

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Шестакова Екатерина Дмитриевна

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

Специальность 1.5.3. — «Молекулярная биология»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

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

**Научные
руководители**

***Шатский Иван Николаевич** – доктор химических наук, доцент*

***Теренин Илья Михайлович** – кандидат химических наук*

**Официальные
оппоненты**

***Лябин Дмитрий Николаевич** – доктор химических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка Российской академии наук, руководитель группы*

***Алкалаева Елена Зиновьевна** – кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией*

***Каменский Петр Андреевич** – доктор биологических наук, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», профессор кафедры молекулярной биологии биологического факультета*

Защита диссертации состоится «15» февраля 2024 г. в 16 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.4 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12, Биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: mgu.03.01.dissovet@gmail.com

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/621285875/>

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Т.В.Комарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

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 1997 году у высших эукариот был открыт другой гомолог *eIF4G1*, известный сейчас как эукариотический фактор инициации трансляции 4G2 (*eIF4G2*, p97, NAT1). *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: эмбрионы мышей с нокаутом *eIF4G2* нежизнеспособны, поскольку в них не происходит гастрюляция. Также описаны роли *eIF4G2* в апоптозе и клеточной дифференцировке. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе наблюдаемых эффектов на сегодняшний день изучены плохо и недостаточно подробно.

За последние два десятилетия были представлены противоречивые данные о функции *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. Большинство опубликованных по этой теме работ были посвящены изучению роли *eIF4G2* во внутренней инициации на клеточных мРНК. Впоследствии оказалось, что распространенные в то время методы изучения IRES-элементов ненадежны и приводят к артефактам; и примерно в то же появились свидетельства вовлечения *eIF4G2* в кэп-зависимую инициацию трансляции. В результате было предложено несколько механизмов работы *eIF4G2*, различающихся тем, какой белок ответственен за связывание с кэпом 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. Среди выявленных мишеней действительно есть много генов, вовлеченных в дифференцировку, апоптоз и регуляцию метаболической активности клетки. Неясно, однако, почему трансляция одних мРНК требует *eIF4G2*, а других нет. Выяснение этого и стало целью данной работы.

Цели и задачи исследования

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*.

Для достижения цели были поставлены следующие 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.

Методология и методы исследования

В работе использовали современные методы: клонирование для создания молекулярно-генетических конструкций, выращивание клеточных культур, нокдаун генов с помощью трансфекции siRNA, *in vitro* транскрипция для получения репортерных мРНК и последующая трансфекция клеток исследуемыми мРНК, измерение активностей люцифераз, иммуноблоттинг, а также статистические методы для анализа полученных результатов. Вклад eIF4G2 в трансляцию исследовали с помощью котрансфекции опытной и референсной m⁷G-кэпированных и полиаденилированных репортерных мРНК в клетки 293Т или Huh7 с нокдауном *eIF4G2* (с помощью одной из двух siRNA). Опытная мРНК кодировала люциферазу светлячка (Fluc) и содержала исследуемую 5'НТО, а референсную мРНК, кодирующую NanoLuc с 5'НТО β-глобина, использовали для нормировки. Для наглядности представлены результаты, полученные на клетках 293Т с нокдауном *eIF4G2* с помощью только одной siRNA. Для определения статистической значимости использовали U-тест Манна-Уитни.

Научная новизна полученных результатов 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 открытой рамки считывания (*uORF*, *upstream open reading frame*) делает трансляцию мРНК eIF4G2-зависимой.

Подробно исследован фундаментальный механизм, благодаря которому наличие uORF приводит к потребности трансляции в eIF4G2. Чтобы добраться до основного стартового кодона в случае наличия uORF, сканирующий комплекс должен либо “проехать мимо” стартового кодона uORF (пропускающее сканирование, *leaky scanning*), либо возобновить сканирование после ее трансляции (реинициация). 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 одновременно на одной и той же мРНК.

Подробно исследована инициация трансляции уникальной бицистронной мРНК POLG/POLGARF человека, кодирующей каталитическую субъединицу митохондриальной ДНК-полимеразы POLG и консервативный пептид POLGARF. Показано, как в случае этой мРНК uORF, инициация трансляции рамки POLGARF со стартового кодона CUG (но не AUG) и трансляция с участием eIF4G2 обеспечивают физиологически адекватный уровень синтеза обоих белков POLG и POLGARF при 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, PND2, 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.

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 и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ. Результаты работы были представлены на защите научно-квалификационной работы по окончании аспирантуры факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова.

Личный вклад автора

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. И. Теренин, В. Смирнова, П. Мищенко и Р. Тумбинский участвовали в изготовлении некоторых генетических конструкций и выполняли отдельные повторности некоторых трансфекций. Т. Зацепин и Т. Приказчикова осуществляли подбор последовательностей, синтез siRNA, а также получали готовые липосомные частицы с siRNA.

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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Валидация мРНК мишеней eIF4G2

Ранее нами было показано, что трансляция мРНК с 5'НТО ARAF1, CCNI, PPF1A4 человека и Maf1, Map3k3, Rcbp2, Stard7 мыши в клетках 293Т зависит от eIF4G2 [Смирнова, 2022]. 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 было показано, что при нокдауне *eIF4G2* в клетках HeLa уменьшается количество белка RHD2, однако роль 5'НТО соответствующей мРНК не была исследована [Bryant et al., 2018]. Также ранее было обнаружено, что мРНК MYCBP2 человека коиммунопреципитируется с eIF4G2 [Takahashi et al., 2020]. Эффективность трансляции мРНК с 5'НТО RHD2 и MYCBP2 значительно снижается при деплеции eIF4G2, в отличие от репортеров CDK1, TP53 и MYC, которые ранее считались мишенями eIF4G2 (рис. 1).

Располагая достаточно обширным списком мРНК, трансляция которых чувствительна и нечувствительна к деплеции eIF4G2, мы проанализировали длину их 5'НТО, GC-состав и наличие uAUG кодонов (*upstream AUG*, предшествующих AUG). Почти все 5'НТО-мишени eIF4G2 содержат хотя бы один uAUG, а многие из них являются GC-богатыми (GC>65%). Исключением является мРНК Rcbp2, чья 5'НТО очень обогащена GC-нуклеотидными остатками (73% GC), но не содержит uAUG. Дальнейшая работа была посвящена поиску детерминант зависимости трансляции мРНК от eIF4G2.

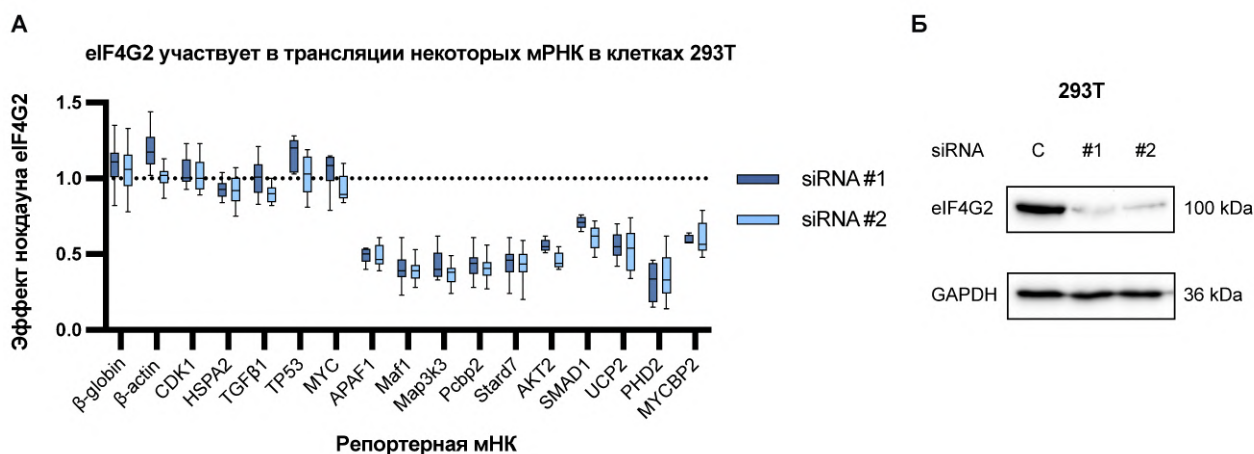


Рисунок 1. Валидация трансляционных мишеней *eIF4G2* в клетках 293Т. В качестве положительного контроля взяты подтвержденные нами ранее *eIF4G2*-зависимые мРНК: *APAF1*, *Maf1*, *Map3k3*, *Pcbp2*, *Stard7*. Верифицированы новые мишени *eIF4G2*: *AKT2*, *SMAD1*, *UCP2*, *PHD2*, *MYCBP2*. (А) Эффект нокдауна в клетках 293Т рассчитан как отношение нормализованной экспрессии репортеров в клетках с нокдауном *eIF4G2* к контрольным клеткам ($n \geq 10$). (Б) Вестерн-блот анализ нокдауна *eIF4G2* в клетках 293Т, *GAPDH* детектирован как контроль нанесения.

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

Большинство мРНК-мишеней *eIF4G2* содержат uORF (предшествующую открытую рамку считывания). Мы решили проверить, связана ли *eIF4G2*-зависимость с наличием uORF, 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-кодоны UAG (рис. 2Г). Выбор мРНК-мишеней был продиктован небольшим количеством uAUG кодонов в этих 5'НТО. Эти замены практически полностью снимали необходимость в *eIF4G2* для *Maf1*, *Stard7* и *MYCBP2* – и в меньшей степени для *APAF1* ($p < 0,0001$) (рис. 2А).

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, присутствующими в этих 5'НТО) и расстояние между ними и основной ORF были близки к таковым в 5'НТО *Stard7* (рис. 2Г). Введение uORF сделало эти мРНК заметно чувствительными к нокдауну *eIF4G2* ($p < 0,001$) (рис. 2Б). 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 кЭПУ.

uORF присутствуют примерно в половине мРНК человека [Johnstone et al., 2016], поэтому маловероятно, что одно лишь наличие uORF делает трансляцию мРНК зависящей от *eIF4G2*. Например, мРНК *EPAS1* и *eIF4G2* имеют по одной uORF, но не реагируют на нокдаун *eIF4G2* (рис. 1А). Мы протестировали ряд 5'НТО, содержащих uORF, например, *AKT2*, *CFTR*, *eIF5*, *HERC1*, *IFRD1*, *MDM2*, *PKR*, *SARS-CoV2*, *SMAD1*, *TUBA1B* и *UCP2*, которые имелись в нашей лаборатории.

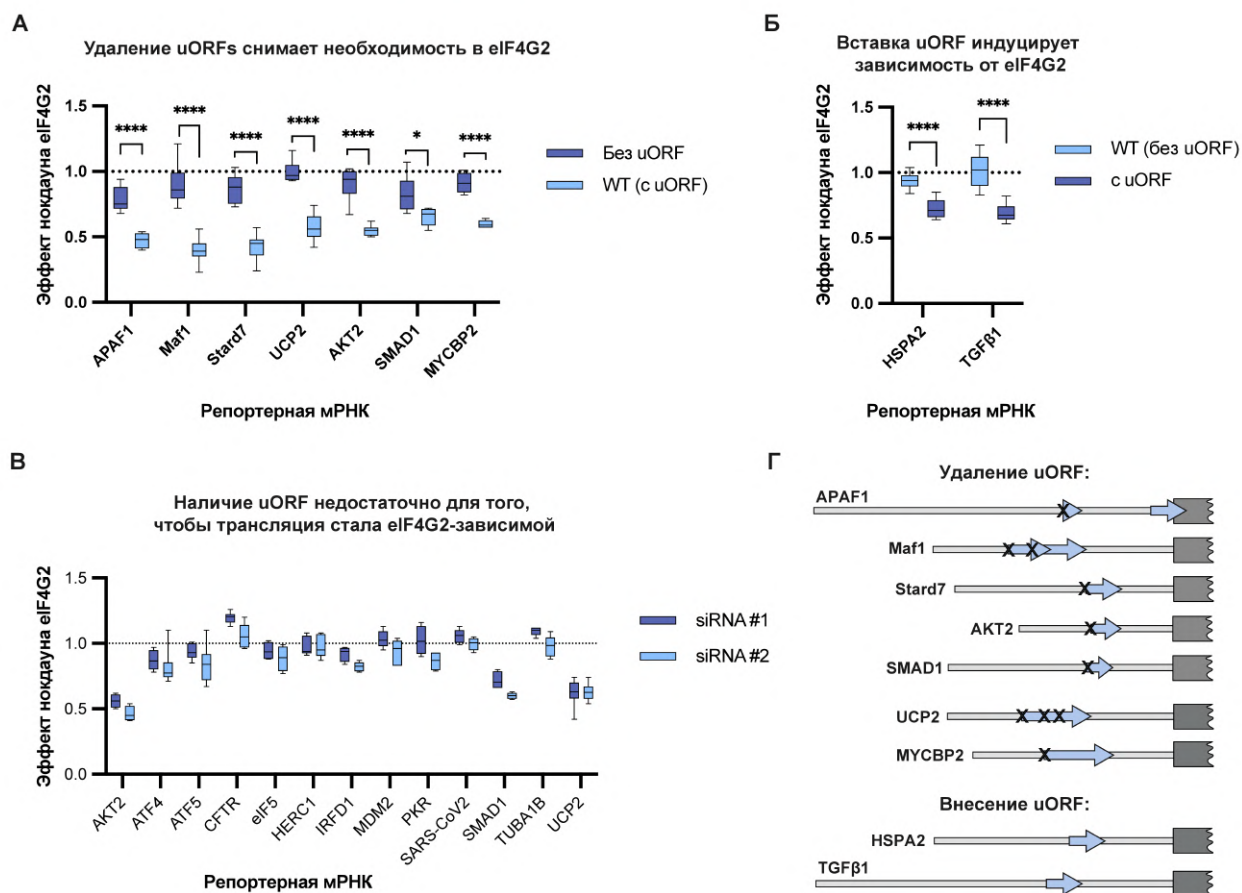


Рисунок 2. uORF в значительной степени определяют eIF4G2-зависимость трансляции ($n \geq 8$). (А) Эффект нокдауна рассчитан как отношение нормализованной экспрессии репортера в клетках 293Т с деплецией eIF4G2 к нормализованной экспрессии в контрольных клетках. uAUG кодоны репортеров были мутированы в стоп-кодона UAG для удаления uORFs. (Б) В 5'НТО TGFβ1 и HSPA2 были введены uORF такого же размера и в такое же положение относительно основного AUG, как uORF Stard7. Оценивали эффект нокдауна eIF4G2 в клетках 293Т ($p < 0,0001$ в обоих случаях). (В) Анализ репортеров, в 5'НТО которых содержится uORF. (Г) Схематичное изображение репортеров, проанализированных в панелях А и Б. Показаны 5'НТО и начало CDS Fluc. Стрелками указаны uORF, крестиками – позиции uAUG, которые были заменены на стоп-кодона.

Из них, только репортеры AKT2 (киназы, ответственной за поглощение глюкозы и дифференцировку скелетных мышц), SMAD1 (переносчика сигнала от рецептора TGFβ) и UCP2 (митохондриального разобщающего белка) оказались зависящими от eIF4G2 (рис. 2В). Мы заменили uAUG кодоны в этих 5'НТО стоп-кодонами UAG, что сделало трансляцию AKT2 и UCP2 независимой от eIF4G2 ($p < 0,0001$) (рис. 2А). Мутация uAUG кодона SMAD1 не привела к существенному снижению вклада eIF4G2 ($p < 0,05$), что расширяет список случаев, когда необходимость трансляции в eIF4G2 определяется другими факторами. Известно, что GC-богатые области 5'НТО (а это случай и Rcbp2, и RHD2, и SMAD1) склонны к образованию вторичных структур, затрудняющих инициацию трансляции [Kozak, 2001; Vattem et al., 2004], поэтому вероятно, что eIF4G2 в данном случае облегчает сканирование этих 5'НТО.

3. Сканирование через транслируемую uORF может делать дальнейшее движение рибосом eIF4G2-зависимым

В случае мРНК с uORF рибосома может достигнуть основного AUG кодона двумя способами: либо сканирующий комплекс пропускает uAUG (пропускающее сканирование), либо сканирование возобновляется после трансляции uORF (реинициация). Однако прежде, чем исследовать эти возможности, необходимо было понять, нужен ли eIF4G2 для трансляции самих uORF. Для этого в репортерах APAF1, Maf1, Stard7 и UCP2 были удалены стоп-кодона uORF, стартовый AUG кодон Fluc и последовательности между ними, при этом uORF оказались слитыми с кодирующей последовательностью люциферазы, в которой отсутствовал AUG кодон (рис. 3Б). Такой подход исключает какой-либо вклад пропускающего сканирования в результаты измерений.

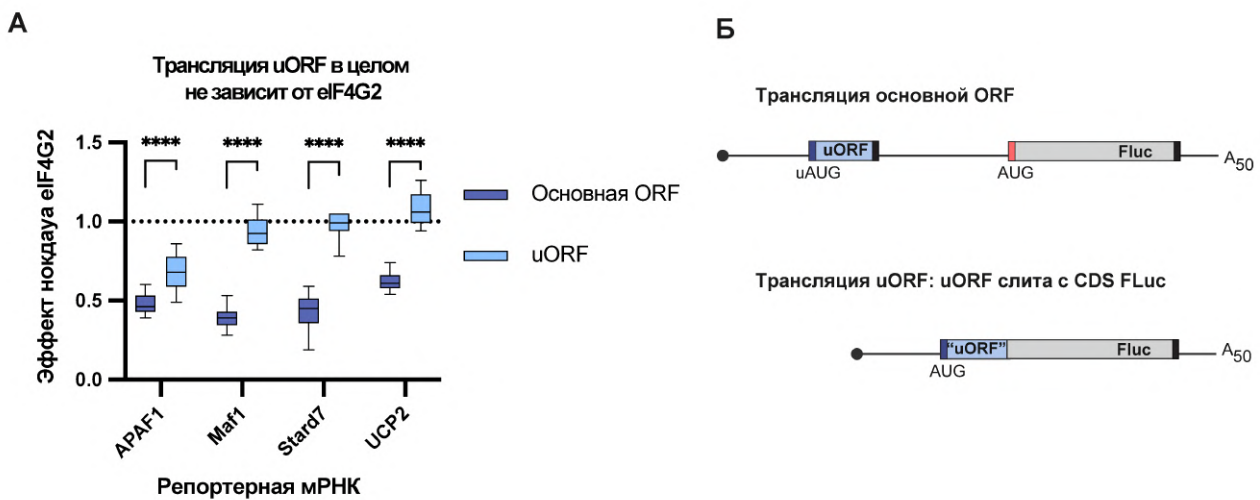


Рисунок 3. *eIF4G2* как правило не участвует в трансляции uORF. (А) Эффект нокдауна представляет собой отношение нормализованной экспрессии репортера в клетках 293Т с деплецией *eIF4G2* к нормализованной экспрессии в контрольных клетках ($n \geq 10$). (Б) Схематичное изображение репортеров. Репортер 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.

Трансляция, инициируемая с AUG кодонов uORF 5'НТО Maf1, Stard7 и UCP2, происходит eIF4G2-независимо, тогда как случай APAF1 более сложен (рис. 3А). Это свидетельствует о том, что на мРНК Maf1, Stard7 и UCP2 потребность в eIF4G2 возникает во время сканирования uORF или после трансляции uORF.

Чтобы изучить роль eIF4G2 в пропускающем сканировании, мы мутировали стоп-кодона uORF 5'НТО Stard7, Maf1 и UCP2 так, что удлинившиеся при этом uORFs начали перекрываться не в рамке считывания с ORF люциферазы (рис. 4Б). В этом случае рибосомы могут инициировать на AUG кодоне Fluc *только* путем пропускающего сканирования, поскольку реинициация в обратном направлении неэффективна [Kozak, 2001; Loughran et al., 2012]. Зависимость трансляции от eIF4G2 во многом сохранилась, хотя и немного уменьшилась в случае Maf1 (рис. 4А). Это указывает на то, что eIF4G2

способствует сканированию рибосом внутри и/или после uORF, но, строго говоря, не исключает возможности участия eIF4G2 и в реинициации [Weber et al., 2022].

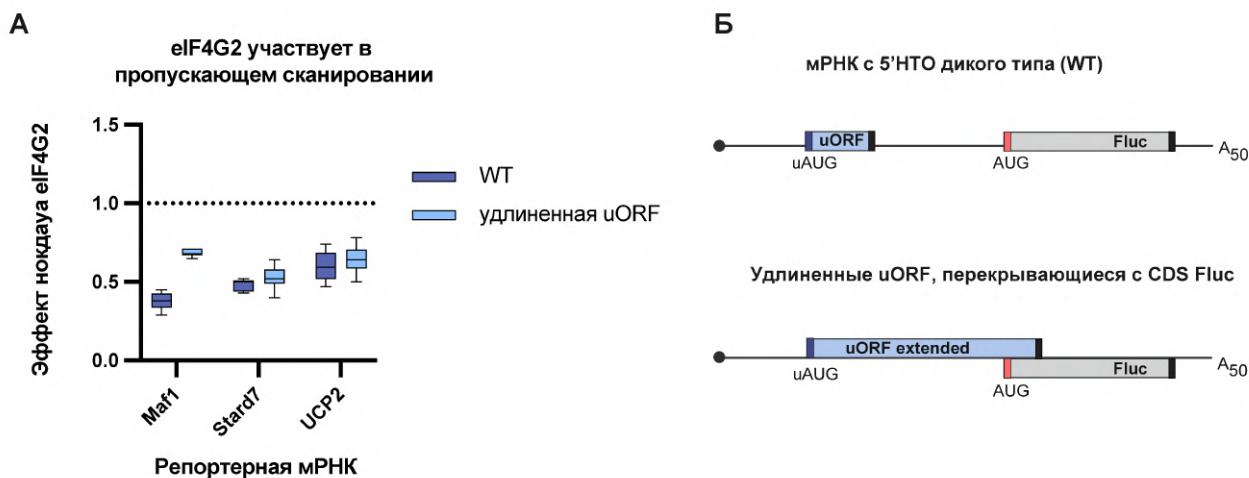


Рисунок 4. eIF4G2 способствует сканированию внутри и/или после uORF. (А) Эффект нокдауна представляет собой отношение нормализованной экспрессии репортера в клетках 293Т с деплецией eIF4G2 к нормализованной экспрессии в контрольных клетках ($n \geq 10$). (Б) Схематичное изображение репортеров. Стоп-кодоны uORF в мРНК Maf1, Stard7 и UCP2 были мутированы так, что удлиненные uORF оказались перекрыты с CDS Fluc, чтобы исключить возможность реинициации трансляции.

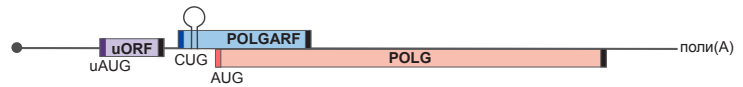
4. Роль eIF4G2 в сканировании 5'НТО эукариотической бицистронной мРНК POLG/POLGARF

Недавно в мРНК каталитической субъединицы митохондриальной ДНК-полимеразы POLG был обнаружен альтернативный сайт инициации трансляции: CUG кодон, обеспечивающий трансляцию консервативной открытой рамки считывания, перекрывающейся с рамкой самой ДНК-полимеразы [Loughran et al., 2020]. Этот белок получил название POLGARF (*POLG Alternative Reading Frame*). 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 (SL) (рис. 5А). Трансляция как POLGARF, так и POLG контролируется uORF: инициация на стартовом кодоне POLG происходит в основном рибосомами, реиницировавшими после трансляции uORF, а в случае POLGARF реинициация и пропускающее сканирование вносят примерно равный вклад (рис. 5Б, 9Д).

Ген *POLG* – один из немногих ядерных генов, ассоциированных с нарушениями мтДНК, 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.

A

POLG/POLGARF мРНК



Граф принятия решений рибосомами (RDG)

Б

1) Инициация на стартовом AUG кодоне POLG происходит в основном путем реинициации после трансляции uORF

2) Реинициация и пропускающее сканирование вносят равный вклад в инициацию трансляции на стартовом CUG кодоне POLGARF

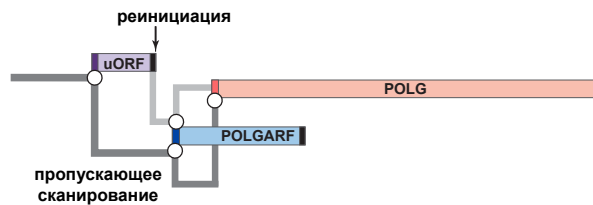


Рисунок 5. Особенности инициации трансляции бицистронной мРНК POLG/POLGARF человека. (А) Схематичное изображение мРНК. (Б) Граф принятия решений рибосомами (RDG, ribosome decision graph), представляющий трансляцию как несколько путей рибосом через 5'НТО. Круги отражают точки бифуркации, в которых рибосома “решает”, начинать трансляцию или нет. Путь пропускающего сканирования показан темно-серым. После трансляции uORF терминировавшая рибосома может возобновлять сканирование для последующей инициации трансляции на стартовых кодонах POLGARF или POLG (путь реинициации показан светло-серым). Реинициация и пропускающее сканирование указаны относительно uORF. Все рибосомы, начинающие трансляцию на стартовом кодоне POLG, пропустили стартовый кодон POLGARF, независимо от их пути через uORF.

4.1. eIF4G2 участвует в трансляции POLG и POLGARF

Мы проверили, необходим ли eIF4G2 для трансляции POLG и/или POLGARF. Репортерные конструкции (рис. 6Б) были получены ранее [Loughran et al., 2012]. В соответствии с нашими ожиданиями, трансляция POLG значительно зависела от eIF4G2, тогда как трансляция POLGARF — в несколько меньшей степени (рис. 6А). Как и в случае большинства ранее подтвержденных нами мРНК-мишеней eIF4G2, eIF4G2-зависимость трансляции и POLGARF, и POLG определяется uORF (для обоих случаев $p < 0.0001$).

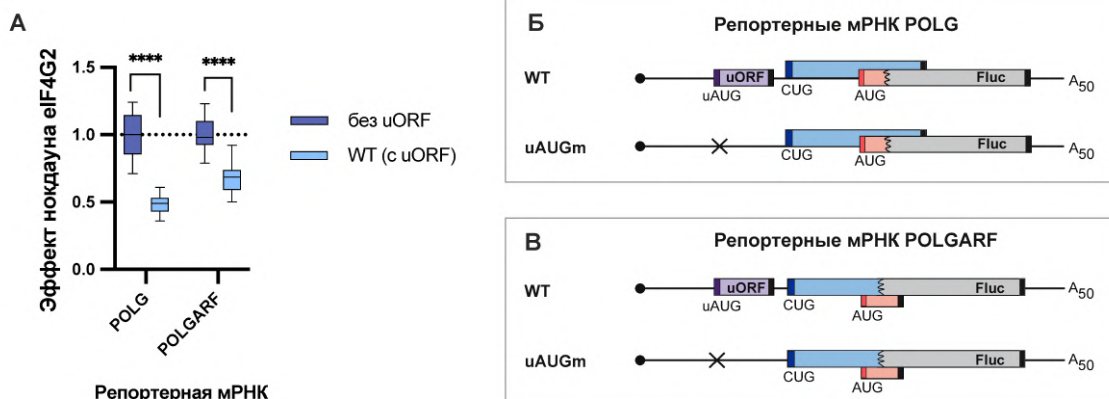


Рисунок 6. Наличие uORF делает трансляцию POLG и POLGARF eIF4G2-зависимой. (А) Эффект нокдауна представлен в виде отношения

нормализованной экспрессии репортера в клетках с нокаутом *eIF4G2* к контрольным клеткам ($n \geq 15$). **(Б)** Схематичное изображение репортеров *POLG* (не в масштабе). Стартовый кодон *POLG* обеспечивает экспрессию репортерного белка, состоящего из 15 N-концевых аминокислот *POLG* (показаны розовым), слитых с люциферазой светлячка *Fluc*. *CUG* кодон находится вне рамки с *Fluc* и обеспечивает трансляцию пептида с 33 N-концевыми аминокислотами *POLGARF*. *uORF* показана фиолетовым, стартовые кодоны — соответствующими цветными полосами, а стоп-кодоны — черными полосками. Крестиком отмечена позиция *uAUG* кодона, который был заменен на стоп-кодон в репортере *uAUGm*. **(В)** Схема репортеров *POLGARF*. Стартовый *CUG* кодон *POLGARF* (обозначен темно-синим) обеспечивает экспрессию репортерного белка, состоящего из 33 N-концевых аминокислот *POLGARF* (показаны голубым) слитых с *Fluc*. Стартовый кодон *POLG* находится вне рамки с *Fluc* и обеспечивает трансляцию пептида длиной 20 аминокислот (показан розовым).

4.2. Роль *uAUG* и *POLGARF* в трансляции *POLG*

Чтобы лучше понять, как рамки *uORF* и *POLGARF* контролируют экспрессию *POLG*, мы мутировали *uAUG* или *CUG* в стоп-кодоны, а также заменили *CUG* на *AUG* без изменения его нуклеотидного контекста (рис. 7В, Г). В каждую из конструкций мы дополнительно ввели мутации, препятствующие образованию шпильки в начале белок-кодирующей части *POLGARF* (обозначены «*SL^{mut}*»).

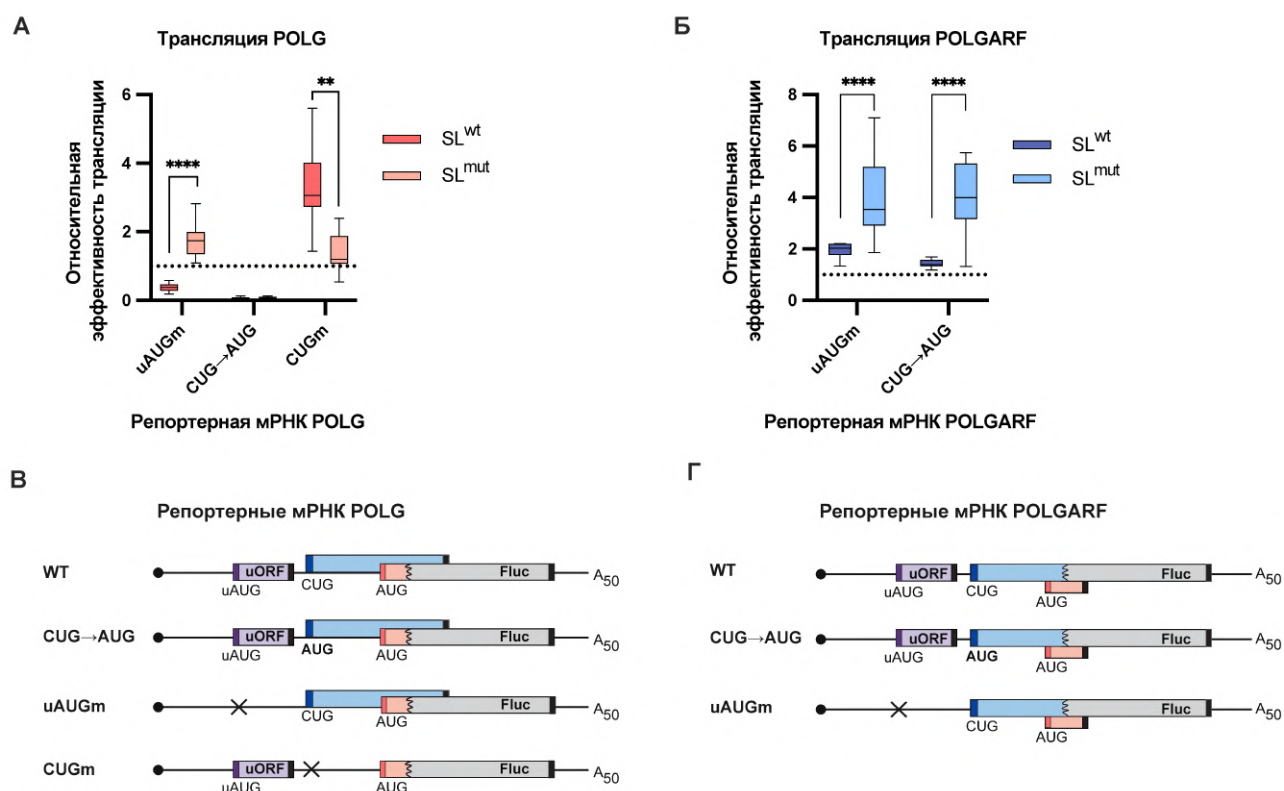


Рисунок 7. Мутация стартовых кодонов влияет на эффективность трансляции *POLG* и *POLGARF*. Все репортеры тестировали либо с 5'НТО дикого типа, либо с мутированной шпилькой *POLGARF* (обозначены «*SL^{wt}*» и «*SL^{mut}*» соответственно). Относительная эффективность трансляции представлена как отношение нормализованной экспрессии мутантного репортера к нормализованной экспрессии репортера с 5'НТО дикого типа. Пунктирная линия на отметке 1 соответствует

эффективности трансляции репортерной мРНК с 5'НТО дикого типа. (А) Результаты трансфекции репортерных мРНК POLG. (Б) Результаты трансфекции репортерной мРНК POLGARF. 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.

Удаление uORF стимулирует трансляцию POLGARF (рис. 7Б) и сильно подавляет трансляцию POLG (рис. 7А), однако при распаривании шпильки удаление uORF увеличивает эффективность трансляции как POLGARF, так и POLG. По всей видимости, при разрушении шпильки сканирующие комплексы заметно хуже задерживаются на CUG кодоне POLGARF (~2,7 раза) (рис. 8Б), и соответственно, в большей степени инициируют трансляцию на AUG кодоне POLG (~2,8 раза) (рис. 8А). Это согласуется с тем, что удаление стартового кодона POLGARF стимулирует трансляцию POLG в 3 раза (рис. 7А). При этом такая мутация на фоне распаривания шпильки приводит лишь к незначительному (всего в 1,2 раза) усилению трансляции POLG.

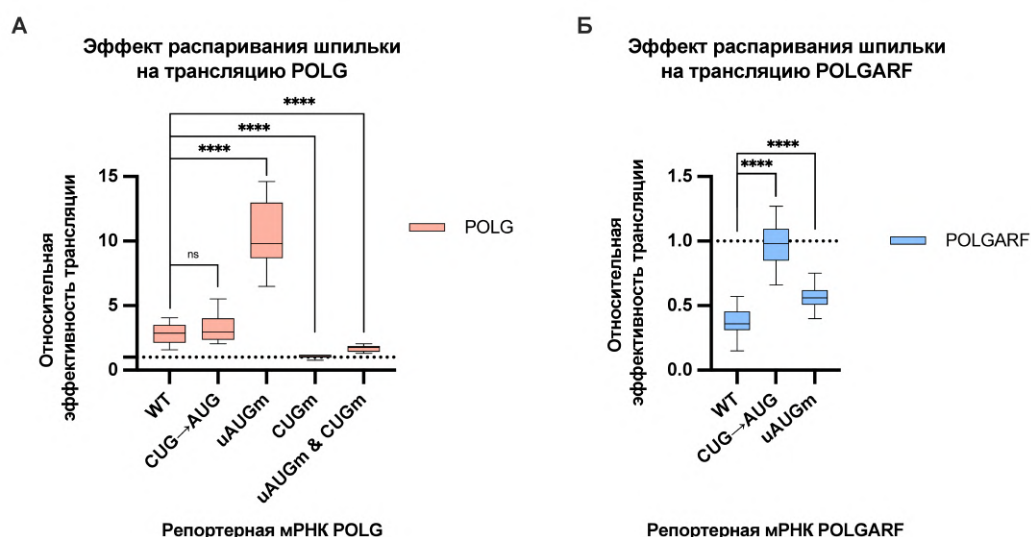


Рисунок 8. Разрушение инициаторной шпильки вблизи CUG кодона POLGARF влияет на эффективность трансляции POLG и POLGARF. Относительная эффективность трансляции представлена как отношение нормализованной экспрессии мутантного репортера к нормализованной экспрессии репортера с 5'НТО дикого типа. Пунктирная линия на отметке 1 соответствует эффективности трансляции репортерной мРНК с 5'НТО дикого типа. Звездочки соответствуют $p < 0,0001$, ns – статистически незначимо. (А) Результаты трансфекции репортерных мРНК POLG. (Б) Результаты трансфекции репортерных мРНК POLGARF.

Замена стартового кодона POLGARF с CUG на AUG всего в ~1,5 раза увеличивает эффективность инициации, когда шпилька интактна, но значительно (в ~4 раза) стимулирует трансляцию POLGARF, если ее мутировать (рис. 7Б). Это подтверждает, что именно инициаторная шпилька делает трансляцию на POLGARF такой эффективной. Интересно, что при этом эта же мутация практически полностью ингибирует трансляцию POLG (~14-кратное снижение) независимо от наличия шпильки (рис. 7А).

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 сводит инициацию на следующем стартовом кодоне к нулю. В любом случае, это объясняет, почему трансляция POLGARF иницируется не на AUG – в противном случае экспрессия POLG была бы крайне низкой.

4.3. 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, при этом реинициация и пропускающее сканирование вносят примерно равный вклад в инициацию на его CUG кодоне (рис. 9Д). Поэтому мы решили оценить роль eIF4G2 в обоих механизмах инициации POLG и POLGARF.

Для этого uORF была модифицирована так, чтобы инициация на исследуемых мРНК происходила либо только путем пропускающего сканирование, либо преимущественно путем реинициации (рис. 9В и 9Г). Во-первых, мы удлинили uORF так, чтобы она перекрывалась вне рамки считывания с Fluc («*uORF ext*»), при этом трансляция полностью зависела бы от рибосом, «протекающих» через uAUG кодон. Во-вторых, чтобы «отфильтровать» «протекающие» рибосомы и сделать трансляцию зависящей в основном от реинициации, мы ввели два AUG кодона в хорошем контексте рядом с uAUG в рамке с uORF («*uAUG x2*»). Для того чтобы оценить степень задержки сканирующих комплексов на стартовых кодонах uORF, вводили одновременно обе мутации («*uAUG x2 & uORF ext*»). Такая двойная мутация снижает трансляцию и POLG, и POLGARF почти до фонового уровня (рис. 9Д), то есть введенные uAUG кодоны действительно сильно подавляют пропускающее сканирование, и почти вся трансляция Fluc на репортерах «*uAUG x2*» на самом деле опосредована реинициацией.

Подавление пропускающего сканирования («*uAUG x2*») сделало трансляцию POLG более зависимой от eIF4G2 и, наоборот, устранение реинициации («*uORF ext*») сделало ее чуть менее чувствительной к деплеции eIF4G2 (рис. 9А). Таким образом, eIF4G2 обеспечивает трансляцию POLG, способствуя как пропускающему сканированию, так и реинициации.

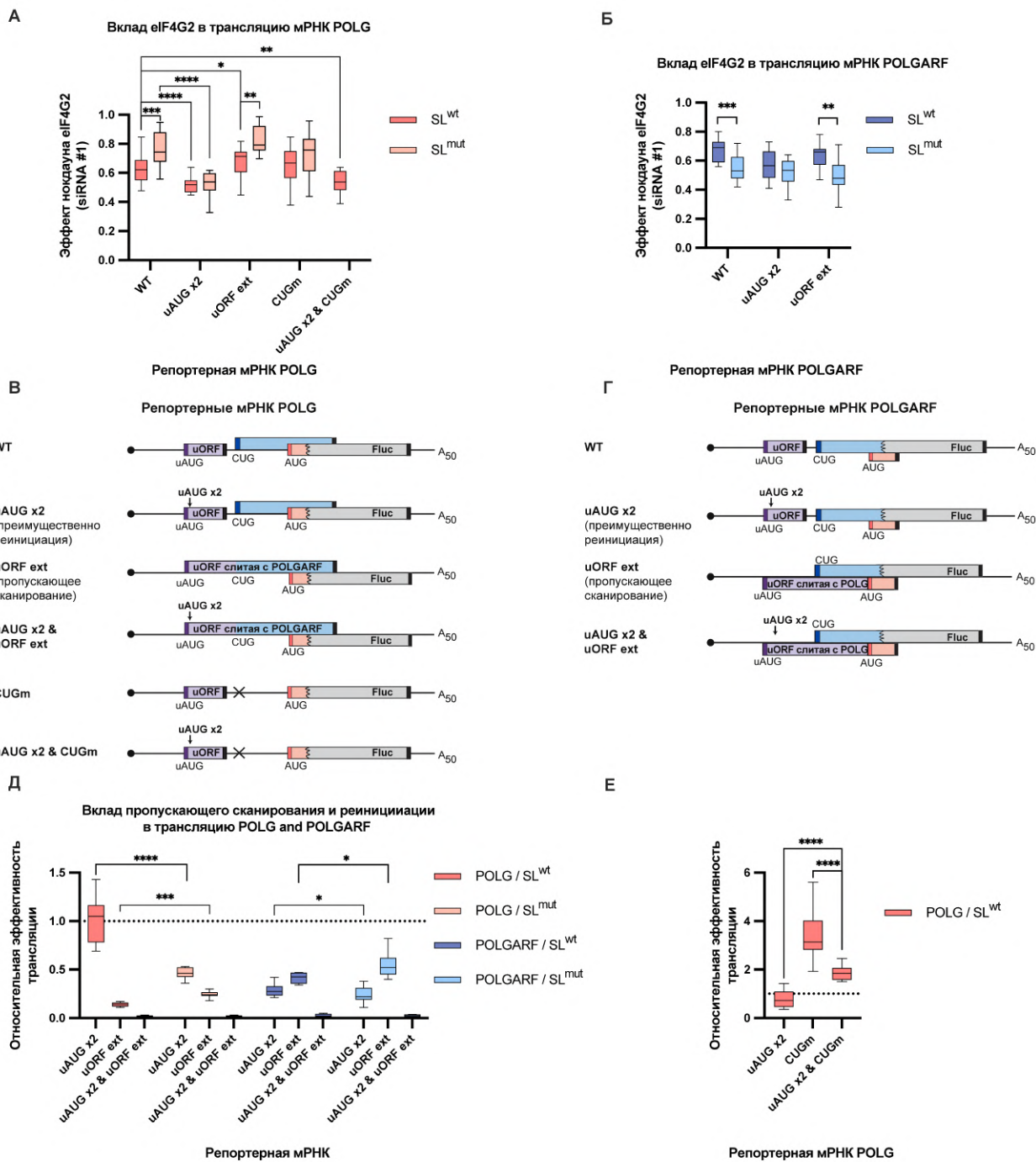


Рисунок 9. eIF4G2 промотирует как пропускающее сканирование, так и реинициацию на мРНК POLG и POLGARG. (А) Репортерные мРНК POLG трансфицированы в клетки 293Т с нокдауном ($n \geq 10$). Все мРНК тестировали либо с 5'НТО дикого типа, либо с мутированной инициаторной шпилькой POLGARG (обозначены «SL^{wt}» и «SL^{mut}»). (Б) Результаты трансфекции репортерных мРНК POLGARG. Панели В и Г отражают схематичное изображение репортеров POLG и POLGARG. (Д) Вклад пропускающего сканирования и реинициации в трансляцию мРНК POLG и POLGARG. Относительная эффективность трансляции представлена как отношение нормализованной экспрессии мутантного репортера (обозначенного как «uAUG x2» или «uORF ext» для оценки реинициации и пропускающего сканирования соответственно) на нормализованную экспрессию репортера с 5'НТО дикого типа. Пунктирная линия на отметке 1 соответствует эффективности трансляции репортера с 5'НТО дикого типа. (Е) Реиницировавшие рибосомы в основном

пропускают стартовый кодон POLGARF и иницируют на кодоне POLG. Относительная эффективность трансляции рассчитана так же, как и на панели Д. Звездочки соответствуют $p < 0,0001$.

Реинициация — это малоизученный процесс, 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, 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, а eIF4G2 участвует в последующем сканировании. Можно было бы предположить, что на пути к инициаторному кодону POLG реиницировавшие рибосомы интерферируют с рибосомами, транслирующими POLGARF, — и в этот момент возникает потребность в eIF4G2. Однако удаление стартового кодона POLGARF («uAUG x2 & CUGm») не увеличило потребность реинициации в eIF4G2 по сравнению с репортером «uAUG x2» (рис. 9А).

При этом трансляция репортера POLGARF «uAUG x2» зависит от eIF4G2 даже несколько сильнее, чем трансляция мРНК POLGARF дикого типа (рис. 9Б). Небольшое расстояние между стоп-кодоном uORF и стартовым кодоном POLGARF (всего 11 нуклеотидов), вероятно, слишком мало 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 (см. репортер «CUGm» на рис. 9Е). Когда же возможна только реинициация, удаление CUG кодона стимулирует трансляцию POLG очень слабо (сравните эффективности трансляции репортеров «uAUG x2 & CUGm» и «uAUG x2» на рис. 9Е). 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.

5. 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 белка в реинициацию на ранее идентифицированных мишенях eIF4G2: Stard7, Maf1 и UCP2, для которых мы ранее показали роль eIF4G2 в пропускающем сканировании (рис. 4). По аналогии с POLG/POLGARF, мы ввели два дополнительных AUG кодона в хороших нуклеотидных контекстах в uORF 5'НТО Maf1, Stard7 и UCP2 дикого типа или с мутантной uORF, перекрывающейся с рамкой Fluc (рис. 10B).

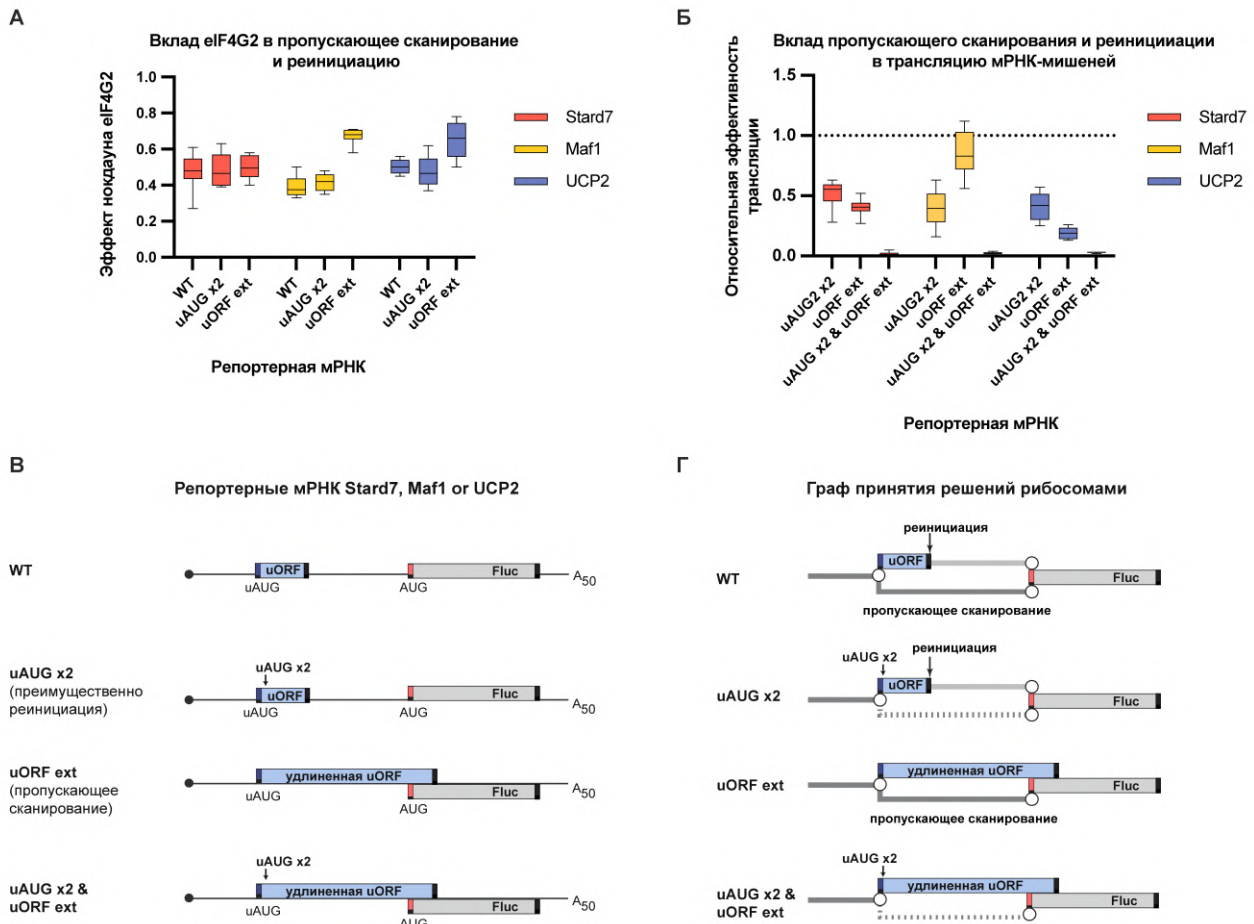


Рисунок 10. eIF4G2 промотирует как пропускающее сканирование, так и реинициацию на мРНК Stard7, Maf1 и UCP2. (А) Эффект нокдауна представлен в виде отношения нормализованной экспрессии репортера в клетках с нокдауном eIF4G2 к контрольным клеткам 293Т (n≥10). (Б) Вклад пропускающего сканирования и реинициации в трансляцию мРНК Stard7, Maf1 и UCP2. Относительная эффективность трансляции представлена как отношение нормализованной экспрессии мутантного репортера на нормализованную экспрессию репортера с 5'НТО дикого типа. Пунктирная линия на отметке 1 соответствует эффективности трансляции репортера с 5'НТО дикого типа. (В) Схематичное изображение репортеров (не в масштабе). (Г) Графы принятий решений рибосомами для исследуемых репортеров.

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. 10Б). Это значит, что мРНК типа «uAUG x2» можно использовать для оценки вклада eIF4G2 в реинициацию на 5'НТО Stard7, Maf1 и UCP2. Во всех этих случаях uORF, похоже, контролируют инициацию трансляции на основном AUG-кодоне через оба механизма (рис. 10Б). Трансляция репортерных конструкций, полагающихся на реинициацию («uAUG x2»), также значительно снижается во всех случаях при деплеции eIF4G2 (рис. 10А).

Таким образом, 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.

6. eIF4G2 вовлечен в кэп-зависимую трансляцию с участием eIF4E, а не eIF3d

Большинство мишеней eIF4G2 обладают высокой кэп-зависимостью, а также чувствительны к инактивации eIF4E при ингибировании киназы mTOR [Смирнова, 2022]. Однако существуют данные о том, что eIF3d также может связывать кэп [Lamper 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. 11, 12). Большинство протестированных мРНК не реагируют на нокдаун *eIF3d* ни при нормальных условиях (рис. 11, 12Б), ни при инактивации mTOR, когда eIF4E-зависимая трансляция сильно подавлена (рис. 12Г). Зависимость трансляции от eIF4G2 не менялась ни при деплеции eIF3d, ни при инактивации mTOR (рис. 12А, 12В). 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.

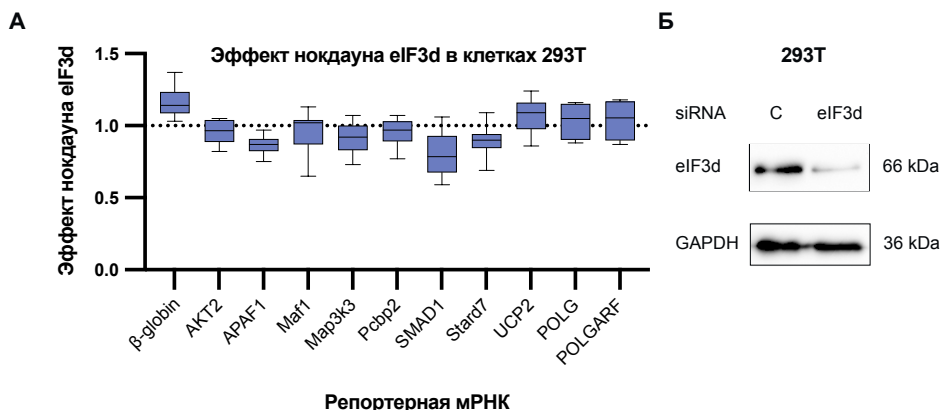


Рисунок 11. Трансляция мРНК-мишеней eIF4G2 нечувствительна к деплеции eIF3d. (А) Эффект нокдауна представлен в виде отношения нормализованной экспрессии репортера в клетках с деплецией eIF3d к контрольным клеткам 293Т ($n \geq 7$).

(Б) Вестерн-блот анализ нокдауна *eIF3d* в клетках 293T, *GAPDH* детектирован как контроль нанесения.

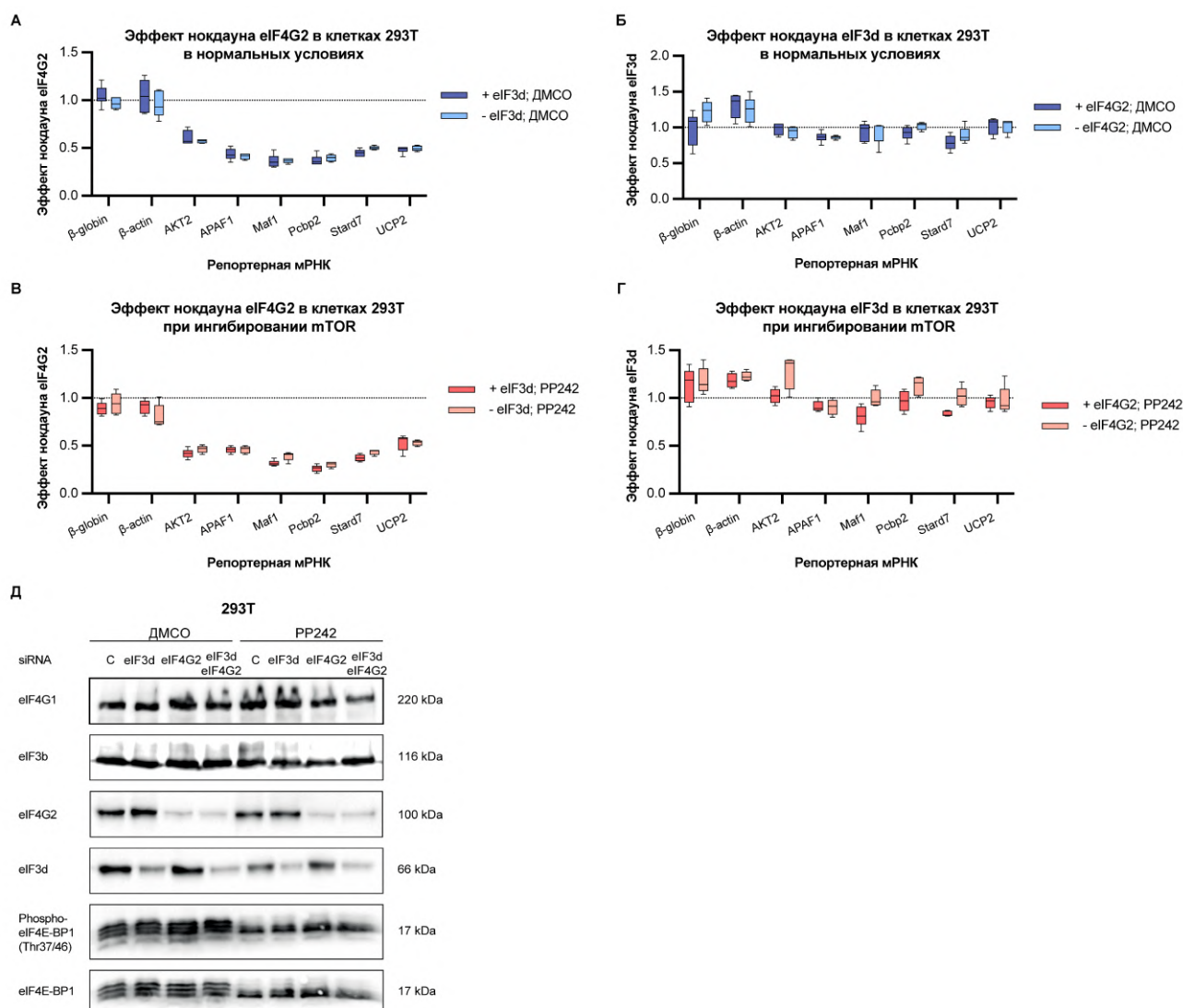


Рисунок 12. Нокдаун *eIF3d* и *eIF4G2* в клетках 293T. Деpletировали *eIF3d*, *eIF4G2* или оба этих белка. Перед трансфекцией мРНК клетки обрабатывали ингибитором mTOR (1 мкМ PP242) или ДМСО. Пунктирная линия на отметке 1 соответствует ответу, идентичному поведению референсного репортера β -глобина (т.е. отсутствие эффекта нокдауна). **(А)** Эффект нокдауна *eIF4G2* при наличии или в отсутствие *eIF3d* при нормальных условиях (контрольная обработка ДМСО) рассчитан как отношение нормализованной экспрессии репортера в клетках с нокдауном *eIF4G2* к контрольным клеткам (обозначены как «+ *eIF3d*») или в клетках с двойным нокдауном к контрольным клеткам (обозначены как «- *eIF3d*»). **(Б)** Эффект нокдауна *eIF3d* при наличии или деpleции *eIF4G2* рассчитан как отношение нормализованной экспрессии репортеров в клетках с нокдауном *eIF3d* к контрольным клеткам (обозначены как «+ *eIF4G2*») или в клетках с двойным нокдауном к контрольным клеткам (обозначены как «- *eIF4G2*»). Панели **В** и **Г** аналогичны панелям **А** и **Б**, за исключением того, что клетки были дополнительно обработаны ингибитором mTOR (1 мкМ PP242). **(Д)** Вестерн-блот анализ контрольных клеток 293T и клеток с деpleцией *eIF3d*, *eIF4G2* или обоих белков; клетки обработаны 1 мкМ PP242 или ДМСО. *eIF3b* детектирован как контроль нанесения.

7. Модель участия eIF4G2 в кэп-зависимой трансляции

Полученные результаты наглядно демонстрируют, что eIF4G2 вовлечен в кэп-зависимую трансляцию, в которой роль кэп-связывающего белка выполняет именно eIF4E, а не eIF3d на всех протестированных мРНК-мишенях eIF4G2. При этом eIF4G2 вступает в дело после распознавания кэпа и привлечения рибосомных комплексов на мРНК. Зависимость трансляции от eIF4G2 для тестируемых мишеней определяется наличием uORF в их 5'НТО, причем и реинициация, и пропускающее сканирование с участием eIF4G2 играют важную роль в обеспечении трансляции основных ORF.

Многие исследователи, в том числе и мы, полагали ранее, что на одной мРНК при наличии uORF трансляция основной рамки осуществляется либо преимущественно через механизм пропускающего сканирования, либо путем реинициации, в зависимости от контекста uAUG стартовых кодонов и длины uORF, поэтому и роль eIF4G2 ассоциировали лишь с одним из этих способов трансляции. В данной работе мы показали, что eIF4G2 участвует в обоих этих механизмах на одной и той же мРНК. Таким образом, мы предлагаем следующую модель участия eIF4G2 в канонической кэп-зависимой трансляции на мРНК с uORF (рис. 13).

Привлечение рибосомы к мРНК происходит eIF4F-зависимо, но последующая трансляция uORF приводит к возникновению потребности в eIF4G2 двумя способами. eIF4G2 либо помогает рибосоме возобновить сканирование после терминации и участвует в реинициации, либо промотирует пропускающее сканирование. В последнем случае eIF4G2 замещает eIF4G1, когда последний диссоциирует из сканирующего комплекса в результате столкновения сканирующего комплекса, пропустившего uAUG, с иницирующей, транслирующей, или терминирующей 80S рибосомой. Такая замена одного гомолога eIF4G на другой способствует 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.

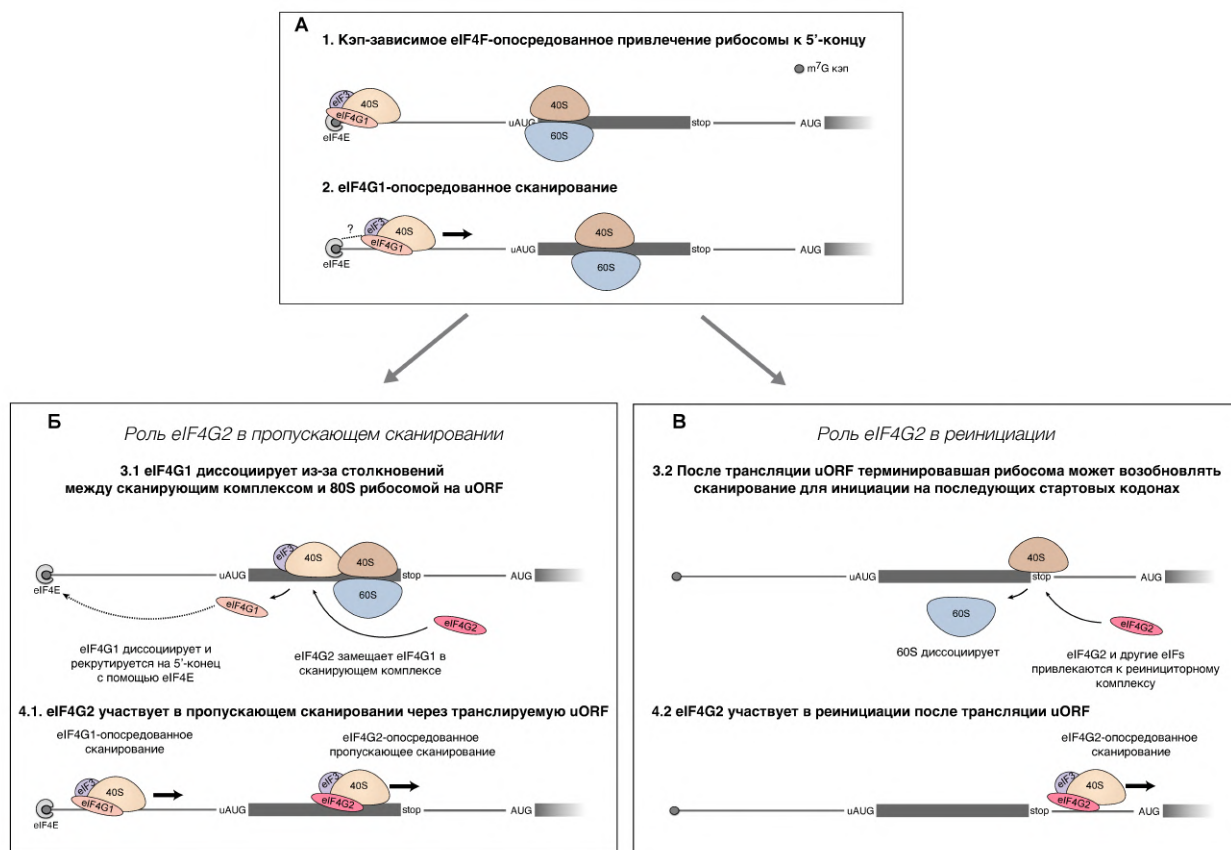


Рисунок 13. Предлагаемый механизм участия *eIF4G2* в кэп-зависимой трансляции на мРНК с *uORF*. **(А)** 40S субчастица рибосомы привлекается к 5'-концу мРНК посредством взаимодействия между m^7G -кэпом и *eIF4F*. *eIF4G1* облегчает сканирование, начиная с самого 5'-конца. **(Б)** Столкновение сканирующего 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)** На той же самой мРНК *eIF4G2* может помочь терминировавшей рибосоме возобновить сканирование и таким образом способствовать реинициации. Другие инициаторные факторы для простоты не показаны.

Заключение

Нами впервые показано, что зависимость трансляции от eIF4G2 часто определяется наличием uORF в 5'НТО (как в случае мРНК Maf1, Stard7, UCP2, AKT2, MYCBP2, POLG/POLGARF), но случаи APAF1, SMAD1 и Pcrb2 показывают, что механизм вовлечения eIF4G2 более сложен. Полученные результаты демонстрируют, что 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 дополняют полученные ранее результаты [Смирнова, 2022] и подтверждают, что eIF4G2 вступает в дело после распознавания кэпа и привлечения рибосомных комплексов на мРНК.

Наши данные также подчеркивают, что пропускающее сканирование и реинициация не являются взаимоисключающими и происходят 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.

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.

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.

Публикации по теме диссертации

1. Smirnova V.V., **Shestakova E.D.**, Bikmetov D.V., Chugunova A.A., Osterman I.A., Serebryakova M.V., Sergeeva O.V., Zatsepin T.S., Shatsky I.N., Terenin I.M. eIF4G2 balances its own mRNA translation via a PCBP2-based feedback loop // RNA. 2019. Vol. 25, № 7. P. 757–767. IF = 4,6 (Web of Science).
2. Smirnova V.V.*, **Shestakova E.D.***, Nogina D.S., Mishchenko P.A., Prikazchikova T.A., Zatsepin T.S., Kulakovskiy I.V., Shatsky I.N., Terenin I.M. Ribosomal leaky scanning through a translated uORF requires eIF4G2 // Nucleic Acids Res. 2022. Vol. 50, № 2. P. 1111–1127. IF = 14,9 (Web of Science).
* Авторы внесли равный вклад (Joint First Authors)
3. **Shestakova E.D.**, Smirnova V.V., Shatsky I.N., Terenin I.M. Specific mechanisms of translation initiation in higher eukaryotes: the eIF4G2 story // RNA. 2023. Vol. 29, № 3. P. 282–299. IF = 4,6 (Web of Science).
4. **Shestakova E.D.**, Tumbinsky R.S., Andreev D.E., Rozov F.N., Shatsky I.N., Terenin I.M. The Roles of eIF4G2 in Leaky Scanning and Reinitiation on the Human Dual-Coding POLG mRNA // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24, № 24. P. 17149. IF = 5,6 (Web of Science).