 5'НТО, именно наличие uORF вносит основной вклад в зависимость трансляции *POLG* и *POLGARF* от *eIF4G2*.

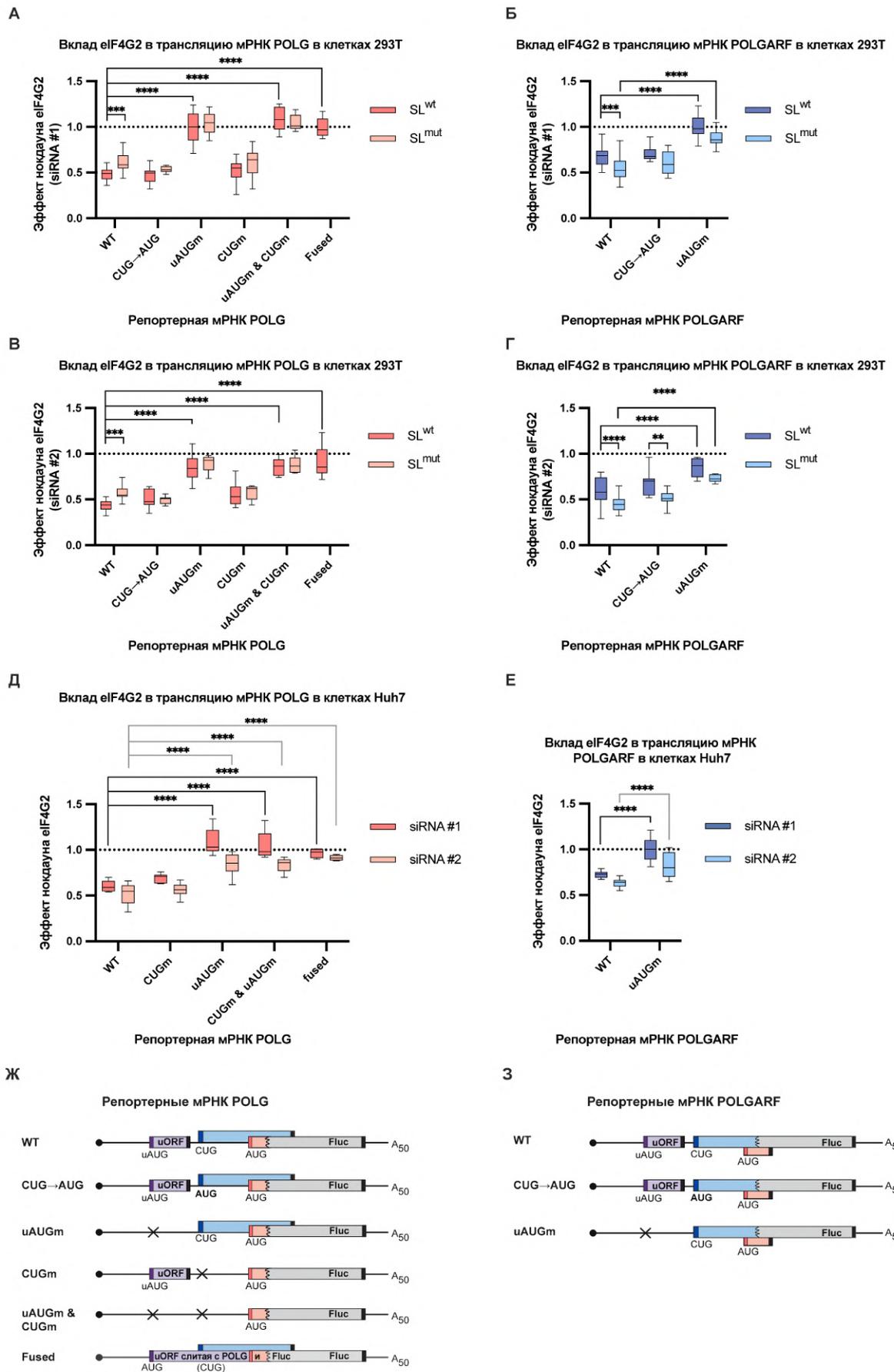


Рисунок 36. eIF4G2 промотирует трансляцию POLG и POLGARF. (А) *In vitro* транскрибированные m^7G -кэпированные и полиаденилированные репортерные мРНК

с 5'НТО POLG дикого типа (WT) или с указанными мутациями были трансфицированы в клетки 293T с деплецией eIF4G2 (siRNA #1) вместе с референсной мРНК β -глобина ($n \geq 10$). Данные представлены в виде отношения нормализованной экспрессии репортера в клетках с нокдауном eIF4G2 к контрольным клеткам. Все репортеры тестировали либо с интактной, либо с распаренной шпилькой (обозначены «SL^{wt}» и «SL^{mut}» соответственно). Статистическая значимость определена с помощью U-теста Манна-Уитни. Три звездочки и четыре звездочки соответствуют $p < 0,001$ и $p < 0,0001$. Статистическая значимость результатов, полученных для конструкций с мутированной шпилькой, опущена для удобства восприятия ($p < 0,0001$ для «uAUG_{wt}» и «CUG_{wt} & uAUG_{wt}» по сравнению с репортером WT). **(Б)** Результаты трансфекции репортерной мРНК POLGARF (аналогично панели А). Панели В и Г аналогичны панелям А и Б соответственно, за исключением того, что для нокдауна eIF4G2 использовали siRNA #2. Панели Д и Е аналогичны панелям А и Б соответственно, за исключением того, что нокдаун осуществляли в клетках Huh7 с использованием обеих siRNA. Тестировали только репортеры с интактной шпилькой. **(Ж)** Схематичное изображение репортеров POLG (не в масштабе). Крестиками отмечены позиции стартовых кодонов, которые были заменены на стоп-кодона в соответствующих репортерах. В репортерной мРНК, названной «fused», uORF слита с рамкой POLG и Fluc. Полученная химерная конструкция позволяет оценивать роль eIF4G2 в инициации трансляции мРНК POLG/POLGARF с 5'-конца до uAUG кодона. **(З)** Схематичное изображение репортеров POLGARF (аналогично панели Ж).

Рассматриваемый случай регуляции трансляции мРНК POLG/POLGARF с помощью uORF с участием eIF4G2 чуть более сложный, чем для ранее описанных мРНК-мишеней, поскольку в данном случае eIF4G2 контролирует экспрессию сразу двух цистронов. Остается не совсем ясно, почему трансляция цистрона POLG более требовательна к наличию eIF4G2, чем трансляция POLGARF. Можно было бы предположить, что это может быть связано с инициацией трансляции POLGARF на не-AUG кодоне. К тому же, совсем недавно было показано, что деплеция eIF3d или eIF4G2 может специфически улучшать трансляцию со стартового кодона CUG [She et al., 2023]. Однако, нам не удалось наблюдать усиление трансляции POLGARF при нокдауне eIF3d (рис. 32Б), а также замена стартового кодона CUG на AUG не изменила восприимчивость POLGARF к деплеции eIF4G2 (рис. 36Б, Г, Е).

Большая чувствительность трансляции POLG по сравнению с POLGARF к деплеции eIF4G2 может быть связана с наличием инициаторной шпильки POLGARF. Как уже было отмечено ранее, эта шпилька обеспечивает необычайно эффективную для не-AUG кодона инициацию трансляции с этого цистрона. Распаривание этой шпильки увеличивает потребность в eIF4G2 для трансляции POLGARF (рис. 36Б, Г) и снижает ее для трансляции POLG (рис. 36А, В). Можно предложить, что наличие рамки POLGARF, перекрывающейся с основной, является дополнительным препятствием на пути сканирующих рибосом к стартовому кодону POLG, требующим участия eIF4G2. В таком случае значительное снижение инициации трансляции на CUG кодоне POLGARF при распаривании шпильки,

делало бы трансляцию POLG менее зависимой от eIF4G2. Однако репортерная мРНК POLG с мутированным CUG стартовым кодоном требует eIF4G2 в той же степени, как и мРНК дикого типа. То есть трансляция рамки POLGARF не вносит дополнительный вклад в eIF4G2-зависимость трансляции мРНК POLG. Однако такая интерпретация объясняет изменения eIF4G2-зависимости трансляции репортеров POLG, но не POLGARF. Более подробно предполагаемый механизм будет рассмотрен ниже (см. Раздел 8.5).

8.5. Роль eIF4G2 в пропускающем сканировании и в реинициации на мРНК POLG/POLGARF

Из того, что инициация трансляции на AUG кодоне POLG происходит в основном рибосомами, реиницировавшими после трансляции uORF, и при этом трансляция POLG сильно зависит от eIF4G2, как кажется, следует, что в данном случае eIF4G2 должен обеспечивать именно реинициацию, а не пропускающее сканирование. Трансляция POLGARF чуть меньше зависит от eIF4G2 по сравнению с POLG (рис. 31, 36, 37, 38), при этом реинициация и пропускающее сканирование вносят примерно равный вклад в инициацию на его CUG кодоне (рис. 37Ж, 38В). Поэтому мы решили оценить роль eIF4G2 в обоих механизмах инициации POLG и POLGARF.

В репортерах POLGARF и POLG uORF была модифицирована так, чтобы инициация на исследуемых мРНК происходила либо только путем пропускающего сканирование, либо преимущественно путем реинициации (рис. 37Д, Е; рис. 39). Для начала стоп-кодон uORF был мутирован так, чтобы удлиненная uORF перекрывалась вне рамки считывания с ORF POLGARF (репортер POLGARF «*uORF ext*») (рис. 37Д, 39В). В таком случае трансляция POLGARF полностью зависит от рибосом, “протекающих” через uAUG кодон (рис. 39В, Г). Для изучения роли пропускающего сканирования в случае репортерной мРНК POLG мы соединили uORF с рамкой POLGARF так, что трансляция POLG стала зависеть исключительно от “протекающих” через uAUG кодон рибосом (репортер POLG «*uORF ext*») (рис. 37Д; рис. 39А, Б). Во-вторых, чтобы “отфильтровать” протекающие рибосомы и сделать трансляцию POLG и POLGARF зависящей в основном от реинициации, мы ввели два дополнительных AUG кодона в хорошем контексте рядом с uAUG в рамке с uORF (обозначены «*uAUG x2*») (рис. 37Д, Е; рис. 39). Для того чтобы оценить степень задержки сканирующих комплексов на стартовых кодонах uORF, вводили одновременно обе мутации («*uAUG x2 & uORF ext*») (рис. 37Д, Е; рис. 39).

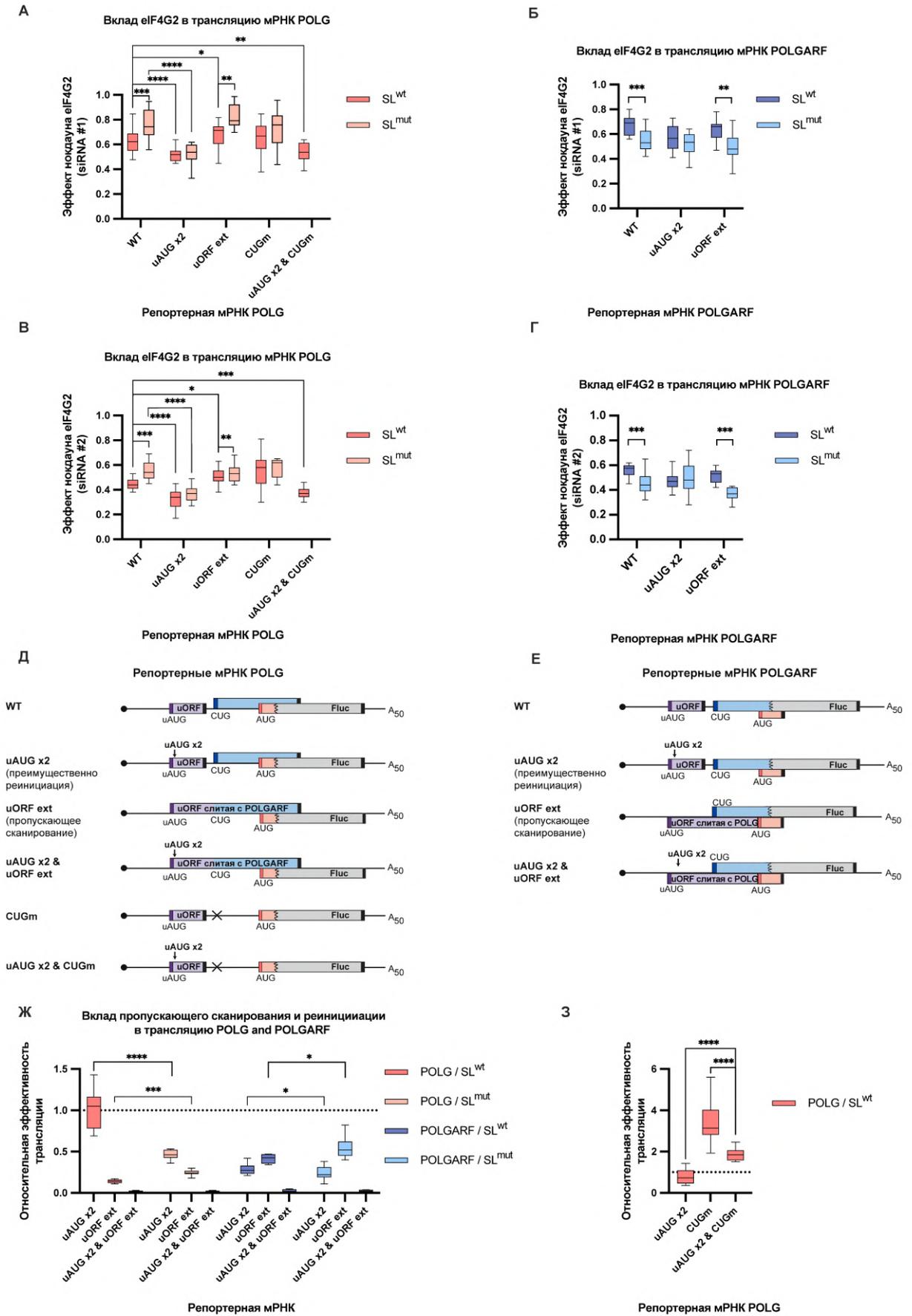


Рисунок 37. eIF4G2 промотирует как пропускающее сканирование, так и реинициацию на мРНК POLG и POLGARF в клетках 293T. (А) *In vitro* m^7G -кэпированные и полиаденилированные репортерные мРНК POLG с 5'НТО дикого типа (WT) или с

указанными мутациями были трансфицированы в клетки 293Т с нокдауном *eIF4G2* вместе с референсной репортерной мРНК β -глобина ($n \geq 10$). Для нокдауна *eIF4G2* использовали siRNA #1. Все репортеры тестировали либо с интактной, либо с мутированной инициаторной шпилькой *POLGARF* (обозначены «*SL^{wt}*» и «*SL^{mut}*» соответственно). Эффект нокдауна представляет собой отношение нормализованной экспрессии репортера в клетках с деплецией *eIF4G2* к нормализованной экспрессии в контрольных клетках. Статистическая значимость определена с помощью U-теста Манна-Уитни. Звездочки обозначают *p*-значение (одна, две, три и четыре звездочки означают $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ и $p < 0,0001$ соответственно). **(Б)** Результаты трансфекции репортерных мРНК *POLGARF* (аналогично панели А). Панели **В** и **Г** аналогичны панелям А и Б, но для нокдауна *eIF4G2* использовали другую siRNA. **(Д)** Схематичное изображение репортеров *POLG* (не в масштабе). Для оценки вклада *eIF4G2* в пропускающее сканирование *uORF* удлиняли так, чтобы она перекрывалась вне рамки считывания с *Fluc* («*uORF ext*»). Чтобы значительно уменьшить “протекание” рибосом через *uAUG* кодон, два дополнительных *AUG* кодона были введены в рамке и рядом с *uAUG* кодоном (репортеры «*uAUG x2*»). На такой 5'НТО рибосомы в основном достигают основного стартового кодона *POLG* путем реинициации. Обе мутации были введены в 5'НТО *POLG* (репортер «*uAUG x2 & uORF ext*»), чтобы оценить степень задержки сканирующих комплексов на стартовых кодонах *uORF*. Сравнение трансляции репортеров *POLG* «*uAUG x2*» и «*uAUG x2 & CUGt*» позволяет оценить потенциальную дополнительную потребность в *eIF4G2* при сканировании участка от стартового кодона *POLGARF* до *AUG* кодона *POLG*. Стартовые кодоны показаны соответствующими цветными полосами, а стоп-кодоны — черным. **(Е)** Панель Е аналогична панели Д, за исключением того, что на ней представлены репортерные мРНК *POLGARF*. **(Ж)** Вклад пропускающего сканирования и реинициации в трансляцию мРНК *POLG* и *POLGARF* в клетках 293Т. Относительная эффективность трансляции представлена как отношение нормализованной экспрессии мутантного репортера (обозначенного как «*uAUG x2*» или «*uORF ext*» для оценки реинициации и пропускающего сканирования соответственно) к нормализованной экспрессии репортера с 5'НТО дикого типа. Пунктирная линия на отметке 1 соответствует эффективности трансляции репортера с 5'НТО дикого типа. Статистическая значимость определена с помощью U-теста Манна-Уитни. Четыре, три и одна звездочка означают $p < 0,0001$, $p < 0,001$ и $p < 0,01$ соответственно. **(З)** Реиницировавшие рибосомы в основном пропускают стартовый кодон *POLGARF* и иницируют на *AUG* кодоне *POLG* в клетках 293Т. Относительная эффективность трансляции и статистическая значимость рассчитаны так же, как и на панели Ж. Звездочки обозначают $p < 0,0001$.

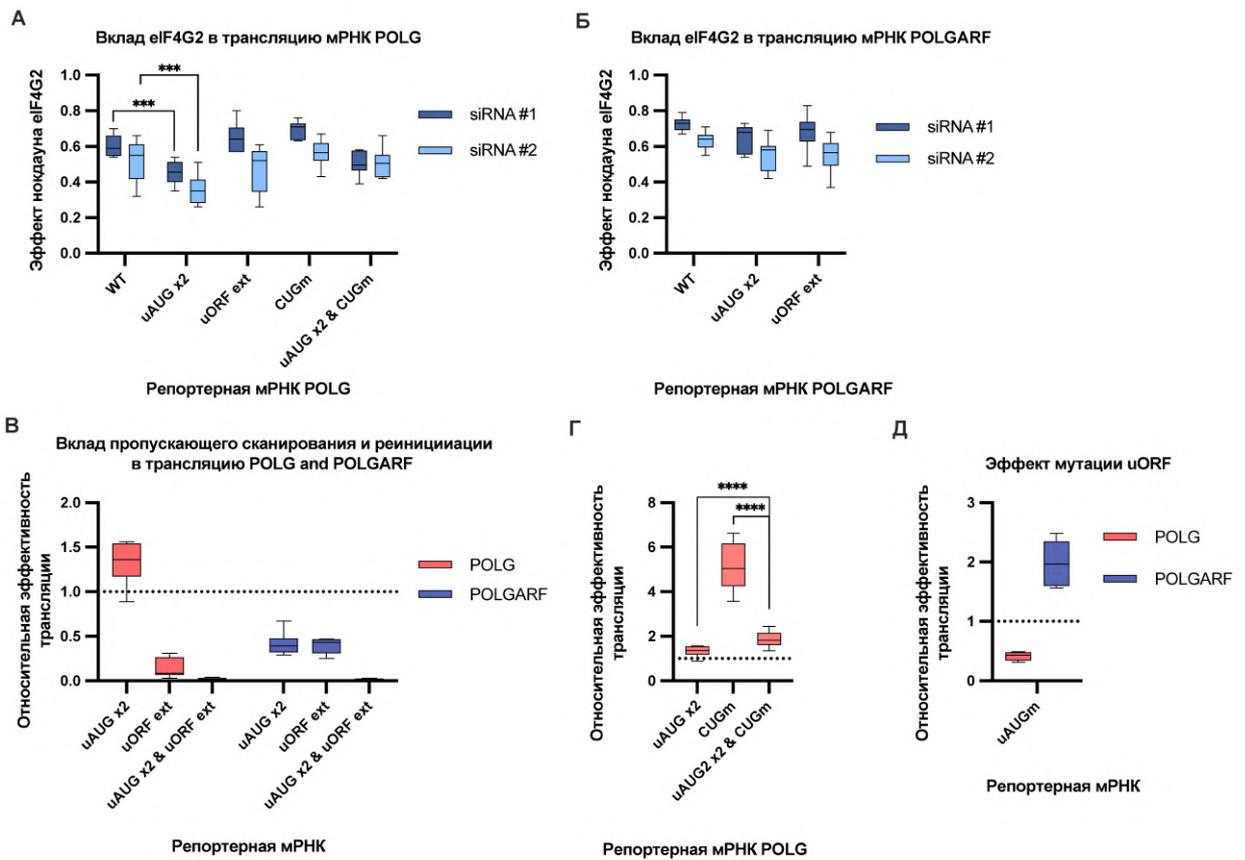


Рисунок 38. *eIF4G2* промотирует как пропускающее сканирование, так и реинициацию на мРНК *POLG* и *POLGARF* в клетках *Huh7*. (А) *In vitro* m^7G -кэпированные и полиаденилированные репортерные мРНК *POLG* с 5'НТО дикого типа (WT) или с указанными мутациями были трансфицированы в клетки *Huh7* с нокдауном *eIF4G2* вместе с референсной репортерной мРНК β -глобина ($n \geq 10$). Для нокдауна *eIF4G2* использовали одну из двух siRNA. Эффект нокдауна представляет собой отношение нормализованной экспрессии репортера в клетках с деплецией *eIF4G2* к нормализованной экспрессии в контрольных клетках. Статистическая значимость определена с помощью U-теста Манна-Уитни. Три звездочки означают $p < 0,001$. Репортер «uORF ext» позволяет оценить вклад *eIF4G2* в пропускающее сканирование, «uAUG x2» — в реинициацию, а репортер «uAUG x2 & uORF ext» — оценить степень задержки сканирующих комплексов на стартовых кодонах uORF. Сравнение трансляции репортеров *POLG* «uAUG x2» и «uAUG x2 & CUGm» позволяет оценить потенциальную дополнительную потребность в *eIF4G2* при сканировании участка от стартового кодона *POLGARF* до AUG кодона *POLG*. (Б) Результаты трансфекции репортерных мРНК *POLGARF* (аналогично панели А). (В) Вклад пропускающего сканирования и реинициации в трансляцию мРНК *POLG* и *POLGARF* в клетках *Huh7*. Относительная эффективность трансляции представлена как отношение нормализованной экспрессии мутантного репортера (обозначенного как «uAUG x2» или «uORF ext» для оценки реинициации и пропускающего сканирования соответственно) к нормализованной экспрессии репортера с 5'НТО дикого типа. Пунктирная линия на отметке 1 соответствует эффективности трансляции, идентичной эффективности трансляции репортера с 5'НТО дикого типа. (Г) Реиницировавшие рибосомы в основном пропускают стартовый кодон *POLGARF* и иницируют на AUG кодоне *POLG* в клетках *Huh7*. Относительная эффективность трансляции и статистическая значимость рассчитаны так же, как и на панели В. Звездочки обозначают $p < 0,0001$. (Д) Удаление uORF стимулирует трансляцию *POLGARF* и значительно подавляет трансляцию *POLG* в клетках *Huh7*.

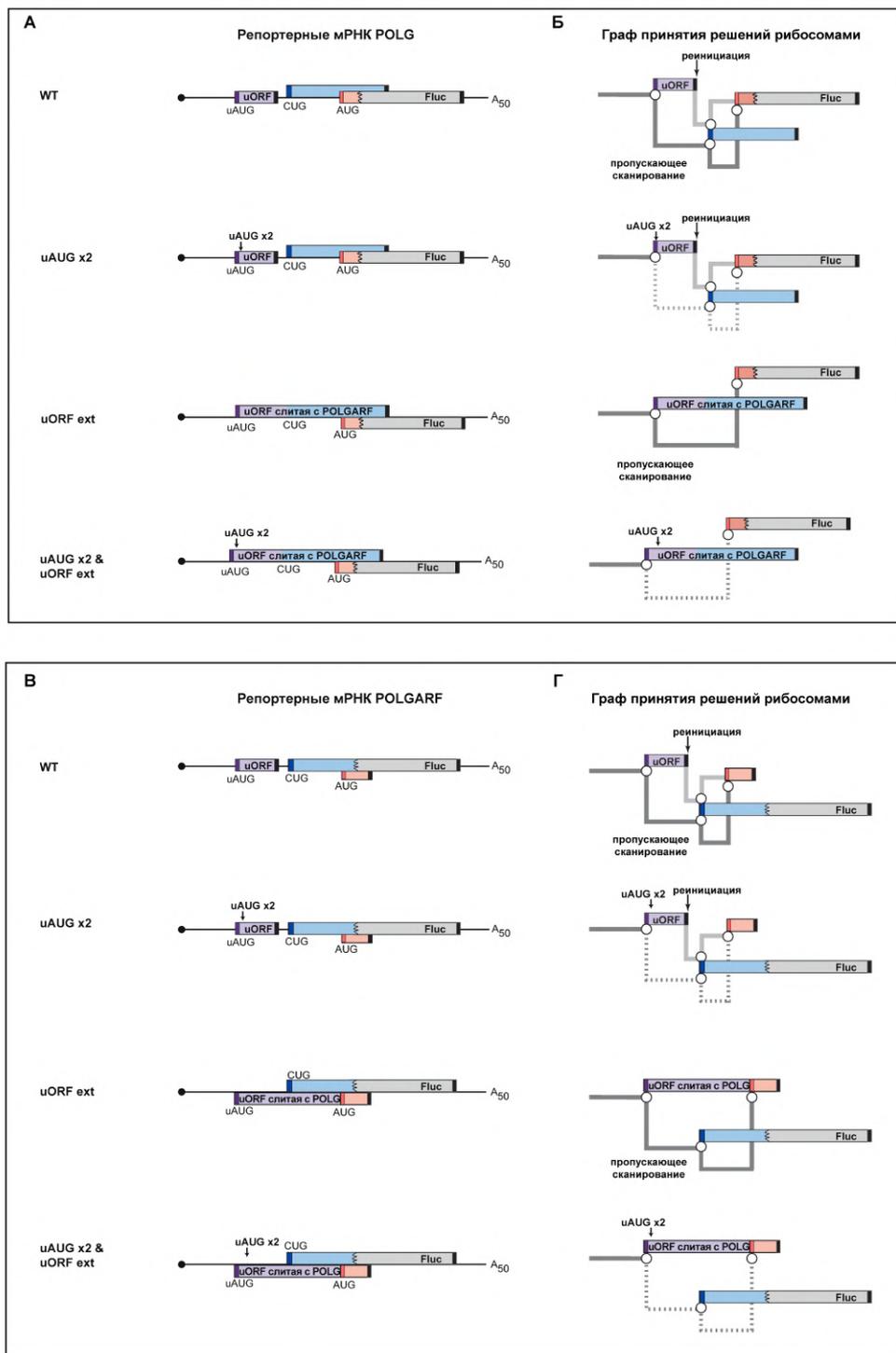


Рисунок 39. Графы принятий решений рибосомами для тестируемых репортерных мРНК POLG и POLGARF. Инициация трансляции на репортерах POLG и POLGARF дикого типа (WT) может происходить как по механизму реинициации, так и по механизму пропускающего сканирования. (А) Схемы репортеров POLG для изучения обоих механизмов. На репортере «uAUG x2» инициация происходит преимущественно путем реинициации, а на репортере «uORF ext» — только путем пропускающего сканирования. Конструкция «uAUG x2 & uORF ext» позволяет оценить задержку сканирующих комплексов на uORF с введенными дополнительными стартовыми кодонами. Эффективность трансляции такой мРНК должна стремиться к нулю. (Б) Графы принятий решений рибосомами для репортеров POLG. Панели В и Г аналогичны панелям А и Б за исключением того, что показаны схемы для репортеров POLGARF.

В соответствии с предыдущими наблюдениями [Loughran et al., 2020], трансляция POLGARF обеспечивается “протекшими” и реиницировавшими рибосомами примерно в равной степени, в то время как большая часть трансляции POLG осуществляется реиницировавшими рибосомами (рис. 37Ж, рис. 38В). Двойная мутация, предотвращающая как пропускающее сканирование, так и реинициацию («*uAUG x2 & uORF ext*») значительно снижает трансляцию и POLG, и POLGARF почти до фонового уровня (рис. 37Ж, рис. 38В), демонстрируя, что введенные дополнительно *uAUG* кодоны действительно сильно подавляют пропускающее сканирование, и что почти вся трансляция Fluc на репортерах «*uAUG x2*» на самом деле опосредована реинициацией, а не какими-то другими возможными в теории механизмами. Отметим, что такой подход напрямую не отражает долю реинициации при трансляции репортеров дикого типа, поскольку такая мутация в *uORF* увеличивает эффективность реинициации в сравнении с 5'НТО дикого типа. Это обусловлено двумя причинами: 1) при инициации на введенных *uAUG* кодонах, *uORF* как бы становится короче, что само по себе повышает вероятность реинициации; 2) дополнительные стартовые кодоны увеличивают количество рибосом, которые транслируют *uORF* и, соответственно, могут реиницировать после терминации трансляции. Репортер «*uAUG x2*» можно использовать для оценки верхней границы вклада реинициации в трансляцию мРНК дикого типа. Напрямую вклад реинициации в трансляцию POLGARF и POLG можно оценить путем вычитания из 1 рассчитанного вклада пропускающего сканирования («*uORF ext*» на рис. 37Ж, рис. 38В). Результаты, полученные с репортерами «*uORF ext*» и «*uAUG x2*», согласуются друг с другом.

Подавление пропускающего сканирования (репортер «*uAUG x2*») сделало трансляцию POLG более зависимой от *eIF4G2* и, наоборот, устранение реинициации (репортер «*uORF ext*») сделало ее чуть менее восприимчивой к деплеции *eIF4G2* (рис. 37А, В; рис. 38А). Таким образом, *eIF4G2* обеспечивает трансляцию POLG, способствуя как пропускающему сканированию, так и реинициации.

Примечательно, что разрушение шпильки оказывало лишь незначительное влияние на трансляцию POLG, происходящую в результате реинициации, но при этом значительно усиливало трансляцию POLG, основанную на пропускающем сканировании (рис. 40А). Одно из возможных объяснений заключается в том, что “протекшие” через *uAUG* кодон рибосомы почему-то более чувствительны ко вторичной структуре, чем реиницирующие комплексы, что как будто подтверждается экспериментальными данными (рис. 37Б, Г). Другое не взаимоисключающее объяснение состоит в том, что большинство реиницировавших рибосом “проходят мимо” стартового кодона POLGARF, поскольку он находится слишком близко к стоп-кодону *uORF*, тогда как для эффективной реинициации

необходимо достаточное межцистронное расстояние [Abastado et al., 1991; Grant et al., 1994; Kozak, 1987a; Luukkonen et al., 1995]. Следующие наблюдения косвенно подтверждают и эту интерпретацию: а) мутация шпильки примерно одинаково влияет на оба способа инициации POLGARF (рис. 40Б); и б) распаривание шпильки никак не сказывается на трансляции репортера POLG, если CUG кодон удален (репортер POLG «CUGm») (рис. 34А).

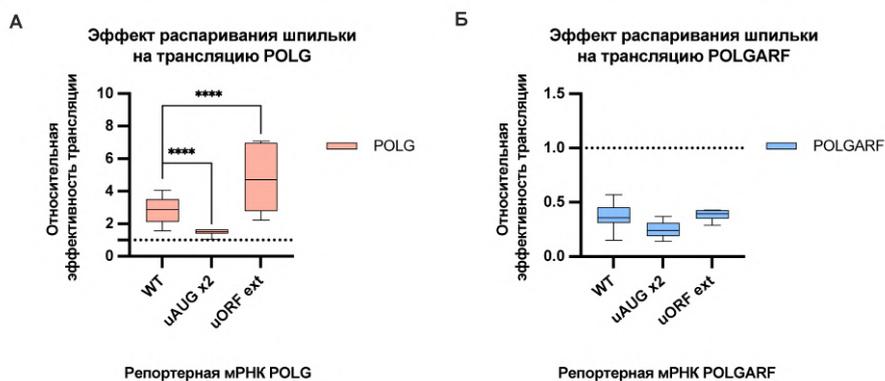


Рисунок 40. Разрушение инициаторной шпильки вблизи CUG кодона POLGARF изменяет эффективность реинициации и пропускающего сканирования для POLG. *m*⁷G-кэпированные и полиаденилированные репортерные мРНК с 5'НТО дикого типа или с внесенными мутациями трансфицировали в клетки 293Т вместе с референтной репортерной мРНК β-глобина (n≥15). Активность Nluc использовали для нормализации экспрессии репортера Fluc. Все репортеры тестировали либо с интактной, либо с мутированной инициаторной шпилькой POLGARF. Эффект распаривания шпильки показан как отношение нормализованной экспрессии репортера с мутантной последовательностью в области шпильки к нормализованной экспрессии соответствующего репортера с интактной шпилькой. Пунктирная линия на отметке 1 соответствует эффективности трансляции, идентичной эффективности трансляции репортерной мРНК с 5'НТО дикого типа. **(А)** Результаты трансфекции репортерных мРНК POLG. Статистическая значимость определена с помощью U-теста Манна-Уитни. Четыре звездочки соответствуют p<0,0001, ns – статистически незначимо. **(Б)** Результаты трансфекции репортерных мРНК POLGARF (аналогично панели А).

Реинициация — это малоизученный процесс [Hellen, 2018; Kozak, 2001b; Kozak, 2002; Sherlock et al., 2023], который включает в себя: а) переход рибосомного комплекса из посттерминационного состояния в состояние, пригодное для сканирования, б) повторное приобретение eIF2 и в) собственно сканирование. Рибосомы, транслирующие расположенную ниже ORF (в нашем случае POLGARF), могут потенциально мешать реиницировавшим рибосомам сканировать эту область (в нашем случае область между CUG кодоном POLGARF и AUG кодоном POLG), как это происходит в случае eIF4G2-зависимого пропускающего сканирования. Хотя полученные результаты и говорят, что eIF4G2 способствует реинициации, на самом деле это не исключает возможности того, что eIF4G1 является основным фактором на начальных этапах реинициации, то есть инициирует сканирование реиницировавшими рибосомами [Mohammad et al., 2021; Pöyry

et al., 2004] , а eIF4G2 преимущественно участвует в последующем сканировании. Можно было бы предположить, что по пути к инициаторному кодону POLG реиницировавшие рибосомы интерферируют с рибосомами, транслирующими POLGARF, – и в этот момент возникает потребность в eIF4G2. Поэтому мы решили изучить вклад eIF4G2 в реинициацию для трансляции POLG, когда CUG кодон мутирован в стоп-кодон (репортер обозначен «*uAUG x2 & CUGm*»). Удаление стартового кодона POLGARF не увеличило потребность реинициации в eIF4G2 по сравнению с репортером «*uAUG x2*» (рис. 37А, В, рис. 38А).

При этом трансляция репортера POLGARF «*uAUG x2*» зависит от eIF4G2 даже несколько сильнее, чем трансляция репортерной мРНК POLGARF дикого типа (рис. 37Б, Г, рис. 38Б). Небольшое расстояние между стоп-кодоном uORF и стартовым кодоном POLGARF (всего 11 нуклеотидов), вероятно, слишком малó для того, чтобы eIF4G2 успевал заменить eIF4G1. Приходится заключить, что eIF4G2 присутствует в реиницирующих комплексах с самого начала, и, следовательно, способствует реинициации в строгом значении этого слова как в случае POLGARF, так и в случае POLG.

Когда трансляция POLG осуществляется как путем реинициации, так и путем пропускающего сканирования, удаление стартового кодона POLGARF приводит к значительному усилению эффективности трансляции POLG (репортеры «*CUGm*» на Рисунках 37З и 38Г). Когда же возможна только реинициация, удаление CUG кодона стимулирует трансляцию POLG очень слабо (сравните эффективности трансляции репортеров «*uAUG x2 & CUGm*» и «*uAUG x2*» на Рисунках 37З и 38Г). Это говорит о том, что «протекшие» через uAUG кодон рибосомы в основном иницируют на стартовом кодоне POLGARF, в то время как реиницировавшие рибосомы в основном “обходят” CUG, чтобы иницировать на следующем стартовом кодоне, то есть на AUG кодоне POLG.

Тем не менее, остается неясным, почему трансляция POLG в большей степени зависит от eIF4G2, чем трансляция POLGARF, и почему разрушение шпильки приводит к выравниванию вклада eIF4G2 в трансляцию обоих белков. Похоже, что “протекшие” через uAUG кодон рибосомы не становятся более требовательными к eIF4G2 во время сканирования области между стартовым кодоном POLGARF и стартовым кодоном POLG (рис. 37А, Б, рис. 38А). Это может объясняться тем, что реиницирующие рибосомы в большей степени полагаются на eIF4G2, чем “протекшие” через uAUG кодон, что, по-видимому, верно для POLG (рис. 37А, В; рис. 38А). Тогда чем больше инициация трансляции зависит от реинициации, тем больше она зависит от eIF4G2. Полученные данные хорошо подтверждают идею о том, что реиницирующие рибосомы в основном игнорируют стартовый кодон POLGARF из-за очень короткого расстояния между стоп-кодоном uORF и CUG стартовым кодоном, и трансляция POLG в основном обеспечивается

реиницировавшими рибосомами. Разрушение шпильки не оказывает заметного влияния на реинициацию, но способствует пропускающему сканированию через CUG, тем самым увеличивая количество менее eIF4G2-зависимых “протекших” рибосом, которые достигают стартового кодона POLG.

9. Роль eIF4G2 в пропускающем сканировании и в реинициации на мРНК Stard7, Maf1 и UCP2

Полученная возможность дифференциально оценивать вклад eIF4G2 в механизмы пропускающего сканирования и реинициации на мРНК POLG/POLGARF побудила нас проверить вклад этого белка в реинициацию на ранее идентифицированных трансляционных мишенях eIF4G2 — Stard7, Maf1 и UCP2, для которых мы ранее показали роль eIF4G2 в пропускающем сканировании (рис. 22). По аналогии с репортерными конструкциями POLG и POLGARF, мы ввели два дополнительных uAUG кодона в хороших нуклеотидных контекстах в uORF 5'НТО Maf1, Stard7 и UCP2 дикого типа или с мутантной uORF, перекрывающейся с рамкой Fluc (рис. 41B). Как и для мРНК POLG и POLGARF, удлинение uORF на фоне введения дополнительных uAUG кодонов («uAUG x2 & uORF ext») почти полностью подавляло экспрессию Fluc во всех трех случаях (рис. 41Д, рис. 42B). Это свидетельствует о том, что введение дополнительных uAUG кодонов приводит во всех случаях к значительной задержке едва ли не всех рибосом на этих uAUG кодонах. Соответственно, репортерные конструкции типа «uAUG x2» можно аналогичным образом использовать для оценки вклада eIF4G2 в реинициацию на 5'НТО Stard7, Maf1 и UCP2 (рис. 41Д, 42B). Во всех этих случаях uORF, похоже, контролируют инициацию трансляции на основном AUG кодоне через оба механизма (рис. 41Д, 42B). Трансляция репортерных конструкций, полагающихся на реинициацию («uAUG x2»), также значительно снижается во всех случаях при деплеции eIF4G2 (рис. 41А, Б; рис. 42А, Б).

Поскольку мы ранее установили, что наличие первого uAUG кодона в uORF UCP2 не вносит вклад в зависимость трансляции этой мРНК от eIF4G2 (рис. 24А), мы дополнительно изучили роль eIF4G2 в реинициации и пропускающем сканировании на мРНК UCP2, в которой этот первый стартовый кодон uORF был заменен на стоп-кодон (репортер обозначен как «XI») (рис. 43). При этом uORF UCP2 укорачивается примерно на 30%, что теоретически может повысить эффективность реинициации. Хотя мутация первого uAUG кодона стимулирует трансляцию репортера UCP2 примерно в 2 раза (данные не показаны), она никак не сказывается на соотношении вкладов реинициации и пропускающего сканирования для мРНК UCP2 (рис. 43В, Е) и не изменяет вклад eIF4G2 в оба этих механизма (рис. 43А, Б, Г, Д).

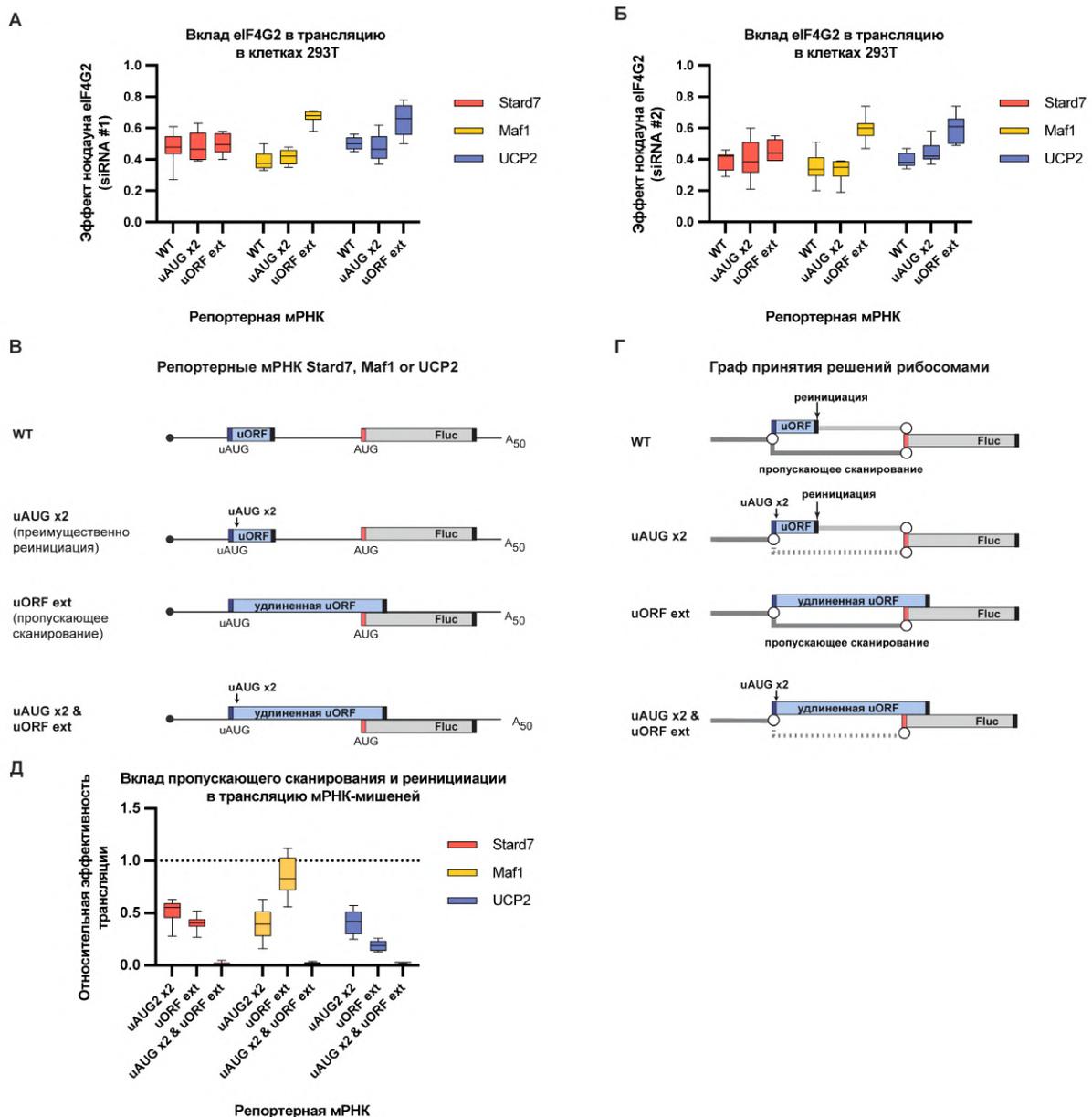


Рисунок 41. *eIF4G2* промотирует как пропускающее сканирование, так и реинициацию на мРНК *Stard7*, *Maf1* и *UCP2* в клетках 293T. **(А)** *In vitro* m^7G -этированные и полиаденилированные репортерные мРНК *Stard7*, *Maf1* и *UCP2* трансфицировали в клетки 293T с нокдауном *eIF4G2* (с помощью siRNA #1) вместе с референсной репортерной мРНК β -глобина ($n \geq 10$). Эффект нокдауна представлен в виде отношения нормализованной экспрессии репортера в клетках с деплецией *eIF4G2* к нормализованной экспрессии в контрольных клетках. **(Б)** Панель **Б** аналогична панели **А**, но для нокдауна *eIF4G2* использовали другую siRNA. **(В)** Схематичное изображение репортеров, рассмотренных на панелях **А** и **Б** (не в масштабе). На репортере «uAUG x2» инициация происходит преимущественно путем реинициации, а на репортере «uORF ext» — только путем пропускающего сканирования. Конструкция «uAUG x2 & uORF ext» позволяет оценить задержку сканирующих комплексов на uORF с введенными дополнительными стартовыми кодонами. **(Г)** Графы принятых решений рибосомами для репортеров *Stard7*, *Maf1* и *UCP2*. **(Д)** Вклад пропускающего сканирования и реинициации в трансляцию мРНК-мишеней. Относительная эффективность трансляции представлена как отношение нормализованной экспрессии мутантного репортера к нормализованной экспрессии репортера с 5'НТО дикого типа. Пунктирная линия на отметке 1 соответствует эффективности трансляции репортера с 5'НТО дикого типа (WT).

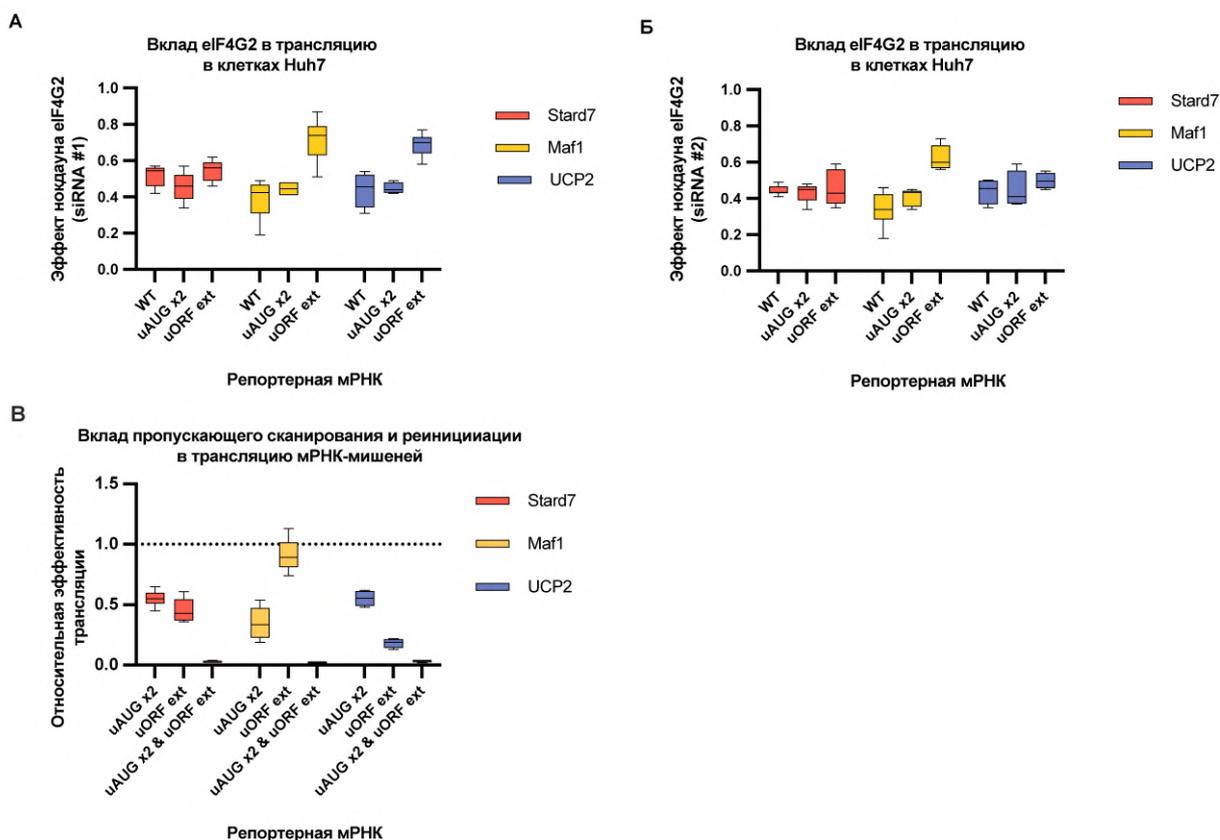


Рисунок 42. *eIF4G2* промотирует как пропускающее сканирование, так и реинициацию на мРНК *Stard7*, *Maf1* и *UCP2* в клетках *Huh7*. **(А)** *In vitro* m^7G -эпированные и полиаденилированные репортерные мРНК *Stard7*, *Maf1* и *UCP2* трансфицировали в клетки *Huh7* с нокдауном *eIF4G2* вместе с референсной репортерной мРНК β -глобина ($n \geq 10$). Нокдаун осуществляли с помощью siRNA #1 против *eIF4G2*. Эффект нокдауна представляет собой отношение нормализованной экспрессии репортера в клетках с деплецией *eIF4G2* к нормализованной экспрессии в контрольных клетках. **(Б)** Панель **Б** аналогична панели **А**, но для нокдауна *eIF4G2* использовали другую siRNA. **(В)** Вклад пропускающего сканирования и реинициации в трансляцию мРНК *Stard7*, *Maf1* и *UCP2* в клетках *Huh7*. Относительная эффективность трансляции представлена как отношение нормализованной экспрессии мутантного репортера (обозначенного как «uAUG x2» или «uORF ext» для оценки реинициации и пропускающего сканирования соответственно) к нормализованной экспрессии репортера с 5'НТО дикого типа. Пунктирная линия на отметке 1 соответствует эффективности трансляции, идентичной эффективности трансляции репортера с 5'НТО дикого типа (WT).

Таким образом, так же, как и в случае с мРНК *POLG/POLGARF*, *eIF4G2* одновременно промотирует и реинициацию, и пропускающее сканирование на мРНК *Stard7*, *Maf1* и *UCP2*. Примечательно, что вклад реинициации и пропускающего сканирования различен для исследуемых мРНК, и вклад *eIF4G2* в изучаемые механизмы также различен, что приводит к различным измеряемым результатам при деплеции *eIF4G2*. Подытоживая результаты, приведенные в данном разделе, можно сказать, что мы убедительно доказали, что *eIF4G2* может способствовать как пропускающему сканированию, так и реинициации на одной и той же мРНК.

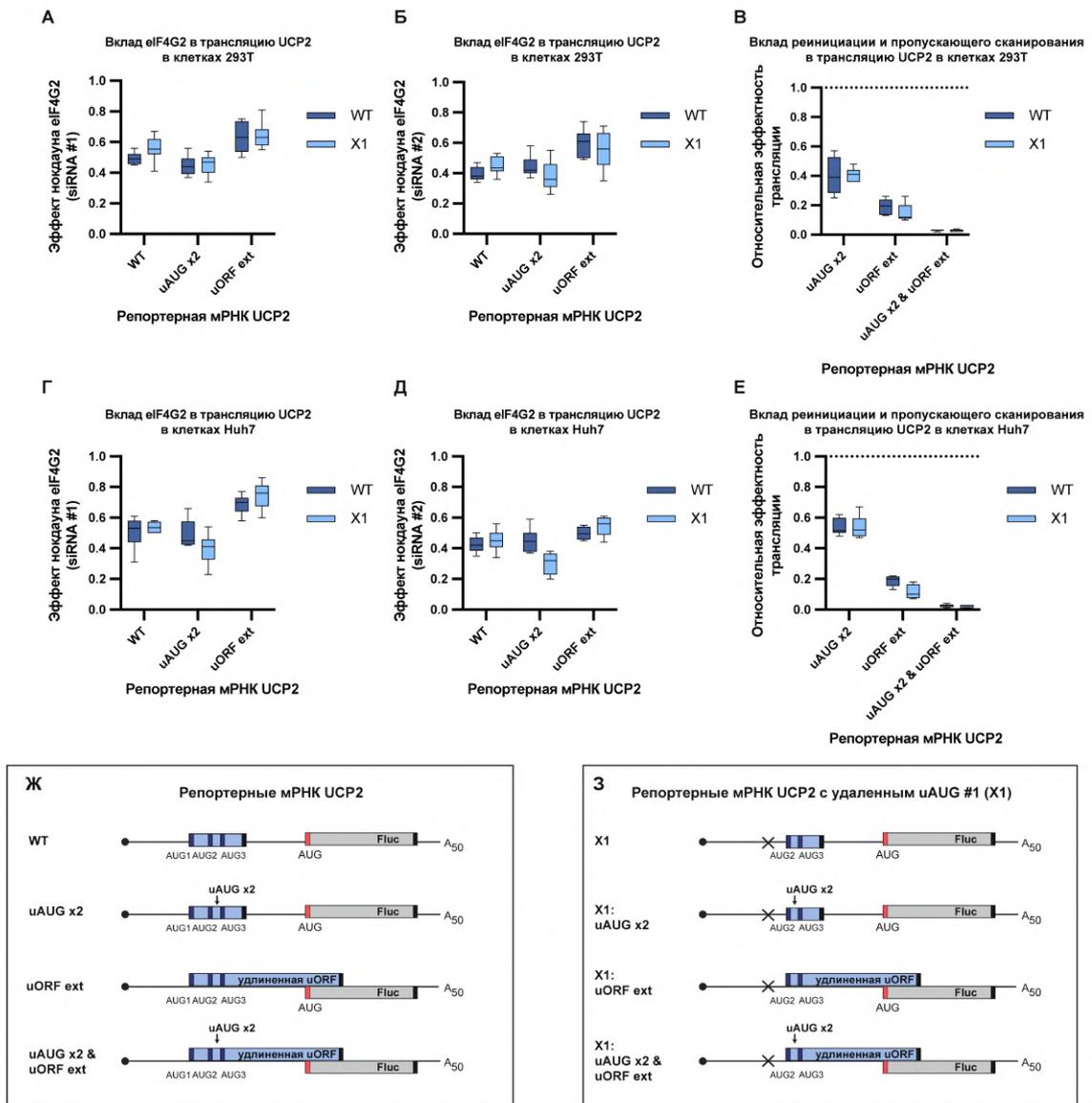


Рисунок 43. *eIF4G2* промотирует как пропускающее сканирование, так и реинициацию на мРНК UCP2, как при наличии всех трех *uAUG* кодонов, так и при удалении *uAUG1*. (А) *In vitro* m^7G -эпированные и полиаденилированные репортерные мРНК с 5'НТО UCP2 трансфицировали в клетки 293Т с нокдауном *eIF4G2* вместе с референтной репортерной мРНК β -глобина ($n \geq 10$). Конструкции WT означают, что все три стартовых кодона *uORF* 5'НТО UCP2 сохранены. В конструкциях "X1" *uAUG1* заменен на стоп-кодон UAG. Нокдаун осуществляли с помощью siRNA #1 против *eIF4G2*. Эффект нокдауна представляет собой отношение нормализованной экспрессии репортера в клетках с деплецией *eIF4G2* к нормализованной экспрессии в контрольных клетках. (Б) Панель Б аналогична панели А, но для нокдауна *eIF4G2* использовали другую siRNA. (В) Вклад пропускающего сканирования и реинициации в трансляцию UCP2 в клетках Huh7. Относительная эффективность трансляции представлена как отношение нормализованной экспрессии мутантного репортера (обозначенного как «uAUG x2» или «uORF ext» для оценки реинициации и пропускающего сканирования соответственно) к нормализованной экспрессии репортера с 5'НТО дикого типа. Пунктирная линия на отметке 1 соответствует эффективности трансляции, идентичной эффективности трансляции репортера с 5'НТО дикого типа (WT). Панели Г, Д и Е аналогичны панелям А, Б и В за исключением того, что трансфицировали клетки Huh7. Панели Ж и 3 отражают схемы протестированных репортерных мРНК с 5'НТО UCP2.

10. Модель участия eIF4G2 в кэп-зависимой трансляции

Многие исследователи, в том числе и мы, полагали, что на одной мРНК при наличии uORF трансляция основной рамки осуществляется либо преимущественно по механизму пропускающего сканирования, либо путем реинициации, в зависимости от нуклеотидного контекста uAUG стартовых кодонов и длины uORF. В связи с этим и роль eIF4G2 связывали лишь с одним из этих способов трансляции. В представленной работе нам удалось изучить вклад этих двух механизмов в трансляцию нескольких мРНК и оценить их зависимость от eIF4G2. Мы показали, что eIF4G2 может способствовать обоим механизмам на одной и той же мРНК. Известно, что для акта реинициации как такового, не требуется eIF4G [Skabkin et al., 2013], поэтому вполне вероятно, что в последующем сканировании может участвовать либо eIF4G1, либо eIF4G2. Наши данные также подчеркивают, что пропускающее сканирование и реинициация не являются взаимоисключающими и вполне могут происходить на одной мРНК с разным вкладом каждого механизма (рис. 37Ж, рис. 38В, рис. 41Д, рис. 42В, рис. 43В, Е). Таким образом, предложенная нами ранее модель участия eIF4G2 в канонической кэп-зависимой трансляции на мРНК с uORF может быть дополнена (рис. 44).

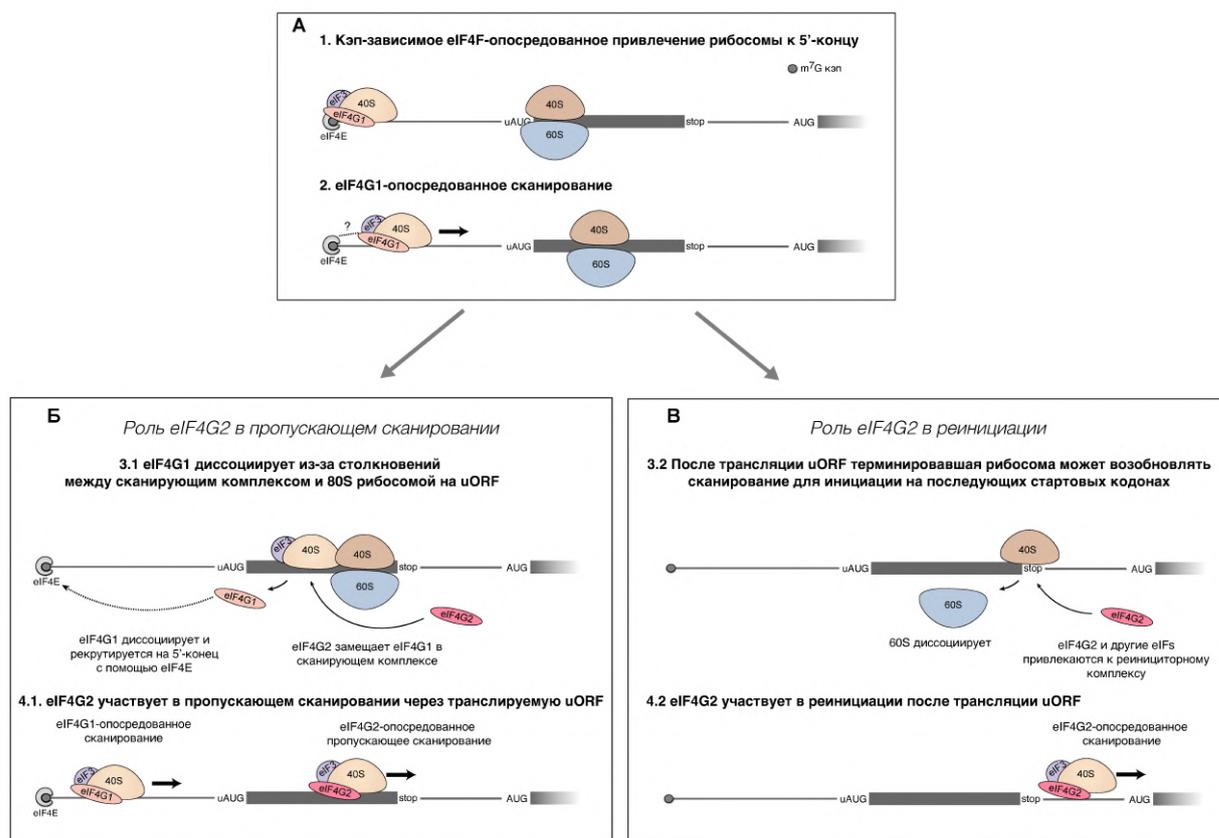


Рисунок 44. Предложенный механизм участия eIF4G2 в канонической кэп-зависимой трансляции у эукариот на мРНК с uORF. eIF4G2 может обеспечивать как реинициацию, так и пропускающее сканирование на одной мРНК. (А) Малая субъединица рибосомы

привлекается к 5'-концу мРНК посредством взаимодействия между m^7G -кэпом и eIF4F. eIF4G1 облегчает сканирование с самого 5'-конца. На рисунке изображена рибосома 80S, транслирующая uORF. **(Б)** Роль eIF4G2 в пропускающем сканировании. Столкновение сканирующего комплекса с 80S рибосомой в пределах uORF приводит к частичной потере eIF4G1, который возвращается к m^7G -кэпу благодаря взаимодействию с eIF4E. После этого роль хеликазы берет на себя eIF4G2-eIF4A, тем самым обеспечивая пропускающее сканирование. **(В)** eIF4G2 также может промотировать реинициацию на этой же мРНК. eIF4G2 помогает терминировавшей рибосоме возобновить сканирование и таким образом способствует реинициации. Тройственный комплекс (eIF2, Мет-мРНК_и^{Met} и ГТФ), eIF1, eIF1A, eIF5, eIF4A, eIF4B и другие потенциальные инициаторные факторы для простоты не показаны.

Заключение

Наши данные убедительно дополняют полученные ранее результаты [Смирнова, 2022] и подтверждают, что eIF4G2 вступает в дело после распознавания кэпа и аккомодации рибосомных комплексов на мРНК. Представленные нами данные в совокупности однозначно свидетельствуют о том, что сканирование требует участия eIF4G2 в условиях недостатка eIF4G1.

Зависимость от eIF4G2 часто определяется наличием uORF в 5'НТО (как в случае мРНК Maf1, Stard7, UCP2, AKT2, MYCBP2, POLG/POLGARF), но случаи APAF1, SMAD1, PHD2 и Pcbp2 показывают, что механизм вовлечения eIF4G2 более сложен. Для мРНК Maf1, Stard7, UCP2 и POLG/POLGARF трансляция самих uORF и, соответственно, все предшествующие этапы инициации, включая привлечение рибосомного комплекса к мРНК, являются eIF4G2-независимыми. При этом известно, что eIF4G2 не связывается с кэп-сефарозой и [Liberman et al., 2015; Tcherkezian et al., 2014], следовательно, eIF4G2 не входит в состав кэп-связывающих комплексов. Наши данные не исключают, что на определенных мРНК в условиях значительной инактивации eIF4E и другие белки могут привлекать eIF4G2 на мРНК для обеспечения кэп-зависимой трансляции [Bukhari et al., 2016; de la Parra et al., 2018] или что сам eIF4G2 может связывать мРНК для привлечения рибосом по механизму CITE [Shatsky et al., 2018]. Представленные эксперименты показывают, что eIF4G2 является специализированным фактором, обеспечивающим сканирование, и, как таковой, может потенциально участвовать в любом сканирующем механизме инициации после привлечения рибосомы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что на всех протестированных мРНК-мишенях (таких как Maf1, Stard7, UCP2, AKT2, SMAD1, POLG/POLGARF) eIF4G2 вовлечен в кэп-зависимую трансляцию, в которой роль кэп-связывающего белка выполняет eIF4E, а не eIF3d, как предполагалось ранее [de la Parra et al., 2018].

Наши данные также демонстрируют, что пропускающее сканирование и реинициация не являются взаимоисключающими и вполне могут происходить на одной мРНК с разным вкладом каждого механизма. При этом eIF4G2 может в разной степени способствовать и пропускающему сканированию, и реинициации одновременно на одной и той же мРНК.

Белки-ридеры m⁶A-модификации мРНК PRRC2A-2C, взаимодействующие с eIF4G2, также способствуют пропускающему сканированию некоторых мРНК [Bohlen et al., 2023]. Будущие исследования покажут, как эти eIF4G2 и PRRC2A-2C взаимодействуют между собой, способствуя пропускающему сканированию.

eIF4G2 играет важную роль в обеспечении трансляции бицистронной мРНК POLG/POLGARF. При доминировании в эукариотической клетке кэп-зависимой трансляции, потенциал для эффективной трансляции двух белков с бицистронной мРНК крайне ограничен. В случае мРНК POLG/POLGARF наличие uORF, инициация трансляции POLGARF с эффективного из-за примыкающей шпильки стартового кодона CUG (но не AUG) и участие eIF4G2 в трансляции этой мРНК все вместе обеспечивают физиологически адекватный уровень синтеза обоих белков.

Можно предположить, что снижение экспрессии POLG при нокадауне *eIF4G2* может приводить, соответственно, к снижению количества митохондриальной ДНК в клетках. Отметим, что ранее исследователи уже отмечали роль eIF4G2 в трансляции мРНК, кодирующих белки, так или иначе связанных с функционированием митохондрий [Yoffe et al., 2016]. В частности, исследователями было отмечено, что при нокадауне *eIF4G2* количество MFF (*Mitochondrial fission factor*), главного фактора деления митохондрий, уменьшается. В данном случае eIF4G2 может быть вовлечен в регуляцию популяции митохондрий в клетках за счет контроля трансляции ключевых белков, таких как POLG и MFF. В качестве продолжения работы необходимо верифицировать снижение экспрессии POLG при деплеции eIF4G2, оценить изменение количества митохондриальной ДНК и изучить влияние нокадауна *eIF4G2* на морфологию митохондрий клеток.

Несмотря на последние успехи в понимании механизма работы eIF4G2, все еще остается много вопросов. Во-первых, мы не знаем, почему одни мРНК, содержащие uORF, требуют eIF4G2 для трансляции, а другие — нет. Необходимо понять, как последовательности вблизи uORF влияют на необходимость участия eIF4G2. Критически важным представляется анализ тех eIF4G2-зависимых 5'НТО, которые не содержат uORF, такие как *Pcbp2*, *KMT2D* [David et al., 2022] и *Sos1* [Sugiyama et al., 2017]. Вполне возможно, что последние содержат еще неидентифицированные инициаторные кодоны, отличные от AUG. Если же это не так (см. случай *Pcbp2*), то необходимо искать другие элементы структуры 5'НТО, которые могут приводить к диссоциации eIF4G1 и замене его на eIF4G2.

Во-вторых, мРНК-мишени eIF4G2, по-видимому, обладают довольно длинными 5'НТО. Хотя это может быть простым совпадением (вероятность наличия uAUG кодона в более длинной 5'НТО выше, чем в короткой), это также может отражать более высокую вероятность диссоциации eIF4G1 из сканирующих комплексов, удаляющихся от m⁷G-кэпа. Необходимо выявить и другие детерминанты eIF4G2-зависимости трансляции и установить их структуру. Некоторые нуклеотидные последовательности могут служить барьерами для сканирования в случае некоторых мРНК-мишеней eIF4G2, впечатляющих обилием нуклеотидов G и C в своих 5'НТО (см., например, 5'НТО мРНК *Pcbp2*, *RHD2*, *FOXp3*,

HMGN3 и PRICKLE1). В других случаях вторичные и третичные структуры теоретически могут инициировать сборку сканирующих комплексов в режиме CITE с участием eIF4G2 или повышать локальную концентрацию eIF4G2, чтобы диссоциированный eIF4G1 мог быть легко замещен. Действительно, недавно было продемонстрировано наличие высокоаффинных сайтов для eIF4G1 и eIF4G2 в 5'НТО некоторых мРНК животных [Haizel et al., 2020]. Уточнение динамики взаимодействия между m⁷G-кэпом и eIF4F в процессе сканирования также может быть полезным для понимания механизма инициации, опосредованного eIF4G2.

В настоящий момент остается загадкой роль взаимодействия eIF2 и eIF4G2. Интересно, что eIF4G1 связывает eIF1 у дрожжей [He et al., 2003; Singh et al., 2017] и у человека [Sehrawat et al., 2022; Sinvani et al., 2015], и в обоих случаях это взаимодействие необходимо для обеспечения специфичности выбора старта инициации [He et al., 2003; Sehrawat et al., 2022]. У eIF4G2 отсутствует сайт связывания eIF1, поэтому сканирующие комплексы с eIF4G2 могут иметь другие свойства распознавания контекста стартовых кодонов. С другой стороны, eIF5 человека, в отличие от своего дрожжевого гомолога, не может одновременно связываться с eIF1 и с eIF2β [Luna et al., 2012]; таким образом, взаимодействие eIF2β-eIF4G2, вероятно, мешает связыванию eIF2β-eIF5 и может способствовать селекции стартовых кодонов комплексами с eIF4G2. Более того, апоптотический фрагмент eIF4G2 (p86) лишен участка связывания eIF2, однако разница в активности между p86 и полноразмерной формой eIF4G2 на данный момент не изучена.

Взаимодействие eIF3 и eIF4G2 также является открытым вопросом. До сих пор не установлено, является ли связывание eIF4G1 и eIF4G2 с eIF3 взаимоисключающим, и неизвестно, какая часть структуры eIF4G2 отвечает за взаимодействие с eIF3. Если в некоторых случаях eIF4G2 доставляется на мРНК через eIF3d, связанный с m⁷G-кэпом, то непонятно, почему eIF3d приносит в рибосомный комплекс eIF4G2, а не eIF4G1. Наконец, учитывая предполагаемую роль eIF4G2 в сканировании, не совсем понятно, почему деплеция eIF4G2 усиливает трансляцию некоторых мРНК. Возможно, это обусловлено вторичными эффектами, связанными с уменьшением количества каких-то белков-репрессоров трансляции.

Было бы очень информативно собрать 48S инициаторные комплексы на eIF4G2-зависимых 5'НТО, используя полные клеточные экстракты или очищенные белки из фракции солевого смыва с рибосом, и изучить их белковый состав. С помощью такого подхода, возможно, удастся выявить специфических партнеров eIF4G2. Клеточные линии, экспрессирующие eIF4G2 и eIF4G1 с аффинными тэгами, были бы полезны для иммунопреципитации соответствующих сканирующих комплексов. Использование

современных омиксных технологий для идентификации трансляционных мишеней eIF4G2 и потенциальных партнеров в комбинации со сборкой инициаторных комплексов из полностью очищенных компонентов *in vitro* позволили бы установить детальный молекулярный механизм функционирования белка в трансляции.

Выводы

1. В исследованных случаях eIF4G2 участвует в кэп-зависимой трансляции, в которой роль кэп-связывающего белка выполняет eIF4E, а не eIF3d, как предполагалось ранее.
2. Зависимость трансляции мРНК AKT2, SMAD1, MYCBP2, PHD2, UCP2 и POLG/POLGARF от eIF4G2 определяется их 5'НТО.
3. Наличие uORF в 5'НТО является важнейшим фактором, определяющим зависимость трансляции этих мРНК от eIF4G2.
4. eIF4G2 участвует как в пропускающем сканировании, так и в реинициации при трансляции мРНК Maf1, Stard7, UCP2 и POLG/POLGARF.
5. Наличие uORF, инициация трансляции POLGARF с эффективного из-за примыкающей шпильки стартового кодона CUG (но не AUG) и трансляция с участием eIF4G2 обеспечивают физиологически адекватный уровень синтеза обоих белков POLG и POLGARF с природной бицистронной мРНК.

Материалы и методы

1. Получение молекулярно-генетических конструкций

Репортерные плазмиды с 5'НТО β -актина, CCNI, CDK1, eIF4G2, TNF α , TP53, eIF5, PPFIA4, TGF β 1 человека и Maf1, Map3k3, Pcbp2, Stard7 мыши, IRES-элементом PTV [Смирнова, 2022], APAF1 [Andreev et al., 2012], ATF4, IFRD1, UCP2 человека [Andreev et al., 2015], β -глобина кролика, HIV1 [Smirnova et al., 2016], POLG и POLGARF человека [Loughran et al., 2020], и безлидерный репортер [Akulich et al., 2016] были получены ранее в лаборатории. 5'НТО АКТ2, ATF4, ATF5, EPAS1, hnRNPК (обоих вариантов транскрипта), HERC1, HSPA2, c-jun, MYCBP2, PCBP1, PKR, PHD2, SMAD1, человека были амплифицированы с кДНК, полученной из клеток 293Т.

Для амплификации 5'НТО PCBP1, АКТ2, PHD2 и SMAD1 требовалась частичная замена дГТФ на 7-деаза-дГТФ (дГТФ:7-деаза-дГТФ 3:1) (N0445, NEB, США). Точные границы 5'НТО были выбраны на основе данных CAGE, доступных в геномном браузере Zenbu [Severin et al., 2014]. Плазмиды с заклонированными 5'НТО CFTR1, MDM2 и TUBA1B [Akulich et al., 2019] человека были любезно предоставлены С.Е. Дмитриевым и К. А. Лашкевич (лаборатория системной биологии старения НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова). Плазида, содержащая последовательность 5'НТО SARS-CoV2, была любезно предоставлена А.Н. Анисенко (химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова). Плазмиды, содержащие 5'НТО, представленных в вакцинах BNT162b2/BioNTech и mRNA1273/Moderna против SARS-CoV2 [Fang et al., 2022] любезно предоставлены И. М. Терениным (лаборатория регуляции синтеза белка НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова).

Почти все исследованные 5'НТО были клонированы перед люциферазой светлячка (*Fluc*, *firefly luciferase*) в вектор pGL3 (Promega, США), за исключением 5'НТО CCNI, PPFIA4 и UHMK1, которые были клонированы в вектор pNL1.1 (Promega) и, таким образом, кодируют NanoLuc (Nluc). Репортерные конструкции с 5'НТО дикого типа POLG и POLGARF были заклонированы перед люциферазой светлячка в вектор pсDNA3.1, и предоставлены Д.Е. Андреевым (лаборатория регуляции синтеза белка НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова). Все плазмиды были созданы с помощью традиционных методов клонирования (ПЦР, рестрикция, лигирование), а результаты подтверждены секвенированием (Евроген, Россия). Для клонирования использовали высокоточные ДНК-полимеразы Phusion или Q5), ферменты рестрикции (Сибэнзайм, Россия; Thermo Fisher Scientific или NEB, США); T4 ДНК-лигазу (Thermo Fisher Scientific или NEB). Реакции проводили в соответствии с протоколами фирм-производителей. Для

очистки фрагментов ДНК из агарозного геля использовали наборы Monarch® DNA extraction Kit (NEB) или Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Лигазные смеси трансформировали в химически компетентные клетки *E. coli* штамма TOP10F' (Invitrogen, США), приготовленные самостоятельно. Для проверки трансформантов использовали ПЦР с колоний с помощью Taq ДНК-полимеразы (Евроген) по протоколу фирмы-производителя. Очищенную плазмидную ДНК получали с помощью набора для выделения Plasmid Miniprep (BC021L, Евроген). Олигонуклеотиды, использованные для клонирования приведены в таблице 3 в Приложении 3.

2. Приготовление компетентных клеток

Для приготовления компетентных клеток TOP10F', клетки предварительно высевали из коммерческой ампулы (Invitrogen) на чашку Петри с агаризованной средой LB и тетрациклином (50 мкг/мл) и растили ночь при 37 °С. На следующий день использовали одну колонию для посева ночной культуру клеток в 6 мл среды SOB с тетрациклином. Выращивали в течение ночи в шейкер-инкубаторе Innova 40R (New Brunswick Scientific, США) при 37 °С и 180 об/мин.

На следующий день утром разводили культуру в 100 раз в среде SOB (40 мл культуры) и культивировали 2 часа при 37 °С и 180 об/мин. Через 2 часа пересеивали культуру с разведением в 20 раз в предварительно нагретую колбу и среду SOB (200 мл культуры). Культивировали еще около 3 часов для достижения оптической плотности при 600 нм около 0.6. Затем культуру охлаждали во льду в течение 15-20 минут и далее все процедуры приготовления клеток проводили стерильно и при 4 °С или на льду. Центрифугировали клетки при 3000 g в течение 20 минут при 4 °С, осадок ресуспендировали в 80 мл буфера TFB1 (30 mM ацетата калия; 10 mM хлорида кальция; 50 mM хлорида марганца; 100 mM хлорида рубидия; 15% глицерина; pH доведен до 5.8 1 M уксусной кислотой), профильтрованного через 0,22 мкм. Сначала клетки ресуспендировали в небольшом объеме, затем, после получения однородной густой, полностью размешанной суспензии – в полном объеме. При этом, внимательно следили, чтобы клетки не нагревались при пипетировании. Инкубировали клетки во льду в течение 15 минут. Центрифугировали клетки при 3000 g в течение 20 минут при 4 °С, осадок ресуспендировали в 8 мл буфера TFB2 (100 mM MOPS; 75 mM хлорида кальция; 10 mM хлорида рубидия; 15% глицерин; pH доведен до 6,5 1 M гидроксидом калия), профильтрованного через 0,22 мкм. Затем готовили аликвоты по 80 мкл и инкубировали на льду на льду 30-45 минут (считая от момента начала приготовления аликвот), замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -70 °С. Компетентность у приготовленных клеток, как правило, составляла примерно $4 \cdot 10^6$.

3. *In vitro* транскрипция

Матрицы для *in vitro* транскрипции готовили методом ПЦР с использованием праймеров RV3L (прямой) и FLA50 или GL3r (обратный) для последующего получения полиаденилированных (50-нуклеотидны поли(А)-хвост) или неполиаденилированных мРНК соответственно (см. последовательности в таблице 3 в Приложении 3). Матрицы для *in vitro* транскрипции репортерных мРНК POLG и POLGARF амплифицировали с праймеров CMVDL и BGN50. Для амплификации матрицы PCBP1 добавляли 7-деаза-дГТФ в смесь для ПЦР (дГТФ:7-деаза-дГТФ 3:1) (N0445, NEB). Продукты ПЦР очищали с помощью наборов Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) или Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (5 мкг) (NEB), дополнительно депротеинизировали с помощью фенол-хлороформной экстракции, осаждали этанолом и ацетатом натрия при -20 °С в течение нескольких часов, центрифугировали при комнатной температуре при 14 000 g в течение 10 минут, осадок промывали 70% этанолом, сушили и затем растворяли в деионизированной воде без нуклеаз (Promega или Евrogen).

Транскрипцию *in vitro* проводили в буфере, содержащем 40 мМ ДТТ, 2 мМ спермидина, 80 мМ HEPES-КОН pH 7,5 и 24 мМ хлорида магния. Реакционная смесь также содержала по 3 мМ АТФ, ЦТФ и УТФ (Биосан, Россия), 12 мМ кэп-аналога и на 10 мкл реакции 4 ед. ингибитора рибонуклеазы RiboCare (Евrogen), 50 ед. T7 РНК-полимеразы (E-1010, Биолабмикс, Россия), 0,1 ед. неорганической пирофосфатазы *E. coli* (M0361L, NEB) и 0,4–0,5 мкг матрицы. Использовали следующие кэп-аналоги: 3'-ОМе-m⁷GpppG кэп-аналог ARCA (anti-reverse Cap analogue) (S1411, NEB или ARCA-0050, Биолабмикс), (3'-ОМе-m⁷G)(5')ppp(5')(2'-ОМеА)pG clean-cap аналог (m⁷GmAmG-кэп) (AGME-0050, Биолабмикс) или G(5')ppp(5')A А-кэп-аналог (S1406, NEB). мРНК с 5'НТО РНД2 дикого типа и с мутированными uAUG кодонами получали с добавлением 7,5 мМ псевдоуридин-трифосфата (Биолабмикс) в смесь для *in vitro* транскрипции. Реакцию транскрипции проводили в течение 2 часов при 37 °С, затем добавляли еще по 3 мМ каждого нуклеозидтрифосфата и инкубировали еще 2 часа. ДНК гидролизovali с использованием нуклеазы RQ1 (Promega), а РНК осаждали добавлением LiCl до 2,8 М и инкубировали на льду в течение одного часа. РНК осаждали центрифугированием при 20 000 g в течение 15 минут при 4 °С, осадок промывали 70% этанолом, высушивали, растворяли в деионизированной воде, не содержащей нуклеазы (Promega или Евrogen), и хранили при -80 °С. Концентрацию и степень чистоты определяли спектрофотометрически по поглощению при 260 нм и 280 нм (Eppendorf BioSpectrometer® basic, Германия).

4. Трансфекции siRNA и мРНК

Все клетки культивировали в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США) в CO₂-инкубаторе при 37 °С. Нокдаун *eIF4G1*, *eIF4G2* или *eIF3d* в клетках человека 293Т, Huh7 или RKO *eIF4G3*^(-/-) проводили следующим образом. В 1-й день клетки высевали в 4-, 12- или 6-луночный планшет (в зависимости от количества экспериментальных точек) при плотности ~20% и одновременно с пересевом проводили первый раунд трансфекции siRNA. Для трансфекции siRNA использовали либо Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, США) по протоколу фирмы-производителя, либо самодельные липосомные частицы с siRNA, любезно предоставленные сотрудниками лаборатории Т. С. Зацепина (химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова) (см. ниже). При использовании Lipofectamine RNAiMAX разводили трансфекционный реагент из расчета 1 мкл реагента на 20 пкмоль siRNA в 20 мкл среды Opti-MEM (Gibco, США), отдельно разводили каждую siRNA в 20 мкл среды Opti-MEM. Затем смешивали смесь siRNA с разведенным трансфекционным реагентом и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре и добавляли к клеткам. Конечная концентрация siRNA составляла 10 нМ в культуральной среде. При использовании реагента Lipofectamine RNAiMAX и самодельных липосомных частиц для РНК-интерференции полученные результаты были сходными, однако использование последних дало заметно более воспроизводимые данные с гораздо меньшим разбросом экспериментальных точек.

На 3-й день клетки высевали в лунки 48-луночного планшета при плотности ~30% одновременно со вторым раундом трансфекции siRNA. На 4-й день (через ~72 часа после первого внесения siRNA) проводили трансфекцию репортерных мРНК. Для трансфекции мРНК использовали либо трансфекционный реагент Lipofectamine 3000 (Invitrogen), либо GenJect-40 (Moloca, Россия). Каждую лунку 48-луночного планшета трансфицировали 50 нг опытной репортерной мРНК с исследуемой 5'НТО и 5 нг референсной m⁷G-кэпированной и полиаденилированной мРНК с 5'НТО β-глобина (кодирующей Nluc или Fluc, в зависимости от ситуации). В случае трансфекции с помощью Lipofectamine 3000, 50 нг репортерной мРНК и 5 нг референсной мРНК смешивали в 20 мкл Opti-MEM. В отдельной пробирке готовили смесь трансфекционного реагента Lipofectamine из расчета 0,4 мкл реагента (на такое количество обеих мРНК) в 10 мкл Opti-MEM. Объемы увеличивали в соответствии с необходимым количеством экспериментальных точек. Затем смесь мРНК добавляли к раствору трансфекционного реагента, инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре и добавляли к клеткам.

В случае трансфекции с помощью GenJect-40, 50 нг репортерной мРНК и 5 нг референсной мРНК смешивали в 50 мкл стерильного PBS (Gibco). В отдельной пробирке

готовили смесь трансфекционного реагента GenJect-40 из расчета 0,21 мкл реагента (на такое количество обеих мРНК) в 6,07 мкл PBS и инкубировали 10 минут при комнатной температуре. Объемы увеличивали в соответствии с необходимым количеством экспериментальных точек. После преинкубации, к смеси мРНК в PBS добавляли к раствор трансфекционного реагента, инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре и добавляли к клеткам. В случае, когда проводили мРНК-трансфекцию клеток с дополнительной обработкой индукторами стресса, за десять минут до трансфекции клетки обрабатывали 1 мкМ PP242 (Tocris Bioscience, Франция), 40 мкМ раствором арсенита натрия (Sigma-Aldrich, США) или 1 мкМ раствора тапсигаргина (MilliporeSigma, США). Через три (два — в случае обработки индукторами стресса) часа клетки лизировали с помощью реагента 1x Passive lysis buffer (E1531, Promega) в соответствии с протоколом фирмы-производителя и измеряли активность люцифераз вручную с помощью системы Dual-Luciferase® Reporter Assay System (E1980, Promega) и люминометра Modulus (Turner Biosystems).

Клетки RKO с нокаутом *eIF4G3* (*eIF4G3^{-/-}*) были получены ранее в лаборатории В.В. Смирновой с помощью нуклеазы AsCpf1 [Смирнова, 2022]. В этих клетках вместо полноразмерного eIF4G3 экспрессируется белок, состоящий 212 N-концевых а.о. eIF4G3 и 53 а.о., транслируемых со сдвинутой рамки считывания.

5. siRNA

Последовательности олигорибонуклеотидов для дуплексов siRNA для нокдауна *eIF4G2*, *eIF4G1* и *eIF3d* описаны в таблице 1 (прописными буквами обозначены немодифицированные рибонуклеотиды, строчными — рибонуклеотиды, защищенные 2'-О-Me). Т. С. Зацепин и Т. А. Приказчикова (Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова) выполняли подбор последовательной, синтез siRNA, а также приготовление готовых липосомных частиц с siRNA. Химически модифицированные siRNA были сконструированы как 21-нуклеотидные молекулы дцРНК с двумя 3'-выступающими dT нуклеотидами. Последовательности siRNA, направленные на мРНК eIF4G1, eIF4G2 и eIF3d человека, подбирали в соответствии с ранее описанным методом [Zeigerer et al., 2012].

Вкратце, последовательность мРНК разделяли на 19-мерные последовательности со сдвигом на один нуклеотид. Все 19-мерные последовательности-кандидаты оценивали по двум критериям: высокий потенциал против целевой мРНК (эффективность siRNA) и низкий потенциал против других мРНК (специфичность siRNA). Для исключения внецелевой активности 19-мерные кандидаты выравнивали по базе данных мРНК RefSeq, а их способность к нецелевому связыванию оценивали по количеству несоответствий при

спаривании с «seed»-регионом, вне «seed»-региона и в сайте расщепления. Кандидаты с низкой внецелевой активностью далее отфильтровывали в соответствии с потенциальной эффективностью, рассчитанной по нескольким известным критериям [Anderson et al., 2008; Pei et al., 2006; Reynolds et al., 2004]. Полученные последовательности дополнительно фильтровали для исключения иммуностимулирующих последовательностей. Наконец, в последовательности наиболее предпочтительных кандидатов вводили 2'-О-Метилмодификацию пиримидиновых нуклеотидов и одиночную 3'-внутринуклеотидную тиофосфатную связь для дальнейшего снижения иммунного ответа, внецелевых эффектов и повышения стабильности к нуклеазам [Jackson et al., 2006].

Таблица 1. Используемые олигорибонуклеотиды для РНК-интерференции. Прописными буквами обозначены немодифицированные рибонуклеотиды, а строчными — рибонуклеотиды, защищенные 2'-О-Ме.

siRNA	цепь	Последовательность олигорибонуклеотидов
Контрольная	прямая	cAGcuGuAuucAuAAuuuAdTsdT
	обратная	uAAAUuAUGAAuAcAGCUGdTsdt
eIF4G2 #1	прямая	cuccuuAAAcuAAcuGAAAdTsdT
	обратная	UUUcAGUuAGUUuAAGGAGdTsdt
eIF4G2 #2	прямая	cAAucAAAuucGucAAGAudTsdT
	обратная	AUCUUGACGAAUUUGAUUGdTsdt
eIF4G1	прямая	GuuAAuGAccGAAGAuAuAdTsdT
	обратная	uAuAUCUUCGGUcAUuAACdTsdt
eIF3d	прямая	ccuAGAAuAcuAcGAcAAAdTsdT
	обратная	UUUGUCGuAGuAUUCuAGGdTsdt

Эффективность всех синтезированных siRNA анализировали методом количественной ПЦР (выполнено Т.А. Приказчиковой) и вестерн-блоттинга, и отбирали наилучшие siRNA для дальнейшего использования на основании эффективности нокдауна (данные не показаны). Эффективность нокдауна оценивали по результатам вестерн-блоттинга: эффективность нокдауна *eIF4G1* и *eIF4G2* составила 10-20 и 3-4 для eIF3d. Все олигорибонуклеотиды были синтезированы в лаборатории химии нуклеиновых кислот под руководством Т. С. Зацепина (химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова) по стандартным протоколам на синтезаторе MerMade-12 (BioAutomation Technologies) с использованием 2'-TBDMS фосфорамидитов, очищены методом ионообменной ВЭЖХ и проверены методом масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем (ESI-MS). Для получения дуплексов siRNA смешивали равные количества комплементарных олигорибонуклеотидов (5 нмоль каждой смешивали в 100 мкл 10 мМ ТЕ-буфера), нагревали

до 90°C, охлаждали до комнатной температуры и хранили при 4°C. Липидные частицы для РНК-интерференции готовили, как описано [Sergeeva et al., 2020]. С помощью микрофлюидного чипа смешивали водный раствор дуплекса siRNA, раствор липидов в этаноле (C12-200, 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC, Avanti Polar Lipids), холестерин (Sigma Aldrich), C14 PEG 2000 (Avanti Polar Lipids) в молярном соотношении 50:10:38.5:1.5). Затем полученные липидные наночастицы диализовали в течение ночи в PBS. Размеры полученных частиц измеряли методом динамического светорассеяния (ZetaSizer, Malvern Instruments). Расчетный диаметр частиц составлял 120-150 нм.

6. Вестерн-блоттинг

Для вестерн-блот анализа использовали следующие антитела. Антитела против eIF4G1 (A300-502A), eIF4G2 (A302-249A), eIF3b/EIF3S9 (A301-761A), eIF3d/EIF3S7 (A301-758A), GAPDH (A300-639A) были приобретены в Bethyl laboratories (США). Использовали антитела против фосфорилированной субъединицы eIF2 α (ab32157) от производителя Abcam, против 4E-BP1 (№ 9452) и против фосфорилированной формы 4E-BP1 (Thr37/46) (№ 2855) от производителя Cell Signaling Technology (США). Вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, были приобретены в компании Invitrogen (США) (против антител кролика № 31460, против антител мыши № 31431).

Белки разделяли с помощью ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле по методу Лэммли и затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану (0,2 А; 25 В; 70 минут) (Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio-Rad, США). Качество электропереноса оценивали с помощью покраски пунцовым розовым. Мембраны отмывали от красителя с помощью буфера TBST (20 мМ трис, 150 мМ хлорид натрия, 0,2% Tween20), и блокировали в 3% растворе блокирующего реагента ECL™ Blocking Agent (GE Healthcare, США) в TBST или в 3% растворе сухого молока в TBST при комнатной температуре в течение 1 часа, затем инкубировали с антителами против eIF4G1 (1:5000), eIF3b (1:5000), eIF3d (1:5000), GAPDH (1:5000), 4E-BP1 (1:1000), фосфорилированной формы eIF2 α (1:500) и детектировали с помощью хемилюминесценции с использованием соответствующих антител против антител кролика или мыши в разведении 1:25 000. Инкубацию с первичными и вторичными антителами также проводили в 3% блокирующем реагенте в TBST при тех же условиях. Антитела, детектирующие eIF4G2, eIF3d, GAPDH, визуализировали с помощью набора ECL™ Prime Western Blotting System (GE Healthcare, США). eIF4G1, eIF3b, eIF4E-BP1, фосфорилированную форму 4E-BP1 и фосфорилированную форму eIF2 α детектировали с помощью субстрата SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific). Для детекции фосфорилированной формы eIF4E-BP1 мембрану

блокировали в 5% растворе БСА в TBST при комнатной температуре в течение 1 часа, инкубировали с первичными антителами (1:2000) в течение ночи при 4°C в 5% БСА в TBST, соответствующие вторичные антитела (1:25000) также разводили в 5% БСА в TBST и визуализировали с помощью системы ECL™ Prime Western Blotting (GE Healthcare). После детекции одного из целевых белков, проводили десобцию антител с помощью глицинового буфера (0,1 М глицин, 20 мМ ацетат магния, 50 мМ хлорида калия, pH 2,2) и затем заново блокировали мембрану для последующего вестерн-блот анализа. Изображения получали с помощью ChemiDoc XRS+ с программным обеспечением Image Lab™ 3.0 для обработки и количественной оценки изображений (Bio-Rad, США).

7. Статистический анализ

Полученные данные активностей люцифераз Fluc и NanoLuc анализировали с помощью ПО Microsoft Excel и GraphPad Prism 7. Для расчета нормализованной активности репортера с исследуемой 5'НТО нормировали активность репортерной люциферазы на активность контрольной люциферазы (Fluc/Nluc для репортеров, кодирующих Fluc и Nluc/Fluc для репортеров, кодирующих Nluc). Для большинства представленных данных эффект нокдауна рассчитан как отношение нормализованной экспрессии репортера в клетках с деплецией eIF4G2 к нормализованной экспрессии в контрольных клетках (обработанных контрольной siRNA). Эффект введенных мутаций на эффективность трансляции представляли как относительную эффективность трансляции, рассчитанную как отношение нормализованной экспрессии мутантного репортера к нормализованной экспрессии репортера с 5'НТО дикого типа. Эффекты добавления индукторов стресса (PP242, тапсигаргина и арсенита натрия) на эффективность трансляции рассчитаны как отношение нормализованной экспрессии репортеров в клетках, обработанных веществом, к экспрессии в клетках, обработанных растворителем (ДМСО в случае PP242, PBS в случае тапсигаргина и арсенита натрия). При этом линия на отметке 1 отражает ответ репортерной мРНК, соответствующий поведению референсной мРНК с 5'НТО β-глобина.

Большинство полученных данных для экспериментов по трансфекции мРНК представлены в виде ящиков с усами в стиле Тьюки: ящик обозначает интерквартильный размах (IQR), горизонтальная линия внутри ящика соответствует медиане, усы соответствуют $Q_3+1.5IQR$ и $Q_1-1.5IQR$. Данные, представленные на Рисунках 15А, Б, где для наглядности приведены в виде измеренных средних значений ± стандартная ошибка среднего (SE). Все трансфекции были воспроизведены не менее пяти раз (а в большинстве случаев >10). Статистическую значимость определяли с помощью двухфакторного U-теста Манна-Уитни. Одна, две, три звездочки и четыре звездочки на Рисунках означают $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$ и $p<0,0001$ соответственно.

Благодарности

Хотела бы выразить благодарность моим научным руководителям – Ивану Николаевичу Шатскому и Илье Михайловичу Теренину за руководство исследованием, обучению планированию, подготовке и техническим деталям экспериментов, за обсуждение результатов и подготовку совместных публикаций. Помимо Ивана Николаевича Шатского и Ильи Михайловича Теренина, Виктория Владимировна Смирнова, Полина Андреевна Мищенко и Роман Сергеевич Тумбинский работали вместе с нами над проектом, и некоторые результаты, представленные в этой работе, получены совместными усилиями.

Благодарю Дмитрия Евгеньевича Андреева, как первооткрывателя пептида POLGARF, закодированного в бицистронной мРНК POLG/POLGARF, за неоценимый вклад в изучение роли eIF4G2 в трансляции мРНК POLG и POLGARF, ценные советы и комментарии.

Благодарю коллег из лаборатории системной биологии старения НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, в частности Артема Сергеевича Куценко, Ксению Александровну Лашкевич и Дмитриева Сергея Евгеньевича за взаимопомощь и продуктивное обсуждение результатов.

Благодарю коллег из других лабораторий, принимавших участие в этой работе: Тимофея Сергеевича Зацепина и Татьяну Александровну Приказчикову за подбор, синтез siRNA и получение готовых липосомных частиц, без которых были бы невозможны основные эксперименты, представленные в данной работе.

Благодарю Федора Николаевича Розова за плодотворные обсуждения технических деталей экспериментов и используемых методик, а также за выращивание суспензионных клеток Ehp1293F, которые были необходимы для предварительных *in vitro* экспериментов.

Список литературы

1. Смирнова, В. В. Изучение функции белка DAP5 в трансляции: дис. ... канд. биол. наук: 03.01.03 / Смирнова Виктория Владимировна. - М., 2022. - 79 с.
2. Abastado J.-P., Miller P.F., Jackson B.M., Hinnebusch A.G. Suppression of Ribosomal Reinitiation at Upstream Open Reading Frames in Amino Acid-Starved Cells Forms the Basis for GCN4 Translational Control // *Mol. Cell. Biol.* 1991, 11(1), Pp. 486–496.
3. Abeyrathne P.D., Koh C.S., Grant T., Grigorieff N., Korostelev A.A. Ensemble cryo-EM uncovers inchworm-like translocation of a viral IRES through the ribosome // *eLife*. 2016, 5, Pp. e14874.
4. Akulich K.A., Andreev D.E., Terenin I.M., Smirnova V.V., Anisimova A.S., Makeeva D.S., Arkhipova V.I., Stolboushkina E.A., Garber M.B., Prokofjeva M.M., Spirin P.V., Prassolov V.S., Shatsky I.N., Dmitriev S.E. Four translation initiation pathways employed by the leaderless mRNA in eukaryotes // *Sci. Rep.* 2016, 6(1), Pp. 37905.
5. Akulich K.A., Sinitcyn P.G., Makeeva D.S., Andreev D.E., Terenin I.M., Anisimova A.S., Shatsky I.N., Dmitriev S.E. A novel uORF-based regulatory mechanism controls translation of the human MDM2 and eIF2D mRNAs during stress // *Biochimie*. 2019, 157, Pp. 92–101.
6. Alard A., Marboeuf C., Fabre B., Jean C., Martineau Y., Lopez F., Vende P., Poncet D., Schneider R.J., Bousquet C., Pyronnet S. Differential Regulation of the Three Eukaryotic mRNA Translation Initiation Factor (eIF) 4Gs by the Proteasome // *Front. Genet.* 2019, 10, Pp. 254.
7. Alard A., Katsara O., Rios-Fuller T., Parra C.D.L., Ozerdem U., Ernlund A., Schneider R.J. Breast cancer cell mesenchymal transition and metastasis directed by DAP5/eIF3d-mediated selective mRNA translation // *Cell Rep.* 2023, 42(6), Pp. 112646.
8. Alekhina O.M., Terenin I.M., Dmitriev S.E., Vassilenko K.S. Functional Cyclization of Eukaryotic mRNAs // *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21(5), Pp. 1677.
9. Algire M.A., Maag D., Lorsch J.R. Pi release from eIF2, not GTP hydrolysis, is the step controlled by start-site selection during eukaryotic translation initiation // *Mol. Cell.* 2005, 20(2), Pp. 251–262.
10. Amrani N., Ghosh S., Mangus D.A., Jacobson A. Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP // *Nature*. 2008, 453(7199), Pp. 1276–1280.
11. Anders M., Chelysheva I., Goebel I., Trenkner T., Zhou J., Mao Y., Verzini S., Qian S.-B., Ignatova Z. Dynamic m6A methylation facilitates mRNA triaging to stress granules // *Life Sci. Alliance*. 2018, 1(4). Pp. e201800113.

12. Anderson E.M., Birmingham A., Baskerville S., Reynolds A., Maksimova E., Leake D., Fedorov Y., Karpilow J., Khvorova A. Experimental validation of the importance of seed complement frequency to siRNA specificity // *RNA*. 2008, 14(5), Pp. 853–861.
13. Andreev D.E., Dmitriev S.E., Terenin I.M., Prassolov V.S., Merrick W.C., Shatsky I.N. Differential contribution of the m7G-cap to the 5' end-dependent translation initiation of mammalian mRNAs // *Nucleic Acids Res.* 2009, 37(18), Pp. 6135–6147.
14. Andreev D.E., Dmitriev S.E., Zinovkin R., Terenin I.M., Shatsky I.N. The 5' untranslated region of Apaf-1 mRNA directs translation under apoptosis conditions via a 5' end-dependent scanning mechanism // *FEBS Lett.* 2012, 586(23), Pp. 4139–4143.
15. Andreev D.E., O'Connor P.B., Fahey C., Kenny E.M., Terenin I.M., Dmitriev S.E., Cormican P., Morris D.W., Shatsky I.N., Baranov P.V. Translation of 5' leaders is pervasive in genes resistant to eIF2 repression // *eLife*. 2015, 4, Pp. e03971.
16. Andreev D.E., Arnold M., Kiniry S.J., Loughran G., Michel A.M., Rachinskii D., Baranov P.V. TASEP modelling provides a parsimonious explanation for the ability of a single uORF to derepress translation during the integrated stress response // *eLife*. 2018, 7, Pp. e32563.
17. Andreev D.E., Niepmann M., Shatsky I.N. Elusive Trans-Acting Factors Which Operate with Type I (Poliovirus-like) IRES Elements // *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23(24), Pp. 15497.
18. Anvret A., Westerlund M., Sydow O., Willows T., Lind C., Galter D., Belin A.C. Variations of the CAG trinucleotide repeat in DNA polymerase gamma (POLG1) is associated with Parkinson's disease in Sweden // *Neurosci. Lett.* 2010, 485(2), Pp. 117–120.
19. Asano K., Phan L., Valásek L., Schoenfeld L.W., Shalev A., Clayton J., Nielsen K., Donahue T.F., Hinnebusch A.G. A multifactor complex of eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and tRNA(i)Met promotes initiation complex assembly and couples GTP hydrolysis to AUG recognition // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2001, 66, Pp. 403–415.
20. Avanzino B.C., Jue H., Miller C.M., Cheung E., Fuchs G., Fraser C.S. Molecular mechanism of poliovirus Sabin vaccine strain attenuation // *J. Biol. Chem.* 2018, 293(40), Pp. 15471–15482.
21. Badura M., Braunstein S., Zavadil J., Schneider R.J. DNA damage and eIF4G1 in breast cancer cells reprogram translation for survival and DNA repair mRNAs // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012, 109(46), Pp. 18767–18772.
22. Biziaev N., Egorova T., Alkalaeva E. Dynamics of Eukaryotic mRNA Structure during Translation // *Mol. Biol.* 2022, 56, Pp. 382–394.
23. Boeck R., Curran J., Matsuoka Y., Compans R., Kolakofsky D. The parainfluenza virus type 1 P/C gene uses a very efficient GUG codon to start its C' protein // *J. Virol.* 1992, 66(3), Pp. 1765–1768.

24. Bohlen J., Fenzl K., Kramer G., Bukau B., Teleman A.A. Selective 40S Footprinting Reveals Cap-Tethered Ribosome Scanning in Human Cells // *Mol. Cell.* 2020, 79(4), Pp. 561-574.e5.
25. Bohlen J., Roiuk M., Neff M., Teleman A.A. PRRC2 proteins impact translation initiation by promoting leaky scanning // *Nucleic Acids Res.* 2023, 51(7), Pp. 3391–3409.
26. Bradley S., Narayanan S., Rosbash M. NAT1/DAP5/p97 and Atypical Translational Control in the Drosophila Circadian Oscillator // *Genetics.* 2012, 192(3), Pp. 943–957.
27. Bryant J.D., Brown M.C., Dobrikov M.I., Dobrikova E.Y., Gemberling S.L., Zhang Q., Gromeier M. Regulation of Hypoxia-Inducible Factor 1 α during Hypoxia by DAP5-Induced Translation of PHD2 // *Mol. Cell. Biol.* 2018, 38(11), Pp. e00647-17.
28. Bukhari S.I.A., Truesdell S.S., Lee S., Kollu S., Classon A., Boukhali M., Jain E., Mortensen R.D., Yanagiya A., Sadreyev R.I., Haas W., Vasudevan S. A Specialized Mechanism of Translation Mediated by FXR1a-Associated MicroRNP in Cellular Quiescence // *Mol. Cell.* 2016, 61(5), Pp. 760–773.
29. Calkhoven C.F., Muller C., Martin R., Krosch G., Pietsch H., Hoang T., Leutz A. Translational control of SCL-isoform expression in hematopoietic lineage choice // *Genes Dev.* 2003, 17(8), Pp. 959–964.
30. Calkhoven C.F., Müller C., Leutz A. Translational control of C/EBP α and C/EBP β isoform expression // *Genes Dev.* 2000, 14(15), Pp. 1920–1932.
31. Calvo S.E., Pagliarini D.J., Mootha V.K. Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009, 106(18), Pp. 7507–7512.
32. Chassé H., Boulben S., Cormier P., Morales J. Translational Control of Canonical and Non-Canonical Translation Initiation Factors at the Sea Urchin Egg to Embryo Transition // *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20(3), Pp. 626.
33. Chau D.H.W., Yuan J., Zhang H., Cheung P., Lim T., Liu Z., Sall A., Yang D. Coxsackievirus B3 proteases 2A and 3C induce apoptotic cell death through mitochondrial injury and cleavage of eIF4GI but not DAP5/p97/NAT1 // *Apoptosis.* 2007, 12(3), Pp. 513–524.
34. Chen R., Wang S.K., Belk J.A., Amaya L., Li Z., Cardenas A., Abe B.T., Chen C.-K., Wender P.A., Chang H.Y. Engineering circular RNA for enhanced protein production // *Nat. Biotechnol.* 2023, 41(2), Pp. 262–272.
35. Cheung Y.-N., Maag D., Mitchell S.F., Fekete C.A., Algire M.A., Takacs J.E., Shirokikh N., Pestova T., Lorsch J.R., Hinnebusch A.G. Dissociation of eIF1 from the 40S ribosomal subunit is a key step in start codon selection in vivo // *Genes Dev.* 2007, 21(10), Pp. 1217–1230.

36. Clemens M.J., Bushell M., Jeffrey I.W., Pain V.M., Morley S.J. Translation initiation factor modifications and the regulation of protein synthesis in apoptotic cells // *Cell Death Differ.* 2000, 7(7), Pp. 603–615.
37. Coldwell M.J., Mitchell S.A., Stoneley M., MacFarlane M., Willis A.E. Initiation of Apaf-1 translation by internal ribosome entry // *Oncogene.* 2000, 19(7), Pp. 899–905.
38. Contreras V., Richardson M.A., Hao E., Keiper B.D. Depletion of the cap-associated isoform of translation factor eIF4G induces germline apoptosis in *C. elegans* // *Cell Death Differ.* 2008, 15(8), Pp. 1232–1242.
39. Craig A.W., Haghghat A., Yu A.T., Sonenberg N. Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation // *Nature.* 1998, 392(6675), Pp. 520–523.
40. Curran J., Kolakofsky D. Ribosomal initiation from an ACG codon in the Sendai virus P/C mRNA. // *EMBO J.* 1988, 7(1), Pp. 245–251.
41. Dasso M.C., Milburn S.C., Hershey J.W.B., Jackson R.J. Selection of the 5'-proximal translation initiation site is influenced by mRNA and eIF-2 concentrations // *Eur. J. Biochem.* 1990, 187(2), Pp. 361–371.
42. Dave P., George B., Raheja H., Rani P., Behera P., Das S. The mammalian host protein DAP5 facilitates the initial round of translation of Coxsackievirus B3 RNA // *J. Biol. Chem.* 2019, 294(42), Pp. 15386–15394.
43. David M., Olender T., Mizrahi O., Weingarten-Gabbay S., Friedlander G., Meril S., Goldberg N., Savidor A., Levin Y., Salomon V., Stern-Ginossar N., Bialik S., Kimchi A. DAP5 drives translation of specific mRNA targets with upstream ORFs in human embryonic stem cells // *RNA.* 2022, 28(10), Pp. 1325–1336.
44. De Gregorio E., Preiss T., Hentze M.W. Translation driven by an eIF4G core domain in vivo // *EMBO J.* 1999, 18(17), Pp. 4865–4874.
45. de la Parra C., Ernlund A., Alard A., Ruggles K., Ueberheide B., Schneider R.J. A widespread alternate form of cap-dependent mRNA translation initiation // *Nat. Commun.* 2018, 9(1), Pp. 3068.
46. Dever T.E., Ivanov I.P., Hinnebusch A.G. Translational regulation by uORFs and start codon selection stringency // *Genes Dev.* 2023, 37(11–12), Pp. 474–489.
47. Dever T.E., Ivanov I.P., Sachs M.S. Conserved Upstream Open Reading Frame Nascent Peptides That Control Translation // *Annu. Rev. Genet.* 2020, 54, Pp. 237–264.
48. Di Timoteo G., Dattilo D., Centrón-Broco A., Colantoni A., Guarnacci M., Rossi F., Incarnato D., Oliviero S., Fatica A., Morlando M., Bozzoni I. Modulation of circRNA Metabolism by m6A Modification // *Cell Rep.* 2020, 31(6), Pp. 107641.

49. Diaz de Arce A.J., Noderer W.L., Wang C.L. Complete motif analysis of sequence requirements for translation initiation at non-AUG start codons // *Nucleic Acids Res.* 2018, 46(2), Pp. 985–994.
50. Dmitriev S.E., Terenin I.M., Dunaevsky Y.E., Merrick W.C., Shatsky I.N. Assembly of 48S translation initiation complexes from purified components with mRNAs that have some base pairing within their 5' untranslated regions // *Mol. Cell. Biol.* 2003, 23(24), Pp. 8925–8933.
51. Dorrello N.V., Peschiaroli A., Guardavaccaro D., Colburn N.H., Sherman N.E., Pagano M. S6K1- and β TRCP-Mediated Degradation of PDCD4 Promotes Protein Translation and Cell Growth // *Science.* 2006, 314(5798), Pp. 467–471.
52. Eerola J., Luoma P.T., Peuralinna T., Scholz S., Paisan-Ruiz C., Suomalainen A., Singleton A.B., Tienari P.J. POLG1 polyglutamine tract variants associated with Parkinson's disease // *Neurosci. Lett.* 2010, 477(1), Pp. 1–5.
53. Elfakess R., Sinvani H., Haimov O., Svitkin Y., Sonenberg N., Dikstein R. Unique translation initiation of mRNAs-containing TISU element // *Nucleic Acids Res.* 2011, 39(17), Pp. 7598–7609.
54. Elfakess R., Dikstein R. A translation initiation element specific to mRNAs with very short 5'UTR that also regulates transcription // *PloS One.* 2008, 3(8), Pp. e3094.
55. Fan S., Jia M.-Z., Gong W. Crystal structure of the C-terminal region of human p97/DAP5 // *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 2010, 78(10), Pp. 2385–2390.
56. Fang E., Liu X., Li M., Zhang Z., Song L., Zhu B., Wu X., Liu J., Zhao D., Li Y. Advances in COVID-19 mRNA vaccine development // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2022, 7(1), Pp. 1–31.
57. Fernandez S.G., Ferguson L., Ingolia N.T. Ribosome rescue factor PELOTA modulates translation start site choice and protein isoform levels of transcription factor C/EBP α // *bioRxiv.* 2023, Pp. 2023.01.16.524343.
58. Friedrich D., Marintchev A., Arthanari H. The metaphorical swiss army knife: The multitude and diverse roles of HEAT domains in eukaryotic translation initiation // *Nucleic Acids Res.* 2022, 50(10), Pp. 5424–5442.
59. Gao J., Cai G., Ning Y., Liu L., Yang J., Dong D., Fu B., Lu Y., Cui S., Chen X. DAP5 Ameliorates Cisplatin-Induced Apoptosis of Renal Tubular Cells // *Am. J. Nephrol.* 2012, 35(5), Pp. 456–465.
60. Gather F., Schmitz K., Koch K., Vogt L.-M., Pautz A., Kleinert H. Regulation of human inducible nitric oxide synthase expression by an upstream open reading frame // *Nitric Oxide.* 2019, 88, Pp. 50–60.

61. Gerashchenko M.V., Peterfi Z., Yim S.H., Gladyshev V.N. Translation elongation rate varies among organs and decreases with age // *Nucleic Acids Res.* 2021, 49(2), Pp. e9.
62. Gingras A.-C., Raught B., Gygi S.P., Niedzwiecka A., Miron M., Burley S.K., Polakiewicz R.D., Wyslouch-Cieszynska A., Aebersold R., Sonenberg N. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1 // *Genes Dev.* 2001, 15(21), Pp. 2852–2864.
63. Goyer C., Altmann M., Lee H.S., Blanc A., Deshmukh M., Woolford J.L., Trachsel H., Sonenberg N. TIF4631 and TIF4632 : Two Yeast Genes Encoding the High-Molecular-Weight Subunits of the Cap-Binding Protein Complex (eukaryotic initiation factor 4F) Contain an RNA Recognition Motif-Like Sequence and Carry out an Essential Function // *Mol. Cell. Biol.* 1993, 13(8), Pp. 4860–4874.
64. Gradi A., Imataka H., Svitkin Y.V., Rom E., Raught B., Morino S., Sonenberg N. A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G // *Mol. Cell. Biol.* 1998, 18(1), Pp. 334–342.
65. Grant C.M., Miller P.F., Hinnebusch A.G. Requirements for intercistronic distance and level of eukaryotic initiation factor 2 activity in reinitiation on GCN4 mRNA vary with the downstream cistron // *Mol. Cell. Biol.* 1994, 14(4), Pp. 2616–2628.
66. Grifo J.A., Tahara S.M., Leis J.P., Morgan M.A., Shatkin A.J., Merrick W.C. Characterization of eukaryotic initiation factor 4A, a protein involved in ATP-dependent binding of globin mRNA. // *J. Biol. Chem.* 1982, 257(9), Pp. 5246–5252.
67. Grifo J.A., Tahara S.M., Morgan M.A., Shatkin A.J., Merrick W.C. New initiation factor activity required for globin mRNA translation. // *J. Biol. Chem.* 1983, 258(9), Pp. 5804–5810.
68. Gross L., Vicens Q., Einhorn E., Noireterre A., Schaeffer L., Kuhn L., Imler J.-L., Eriani G., Meignin C., Martin F. The IRES5'UTR of the dicistrovirus cricket paralysis virus is a type III IRES containing an essential pseudoknot structure // *Nucleic Acids Res.* 2017, 45(15), Pp. 8993–9004.
69. Guan B.-J., Hoef V. van, Jobava R., Elroy-Stein O., Valasek L.S., Cargnello M., Gao X.-H., Krokowski D., Merrick W.C., Kimball S.R., Komar A.A., Koromilas A.E., Wynshaw-Boris A., Topisirovic I., Larsson O., Hatzoglou M. A Unique ISR Program Determines Cellular Responses to Chronic Stress // *Mol. Cell.* 2017, 68(5), Pp. 885- 900.e6.
70. Gunnery S., Mäivali Ü., Mathews M.B. Translation of an Uncapped mRNA Involves Scanning // *J. Biol. Chem.* 1997, 272(34), Pp. 21642–21646.
71. Haghighat A., Mader S., Pause A., Sonenberg N. Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. // *EMBO J.* 1995, 14(22), Pp. 5701–5709.

72. Haizel S.A., Bhardwaj U., Gonzalez R.L., Mitra S., Goss D.J. 5'-UTR recruitment of the translation initiation factor eIF4G1 or DAP5 drives cap-independent translation of a subset of human mRNAs // *J. Biol. Chem.* 2020, 295(33), Pp. 11693–11706.
73. Hanson P.J., Ye X., Qiu Y., Zhang H.M., Hemida M.G., Wang F., Lim T., Gu A., Cho B., Kim H., Fung G., Granville D.J., Yang D. Cleavage of DAP5 by coxsackievirus B3 2A protease facilitates viral replication and enhances apoptosis by altering translation of IRES-containing genes // *Cell Death Differ.* 2016, 23(5), Pp. 828–840.
74. Harris M.N., Ozpolat B., Abdi F., Gu S., Legler A., Mawuenyega K.G., Tirado-Gomez M., Lopez-Berestein G., Chen X. Comparative proteomic analysis of all-trans-retinoic acid treatment reveals systematic posttranscriptional control mechanisms in acute promyelocytic leukemia // *Blood.* 2004, 104(5), Pp. 1314–1323.
75. Harris T.E., Chi A., Shabanowitz J., Hunt D.F., Rhoads R.E., Lawrence Jr J.C. mTOR-dependent stimulation of the association of eIF4G and eIF3 by insulin // *EMBO J.* 2006, 25(8), Pp. 1659–1668.
76. Hashem Y., Georges A. des, Dhote V., Langlois R., Liao H.Y., Grassucci R.A., Pestova T.V., Hellen C.U.T., Frank J. Hepatitis-C-virus-like internal ribosome entry sites displace eIF3 to gain access to the 40S subunit // *Nature.* 2013, 503(7477), Pp. 539–543.
77. He H., Haar T. von der, Singh C.R., Li M., Li B., Hinnebusch A.G., McCarthy J.E.G., Asano K. The Yeast Eukaryotic Initiation Factor 4G (eIF4G) HEAT Domain Interacts with eIF1 and eIF5 and Is Involved in Stringent AUG Selection // *Mol. Cell. Biol.* 2003, 23(15), Pp. 5431–5445.
78. Heerma van Voss M.R., Diest P.J. van, Raman V. Targeting RNA helicases in cancer: The translation trap // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer.* 2017, 1868(2), Pp. 510–520.
79. Hellen C.U.T. Translation Termination and Ribosome Recycling in Eukaryotes // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2018, 10(10), Pp. a032656.
80. Henis-Korenblit S., Strumpf N.L., Goldstaub D., Kimchi A. A Novel Form of DAP5 Protein Accumulates in Apoptotic Cells as a Result of Caspase Cleavage and Internal Ribosome Entry Site-Mediated Translation // *Mol. Cell. Biol.* 2000, 20(2), Pp. 496–506.
81. Henis-Korenblit S., Shani G., Sines T., Marash L., Shohat G., Kimchi A. The caspase-cleaved DAP5 protein supports internal ribosome entry site-mediated translation of death proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002, 99(8), Pp. 5400–5405.
82. Hinnebusch A.G. eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes // *Trends Biochem. Sci.* 2006, 31(10), Pp. 553–562.
83. Hinnebusch A.G. The Scanning Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation // *Annu. Rev. Biochem.* 2014, 83(1), Pp. 779–812.

84. Hinnebusch A.G., Ivanov I.P., Sonenberg N. Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs // *Science*. 2016, 352(6292), Pp. 1413–1416.
85. Ho J.J.D., Wang M., Audas T.E., Kwon D., Carlsson S.K., Timpano S., Evagelou S.L., Brothers S., Gonzalgo M.L., Krieger J.R., Chen S., Uniacke J., Lee S. Systemic Reprogramming of Translation Efficiencies on Oxygen Stimulus // *Cell Rep*. 2016, 14(6), Pp. 1293–1300.
86. Hong S., Freeberg M.A., Han T., Kamath A., Yao Y., Fukuda T., Suzuki T., Kim J.K., Inoki K. LARP1 functions as a molecular switch for mTORC1-mediated translation of an essential class of mRNAs // *eLife*. 2017, 6, Pp. e25237.
87. Hoshino S., Imai M., Kobayashi T., Uchida N., Katada T. The eukaryotic polypeptide chain releasing factor (eRF3/GSPT) carrying the translation termination signal to the 3'-Poly(A) tail of mRNA. Direct association of erf3/GSPT with polyadenylate-binding protein // *J. Biol. Chem*. 1999, 274(24), Pp. 16677–16680.
88. Hronová V., Mohammad M.P., Wagner S., Pánek J., Gunišová S., Zeman J., Poncová K., Valášek L.S. Does eIF3 promote reinitiation after translation of short upstream ORFs also in mammalian cells? // *RNA Biol*. 2017, 14(12), Pp. 1660–1667.
89. 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., Ruggero D. The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis // *Nature*. 2012, 485(7396), Pp. 55–61.
90. 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., Hüttelmaier S., Skibbe J.R., Su R., Deng X., Dong L., Sun M., Li C., Nachtergaele S., et al. Recognition of RNA N6-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation // *Nat. Cell Biol*. 2018, 20(3), Pp. 285–295.
91. Hundsdorfer P., Thoma C., Hentze M.W. Eukaryotic translation initiation factor 4GI and p97 promote cellular internal ribosome entry sequence-driven translation // *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2005, 102(38), Pp. 13421–13426.
92. Hurtaud C., Gelly C., Bouillaud F., Lévi-Meyrueis C. Translation control of UCP2 synthesis by the upstream open reading frame // *Cell. Mol. Life Sci*. 2006, 63(15), Pp. 1780.
93. Hwang W.L., Su T.S. Translational regulation of hepatitis B virus polymerase gene by termination-reinitiation of an upstream minicistron in a length-dependent manner // *J. Gen. Virol*. 1998, 79(9), Pp. 2181–2189.
94. Iacono M., Mignone F., Pesole G. uAUG and uORFs in human and rodent 5'-untranslated mRNAs // *Gene*. 2005, 349, Pp. 97–105.

95. Imataka H., Gradi A., Sonenberg N. A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation // *EMBO J.* 1998, 17(24), Pp. 7480–7489.
96. Imataka H., Olsen H.S., Sonenberg N. A new translational regulator with homology to eukaryotic translation initiation factor 4G // *EMBO J.* 1997a, 16(4), Pp. 817–825.
97. Imataka H., Sonenberg N. Human Eukaryotic Translation Initiation Factor 4G (eIF4G) Possesses Two Separate and Independent Binding Sites for eIF4A // *Mol. Cell. Biol.* 1997b, 17(12), Pp. 6940–6947.
98. Ingolia N.T., Ghaemmaghami S., Newman J.R.S., Weissman J.S. Genome-Wide Analysis in Vivo of Translation with Nucleotide Resolution Using Ribosome Profiling // *Science.* 2009, 324(5924), Pp. 218–223.
99. Itzhak D.N., Tyanova S., Cox J., Borner G.H. Global, quantitative and dynamic mapping of protein subcellular localization // *eLife.* 2016, 5, Pp. e16950.
100. Ivanov P., Kedersha N., Anderson P. Stress Granules and Processing Bodies in Translational Control // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2019, 11(5), Pp. a032813.
101. Ivanov I.P., Loughran G., Sachs M.S., Atkins J.F. Initiation context modulates autoregulation of eukaryotic translation initiation factor 1 (eIF1) // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010, 107(42), Pp. 18056–18060.
102. Jackson A.L., Burchard J., Leake D., Reynolds A., Schelter J., Guo J., Johnson J.M., Lim L., Karpilow J., Nichols K., Marshall W., Khvorova A., Linsley P.S. Position-specific chemical modification of siRNAs reduces “off-target” transcript silencing // *RNA.* 2006, 12(7), Pp. 1197–1205.
103. Jackson R.J., Hellen C.U.T., Pestova T.V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010, 11(2), Pp. 113–127.
104. Jackson R.J., Hellen C.U.T., Pestova T.V. Termination and post-termination events in eukaryotic translation // *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology.* 2012, 86, Pp. 45–93.
105. Jackson R.J. The Current Status of Vertebrate Cellular mRNA IRESs // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013, 5(2), Pp. a011569.
106. Jain S., Wheeler J.R., Walters R.W., Agrawal A., Barsic A., Parker R. ATPase-Modulated Stress Granules Contain a Diverse Proteome and Substructure // *Cell.* 2016, 164(3), Pp. 487–498.
107. Jang S.K., Kräusslich H.G., Nicklin M.J., Duke G.M., Palmenberg A.C., Wimmer E. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation // *J. Virol.* 1988, 62(8), Pp. 2636–2643.

108. Johnstone T.G., Bazzini A.A., Giraldez A.J. Upstream ORFs are prevalent translational repressors in vertebrates // *EMBO J.* 2016, 35(7), Pp. 706–723.
109. Kar A.N., MacGibeny M.A., Gervasi N.M., Gioio A.E., Kaplan B.B. Intra-axonal synthesis of eukaryotic translation initiation factors regulates local protein synthesis and axon growth in rat sympathetic neurons // *J. Neurosci.* 2013, 33(17), Pp. 7165–7174.
110. Kearse M.G., Goldman D.H., Choi J., Nwaezeapu C., Liang D., Green K.M., Goldstrohm A.C., Todd P.K., Green R., Wilusz J.E. Ribosome queuing enables non-AUG translation to be resistant to multiple protein synthesis inhibitors // *Genes Dev.* 2019, 33(13–14), Pp. 871–885.
111. Khan Y.A., Jungreis I., Wright J.C., Mudge J.M., Choudhary J.S., Firth A.E., Kellis M. Evidence for a novel overlapping coding sequence in POLG initiated at a CUG start codon // *BMC Genet.* 2020, 21(1), Pp. 25.
112. Kimball S.R., Fabian J.R., Pavitt G.D., Hinnebusch A.G., Jefferson L.S. Regulation of Guanine Nucleotide Exchange through Phosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor eIF2 α : ROLE OF THE α - AND δ -SUBUNITS OF eIF2B // *J. Biol. Chem.* 1998, 273(21), Pp. 12841–12845.
113. Kolupaeva V.G., Pestova T.V., Hellen C.U.T., Shatsky I.N. Translation Eukaryotic Initiation Factor 4G Recognizes a Specific Structural Element within the Internal Ribosome Entry Site of Encephalomyocarditis Virus RNA // *J. Biol. Chem.* 1998, 273(29), Pp. 18599–18604.
114. Kozak M. Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes // *Mol. Cell. Biol.* 1987a, 7(10), Pp. 3438–3445.
115. Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. // *Nucleic Acids Res.* 1987b, 15(20), Pp. 8125–8148.
116. Kozak M. A short leader sequence impairs the fidelity of initiation by eukaryotic ribosomes // *Gene Expr.* 1991, 1(2), Pp. 111–115.
117. Kozak M. New Ways of Initiating Translation in Eukaryotes? // *Mol. Cell. Biol.* 2001a, 21(6), Pp. 1899–1907.
118. Kozak M. Constraints on reinitiation of translation in mammals // *Nucleic Acids Res.* 2001b, 29(24), Pp. 5226–5232.
119. Kozak M. Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation // *Gene.* 2002, 299(1), Pp. 1–34.
120. Kratzat H., Mackens-Kiani T., Ameismeier M., Potocnjak M., Cheng J., Dacheux E., Namane A., Berninghausen O., Herzog F., Fromont-Racine M., Becker T., Beckmann R. A structural inventory of native ribosomal ABCE1-43S pre-initiation complexes // *EMBO J.* 2021, 40(1), Pp. e105179.

121. Kriachkov V., Ormsby A.R., Kusnadi E.P., McWilliam H.E.G., Mintern J.D., Amarasinghe S.L., Ritchie M.E., Furic L., Hatters D.M. Arginine-rich C9ORF72 ALS proteins stall ribosomes in a manner distinct from a canonical ribosome-associated quality control substrate // *J. Biol. Chem.* 2023, 299(1), Pp. 102774
122. Lahr R.M., Fonseca B.D., Ciotti G.E., Al-Ashtal H.A., Jia J.-J., Niklaus M.R., Blagden S.P., Alain T., Berman A.J. La-related protein 1 (LARP1) binds the mRNA cap, blocking eIF4F assembly on TOP mRNAs // *eLife.* 2017, 6, Pp. e24146.
123. Lamper A.M., Fleming R.H., Ladd K.M., Lee A.S.Y. A phosphorylation-regulated eIF3d translation switch mediates cellular adaptation to metabolic stress // *Science.* 2020, 370(6518), Pp. 853–856.
124. Lamphear B.J., Kirchweger R., Skern T., Rhoads R.E. Mapping of Functional Domains in Eukaryotic Protein Synthesis Initiation Factor 4G (eIF4G) with Picornaviral Proteases: IMPLICATIONS FOR CAP-DEPENDENT AND CAP-INDEPENDENT TRANSLATIONAL INITIATION // *J. Biol. Chem.* 1995, 270(37), Pp. 21975–21983.
125. Le H., Tanguay R.L., Balasta M.L., Wei C.C., Browning K.S., Metz A.M., Goss D.J., Gallie D.R. Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity // *J. Biol. Chem.* 1997, 272(26), Pp. 16247–16255.
126. Lee A.S.Y., Kranzusch P.J., Doudna J.A., Cate J.H.D. eIF3d is an mRNA cap-binding protein that is required for specialized translation initiation // *Nature.* 2016, 536(7614), Pp. 96–99.
127. Lee A.S.Y., Kranzusch P.J., Cate J.H.D. eIF3 targets cell-proliferation messenger RNAs for translational activation or repression // *Nature.* 2015, 522(7554), Pp. 111–114.
128. Lee K.-M., Chen C.-J., Shih S.-R. Regulation Mechanisms of Viral IRES-Driven Translation // *Trends Microbiol.* 2017, 25(7), Pp. 546–561.
129. Lee S.H., McCormick F. p97/DAP5 is a ribosome-associated factor that facilitates protein synthesis and cell proliferation by modulating the synthesis of cell cycle proteins // *EMBO J.* 2006, 25(17), Pp. 4008–4019.
130. Lee Y.-Y., Cevallos R.C., Jan E. An Upstream Open Reading Frame Regulates Translation of GADD34 during Cellular Stresses That Induce eIF2 α Phosphorylation // *J. Biol. Chem.* 2009, 284(11), Pp. 6661–6673.
131. LeFebvre A.K., Korneeva N.L., Trutschl M., Cvek U., Duzan R.D., Bradley C.A., Hershey J.W.B., Rhoads R.E. Translation Initiation Factor eIF4G-1 Binds to eIF3 through the eIF3e Subunit // *J. Biol. Chem.* 2006, 281(32), Pp. 22917–22932.
132. Levy-Strumpf N., Deiss L.P., Berissi H., Kimchi A. DAP-5, a Novel Homolog of Eukaryotic Translation Initiation Factor 4G Isolated as a Putative Modulator of Gamma Interferon-Induced Programmed Cell Death // *Mol. Cell. Biol.* 1997, 17(3), Pp. 1615–1625.

133. Lewis S.M., Cerquozzi S., Graber T.E., Ungureanu N.H., Andrews M., Holcik M. The eIF4G homolog DAP5/p97 supports the translation of select mRNAs during endoplasmic reticulum stress // *Nucleic Acids Res.* 2008, 36(1), Pp. 168–178.
134. Li K., Kong J., Zhang S., Zhao T., Qian W. Distance-dependent inhibition of translation initiation by downstream out-of-frame AUGs is consistent with a Brownian ratchet process of ribosome scanning // *Genome Biol.* 2022, 23(1), Pp. 254.
135. Liberman N., Dym O., Unger T., Albeck S., Peleg Y., Jacobovitch Y., Branzburg A., Eisenstein M., Marash L., Kimchi A. The crystal structure of the C-terminal DAP5/p97 domain sheds light on the molecular basis for its processing by caspase cleavage // *J. Mol. Biol.* 2008, 383(3), Pp. 539–548.
136. Liberman N., Gandin V., Svitkin Y.V., David M., Virgili G., Jaramillo M., Holcik M., Nagar B., Kimchi A., Sonenberg N. DAP5 associates with eIF2 β and eIF4AI to promote Internal Ribosome Entry Site driven translation // *Nucleic Acids Res.* 2015, 43(7), Pp. 3764–3775.
137. Lin Y., May G.E., Kready H., Nazzaro L., Mao M., Spealman P., Creeger Y., McManus C.J. Impacts of uORF codon identity and position on translation regulation // *Nucleic Acids Res.* 2019, 47(17), Pp. 9358–9367.
138. Lin Y., Li F., Huang L., Polte C., Duan H., Fang J., Sun L., Xing X., Tian G., Cheng Y., Ignatova Z., Yang X., Wolf D.A. eIF3 Associates with 80S Ribosomes to Promote Translation Elongation, Mitochondrial Homeostasis, and Muscle Health // *Mol. Cell.* 2020, 79(4), Pp. 575-587.e7.
139. Liu Y., Cui J., Hoffman A.R., Hu J.-F. Eukaryotic translation initiation factor eIF4G2 opens novel paths for protein synthesis in development, apoptosis and cell differentiation // *Cell Prolif.* 2023, 56(3), Pp. e13367.
140. Ll acer J.L., Hussain T., Saini A.K., Nanda J.S., Kaur S., Gordiyenko Y., Kumar R., Hinnebusch A.G., Lorsch J.R., Ramakrishnan V. Translational initiation factor eIF5 replaces eIF1 on the 40S ribosomal subunit to promote start-codon recognition // *eLife.* 2018, 7, Pp. e39273.
141. L opez-Ulloa B., Fuentes Y., Pizarro-Ortega M.S., L opez-Lastra M. RNA-Binding Proteins as Regulators of Internal Initiation of Viral mRNA Translation // *Viruses.* 2022, 14(2), Pp. 188.
142. Loughran G., Sachs M.S., Atkins J.F., Ivanov I.P., Ivanov I.P. Stringency of start codon selection modulates autoregulation of translation initiation factor eIF5 // *Nucleic Acids Res.* 2012, 40(7), Pp. 2898–2906.
143. Loughran G., Zhdanov A.V., Mikhaylova M.S., Rozov F.N., Datskevich P.N., Kovalchuk S.I., Serebryakova M.V., Kiniry S.J., Michel A.M., O’Connor P.B.F., Papkovsky D.B., Atkins J.F., Baranov P.V., Shatsky I.N., Andreev D.E. Unusually efficient CUG initiation of an

- overlapping reading frame in POLG mRNA yields novel protein POLGARF // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2020, 117(40), Pp. 24936–24946.
144. Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 // *Genome Biol.* 2014, 15(12), Pp. 550.
145. Lu P.D., Harding H.P., Ron D. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response // *J. Cell Biol.* 2004, 167(1), Pp. 27–33.
146. Luna R.E., Arthanari H., Hiraishi H., Nanda J., Martin-Marcos P., Markus M.A., Akabayov B., Milbradt A.G., Luna L.E., Seo H.-C., Hyberts S.G., Fahmy A., Reibarkh M., Miles D., Hagner P.R., O'Day E.M., Yi T., Marintchev A., Hinnebusch A.G., et al. The C-terminal domain of eukaryotic initiation factor 5 promotes start codon recognition by its dynamic interplay with eIF1 and eIF2 β // *Cell Rep.* 2012, 1(6), Pp. 689–702.
147. Luna R.E., Arthanari H., Hiraishi H., Akabayov B., Tang L., Cox C., Markus M.A., Luna L.E., Ikeda Y., Watanabe R., Bedoya E., Yu C., Alikhan S., Wagner G., Asano K. The interaction between eukaryotic initiation factor 1A and eIF5 retains eIF1 within scanning preinitiation complexes // *Biochemistry.* 2013, 52(52), Pp. 9510–9518.
148. Luukkonen B.G., Tan W., Schwartz S. Efficiency of reinitiation of translation on human immunodeficiency virus type 1 mRNAs is determined by the length of the upstream open reading frame and by intercistronic distance // *J. Virol.* 1995, 69(7), Pp. 4086–4094.
149. Mailliot J., Martin F. Viral internal ribosomal entry sites: four classes for one goal // *WIREs RNA.* 2018, 9(2), Pp. e1458.
150. Marash L., Liberman N., Henis-Korenblit S., Sivan G., Reem E., Elroy-Stein O., Kimchi A. DAP5 Promotes Cap-Independent Translation of Bcl-2 and CDK1 to Facilitate Cell Survival during Mitosis // *Mol. Cell.* 2008, 30(4), Pp. 447–459.
151. Martineau Y., Derry M.C., Wang X., Yanagiya A., Berlanga J.J., Shyu A.-B., Imataka H., Gehring K., Sonenberg N. Poly(A)-binding protein-interacting protein 1 binds to eukaryotic translation initiation factor 3 to stimulate translation // *Mol. Cell. Biol.* 2008, 28(21), Pp. 6658–6667.
152. Martineau Y., Müller D., Pyronnet S. Targeting protein synthesis in cancer cells // *Oncoscience.* 2014, 1(7), Pp. 484–485.
153. Mašek T., Valášek L., Pospíšek M. Polysome Analysis and RNA Purification from Sucrose Gradients // *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ. 2011, 703, Pp. 293–309.
154. Matsuda D., Dreher T.W. Close spacing of AUG initiation codons confers dicistronic character on a eukaryotic mRNA // *RNA N. Y. N.* 2006, 12(7), Pp. 1338–1349.
155. Matsuda D., Mauro V.P. Determinants of Initiation Codon Selection during Translation in Mammalian Cells // *PLOS ONE.* 2010, 5(11), Pp. e15057.

156. Matsui M., Yachie N., Okada Y., Saito R., Tomita M. Bioinformatic analysis of post-transcriptional regulation by uORF in human and mouse // *FEBS Lett.* 2007, 581(22), Pp. 4184–4188.
157. Meyer K.D., Patil D.P., Zhou J., Zinoviev A., Skabkin M.A., Elemento O., Pestova T.V., Qian S.-B., Jaffrey S.R. 5' UTR m6A Promotes Cap-Independent Translation // *Cell.* 2015, 163(4), Pp. 999–1010.
158. Miras M., Miller W.A., Truniger V., Aranda M.A. Non-canonical Translation in Plant RNA Viruses // *Front. Plant Sci.* 2017, 8. Pp. 494.
159. Mitchell S.A., Brown E.C., Coldwell M.J., Jackson R.J., Willis A.E. Protein Factor Requirements of the Apaf-1 Internal Ribosome Entry Segment: Roles of Polypyrimidine Tract Binding Protein and upstream of N-ras // *Mol. Cell. Biol.* 2001, 21(10), Pp. 3364–3374.
160. Mitchell S.A., Spriggs K.A., Coldwell M.J., Jackson R.J., Willis A.E. The Apaf-1 Internal Ribosome Entry Segment Attains the Correct Structural Conformation for Function via Interactions with PTB and unr // *Mol. Cell.* 2003, 11(3), Pp. 757–771.
161. Mohammad M.P., Munzarová Pondelíčková V., Zeman J., Gunišová S., Valášek L.S. In vivo evidence that eIF3 stays bound to ribosomes elongating and terminating on short upstream ORFs to promote reinitiation // *Nucleic Acids Res.* 2017, 45(5), Pp. 2658–2674.
162. Mohammad M.P., Smirnova A., Gunišová S., Valášek L.S. eIF4G is retained on ribosomes elongating and terminating on short upstream ORFs to control reinitiation in yeast // *Nucleic Acids Res.* 2021, 49(15), Pp. 8743–8756.
163. Mortensen R.D., Serra M., Steitz J.A., Vasudevan S. Posttranscriptional activation of gene expression in *Xenopus laevis* oocytes by microRNA-protein complexes (microRNPs) // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011, 108(20), Pp. 8281–8286.
164. Muhs M., Hilal T., Mielke T., Skabkin M.A., Sanbonmatsu K.Y., Pestova T.V., Spahn C.M.T. Cryo-EM of ribosomal 80S complexes with termination factors reveals the translocated cricket paralysis virus IRES // *Mol. Cell.* 2015, 57(3), Pp. 422–432.
165. Murray J., Savva C.G., Shin B.-S., Dever T.E., Ramakrishnan V., Fernández I.S. Structural characterization of ribosome recruitment and translocation by type IV IRES // *eLife.* 2016, 5, Pp. e13567.
166. Nagaraj N., Wisniewski J.R., Geiger T., Cox J., Kircher M., Kelso J., Pääbo S., Mann M. Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line // *Mol. Syst. Biol.* 2011, 7, Pp. 548.
167. Nanda J.S., Saini A.K., Muñoz A.M., Hinnebusch A.G., Lorsch J.R. Coordinated movements of eukaryotic translation initiation factors eIF1, eIF1A, and eIF5 trigger phosphate

- release from eIF2 in response to start codon recognition by the ribosomal preinitiation complex // *J. Biol. Chem.* 2013, 288(8), Pp. 5316–5329.
168. Neupane R., Pisareva V.P., Rodriguez C.F., Pisarev A.V., Fernández I.S. A complex IRES at the 5'-UTR of a viral mRNA assembles a functional 48S complex via an uAUG intermediate // *eLife*. 2020, 9, Pp. e54575.
169. Nevins T.A., Harder Z.M., Korneluk R.G., Holcík M. Distinct regulation of internal ribosome entry site-mediated translation following cellular stress is mediated by apoptotic fragments of eIF4G translation initiation factor family members eIF4GI and p97/DAP5/NAT1 // *J. Biol. Chem.* 2003, 278(6), Pp. 3572–3579.
170. Noderer W.L., Flockhart R.J., Bhaduri A., Diaz de Arce A.J., Zhang J., Khavari P.A., Wang C.L. Quantitative analysis of mammalian translation initiation sites by FACS-seq // *Mol. Syst. Biol.* 2014, 10(8), Pp. 748.
171. Nusch M., Reed V., Bryson-Richardson R.J., Currie P.D., Preiss T. The eIF4G-homolog p97 can activate translation independent of caspase cleavage // *RNA*. 2007, 13(3), Pp. 374–384.
172. Ochs K., Zeller A., Saleh L., Bassili G., Song Y., Sonntag A., Niepmann M. Impaired Binding of Standard Initiation Factors Mediates Poliovirus Translation Attenuation // *J. Virol.* 2003, 77(1), Pp. 115–122.
173. Ozpolat B., Akar U., Steiner M., Zorrilla-Calancha I., Tirado-Gomez M., Colburn N., Danilenko M., Kornblau S., Berestein G.L. Programmed cell death-4 tumor suppressor protein contributes to retinoic acid-induced terminal granulocytic differentiation of human myeloid leukemia cells // *Mol. Cancer Res. MCR*. 2007, 5(1), Pp. 95–108.
174. Ozpolat B., Akar U., Zorrilla-Calancha I., Vivas-Mejia P., Acevedo-Alvarez M., Lopez-Berestein G. Death-associated protein 5 (DAP5/p97/NAT1) contributes to retinoic acid-induced granulocytic differentiation and arsenic trioxide-induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia // *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death*. 2008, 13(7), Pp. 915–928.
175. Paolini N.A., Moore K.S., Summa F.M. di, Fokkema I.F.A.C., Hoen P.A.C. 't, Lindern M. von. Ribosome profiling uncovers selective mRNA translation associated with eIF2 phosphorylation in erythroid progenitors // *PLOS ONE*. 2018, 13(4), Pp. e0193790.
176. Park E.-H., Zhang F., Warringer J., Sunnerhagen P., Hinnebusch A.G. Depletion of eIF4G from yeast cells narrows the range of translational efficiencies genome-wide // *BMC Genomics*. 2011, 12, Pp. 68.
177. Pei Y., Tuschl T. On the art of identifying effective and specific siRNAs // *Nat. Methods*. 2006, 3(9), Pp. 670–676.
178. Pelletier J., Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA // *Nature*. 1988, 334(6180), Pp. 320–325.

179. Pestova T.V., Shatsky I.N., Fletcher S.P., Jackson R.J., Hellen C.U.T. A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs // *Genes Dev.* 1998, 12(1), Pp. 67–83.
180. Pestova T.V., Lomakin I.B., Lee J.H., Choi S.K., Dever T.E., Hellen C.U. The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B // *Nature.* 2000, 403(6767), Pp. 332–335.
181. Pestova T.V., Kolupaeva V.G., Lomakin I.B., Pilipenko E.V., Shatsky I.N., Agol V.I., Hellen C.U. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001, 98(13), Pp. 7029–7036.
182. Pestova T.V., Breyne S. de, Pisarev A.V., Abaeva I.S., Hellen C.U.T. eIF2-dependent and eIF2-independent modes of initiation on the CSFV IRES: a common role of domain II // *EMBO J.* 2008, 27(7), Pp. 1060–1072.
183. Pestova T.V., Kolupaeva V.G. The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection // *Genes Dev.* 2002, 16(22), Pp. 2906–2922.
184. Pilipenko E.V., Pestova T.V., Kolupaeva V.G., Khitrina E.V., Poperechnaya A.N., Agol V.I., Hellen C.U.T. A cell cycle-dependent protein serves as a template-specific translation initiation factor // *Genes Dev.* 2000, 14(16), Pp. 2028–2045.
185. Pisareva V.P., Pisarev A.V. DHX29 reduces leaky scanning through an upstream AUG codon regardless of its nucleotide context // *Nucleic Acids Res.* 2016, 44(9), Pp. 4252–4265.
186. Pöyry T.A.A., Kaminski A., Jackson R.J. What determines whether mammalian ribosomes resume scanning after translation of a short upstream open reading frame? // *Genes Dev.* 2004, 18(1), Pp. 62–75.
187. Pyronnet S., Imataka H., Gingras A.C., Fukunaga R., Hunter T., Sonenberg N. Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E // *EMBO J.* 1999, 18(1), Pp. 270–279.
188. Qin X., Jiang B., Zhang Y. 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein // *Cell Cycle Georget. Tex.* 2016, 15(6), Pp. 781–786.
189. Querido B., Sokabe M., Kraatz S., Gordiyenko Y., Skehel J.M., Fraser C.S., Ramakrishnan V. Structure of a human 48S translational initiation complex // *Science.* 2020, 369(6508), Pp. 1220–1227.
190. Querido J.B., Sokabe M., Díaz-López I., Gordiyenko Y., Fraser C.S., Ramakrishnan V. The structure of a human translation initiation complex reveals two independent roles for the helicase eIF4A // *bioRxiv* 2022. Pp. 2022.12.07.519490

191. Radío S., Garat B., Sotelo-Silveira J., Smircich P. Upstream ORFs Influence Translation Efficiency in the Parasite *Trypanosoma cruzi* // *Front. Genet.* 2020, 11. P.166
192. Radwan M., Ang C.-S., Ormsby A.R., Cox D., Daly J.C., Reid G.E., Hatters D.M. Arginine in C9ORF72 Dipolypeptides Mediates Promiscuous Proteome Binding and Multiple Modes of Toxicity // *Mol. Cell. Proteomics.* 2020, 19(4), Pp. 640–654.
193. Rahman S., Copeland W.C. POLG-related disorders and their neurological manifestations // *Nat. Rev. Neurol.* 2019, 15(1), Pp. 40–52.
194. Rajkowitsch L., Vilela C., Berthelot K., Ramirez C.V., McCarthy J.E.G. Reinitiation and recycling are distinct processes occurring downstream of translation termination in yeast // *J. Mol. Biol.* 2004, 335(1), Pp. 71–85.
195. Ramírez-Valle F., Braunstein S., Zavadil J., Formenti S.C., Schneider R.J. eIF4GI links nutrient sensing by mTOR to cell proliferation and inhibition of autophagy // *J. Cell Biol.* 2008, 181(2), Pp. 293–307.
196. Ray R.E., T. G. Lawson, J. C. Kramer, M. H. Cladaras, J. A. Grifo, R. D. Abramson, W. C. Merrick, R. E. Thach. ATP-dependent unwinding of messenger RNA structure by eukaryotic initiation factors // *J. Biol. Chem.* 1985, 260(12), Pp. 7651–7658.
197. Reynolds A., Leake D., Boese Q., Scaringe S., Marshall W.S., Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference // *Nat. Biotechnol.* 2004, 22(3), Pp. 326–330.
198. Richter N.J., Rogers G.W., Hensold J.O., Merrick W.C. Further biochemical and kinetic characterization of human eukaryotic initiation factor 4H // *J. Biol. Chem.* 1999, 274(50), Pp. 35415–35424.
199. Richter-Cook N.J., Dever T.E., Hensold J.O., Merrick W.C. Purification and characterization of a new eukaryotic protein translation factor. Eukaryotic initiation factor 4H // *J. Biol. Chem.* 1998, 273(13), Pp. 7579–7587.
200. Rogers G.W., Richter N.J., Lima W.F., Merrick W.C. Modulation of the Helicase Activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F // *J. Biol. Chem.* 2001, 276(33), Pp. 30914–30922.
201. Rogers G.W., Richter N.J., Merrick W.C. Biochemical and kinetic characterization of the RNA helicase activity of eukaryotic initiation factor 4A // *J. Biol. Chem.* 1999, 274(18), Pp. 12236–12244.
202. Rozen F., Edery I., Meerovitch K., Dever T.E., Merrick W.C., Sonenberg N. Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F // *Mol. Cell. Biol.* 1990, 10(3), Pp. 1134–1144.
203. Russell P.J., Slivka J.A., Boyle E.P., Burghes A.H.M., Kearsse M.G. Translation reinitiation after uORFs does not fully protect mRNAs from nonsense-mediated decay // *RNA N. Y. N.* 2023, 29(6), Pp. 735–744.

204. Sanson M., Vu Hong A., Massourides E., Bourg N., Suel L., Amor F., Corre G., Bénit P., Barthélémy I., Blot S., Bigot A., Pinset C., Rustin P., Servais L., Voit T., Richard I., Israeli D. miR-379 links glucocorticoid treatment with mitochondrial response in Duchenne muscular dystrophy // *Sci. Rep.* 2020, 10(1), Pp. 9139.
205. Schwanhäusser B., Busse D., Li N., Dittmar G., Schuchhardt J., Wolf J., Chen W., Selbach M. Global quantification of mammalian gene expression control // *Nature.* 2011, 473(7347), Pp. 337–342.
206. Sehrawat U., Haimov O., Weiss B., Tamarkin-Ben Harush A., Ashkenazi S., Plotnikov A., Noiman T., Leshkowitz D., Stelzer G., Dikstein R. Inhibitors of eIF4G1–eIF1 uncover its regulatory role of ER/UPR stress-response genes independent of eIF2 α -phosphorylation // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2022, 119(30), Pp. e2120339119.
207. Seo J.-Y., Jung Y., Kim D.-Y., Ryu H.G., Lee J., Kim S.W., Kim K.-T. DAP5 increases axonal outgrowth of hippocampal neurons by enhancing the cap-independent translation of DSCR1.4 mRNA // *Cell Death Dis.* 2019, 10(2), Pp. 1–15.
208. Sergeeva O., Sergeev P., Melnikov P., Prikazchikova T., Dontsova O., Zatsepin T. Modification of Adenosine196 by Mett13 Methyltransferase in the 5'-External Transcribed Spacer of 47S Pre-rRNA Affects rRNA Maturation // *Cells.* 2020, 9(4), Pp. 1061.
209. Severin J., Lizio M., Harshbarger J., Kawaji H., Daub C.O., Hayashizaki Y., Bertin N., Forrest A.R.R. Interactive visualization and analysis of large-scale sequencing datasets using ZENBU // *Nat. Biotechnol.* 2014, 32(3), Pp. 217–219.
210. Shatsky I.N., Dmitriev S.E., Terenin I.M., Andreev D.E. Cap- and IRES-independent scanning mechanism of translation initiation as an alternative to the concept of cellular IRESs // *Mol. Cells.* 2010, 30(4), Pp. 285–293.
211. Shatsky I.N., Terenin I.M., Smirnova V.V., Andreev D.E. Cap-Independent Translation: What's in a Name? // *Trends Biochem. Sci.* 2018, 43(11), Pp. 882–895.
212. Shaughnessy J.D., Jenkins N.A., Copeland N.G. cDNA Cloning, Expression Analysis, and Chromosomal Localization of a Gene with High Homology to Wheat eIF-(iso)4F and Mammalian eIF-4G // *Genomics.* 1997, 39(2), Pp. 192–197.
213. She R., Luo J., Weissman J.S. Translational fidelity screens in mammalian cells reveal eIF3 and eIF4G2 as regulators of start codon selectivity // *Nucleic Acids Res.* 2023, Pp. gkad329.
214. Shen L., Pelletier J. General and Target-Specific DExD/H RNA Helicases in Eukaryotic Translation Initiation // *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21(12), Pp. 4402.
215. Sherlock M.E., Baquero Galvis L., Vicens Q., Kieft J.S., Jagannathan S. Principles, mechanisms, and biological implications of translation termination-reinitiation // *RNA N. Y. N.* 2023, 29(7), Pp. 865–884.

216. Shirokikh N.E., Dutikova Y.S., Staroverova M.A., Hannan R.D., Preiss T. Migration of Small Ribosomal Subunits on the 5' Untranslated Regions of Capped Messenger RNA // *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20(18), Pp. 4464.
217. Shirokikh N.E., Preiss T. Translation initiation by cap-dependent ribosome recruitment: Recent insights and open questions // *WIREs RNA*. 2018, 9(4).
218. Simonetti A., Brito Querido J., Myasnikov A.G., Mancera-Martinez E., Renaud A., Kuhn L., Hashem Y. eIF3 Peripheral Subunits Rearrangement after mRNA Binding and Start-Codon Recognition // *Mol. Cell*. 2016, 63(2), Pp. 206–217.
219. Singh C.R., Watanabe R., Chowdhury W., Hiraishi H., Murai M.J., Yamamoto Y., Miles D., Ikeda Y., Asano M., Asano K. Sequential Eukaryotic Translation Initiation Factor 5 (eIF5) Binding to the Charged Disordered Segments of eIF4G and eIF2 β Stabilizes the 48S Preinitiation Complex and Promotes Its Shift to the Initiation Mode // *Mol. Cell. Biol.* 2012, 32(19), Pp. 3978–3989.
220. Singh N., Shi J., June C.H., Ruella M. Genome-Editing Technologies in Adoptive T Cell Immunotherapy for Cancer // *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 2017, 12(6), Pp. 522–529.
221. Sinvani H., Haimov O., Svitkin Y., Sonenberg N., Tamarkin-Ben-Harush A., Viollet B., Dikstein R. Translational Tolerance of Mitochondrial Genes to Metabolic Energy Stress Involves TISU and eIF1-eIF4GI Cooperation in Start Codon Selection // *Cell Metab.* 2015, 21(3), Pp. 479–492.
222. Sizova D.V., Kolupaeva V.G., Pestova T.V., Shatsky I.N., Hellen C.U.T. Specific Interaction of Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 with the 5' Nontranslated Regions of Hepatitis C Virus and Classical Swine Fever Virus RNAs // *J VIROL.* 1998, 72, Pp. 4775-4782.
223. Skabkin M.A., Skabkina O.V., Hellen C.U.T., Pestova T.V. Reinitiation and other unconventional posttermination events during eukaryotic translation // *Mol. Cell*. 2013, 51(2), Pp. 249–264.
224. Smirnova V.V., Terenin I.M., Khutornenko A.A., Andreev D.E., Dmitriev S.E., Shatsky I.N. Does HIV-1 mRNA 5'-untranslated region bear an internal ribosome entry site? // *Biochimie.* 2016, 121, Pp. 228–237.
225. Sokabe M., Fraser C.S., Hershey J.W.B. The human translation initiation multi-factor complex promotes methionyl-tRNAⁱ binding to the 40S ribosomal subunit // *Nucleic Acids Res.* 2012, 40(2), Pp. 905–913.
226. Sorokin I.I., Vassilenko K.S., Terenin I.M., Kalinina N.O., Agol V.I., Dmitriev S.E. Non-Canonical Translation Initiation Mechanisms Employed by Eukaryotic Viral mRNAs // *Biochem. Biokhimiia.* 2021, 86(9), Pp. 1060–1094.

227. Spijker H.M. van 't, Stackpole E.E., Almeida S., Katsara O., Liu B., Shen K., Schneider R.J., Gao F.-B., Richter J.D. Ribosome profiling reveals novel regulation of C9ORF72 GGGGCC repeat-containing RNA translation // *RNA* N. Y. N. 2022, 28(2), Pp. 123–138.
228. Srivastava R., Budak G., Dash S., Lachke S.A., Janga S.C. Transcriptome analysis of developing lens reveals abundance of novel transcripts and extensive splicing alterations // *Sci. Rep.* 2017, 7(1), Pp. 11572.
229. Stacey S.N., Jordan D., Williamson A.J., Brown M., Coote J.H., Arrand J.R. Leaky scanning is the predominant mechanism for translation of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from E6/E7 bicistronic mRNA // *J. Virol.* 2000, 74(16), Pp. 7284–7297.
230. Sugiyama H., Takahashi K., Yamamoto T., Iwasaki M., Narita M., Nakamura M., Rand T.A., Nakagawa M., Watanabe A., Yamanaka S. Nat1 promotes translation of specific proteins that induce differentiation of mouse embryonic stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2017, 114(2), Pp. 340–345.
231. Takahashi K., Maruyama M., Tokuzawa Y., Murakami M., Oda Y., Yoshikane N., Makabe K.W., Ichisaka T., Yamanaka S. Evolutionarily conserved non-AUG translation initiation in NAT1/p97/DAP5 (EIF4G2) // *Genomics.* 2005, 85(3), Pp. 360–371.
232. Takahashi K., Jeong D., Wang S., Narita M., Jin X., Iwasaki M., David Perli S., Conklin B.R., Yamanaka S. Critical roles of translation initiation and RNA uridylation in endogenous retroviral expression and neural differentiation in pluripotent stem cells // *Cell Rep.* 2020, 31(9), Pp. 107715.
233. Tan X., Zheng C., Zhuang Y., Jin P., Wang F. The m6A reader PRRC2A is essential for meiosis I completion during spermatogenesis // *Nat. Commun.* 2023, 14(1), Pp. 1636.
234. Tang L., Morris J., Wan J., Moore C., Fujita Y., Gillaspie S., Aube E., Nanda J., Marques M., Jangal M., Anderson A., Cox C., Hiraishi H., Dong L., Saito H., Singh C.R., Witcher M., Topisirovic I., Qian S.-B., et al. Competition between translation initiation factor eIF5 and its mimic protein 5MP determines non-AUG initiation rate genome-wide // *Nucleic Acids Res.* 2017, 45(20), Pp. 11941–11953.
235. Tarun S.Z., Sachs A.B. Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G // *EMBO J.* 1996, 15(24), Pp. 7168–7177.
236. Tcherkezian J., Cargnello M., Romeo Y., Huttlin E.L., Lavoie G., Gygi S.P., Roux P.P. Proteomic analysis of cap-dependent translation identifies LARP1 as a key regulator of 5'TOP mRNA translation // *Genes Dev.* 2014, 28(4), Pp. 357–371.
237. Tee A.R., Proud C.G. Caspase cleavage of initiation factor 4E-binding protein 1 yields a dominant inhibitor of cap-dependent translation and reveals a novel regulatory motif // *Mol. Cell. Biol.* 2002, 22(6), Pp. 1674–1683.

238. Terenin I.M., Dmitriev S.E., Andreev D.E., Royall E., Belsham G.J., Roberts L.O., Shatsky I.N. A cross-kingdom internal ribosome entry site reveals a simplified mode of internal ribosome entry // *Mol. Cell. Biol.* 2005, 25(17), Pp. 7879–7888.
239. Terenin I.M., Dmitriev S.E., Andreev D.E., Shatsky I.N. Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2 // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2008, 15(8), Pp. 836–841.
240. Terenin I.M., Andreev D.E., Dmitriev S.E., Shatsky I.N. A novel mechanism of eukaryotic translation initiation that is neither m7G-cap-, nor IRES-dependent // *Nucleic Acids Res.* 2013, 41(3), Pp. 1807–1816.
241. Terenin I.M., Akulich K.A., Andreev D.E., Polyanskaya S.A., Shatsky I.N., Dmitriev S.E. Sliding of a 43S ribosomal complex from the recognized AUG codon triggered by a delay in eIF2-bound GTP hydrolysis // *Nucleic Acids Res.* 2016, 44(4), Pp. 1882–1893.
242. Terenin I.M., Smirnova V.V., Andreev D.E., Dmitriev S.E., Shatsky I.N. A researcher's guide to the galaxy of IRESs // *Cell. Mol. Life Sci.* 2017, 74(8), Pp. 1431–1455.
243. Thoreen C.C., Chantranupong L., Keys H.R., Wang T., Gray N.S., Sabatini D.M. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation // *Nature.* 2012, 485(7396), Pp. 109–113.
244. Tierney, J.S, Świrski, M., Tjeldnes, H., Mudge, J. M., Kufel, J., Whiffin, N., Valen, E., Baranov, P. V. Ribosome Decision Graphs for the Representation of Eukaryotic RNA Translation Complexity // *bioRxiv.* 2023, Pp. 2023.11.10.566564.
245. Tong J., Lu J., Mao X., Zhu Z., Wang Y., Lou M., Zhang K. Circular RNA-UBE2D2 accelerates the proliferation and metastasis of non-small cell lung cancer cells via modulating microRNA-376a-3p/Eukaryotic Translation Initiation Factor 4γ2 axis // *Bioengineered.* 2022, 13(3), Pp. 5942–5953.
246. Truniger V., Miras M., Aranda M.A. Structural and Functional Diversity of Plant Virus 3'-Cap-Independent Translation Enhancers (3'-CITEs) // *Front. Plant Sci.* 2017, 8.
247. Tzani I., Ivanov I.P., Andreev D.E., Dmitriev R.I., Dean K.A., Baranov P.V., Atkins J.F., Loughran G. Systematic analysis of the PTEN 5' leader identifies a major AUU initiated proteoform // *Open Biol.* 2016, 6(5), Pp. 150203.
248. Uchida N., Hoshino S.-I., Imataka H., Sonenberg N., Katada T. A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in Cap/Poly(A)-dependent translation // *J. Biol. Chem.* 2002, 277(52), Pp. 50286–50292.
249. Unbehaun A., Borukhov S.I., Hellen C.U.T., Pestova T.V. Release of initiation factors from 48S complexes during ribosomal subunit joining and the link between establishment of

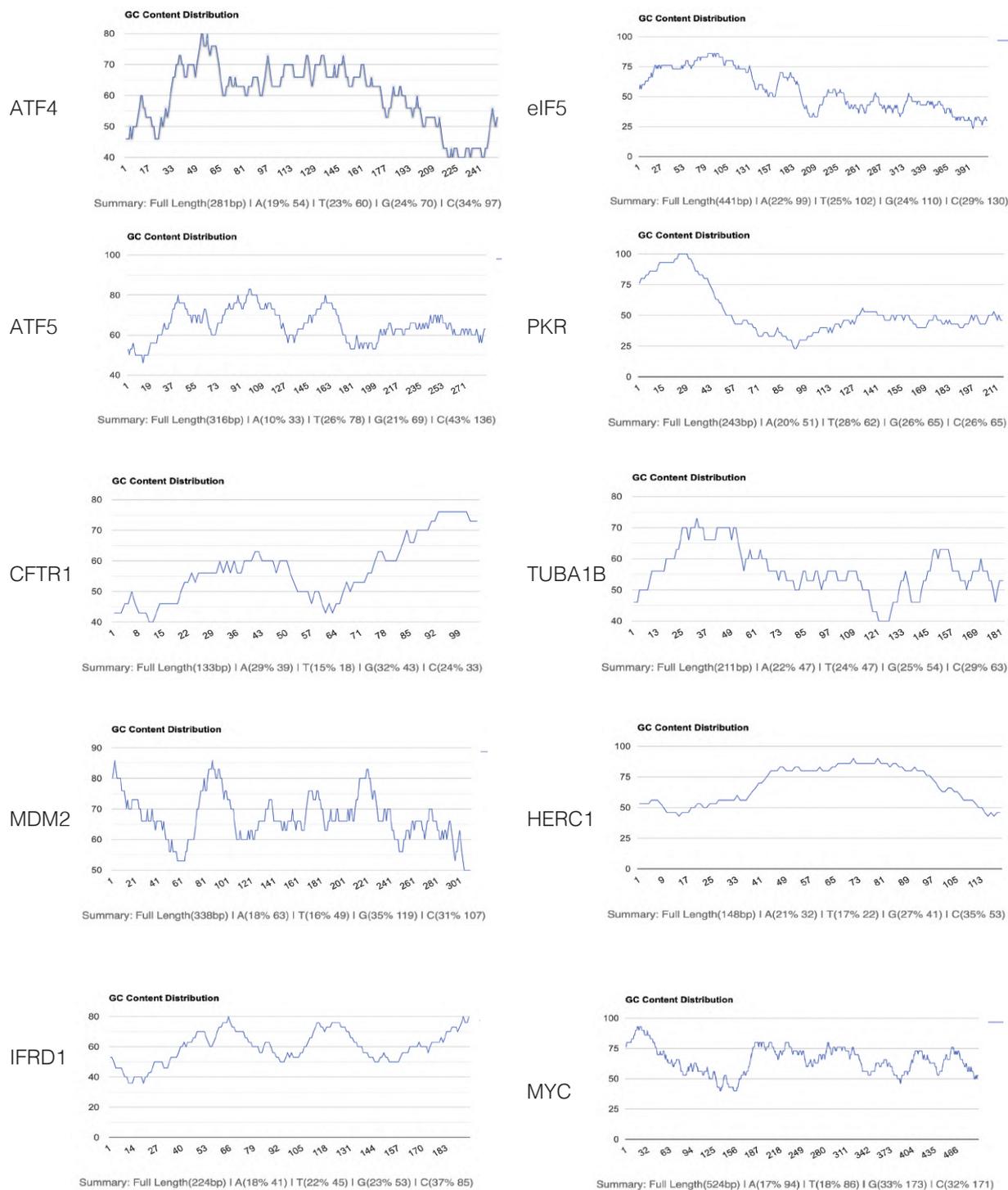
- codon-anticodon base-pairing and hydrolysis of eIF2-bound GTP // *Genes Dev.* 2004, 18(24), Pp. 3078–3093.
250. Vassilenko K.S., Alekhina O.M., Dmitriev S.E., Shatsky I.N., Spirin A.S. Unidirectional constant rate motion of the ribosomal scanning particle during eukaryotic translation initiation // *Nucleic Acids Res.* 2011, 39(13), Pp. 5555–5567.
251. Vasudevan S., Tong Y., Steitz J.A. Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation // *Science.* 2007, 318(5858), Pp. 1931–1934.
252. Vattam K.M., Wek R.C. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004, 101(31), Pp. 11269–11274.
253. Vicens Q., Kieft J.S., Rissland O.S. Revisiting the Closed-Loop Model and the Nature of mRNA 5'–3' Communication // *Mol. Cell.* 2018, 72(5), Pp. 805–812.
254. Villa N., Do A., Hershey J.W.B., Fraser C.S. Human Eukaryotic Initiation Factor 4G (eIF4G) Protein Binds to eIF3c, -d, and -e to Promote mRNA Recruitment to the Ribosome // *J. Biol. Chem.* 2013, 288(46), Pp. 32932–32940.
255. Virgili G., Frank F., Feoktistova K., Sawicki M., Sonenberg N., Fraser C.S., Nagar B. Structural analysis of the DAP5 MIF4G domain and its interaction with eIF4A // *Struct. Lond. Engl.* 1993. 2013, 21(4), Pp. 517–527.
256. Volta V., Pérez-Baos S., Parra C. de la, Katsara O., Ernlund A., Dornbaum S., Schneider R.J. A DAP5/eIF3d alternate mRNA translation mechanism promotes differentiation and immune suppression by human regulatory T cells // *Nat. Commun.* 2021, 12(1), Pp. 6979.
257. Wagner S., Herrmannová A., Hronová V., Gunišová S., Sen N.D., Hannan R.D., Hinnebusch A.G., Shirokikh N.E., Preiss T., Valášek L.S. Selective Translation Complex Profiling Reveals Staged Initiation and Co-translational Assembly of Initiation Factor Complexes // *Mol. Cell.* 2020, 79(4), Pp. 546- 560.e7.
258. Wang J., Shin B.-S., Alvarado C., Kim J.-R., Bohlen J., Dever T.E., Puglisi J.D. Rapid 40S scanning and its regulation by mRNA structure during eukaryotic translation initiation // *Cell.* 2022, 185(24), Pp. 4474–4487.
259. Warnakulasuriyarachchi D., Cerquozzi S., Cheung H.H., Holcik M. Translational Induction of the Inhibitor of Apoptosis Protein HIAP2 during Endoplasmic Reticulum Stress Attenuates Cell Death and Is Mediated via an Inducible Internal Ribosome Entry Site Element // *J. Biol. Chem.* 2004, 279(17), Pp. 17148–17157.
260. Watatani Y., Ichikawa K., Nakanishi N., Fujimoto M., Takeda H., Kimura N., Hirose H., Takahashi S., Takahashi Y. Stress-induced translation of ATF5 mRNA is regulated by the 5'-untranslated region // *J. Biol. Chem.* 2008, 283(5), Pp. 2543–2553.

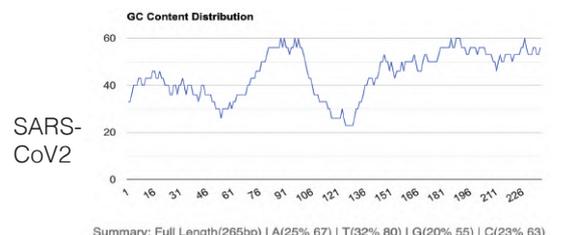
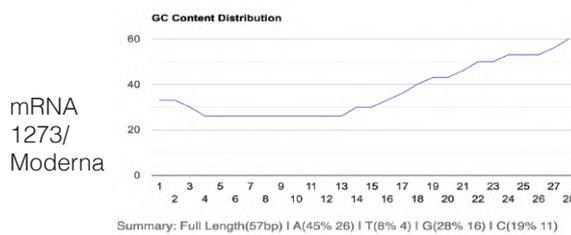
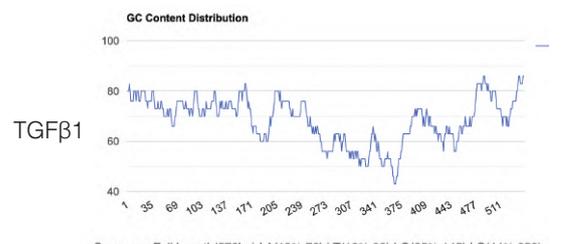
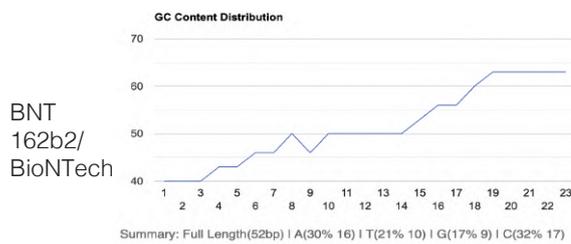
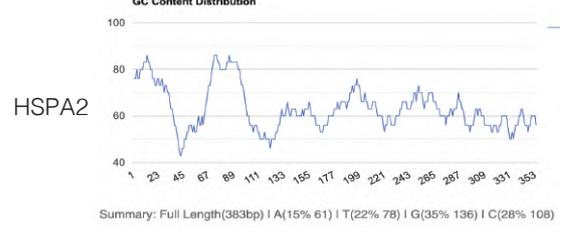
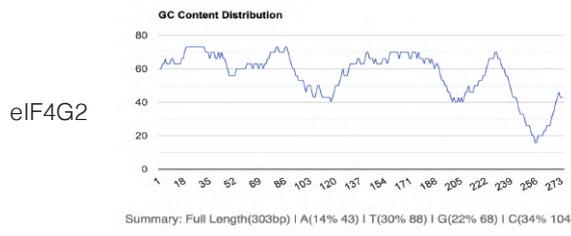
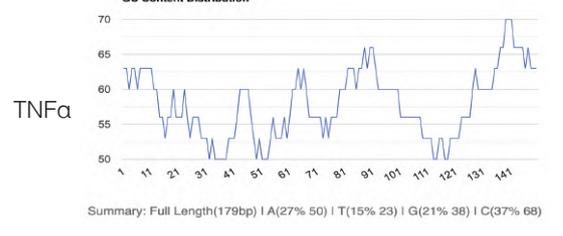
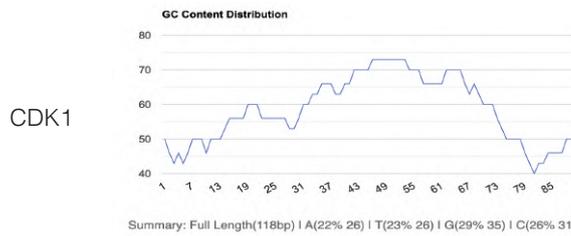
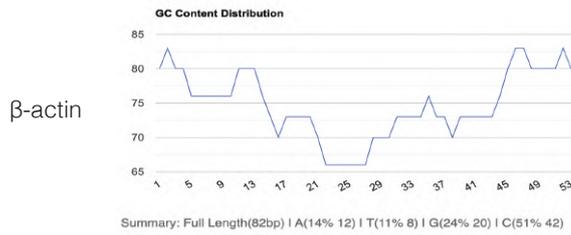
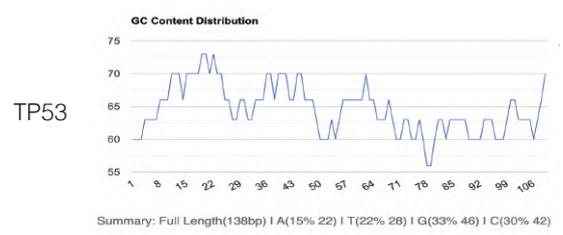
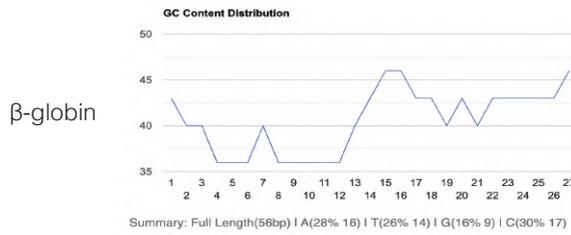
261. Weber R., Kleemann L., Hirschberg I., Chung M.-Y., Valkov E., Igreja C. DAP5 enables main ORF translation on mRNAs with structured and uORF-containing 5' leaders // *Nat. Commun.* 2022, 13(1), Pp. 7510.
262. Weingarten-Gabbay S., Khan D., Liberman N., Yoffe Y., Bialik S., Das S., Oren M., Kimchi A. The translation initiation factor DAP5 promotes IRES-driven translation of p53 mRNA // *Oncogene.* 2014, 33(5), Pp. 611–618.
263. Weiss B., Allen G.E., Kloehn J., Abid K., Jaquier-Gubler P., Curran J.A. eIF4E3 forms an active eIF4F complex during stresses (eIF4FS) targeting mTOR and re-programs the translatoome // *Nucleic Acids Res.* 2021, 49(9), Pp. 5159–5176.
264. Wells S.E., Hillner P.E., Vale R.D., Sachs A.B. Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors // *Mol. Cell.* 1998, 2(1), Pp. 135–140.
265. Werten P.J., Stege G.J., Jong W.W. de. The short 5' untranslated region of the betaA3/A1-crystallin mRNA is responsible for leaky ribosomal scanning // *Mol. Biol. Rep.* 1999, 26(3), Pp. 201–205.
266. Wilson J.E., Pestova T.V., Hellen C.U., Sarnow P. Initiation of protein synthesis from the A site of the ribosome // *Cell.* 2000, 102(4), Pp. 511–520.
267. Woolaway K.E., Lazaridis K., Belsham G.J., Carter M.J., Roberts L.O. The 5' untranslated region of Rhopalosiphum padi virus contains an internal ribosome entry site which functions efficiently in mammalian, plant, and insect translation systems // *J. Virol.* 2001, 75(21), Pp. 10244–10249.
268. Wu R., Li A., Sun B., Sun J.-G., Zhang J., Zhang T., Chen Y., Xiao Y., Gao Y., Zhang Q., Ma J., Yang X., Liao Y., Lai W.-Y., Qi X., Wang S., Shu Y., Wang H.-L., Wang F., et al. A novel m6A reader Prrc2a controls oligodendroglial specification and myelination // *Cell Res.* 2019, 29(1), Pp. 23–41.
269. Wuerth J.D., Habjan M., Kainulainen M., Berisha B., Bertheloot D., Superti-Furga G., Pichlmair A., Weber F. eIF2B as a Target for Viral Evasion of PKR-Mediated Translation Inhibition // *mBio.* 2020, 11(4), Pp. 10.1128/mbio.00976-20.
270. Xu Y., Huangyang P., Wang Y., Xue L., Devericks E., Nguyen H.G., Yu X., Oses-Prieto J.A., Burlingame A.L., Miglani S., Goodarzi H., Ruggero D. ER α is an RNA-binding protein sustaining tumor cell survival and drug resistance // *Cell.* 2021, 184(20), Pp. 5215- 5229.e17.
271. Yamamoto H., Unbehaun A., Spahn C.M.T. Ribosomal Chamber Music: Toward an Understanding of IRES Mechanisms // *Trends Biochem. Sci.* 2017, 42(8), Pp. 655–668.
272. Yamanaka S., Poksay K.S., Arnold K.S., Innerarity T.L. A novel translational repressor mRNA is edited extensively in livers containing tumors caused by the transgene expression of the apoB mRNA-editing enzyme // *Genes Dev.* 1997, 11(3), Pp. 321–333.

273. Yamanaka S., Zhang X.Y., Maeda M., Miura K., Wang S., Faresse R.V., Iwao H., Innerarity T.L. Essential role of NAT1/p97/DAP5 in embryonic differentiation and the retinoic acid pathway // *EMBO J.* 2000, 19(20), Pp. 5533–5541.
274. Yang Y., Fan X., Mao M., Song X., Wu P., Zhang Y., Jin Y., Yang Y., Chen L.-L., Wang Y., Wong C.C., Xiao X., Wang Z. Extensive translation of circular RNAs driven by N6-methyladenosine // *Cell Res.* 2017, 27(5), Pp. 626–641.
275. Ye Y., Liang Y., Yu Q., Hu L., Li H., Zhang Z., Xu X. Analysis of human upstream open reading frames and impact on gene expression // *Hum. Genet.* 2015, 134(6), Pp. 605–612.
276. Yoffe Y., David M., Kalaora R., Povodovski L., Friedlander G., Feldmesser E., Ainfinder E., Saada A., Bialik S., Kimchi A. Cap-independent translation by DAP5 controls cell fate decisions in human embryonic stem cells // *Genes Dev.* 2016, 30(17), Pp. 1991–2004.
277. Yoshikane N., Nakamura N., Ueda R., Ueno N., Yamanaka S., Nakamura M. *Drosophila* NAT1, a homolog of the vertebrate translational regulator NAT1/DAP5/p97, is required for embryonic germband extension and metamorphosis // *Dev. Growth Differ.* 2007, 49(7), Pp. 623–634.
278. Young S.K., Wek R.C. Upstream Open Reading Frames Differentially Regulate Gene-specific Translation in the Integrated Stress Response // *J. Biol. Chem.* 2016, 291(33), Pp. 16927–16935.
279. Zeigerer A., Gilleron J., Bogorad R.L., Marsico G., Nonaka H., Seifert S., Epstein-Barash H., Kuchimanchi S., Peng C.G., Ruda V.M., Del Conte-Zerial P., Hengstler J.G., Kalaidzidis Y., Koteliensky V., Zerial M. Rab5 is necessary for the biogenesis of the endolysosomal system in vivo // *Nature.* 2012, 485(7399), Pp. 465–470.
280. Zhang H., Wang Y., Lu J. Function and Evolution of Upstream ORFs in Eukaryotes // *Trends Biochem. Sci.* 2019, 44(9), Pp. 782–794.
281. Zhang J., Maquat L.E. Evidence that translation reinitiation abrogates nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells // *EMBO J.* 1997, 16(4), Pp. 826–833.
282. Zhou D., Palam L.R., Jiang L., Narasimhan J., Staschke K.A., Wek R.C. Phosphorylation of eIF2 Directs ATF5 Translational Control in Response to Diverse Stress Conditions // *J. Biol. Chem.* 2008, 283(11), Pp. 7064–7073.
283. Zhou J., Wan J., Gao X., Zhang X., Jaffrey S.R., Qian S.-B. Dynamic m6A mRNA methylation directs translational control of heat shock response // *Nature.* 2015, 526(7574), Pp. 591–594.

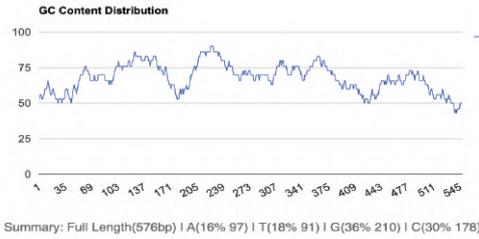
Приложения

Приложение 1. Распределение GC-богатых областей в исследуемых 5'НТО мРНК



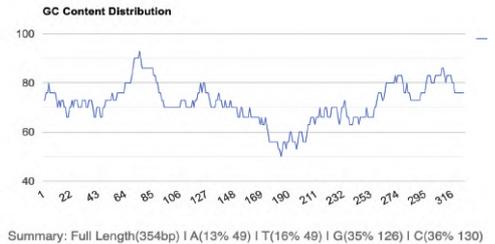


APAF1



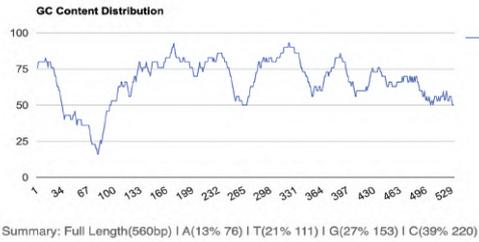
Summary: Full Length(576bp) | A(16% 97) | T(18% 91) | G(36% 210) | C(30% 178)

Stard7



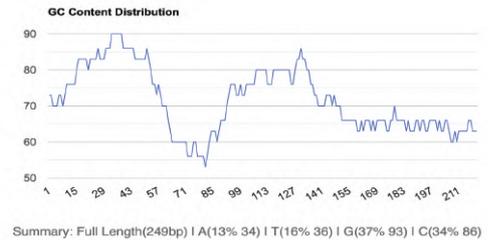
Summary: Full Length(354bp) | A(13% 49) | T(16% 49) | G(35% 126) | C(36% 130)

CCNI



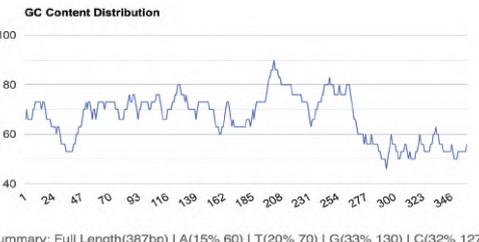
Summary: Full Length(560bp) | A(13% 76) | T(21% 111) | G(27% 153) | C(39% 220)

AKT2



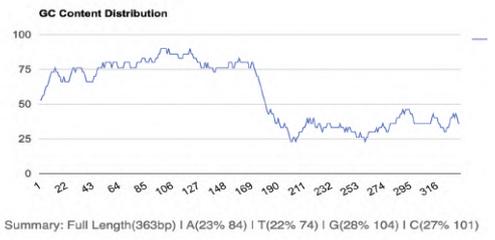
Summary: Full Length(249bp) | A(13% 34) | T(16% 36) | G(37% 93) | C(34% 86)

Maf1



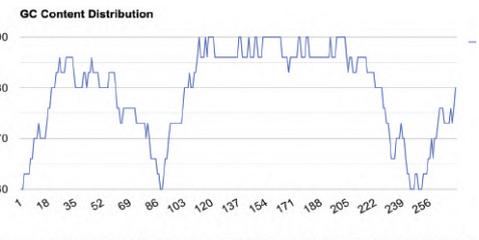
Summary: Full Length(387bp) | A(15% 60) | T(20% 70) | G(33% 130) | C(32% 127)

SMAD1



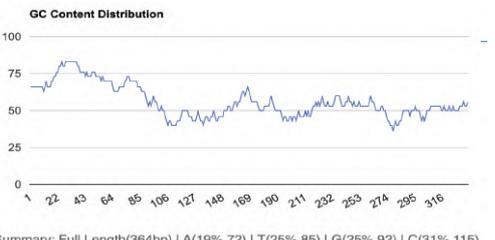
Summary: Full Length(363bp) | A(23% 84) | T(22% 74) | G(28% 104) | C(27% 101)

Map3k3



Summary: Full Length(301bp) | A(10% 33) | T(13% 32) | G(37% 114) | C(40% 122)

UCP2



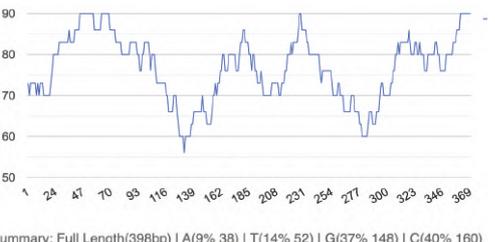
Summary: Full Length(364bp) | A(19% 72) | T(25% 85) | G(25% 92) | C(31% 115)

PPFIA4



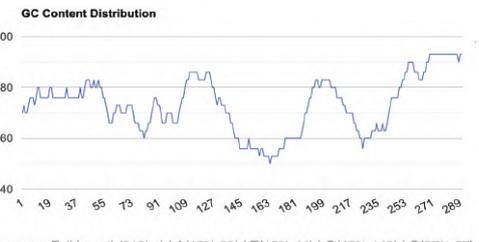
Summary: Full Length(496bp) | A(17% 85) | T(20% 92) | G(27% 136) | C(36% 183)

PHD2



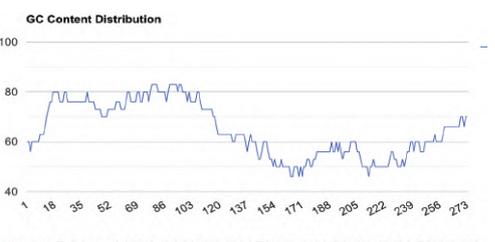
Summary: Full Length(398bp) | A(9% 38) | T(14% 52) | G(37% 148) | C(40% 160)

MYCBP2



Summary: Full Length(319bp) | A(12% 39) | T(15% 44) | G(46% 149) | C(27% 87)

POLG



Summary: Full Length(302bp) | A(21% 66) | T(15% 41) | G(35% 106) | C(29% 89)

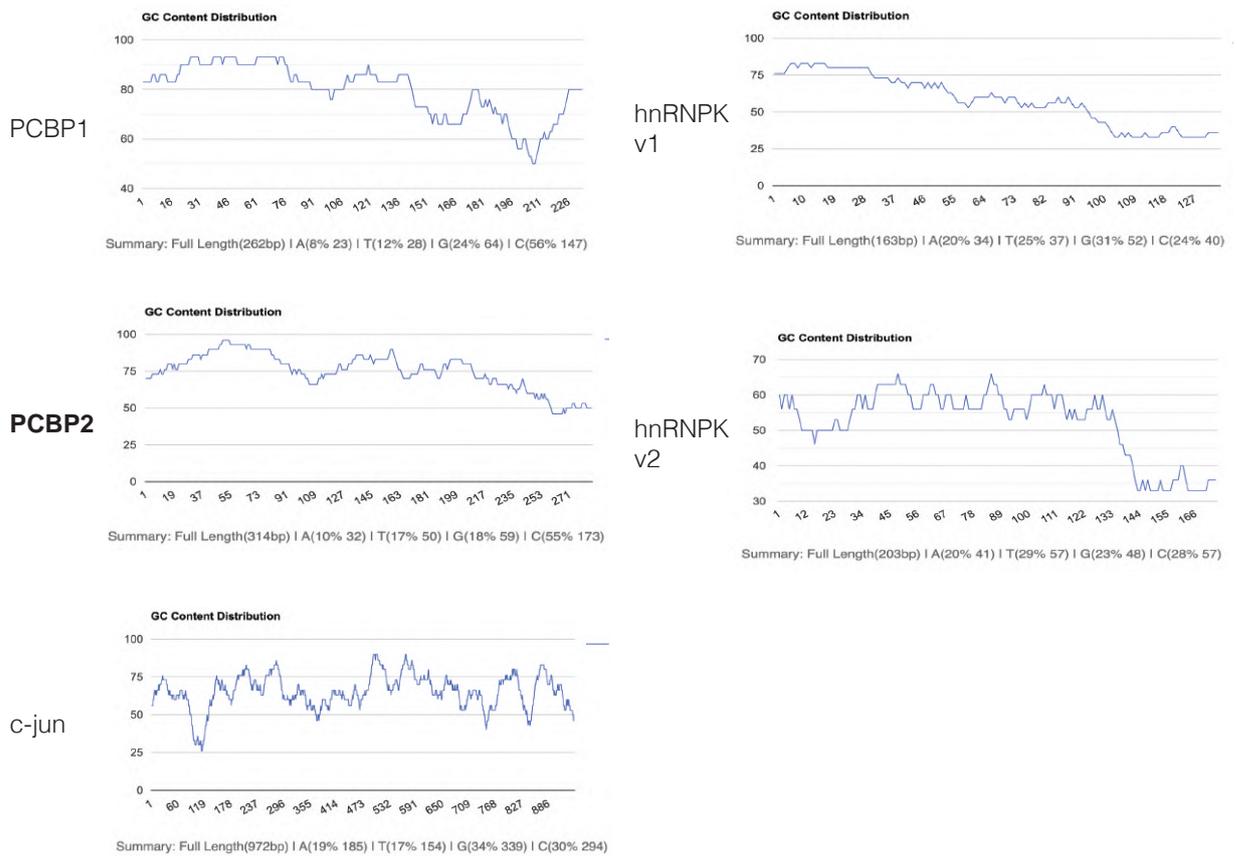


Рисунок 45. Распределение GC-богатых областей в исследуемых 5'НТО мРНК. Получено с помощью ресурса <https://www.biologicscorp.com/tools/GCContent/> (шаг разбиения при подсчете 30 нт). В подписи указаны длина анализируемой 5'НТО (указана в бп для кДНК) и частота встречаемости каждого нуклеотида (%). Vnt162b2 и mRNA1271 – 5'НТО из мРНК-вакцин против Sars-CoV2 от фирм-производителей BioNTech и Moderna соответственно. Жирным подписаны названия 5'НТО мРНК, трансляция которых требует eIF4G2 (трансляционные мишени eIF4G2).

Приложение 2. 5'НТО исследуемых репортерных мРНК

Таблица 2. 5'НТО, использованные в исследовании. В таблице указаны название 5'НТО, организм, из которого взята последовательность 5'НТО, номер транскрипта из базы данных Refseq (NCBI), длина 5'НТО, количество uAUG кодонов и некоторые комментарии.

Название	Организм	RefSeq	Комментарий	Длина, нт	uAUG
β -actin	человек	NM_001101.5		82	0
АКТ2	человек	NM_00124302 7.3	сохранен контекст AUG кодона дикого типа (ACCAUGAAU). Общий 5'НТО для вариантов транскриптов 1 и 2.	249	2
АРАФ1	человек	NM_013229.3		577	2
АТФ4	человек	NM_182810.3	Клонирован с началом CDS АТФ4 для сохранения последовательности uORF2	281	3
АТФ5	человек	NM_00119364 6.2	Представленная последовательность была слита с Fluc, лишенным AUG. Таким образом, перекрывающаяся uORF сохраняется. Часть CDS АТФ5 подчеркнута.	316	2
CCNI	человек	NM_006835.3		560	5
CDK1	человек	NM_001786.5		118	0
eIF4G2	человек	NM_001418.4		303	1
eIF5	человек	NM_001969.5	Предоставленная последовательность была слита с Fluc, в	441	3

			котором отсутствует AUG. Таким образом, перекрывающаяся uORF2 сохраняется. Вариант транскрипта №1		
EPAS1 (HIF2 α)	человек	NM_001430.5		504	1
β -globin	кролик	M10843.1		53	0
hnRNPК v1	человек	NM_031263.4	5'НТО транскрипционных вариантов 2, 4, 5, 6	163	0
hnRNPК v2	человек	NM_002140.5	5'НТО транскрипционных вариантов 1 и 3	203	0
HSPA2	человек		Самая длинная 5'НТО выбрана на основе анализа EST. Наиболее распространенный транскрипт, очевидно, короче.	383	0
IRFD1	человек	NM_001550.4		224	1
c-jun	человек	NM_002228.4	5'НТО транскрипционного варианта	972	0
Maf1	мышь	NM_026859.3	Клонированная 5'НТО короче аннотированного в соответствии с данными EST (ZENBU).	388	2
Map3k3	мышь	NM_011947.4	Заклонированная 5'НТО чуть короче	301	2

			аннотированного в соответствии с данными EST (ZENBU).		
MDM2	человек	NM_00114533 9.2		338	2
MYCBP2	человек	NM_015057.5		319	1
PCBP1	человек	NM_006196.4		262	0
Pcbp2	мышь	NM_011042.2	Заклонированная 5'НТО длиннее аннотированного, на момент клонирования в 2017 году, для соответствия с данными EST (ZENBU).	296	0
PHD2	человек	NM_022051.3	80S рибосомы детектируются при трансляции uORF2 и uORF3 по данным GWIPS-viz	399	3
PKR (eIF2AK2)	человек	NM_0011356 52.2	Заклонированная 5'НТО на 13 нт короче аннотированного, чтобы соответствовать данным ZENBU. 5'НТО варианта транскрипта 2.	243	1
PPF1A4	человек	NM_00130433 1.2	Заклонированная последовательность 5'НТО несколько короче аннотированного,	496	6

			поскольку не удалось амплифицировать более длинную последовательность.		
SARS-CoV2	вирус	NC_045512.2		265	1
SMAD1	человек	NM_005900.3	15 нт CDS SMAD1 были клонированы перед Fluc, поскольку они содержали AUG, открывающий неперекрывающуюся с CDS рамку, и GUG, открывающий перекрывающуюся с CDS рамку, которые могли влиять на экспрессию Fluc. 5'НТО для варианта транскрипта 1	378	1
Stard7	мышь	NM_139308.2		354	1
TGFβ1	человек	NM_000660.7	Соответствует минорному транскрипту, более длинный вариант 5'НТО на ~300 нт длиннее.	572	0
TNFα	человек	NM_000594.4		179	0
TP53	человек	NM_000546.6		138	0
UCP2	человек	NM_003355		364	3
Moderna	вакцина	OR134578.1	Взята из вектора для mRNA1273	55	0
BioNTech	вакцина		5'НТО мРНК α-глобина человека с	52	0

			оптимизированной последовательностью Козак (взята из вектора для BNT162b2)		
POLG/ POLGARF	человек	NM_002693.3	Имеет стартовый кодон для рамки POLGARF	302	1

20115f	ataGgtaccttaatacgaactcactataGGGAGATCAA TCCAGGCTCCAGGAGAAAGCAGGC	Для амплификации 5'НТО SMAD1 человека
20116r	GCCTTTCTTTATGTTTTTGGCGTCTTCA CTTGTCACATTCATAATGACAGCACTA GT	
20127f	ataGgtaccttaatacgaactcactataGGAGCTCTCC CGAAGCCGCGGGTCTCCGGC	Для амплификации 5'НТО PKR (eIF2AK2) человека
20128r	GCCTTTCTTTATGTTTTTGGCGTCTTCC ATTTCTTCTTCCCGTATCCTGGTTGGAA GC	
18053f	tcttacgcgtaatacgaactcactataGGCAGAGTTGC ACTGAGTGTGGCTGAA	Для амплификации 5'НТО c-jun человека
18054r	TGTCCATGGAACAGTCCGTCACCTTAC GTGAGG	
22025f	ctttacgcgtTAATACGACTCACTATAGGG CAGAGCGAGTGGCGCCCGTATGCCCT	Для амплификации 5'НТО PHD2 человека
22026r	CAGCTCGCAGTACTGCCGGTCTCG	
20015f	cccgaggagcggcatgagGGGAGTTCCAGAGG CGGCTA	Для инсерции uAUG кодона в 5'НТО HSPA2
20016r	gggaactcccctcatgCCGCTCCCGGGACCGCC CTCACAAA	
20021f	GGGTCAACCCGTCAAGGGGACTGCGC GGACGGC	Для удаления стоп-кодона Stard7 uORF для сдвига рамки с образованием удлиненной рамки uORF, перекрывающейся с основной
20022r	CCGCGCAGTCCCCTTGACGGGTTGACC CCGAG	
20027f	GGTCAACCCGTcAAgaagacgcaaaaacataaa gaaaggc	Для удаления последовательности между стоп-кодоном uORF Stard7 and последовательностью Fluc, чтобы получить Stard7-uORF- Fluc
20028r	ttttggcgtcttcTTgACGGGTTGACCCCGAGG CCACCT	

20029f	cttacgctTAATACGACTCACTATAGGTG CGCGCGCCTTGGGATTGACTGT	Для переклонирования 5'НТО UCP2 из бицистронной в моноцистронную плазмиду
20030r	GGTTTTCCCTAAGAAAATGGGTGGGAG ACGAAACACCTAATGGTCTAACTATGT GTCCGAGCCGCAGGGA	Для замены всех трех uAUG кодонов в 5'НТО UCP2 на стоп-кодоны
20031f	TCCCACCCATTTTCTtaGGAAAACCAAG GGGATCGGGCCtaGATAGCCACTGGCA GCTTTGAAGAA	
20045r	ggcgaagggtTAgtggcgagacagaccctgcac	Для замены первого uAUG кодонов на стоп-кодон в 5'НТО APAF1
20046r	TGTCTCGCCACtaACCCTTCGCCCCGGG GCAGGTC	
20055f	ATAAAAGAATCCATGAGGGACGGCTC CTGGCTTCT	Для слияния 5'НТО hnRNPК и Stard7 с образованием hnRNPК-Stard7
20056r	GAGCCGTCCCTCATGGATTCTTTTATT AAACGGGCA	
20059f	GTCCCCGGGAGCGGcATGAGGGACGGC TCCTGGCTTCT	Для слияния 5'НТО HSPA2 и HSPA2 с образованием hnRNPК- HSPA2
20069r	CCGTCCCTCATgCCGCTCCCGGGACCG CCCTCACA	
20061f	AACCCGTTAAGGGGTTGCTGGTAGTGC CCGTGGTGC	Для слияния 5'НТО HSPA2 и HSPA2 с образованием HSPA2-hnRNPК
20062r	ACTACCAGCAACCCCTTAACGGGTTGA CCCCGAGG	
20065f	GCCCTCCAGTCCgaagacgссааааасатааагаа aggc	Для удаления последовательности между Maf1 uORF и Fluc для получения Maf1-uORF-Fluc
20066r	ttttggcgtcttcGGACTGGAGGGCGGCGCCG CG	
20070f	CTTTAGAGAAGCTgaagacgссааааасатааагаа aaaggcc	Для удаления последовательности между UCP2 uORF и Fluc для получения UCP2-uORF-Fluc
20071r	ttttggcgtcttcAGCTTCTCTAAAGGTGTCCC GTTCTTC	

19072f	GCAAAAAGGCTAGAGGGACGGCTCCT GG	Для замены uAUG кодон на стоп-кодон в 5'НТО Stard7
19073r	AGCCGTCCCTCTAGCCTTTTTGCAGAA GCG	
19074f	TAGTCGCGGCTGCAGCCCGTTAGGGCC GGCAGGGCCT	Для замены uAUG стартовых кодонов в стоп-кодоны на 5'НТО Maf1
19075r	TAACGGGCTGCAGCCGCGACTAAGCC TCGCCC	
20043f	GACACGCGtaatacgaactactataGGGTTGCTT CCCGCGCCCTGGCCACG	Для удаления 5'-концевых 139 нт из 5'НТО Stard7
20093f	TTGCAGGGGGGCGAGaccATGagcCGGC TGCAGCCCGT	Для улучшения uAUG контекста uAUG1 Maf1 (9 а.о., 18 а.о. или uORF дикого типа)
20094r	GCTGCAGCCGGCTCATGGTCTCGCCCC CCTGCAAC	
20077r	GCCTTTCTTTATGTTTTTGGCGTCTTCG GGGTGCAGGGCTCTGTCTCGCCAC	Для удаления последовательности между APAF1 uORF1 и Fluc для получения APAF1-uORF-Fluc
18035	GAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGG C	
20068f	tcttaCGCGTTAATACGACTCACTATAGG GCAGCCGACAGACACAGCCGCACG	Для удаления 5'-концевых 61 нт из 5'НТО UCP2
20069f	tcttaCGCGTTAATACGACTCACTATAGG GCGATCTCGGCGGTCCGCGGCAGGTT	Для удаления 5'-концевых 59 нт из 5'НТО Maf1
20053f	CTCCAGTCCGGAGGAACCCGCGCTGC GCAA	Удаление стоп-кодона uORF Maf1 для получения удлиненной uORF
20054r	CGCGGGTTCCTCCGACTGGAGGGCG GCG	
20063f	GATCaAGCCCAATTCTGGCAGGaAGTG CTGCCCTA	Для удаления стоп-кодона в пределах линкера между uORF Maf1 и Fluc для получения перекрывающейся uORF с Fluc
20064r	CTtCCTGCCAGAATTGGGCTtGATCAAG CCAGGGT	
20075f	GTTGCTGATaAAAGGTGCCCTGTCT	

20076r	CAGGGGCACCTTTtATCAGCAACAAGACG	Для удаления второго стоп-кодона между UCP2 uORF и Fluc
20074f	GAGAAGCTTGcATCTTGGAGGCCTCACCGTGcGACCTTACAAAGCC	Для удаления стоп-кодона UCP2 uORF и первого стоп-кодона в линкере между UCP2 uORF и Fluc
20087r	TGTCGCCTGGAGTTAACGGGTTGACCCCGAGGCCAC	Для слияния 5'НТО Stard7 и полноразмерной hnRNPК для получения Stard7-hnRNPК200
20088r	CTTCCATGGCATTCTTTTATTAACGGGCACACCAATCA	
20089f	TCAACCCGTAAAGTTGTTGGTCCGACCCAGAACG	Для слияния 5'НТО Stard7 и фрагмента hnRNPК для получения Stard7-hnRNPК100
20090r	GGACCAACAACCTTAAACGGGTTGACC CCGAGGCCAC	
21050f	CATGAGGCGTTAAGCCTGGCTTCTGGA GCGTGAGG	Для укорочения uORF Stard7 до кодирования 3 а.о.
21051r	AAGCCAGGCTTAACGCCTCATGCCTTT TTGCAGAAGCG	
21046f	CTTCTGCGTTAAGAGGTGGCCTCGGGG TCAACCC	Для укорочения uORF Stard7 до кодирования 9 а.о.
21047r	GAGGCCACCTCTTAACGCAGAAGCCA GGAGCCGTCCTC	
21049f	CTCTCCGTTAAACCGCGGCAGGCGCG GGAAT	Для удлинения uORF Stard7 до кодирования 36 а.о.
21050r	CCTGCCGCGGTTTAAACGGAGAGGAAG GGCTGGGGGAA	
21054f	CTATGTCGCCTTGAGAGCCCGTCTTCG CCGGCAGGGC	Для укорочения uORF Maf1 до кодирования 3 а.о.
21055r	ACGGGCTCTCAAGGCGACATAGCCTC GCCCCCTGCA	
21056f	CGTCTTCTCCTGAGGGGCCTGGAGTAA CGGGACGTC	Для укорочения uORF Maf1 до кодирования 9 а.о.

21057r	TCCAGGCCCTCAGGAGAAGACGGGC TGCAGCCGCGACATAG	
20085r	AAGAAGCTTCGTTACGACGTCCCGTTA CTCCAGGCC	Для укорочения uORF Maf1 до кодирования 18 а.о.
21052f	CGGAAAACCAAGGGGATCGGGCCACG ATAGCCACTGGCAGCTTTGAAGAA	Для устранения uAUG кодонов внутри рамки UCP2 uORF (UCP2 «X2,3»)
21053r	GTGGCCCGATCCCCTTGGTTTTCCGTA GAAAATGGGTGGGAGACGAAACACC	
21058f	ATAGTATGACCgcTtgaTGTTTCGTCTCC CACCCAT	Для укорочения UCP2 uORF до кодирования 3 а.о.
21059r	GAAACAtcaAgcGGTCATACTATGTGTC CGAGCC	
21060f	GTGTTTCGTCTCCgcttgaTTTTCTAcGGA AAACCAAGG	Для укорочения UCP2 uORF до кодирования 9 а.о.
21061r	GAAAAtcaagcGGAGACGAAACACCTAA TGGTCATA	
21062f	GAAAACCAAGGGGcTtgatCCAcGATAG CCACTGGCAGCT	Для укорочения UCP2 uORF до кодирования 18 а.о.
21063r	CTATCgTGGatcaAgCCCCTTGGTTTTCCg TAGAAAAT	
21064f	AACCAGCGCAGCGTGGCGtaGGGCGGG GGTAGA	Для замены uAUG кодона на стоп-кодон UAG в 5'НТО АКТ2
21065r	GGCTCTACCCCCGCCtaCGCCACGCTG CGCT	
21066f	TTTAAACACTAGGAtaGGTAATTTCTAC TCTTC	Для замены uAUG кодона на стоп-кодон UAG в 5'НТО SMAD1
21067r	AGTAGAAATTACCTaTCCTAGTGTTTAA AAAAGT	
21087f	GCGAGACCATGAGCCcttgagAGCCCGTc TtcGCCG	Для улучшения контекста uAUG кодона Maf1 (3 а.о. uORF)
21088r	GGGCTtcaagGgetCATggtCTCGCCCCC TGCAACGC	
21091f	AAAGGCATGcGGCGTTAAGCCTGGCTT CTG	

21092r	CCAGGCTTAACGCCgCATGCCTTTTTG CAGAAGC	Для ухудшения контекста uAUG кодона Stard7 (3 а.о. uORF)
21089f	CAAAAAGGCATGcGGGACGGCTCCTG GCTTCTG	Для ухудшения контекста uAUG кодона Stard7 (9 а.о., 18 а.о. и нативной длины uORF)
21090r	GGAGCCGTCCCgCATGCCTTTTTGCAG AAGCG	
22075f	GACACATAGTccGACCATTAGGTGTTT CGTCTCC	Для удаления uAUG1 из UCP2 (X1 UCP2)
22076r	CACCTAATGGTCggACTATGTGTCCGA GCCGCAGGG	
20034f	TCTTCACCATAGACCAAAGACTAGACC ACTCAAAGTCCAGCTC	Для удаления потенциального старта AUU в Pcbp2 (ближний к mAUG) – Pcbp2 «x-AUU»
20035r	AGTGGTCTAGTCTTTGGTCTATGGTGA AGAGTGAAAGCCAA	
20036f	CGCCCCTTAGGTTCCGCCCCCGGCCTC CCGCCCTTCC	Для удаления потенциального старта GUG в Pcbp2 (дальний от mAUG) – Pcbp2 «x-GUG»
20037r	CCGGGGGCGGAACCTAAGGGGCGGGC GGGAAGGCGAG	
22043f	CCTCGGCGGCgtaGAGGCGCTGAGGCG GCT	Для замены uAUG2 на стоп-кодон UAG в 5'НТО PHD2 (PHD2 «X2»)
22044r	TCAGCGCCTCtaCGCCGCCGAGGGCTG AGA	
22045f	AGCGGGTGtaGGCGCAGTAACGGCCC CTA	Для замены uAUG3 на стоп-кодон UAG в 5'НТО PHD2 (PHD2 «X3»)
22046r	TACTGCGCCtaGCACCCGCTACCCTCGC CT	
20119r	CACGACCCGCCCATACCGGTTGTA AAC GCGACATAGCCTCGCCCCCTGCAAC	Для замены нуклеотидов в N-концевой части uORF Maf1 на соответствующие им редкие кодоны («NuORF»)
20120f	taCAaCCgGTATGGGCgGGtcgtGCgTGGA GTAACGGGACGTCGCCGCGA	
20123r	CGTCCTCCCGACGGTCCACATTGTATT CTCGGAAAAAAGCTTCGCGGCGACGT CCCGTTA	Для замены нуклеотидов в C-концевой части uORF Maf1

20124f	ACAaTGtGGaCCGtcgGGaGGaCGtGGaGc gGCgCTaCAGTCCTGAGGAACCCGCGCT GCG	на соответствующие им редкие кодоны (« <i>CuORF</i> »)
21107r	ATCAAGCTTCCAGCCATTTCCGCTTTA CTCTGACAATGGGAGTGGCTATCATGG CCCGATCC	Для перемешивания нуклеотидов С-концевой части uORF UCP2 (получившаяся конструкция названа «С конц. KRK»)
22081r	ATCAAGCTTCCAGCCAtcctagtgcТАСТСТ GACAATGGGAGTGGCTAT	Обратный праймер для замены KRK на ALG в конструкции с перемешанными нуклеотидами в uORF UCP2 («С конц. AGL»)
23037F	GCGGGGTTAGgtaAGCGGCCCCAGTAG CGGCGAGG	Для замены uAUG кодона на стоп-кодон в 5'НТО MYCBP2
23038R	TGGGGCCGCTtacCTAACCCCGCCACCC CGGGAAT	
23097f	TGGAAGGCAGGctgaGTCAAACCCATTT CACTGACAGGAG	Для мутации uAUG кодона в конструкциях POLG и POLGARF
23098r	TGAAATGGGTTTGACTcaGCCTGCCTTC CACCCCAAATCG	
22062f	TGACTCaCAGaGaGGaGGaCCCTGCACC AACCATGAGCCGC	Для распаривания шпильки в конструкциях POLG и POLGARF; N-концевые а.о. POLGARF при этом не изменяются
22063r	CAGGGtCCtCCtCtTGtGAGTCAGAACA CCTGGCTTTGGG	
23127r	TGGCTTCTTTTcCTGGCTGGAAGACGT GGAGAG	Обратный праймер для удлинения uORF в POLGARF
23128f	TTCCAGCCAGTcAAAAGAAGCCAAGCT GGAGCC	Для слияния uORF и POLGARF (для получения « <i>uORF ext</i> » POLG)
23129r	TGGCTTCTTTTgACTGGCTGGAAGACG TGGAGA	

23130f	ATGGTCAtggCCATgaCACTGACAGGAG AGCAGAGA	Для введения еще двух uAUG кодонов в uORF POLG и POLGARF (POLG и POLGARF «uAUG x2»)
23131r	TGTCAGTGtcATGGccaTGACCATGCCTG CCTTCCACC	
23132f	CATGAGGatgGGCatggGGCTTCTGGAGC GTGAGGTGG	Для вставки двух AUG кодонов в uORF Stard7 («uAUG x2»)
23133r	AAGCCccatGCCcatCCTCATGCCTTTTTG CAGAAGCG	
23134f	aCcATGGAAAACatgGGGGATCGGGCCA TGATAGCCA	Для вставки AUG кодона и улучшения контекста uAUG2 в uORF UCP2 (UCP2 «uAUG x2»)
23135r	CGATCCCCcatGTTTTCCATgGtAAATGG GTGGGAGACGAAACAC	
23136f	GAGaccATGagcacGaTGgAGCCCGTATGG GCCGGCA	Для введения дополнительных AUG кодонов в uORF в Maf1 с улучшенным стартовым uAUG кодоном (Maf1 «uAUG x2»)
23137r	GCTcCatCgtgctCATggtCTCGCCCCCTG CAACGC	