

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Лябин Дмитрий Николаевич

**РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА γ -БОКС-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА 1
И ЕГО РОЛЬ В ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ**

Специальность 1.5.3.– молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт белка Российской академии наук

Официальные оппоненты:

Озолинь Ольга Николаевна

доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией функциональной геномики и клеточного стресса Института биофизики клетки РАН ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Сергиев Пётр Владимирович

член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор кафедры химии природных соединений химического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

Шатский Иван Николаевич

доктор химических наук, доцент, главный научный сотрудник отдела химии и биохимии нуклеопротеидов НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

Защита диссертации состоится **9 февраля** 2023 г. в **16:00** на заседании диссертационного совета МГУ.015.4(МГУ.03.01) Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Биологический факультет, ауд. 389.

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 сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/508118475/>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2022 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета,

Доктор биологических наук

Т.В. Комарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

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

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

Следует отметить, что накопившиеся знания о функциях YB-1 представляют собой данные, полученные на единичных генах или мРНК, либо, в лучшем случае, на группе генов. До сих пор не было проведено исследований, показывающих влияние YB-1 на экспрессию всех клеточных генов; в частности, не исследованы изменения транскриптома и транслатома клеток в условиях снижения и повышения количества YB-1, не сопоставлены эти данные с данными о том, какой набор мРНК связывает YB-1 в клетках. В данной диссертационной работе будут впервые представлены результаты подобных исследований, позволяющих выявить полный набор контролируемых белком YB-1 генов и

приближающих нас к пониманию функций этого белка в клетке, к пониманию того, в каких клеточных процессах YB-1 выступает как трансляционный регулятор, а в каких как транскрипционный. Кроме того, основываясь на литературных данных, можно было предположить, что функции YB-1 могут частично перекрываться с функциями его гомолога, белка YB-3, и доказательства в пользу этого предположения впервые будут приведены в настоящей работе. Безусловно, это придаст импульс для исследования детальных механизмов работы YB-1 и для решения более прикладных задач, связанных с применением YB-1 в качестве терапевтической мишени при лечении раковых и воспалительных заболеваний.

Цель и задачи исследования

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

В соответствии с целями предполагалось решить следующие задачи:

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

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

Предмет исследования – функции и регуляция синтеза YB-1.

Научная новизна работы и практическая значимость работы

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

связывания с этим элементом РАВР и повышению связывания YB-1, что приводит к подавлению трансляции мРНК *YB-1*.

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

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

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

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

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

Методология диссертационного исследования

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

Анализ содержания белков и мРНК в образцах проводился методами иммуноблоттинга, нозерн-блоттинга и ОТ-ПЦР в реальном времени. Используемые в работе белки продуцировались и выделялись из штаммов *E. coli*. Методы анализа РНК-белковых комплексов включали в себя метод ультрафиолетовых и фотохимических сшивок, иммунопреципитации и связывания РНК-белковых комплексов на нитроцеллюлозных фильтрах. Генно-инженерными методами создавались плазмиды, кодирующие как природные мРНК, так и репортерные мРНК с различными 5' НТО и 3' НТО, а также их варианты, включающие делеции и точечные замены. С помощью этих плазмид методом транскрипции *in vitro* получали соответствующие мРНК, которые энзиматически экзипировали и в некоторых случаях полиаденилировали. Анализ трансляции полученных мРНК проводился как в бесклеточных системах трансляции на основе клеток млекопитающих, так и в культурах эукариотических клеток. Детекцию продуктов трансляции проводили либо по включению радиоактивной метки (^{35}S -метионин), либо флуоресцентной метки (азидогомоаланин и Alexa488), либо по активности синтезируемых с репортерных мРНК люцифераз *Photinus pyralis*, *Renilla reniformis* или *Oplophorus gracilirostris*. Клеточные линии с нокаутом генов *YBX1* и *YBX3* получали методом редактирования генома CRISPR/Cas9. Полногеномное изучение трансляции в клетках проводили с помощью рибосомного профайлинга (Ribo-Seq). Анализ транскриптома клеток проводили методом высокопроизводительного секвенирования РНК (RNA-Seq).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Авторегуляцию трансляции мРНК *YB-1*, обнаруженную ранее в бесклеточной системе трансляции, можно наблюдать в культивируемых эукариотических клетках. Ингибирующее действие *YB-1* на трансляцию собственной мРНК опосредовано её нетранслируемыми областями.
2. Помимо белков *YB-1* и PABP в регуляции трансляции мРНК *YB-1* может принимать участие белок гетерогенных ядерных мРНК Q (hnRNP Q). Усиливая взаимодействие *YB-1* с 3'НТО мРНК *YB-1* и ослабляя взаимодействие с ней PABP, hnRNP Q ингибирует трансляцию мРНК *YB-1* в бесклеточной системе трансляции.
3. Синтез белка *YB-1* зависит от пролиферативного статуса клеток. Замедление клеточного деления приводит к снижению синтеза *YB-1* и впоследствии к снижению его количества. Ключевую роль в этом играют активность mTOR-сигнального каскада и 5' нетранслируемая область мРНК *YB-1*.
4. Альтернативные формы мРНК *YB-1* образуются за счет минорных стартов транскрипции в первом интроне гена *YBX1* и способны транслироваться. Инициация их трансляции происходит не на каноническом AUG-кодоне, а на смежной паре кодонов AUCGUG. Продуктом трансляции альтернативных форм мРНК *YB-1* является белок *YB-1* без N-концевого домена. С основной формы мРНК *YB-1* помимо основного продукта (белка *YB-1*) синтезируется удлинённая с N-конца форма

- белка YB-1, образующаяся за счет инициации трансляции на неканоническом стартовом кодоне AUC в 5'НТО, находящемся в той же рамке считывания, что и основной стартовый AUG-кодон.
5. Нокаут гена *YBX1* в клетках НЕК293Т не приводит к глобальным изменениям в транскриптоме и транслятоме благодаря повышению в клетках количества гомолога YB-1 – белка YB-3, который способен заменять YB-1 по крайней мере в РНК-зависимых функциях – в первую очередь, в трансляции.
 6. Повышение количества YB-3 в клетках НЕК293Т при нокауте гена *YBX1* связано с регуляцией белком YB-1 трансляции и стабильности мРНК *YB-3* за счет его прямого взаимодействия с нетранслируемыми областями этой мРНК.

Степень достоверности результатов

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

Апробация работы

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

Публикации

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

Личный вклад автора

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

Структура и объем работы

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

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

I. РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ мРНК *YB-1*

Первая часть данной работы посвящена изучению регуляции синтеза *YB-1* в живых клетках. Однако отправной точкой этого исследования послужила кандидатская диссертация автора, посвященная изучению регуляции трансляции мРНК *YB-1* в бесклеточной системе белкового синтеза. Целесообразно кратко изложить основные результаты этой работы, поскольку это позволит оценить те знания о регуляции синтеза *YB-1*, которые имелись на момент начала экспериментов, вошедших в докторскую диссертацию.

Было показано, что белок *YB-1* способен ингибировать трансляцию собственной мРНК в бесклеточной системе белкового синтеза на основе лизата ретикулоцитов кролика. Для этого необходимо специфическое взаимодействие *YB-1* с так называемой регуляторной последовательностью, локализованной в начале 3' нетранслируемой области (3'НТО) мРНК *YB-1*. Методом химического футпринтинга были локализованы два близко расположенных сайта связывания *YB-1* с регуляторной последовательностью. Мутации в этих сайтах приводят к тому, что *YB-1* теряет способность к селективному ингибированию трансляции собственной мРНК. Кроме того, в регуляторной последовательности был обнаружен протяженный А-богатый сайт связывания поли(А)-связывающего белка (poly(A)-binding protein, PABP), который перекрывался с сайтами связывания *YB-1*. Оказалось, что белки конкурируют за связывание с регуляторной последовательностью и способны вытеснять друг друга с нее.

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

Дальнейшие исследования, показали, что в регуляцию трансляции мРНК *YB-1* при участии *YB-1* и PABP может вмешиваться другой белок – hnRNPQ.

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

Белок hnRNP Q (heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein Q, белок Q гетерогенных ядерных мРНК) был обнаружен как белок, взаимодействующий с 3'НТО мРНК *YB-1* в экспериментах по выделению белков лизата ретикулоцитов кролика с помощью биотинилированных фрагментов 3'НТО мРНК *YB-1* (Рис. 1А). Как видно на рисунке 1Б, белок p105 имеет повышенное сродство к фрагменту III, белки hnRNP Q и UNR предпочтительно связываются с регуляторным элементом мРНК *YB-1*, а hnRNP F – с фрагментами II и III. Среди белков, специфично связывающихся с 3'НТО мРНК *YB-1* можно отметить белки hnRNP Q и UNR, участвующие в регуляции трансляции мРНК *c-fos*. Для остальных определенных белков участие в регуляции трансляции или стабильности специфических мРНК достоверно не показано. Белок hnRNP Q был выбран для дальнейшей работы по нескольким причинам. Во-первых, он специфически связывается с регуляторным элементом мРНК *YB-1*, с которым, как уже было сказано, взаимодействуют белки *YB-1* и PABP, которые регулируют трансляцию этой мРНК. Во-вторых, hnRNP Q по электрофоретической подвижности схож с белком, который, как было показано

ранее в экспериментах по УФ-сшивкам, перешивается с 3'НТО мРНК *YB-1* и также как и PABP вытесняется с неё поли(А)-РНК-ой, то есть имеет повышенное сродство к А-богатым последовательностям (Eliseeva et al., 2012). Наконец, в-третьих, сообщалось, что hnRNP Q может взаимодействовать с YB-1 (Moraes et al., 2003, Weidensdorfer et al., 2009). Исходя из этого, было предположено, что hnRNP Q также оказывает влияние на трансляцию мРНК *YB-1*, возможно, за счет изменения связывания YB-1 и PABP с регуляторным элементом мРНК *YB-1*.

Специфичность связывания hnRNP Q с регуляторным элементом в 3'НТО мРНК *YB-1* была подтверждена в экспериментах по связыванию рекомбинантного белка hnRNP Q с биотинилированными фрагментами 3'НТО мРНК *YB-1* (см. полный текст диссертации).

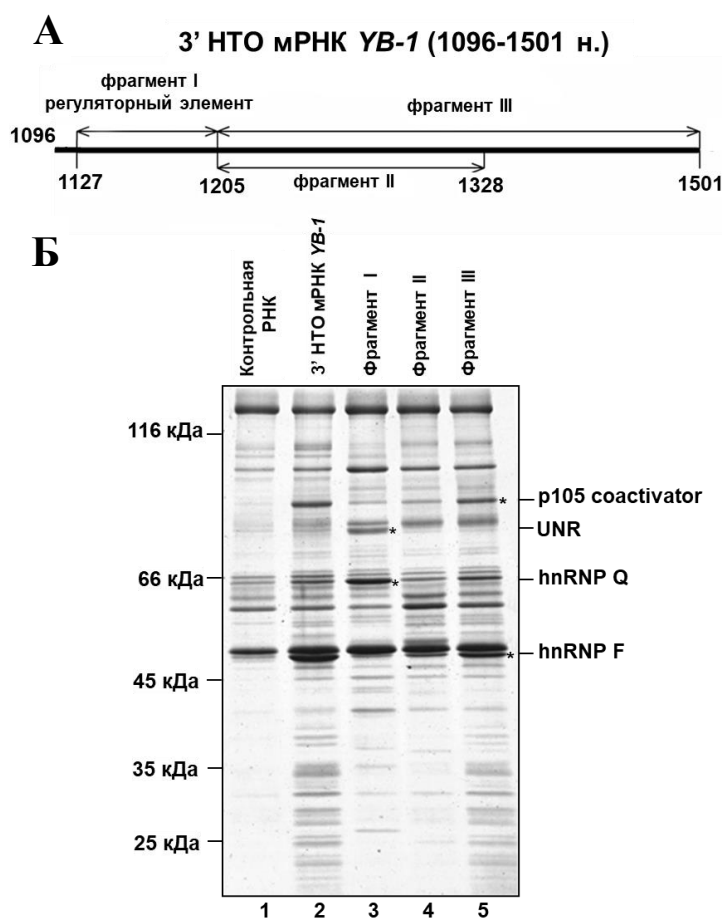


Рисунок 1. А. Схема 3'НТО мРНК *YB-1*. Б. Электрофореграмма препарата белков лизата ретикулоцитов кролика, связавшихся либо с контрольной мРНК АβG (дорожка 1), либо с полной 3'НТО мРНК *YB-1*, либо с фрагментами 3'НТО мРНК *YB-1*: регуляторным элементом (фрагмент I, 1136-1204 н. в последовательности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

Далее в бесклеточной системе трансляции (БСТ) на основе лизата ретикулоцитов кролика было исследовано влияние рекомбинантного белка hnRNP Q на трансляцию мРНК *YB-1* и мРНК *люциферазы* (в качестве контроля). В экспериментах использовали кэпированные и полиаденилированные (K^+A^+) мРНК. Данные мРНК транслировали в БСТ в присутствии [^{35}S]-метионина и экзогенного hnRNP Q в увеличивающихся количествах. Белки разделяли ДСН-гель-электрофорезом, а [^{35}S]-меченные продукты трансляции детектировали автордиографией (Рис. 2А,Б). На рисунках видно, что при увеличении количества белка hnRNP Q трансляция мРНК *YB-1* значительно подавляется. В то же время трансляция контрольной мРНК *люциферазы* в этих условиях стимулируется.

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

Для того, чтобы проверить, изменяется ли эффективность связывания РАВР и YB-1 (основных регуляторов трансляции мРНК *YB-1*) при добавлении hnRNP Q, был проведен эксперимент по связыванию биотинилированного регуляторного элемента 3'НТО мРНК *YB-1* с белками лизата ретикулоцитов кролика в присутствии рекомбинантного hnRNP Q. Как видно на рисунке 2В, при добавлении hnRNP Q наблюдается постепенное уменьшение связывания РАВР с регуляторным элементом 3'НТО мРНК *YB-1* и одновременное увеличение связывания белка YB-1.

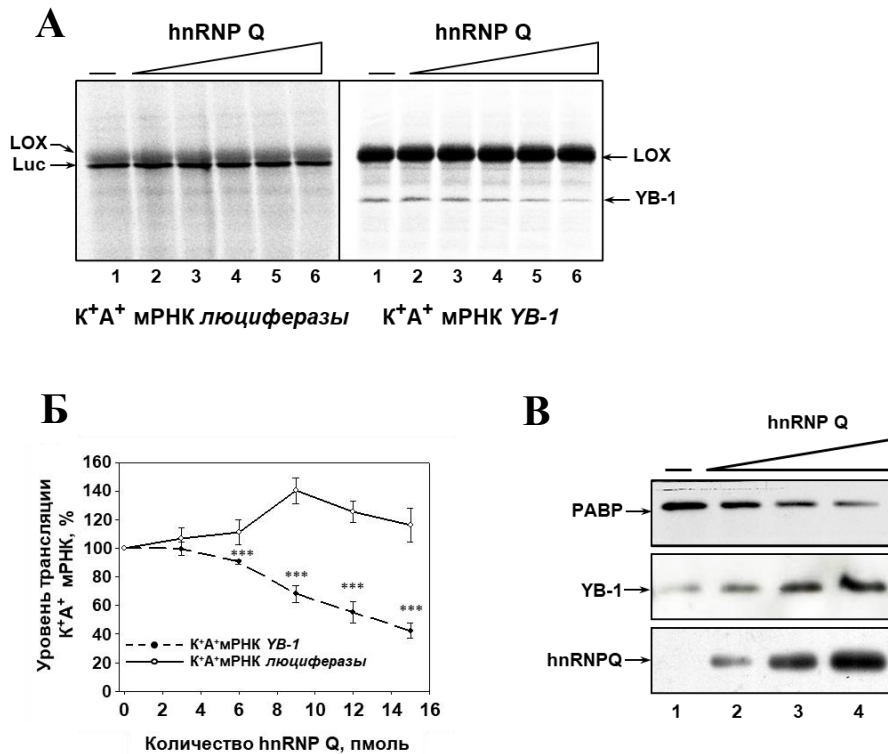


Рисунок 2. А-Б. Влияние hnRNP Q на трансляцию экзипированных полиаденилированных мРНК *YB-1* и мРНК люциферазы. 100 нг мРНК транслировали в БСТ на основе ретикулоцитов кролика в течение 45 мин при 30°C в присутствии [³⁵S]-метионина и увеличивающихся количеств рекомбинантного hnRNP Q (дорожки 2–6 – 200,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

Можно предположить, что hnRNP Q непосредственно привлекает YB-1 на регуляторный элемент и способствует вытеснению РАВР. С другой стороны, известно, что hnRNP Q, как и РАВР, предпочитает связываться с А-богатыми последовательностями (Gorlach et al., 1994). Поэтому hnRNP Q может препятствовать связыванию РАВР с А-богатым участком регуляторного элемента. В этом случае снижение связывания РАВР также приводит к повышению связывания YB-1 и, следовательно, к ингибированию трансляции мРНК *YB-1*. В любом случае ингибирующее влияние белка hnRNP Q на

трансляцию мРНК *УВ-1* может объясняться тем, что он способствует повышенному связыванию белка *УВ-1* с регуляторным элементом в 3'НТО.

2. Регуляция синтеза *УВ-1* в клетках

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

Анализ уровня синтеза *УВ-1* в культивируемых клетках методом метаболического мечения

Для изучения регуляции синтеза *УВ-1* в клетках необходимо было разработать метод, который бы позволил детектировать именно вновь синтезированный белок *УВ-1*. Для этого был применен метод метаболического мечения белков клеток [³⁵S]-метионином с последующей иммунопреципитацией меченного *УВ-1* из лизатов клеток за соответствующие антитела, электрофоретическим разделением белков преципитата в кислотном мочевином геле и автордиографией.

На рисунке 3А представлена типичная электрофореграмма и радиоавтограф, получаемые в этих экспериментах. Белок, соответствующий по подвижности рекомбинантному белку *УВ-1*, был вырезан из геля, проанализирован методом пептидного фингерпринтинга и идентифицирован как *УВ-1*.

С помощью описанного подхода был проанализирован синтез *УВ-1* в клетках HeLa, HEK293T, NIH 3T3, CHO и Vero. Оказалось, что в клетках NIH3T3, CHO и Vero с высоким содержанием мРНК *УВ-1* во фракции свободных мРНК (см. полный текст диссертации) синтез *УВ-1*, тем не менее, осуществляется (Рис. 3Б, дорожки 1, 3 и 5). Уровень этого синтеза ниже по сравнению с таковым в клетках HeLa и HEK293T (в 2-3 раза) с высоким содержанием мРНК *УВ-1* в полисомной фракции (см. полный текст диссертации) (Рис. 3Б, дорожки 2 и 4). Таким образом, доля синтеза *УВ-1* в тотальном белковом синтезе в клетках NIH3T3, Vero и CHO ниже, чем в клетках HeLa и HEK, что подтверждает данные по анализу содержания мРНК *УВ-1* во фракциях полисом и свободных мРНК (см. полный текст диссертации). Кроме того, можно утверждать, что мРНК *УВ-1* в большинстве исследованных клеточных линий действительно плохо транслируется, а не находится в полностью нетранслируемой маскированной форме.

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

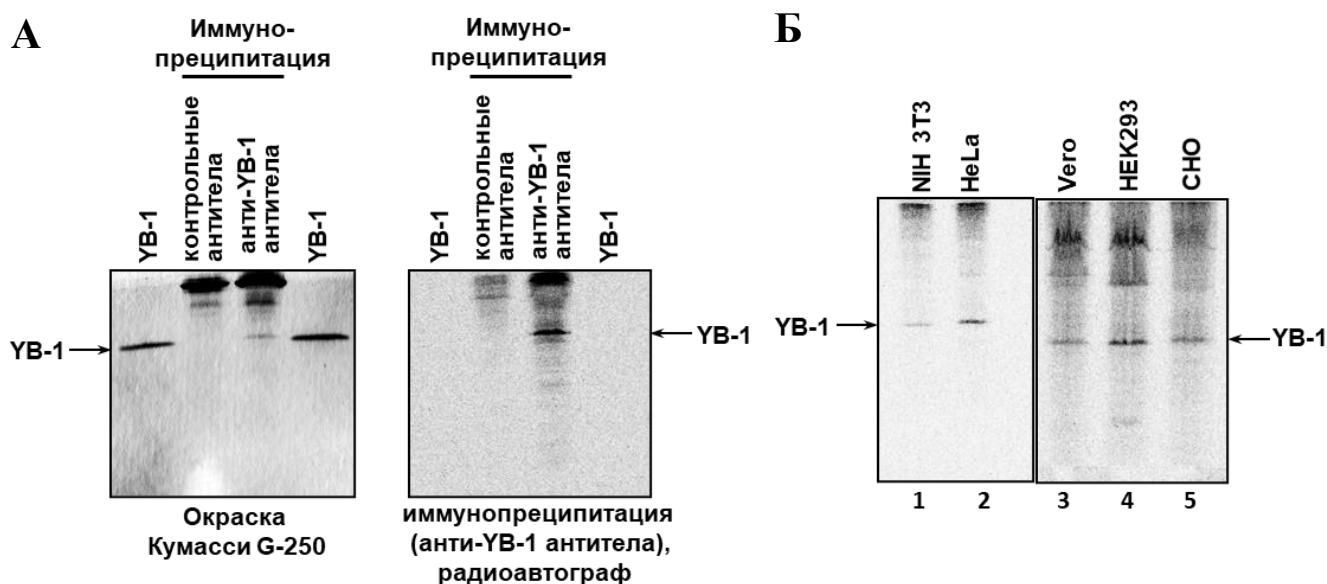


Рисунок 3. Метод анализа синтеза YB-1 в клетке. А. Клетки HeLa инкубировали в среде с [³⁵S]-метионином в течение 2 ч, собирали и лизировали. Лизат клеток использовали для иммунопреципитации с преиммунными антителами или антителами против YB-1. Белки, связанные с антителами, разделяли с помощью кислотномочевинного электрофореза в ПААГ, окрашивали Кумасси-G250, а [³⁵S]-меченые белки выявляли с помощью автордиографии. Белок с электрофоретической подвижностью, соответствующей рекомбинантному YB-1, вырезали из геля и идентифицировали как YB-1 с помощью масс-спектрометрии. Б. Анализ синтеза YB-1 в клетках различных линий. Клетки инкубировали в среде с [³⁵S]-метионином в течение 2 ч, собирали и лизировали. Лизаты клеток уравнивали по общей радиоактивности и использовали для иммунопреципитации с антителами против YB-1. Белки, связанные с антителами, разделяли с помощью кислотномочевинного электрофореза в ПААГ, а [³⁵S]-меченые белки выявляли с помощью автордиографии.

Авторегуляция синтеза YB-1 в клетках HeLa

Одной из особенностей синтеза YB-1 в бесклеточной системе трансляции является способность YB-1 при взаимодействии с регуляторной последовательностью в 3'НТО контролировать трансляцию собственной мРНК. Однако существует ли такая негативная регуляция в живых клетках, было неизвестно. Необходимо было показать, что повышение в клетке количества YB-1 приводит к уменьшению трансляции мРНК *YB-1* и, соответственно, к уменьшению количества эндогенного белка YB-1. Клетки HeLa были трансфицированы плазмидой pсDNA3-НА-YB-1, кодирующей белок YB-1 с гемагглютининным довеском на N-конце (чтобы отличать экзогенный YB-1 от эндогенного), и культивировали клетки в присутствии [³⁵S]-метионина через 24 или 48 часов после трансфекции. Через 24 часа после трансфекции клеток плазмидой экспрессия экзогенного НА-YB-1 достигала максимума (Рис. 4А). При этом количество экзогенного НА-YB-1 было приблизительно равно количеству эндогенного белка YB-1, а видимого изменения количества эндогенного YB-1 не наблюдалось.

Синтез эндогенного YB-1 через 24 часа после трансфекции достоверно снижался в клетках, экспрессирующих НА-YB-1, при том, что общий белковый синтез в этих клетках не изменялся (Рис.

4Б,В). Интересно, что через 48 часов после трансфекции синтез экзогенного HA-YB-1 снижается до уровня синтеза эндогенного, а тот в свою очередь восстанавливается до уровня синтеза в клетках не экспрессирующих HA-YB-1. Это означает, что через 48 часов после трансфекции количество экзогенного белка HA-YB-1 уменьшилось, и его количества уже недостаточно для ингибирования синтеза эндогенного YB-1.

Эти результаты позволяют предположить, что эндогенный белок YB-1 весьма стабилен, и период его полураспада в клетке заметно превышает 24 часа. Поэтому и нельзя за этот промежуток времени видеть уменьшение количества YB-1, даже если его синтез подавляется. Действительно, эксперименты показали, что в исследованных клеточных линиях (HeLa в том числе) YB-1 обладает довольно высокой стабильностью (период полураспада – около 60 часов), сравнимой со стабильностью большинства клеточных белков (см. полный текст диссертации).

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

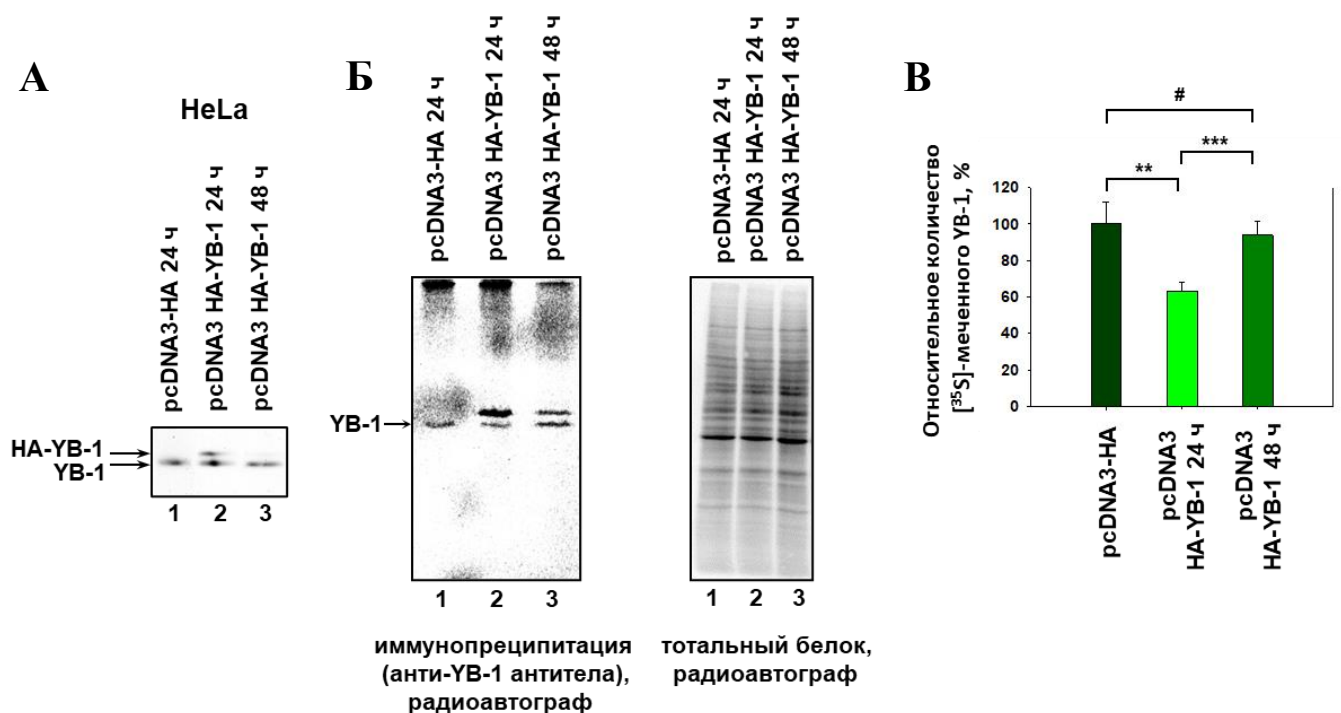


Рисунок 4. Авторегуляция синтеза YB-1 в клетках HeLa. А,Б. Клетки HeLa, трансфицировали плазмидой pcDNA3-HA-YB-1 или pcDNA3-HA и через 24 и 48 часов анализировали количество эндогенного (YB-1) и экзогенного (HA-YB-1) белка методом иммуноблоттинга с помощью антител против YB-1 (А) или уровень синтеза эндогенного (YB-1) и экзогенного (HA-YB-1) методом метаболического мечения белков $[^{35}\text{S}]$ -метионином (Б, левая панель). Лизаты клеток уравнивали по уровню общего белкового синтеза (Б, правая панель). В. Относительная радиоактивность полос, соответствующих YB-1 на радиоавтографе (Б, левая панель), определенная с использованием Packard Cyclone Storage Phosphor System (Packard Instrument Company, Inc.). Уровень синтеза YB-1 в клетках, трансфицированных плазмидой pcDNA3-HA, принимался за 100%. Ошибки – 2 стандартных отклонения. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний t-критерий Стьюдента; ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,005$, # - недостоверно.

Для этого исследовалась трансляция репортерной мРНК люциферазы *NLucP* с 5'- и 3'-нетранслируемыми областями мРНК *YB-1* в клетках HEK293TΔYB-1, клетках HEK293TΔYB-1+YB-1

(стабильно экспрессирующих YB-1 на уровне, сопоставимом с уровнем эндогенного белка) и в этих же клетках HEK293TΔYB-1+YB-1, но дополнительно экспрессирующих YB-1 с плазмиды (Рис. 5А). Использование такого набора клеток позволило смоделировать ситуацию, когда репортерная мРНК транслируется в клетках с различным уровнем YB-1: от полного его отсутствия, до гиперэкспрессии.

Плазмидой pNL2.2, кодирующей мРНК *NlucP* с 5' и 3'НТО мРНК *YB-1* под контролем промотора *YB-1*, трансфицировали указанные клетки. При трансфекции в клетки вводилась не только плазида pNL2.2, но и плазида, кодирующая мРНК люциферазы сверчка (*Fluc*) с 5' и 3'НТО мРНК *BTF3* (мРНК фактора транскрипции *BTF3*), в качестве внутреннего контроля. После 24 часов культивирования из части клеток выделяли РНК для измерения количества синтезированных мРНК *NlucP* и *Fluc*, а другую часть использовали для измерения активности люцифераз *NlucP* и *Fluc*. Активность люциферазы *NlucP* нормализовали по активности внутреннего контроля *Fluc*, а количество мРНК *NlucP* – по количеству мРНК *BTF3_Fluc_BTF3*.

На рисунке 5Б видно, что в перерасчете на мРНК, трансляция репортерной мРНК с НТО мРНК *YB-1* снижается с повышением количества YB-1 в клетке. Учитывая, что расчеты проведены относительно контрольной мРНК *Fluc* с НТО мРНК *BTF3*, можно говорить о том, что наблюдаемое ингибирование специфично.

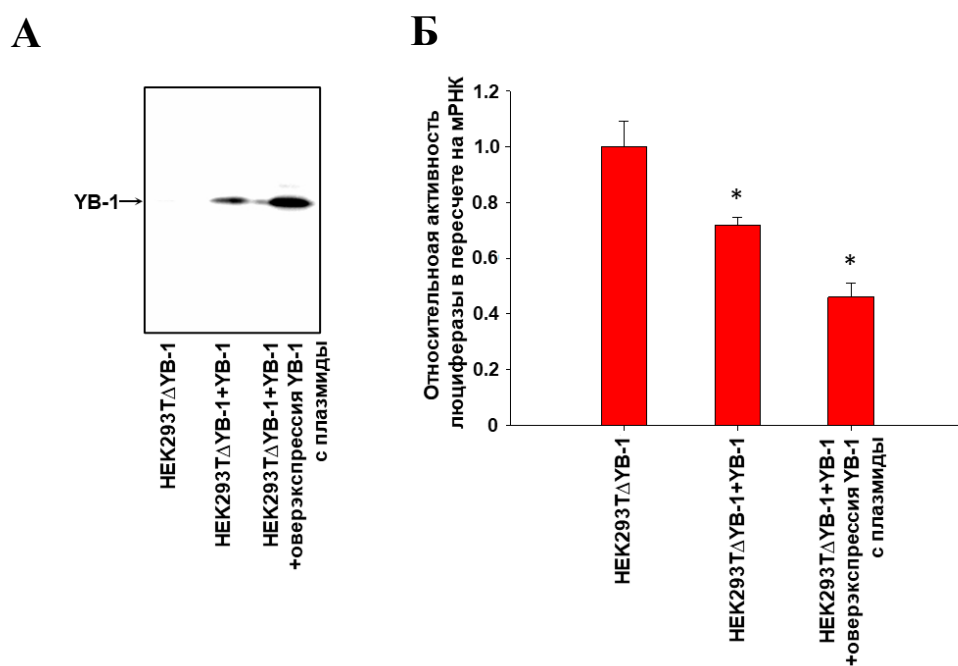


Рисунок 5. НТО мРНК *YB-1* обуславливают специфическую регуляцию трансляции белком YB-1. Клетки HEK293TΔYB-1, HEK293TΔYB-1+YB-1 и клетки HEK293TΔYB-1+YB-1, трансфицированные плазмидой pсDNA3YB-1-риго, трансфицировали плазмидами pNL2.2YB-1_Nluc_YB-1 и pNL2.2BTF3_Fluc_BTF3 (в качестве внутреннего контроля) и через 24 часа собирали и использовали: для иммуноблоттинга (А) и для измерения количества мРНК *Nluc*- и *Fluc* методом ОТ-ПЦР в реальном времени и для определения активности *NlucP* и *Fluc*. Б. Активность *NlucP* в перерасчете на количество мРНК, полученная из данных об активности люциферазы *Nluc*, синтезированной с плазмиды pNL2.2YB-1_Nluc_YB-1 (нормализованной по активности *Fluc*, синтезированной с плазмиды pNL2.2BTF3_Fluc_BTF3) и количестве мРНК *Nluc*, синтезированной с плазмиды pNL2.2YB-1_Nluc_YB-1 (нормированной к количеству мРНК *Fluc*, синтезированной с плазмиды pNL2.2BTF3_Fluc_BTF3). Ошибки – два стандартных отклонения. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний t-критерий Стьюдента. **p < 0,01, *p < 0,05.

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

В совокупности все вышеизложенные факты свидетельствуют о существовании авторегуляции синтеза *YB-1* в культивируемых клетках млекопитающих.

Синтез *YB-1* и деление клеток

Известно, что количество *YB-1* в клетке коррелирует с пролиферативной способностью клеток. Так, повышенное содержание *YB-1* коррелирует с экспрессией маркеров пролиферации, гиперэкспрессия *YB-1* приводит к гиперплазии, а время удвоения клеток увеличивается при подавлении экспрессии *YB-1* микрорегуляторными РНК (Basaki et al., 2010, Bergmann et al., 2005). Однако можно предположить и обратное – замедление деления клеток может вызвать снижение уровня синтеза *YB-1*. Простым способом замедлить скорость деления клеток является изменение плотности клеток. Это так называемое торможение пролиферации, зависимое от плотности. Для проверки этого предположения лизаты клеток HeLa с чашек различной плотности уравнивали по включенной радиоактивной метке ($[^{35}\text{S}]$ -метионину), (Рис. 6А) и измеряли уровень синтеза *YB-1*. На рисунке 6Б видно, что при увеличении плотности клеток HeLa синтез *YB-1* падает примерно в 2 раза.

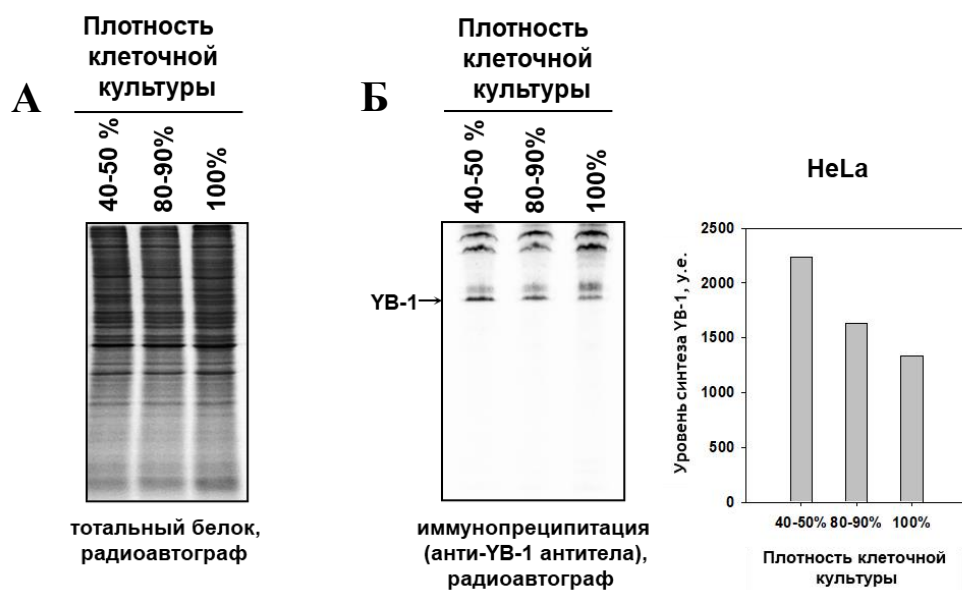


Рисунок 6. Зависимость синтеза *YB-1* от плотности клеточной культуры. В клетках HeLa различной плотности анализировали уровень синтеза *YB-1* методом метаболического мечения белков $[^{35}\text{S}]$ -метионином (Б). Лизаты клеток уравнивали по уровню общего белкового синтеза (А). Относительную радиоактивность полос определяли с использованием Packard Cyclone Storage Phosphor System (Packard Instrument Company, Inc.) (Б, правая панель).

Второй способ замедления клеточной пролиферации – это голодание клеток по сыворотке (отсутствие факторов роста в среде). Чтобы выяснить, как отсутствие сыворотки повлияет на синтез и количество *YB-1* в клетках НЕК293Т, эти клетки подвергали длительному (2 суток) культивированию в бессывороточной среде и анализировали количество *YB-1* и скорость его синтеза. В клетках, подвергшихся такому воздействию, можно наблюдать уменьшение количества белка *YB-1* (ср. дорожки 1 и 2 Рис. 7А), а после добавления сыворотки к голодавшим клеткам НЕК293Т количество *YB-1*

восстанавливается довольно быстро (за 3-6 часов) (Рис. 7А, дорожка 3). Эти данные хорошо соотносятся с результатами экспериментов по измерению уровня синтеза YB-1. В случае голодания клеток синтез YB-1 падает значительно сильнее (в 4-5 раз) (Рис. 7Б, ср. дорожки 1 и 2) по сравнению со снижением тотального белкового синтеза (примерно в 2 раза, гистограмма на рисунке 7Б), что, вероятно, и приводит к снижению количества белка YB-1. Еще одной причиной быстрого снижения количества белка YB-1 может являться снижение его стабильности, но этот вопрос в данной работе не изучался. Добавление сыворотки к голодавшим клеткам приводит к возрастанию синтеза YB-1 (в 5-6 раз) до уровня синтеза YB-1 даже несколько выше, чем в контрольных клетках (Рис. 7Б, ср. дорожки 2 и 3), что позволяет клеткам восстановить количество YB-1 до изначального уровня. Тотальный белковый синтез при этом слабо увеличивается (гистограмма на рисунке 7Б). Аналогичные результаты были получены и на других клетках – NIH3T3 (см. полный текст диссертации).

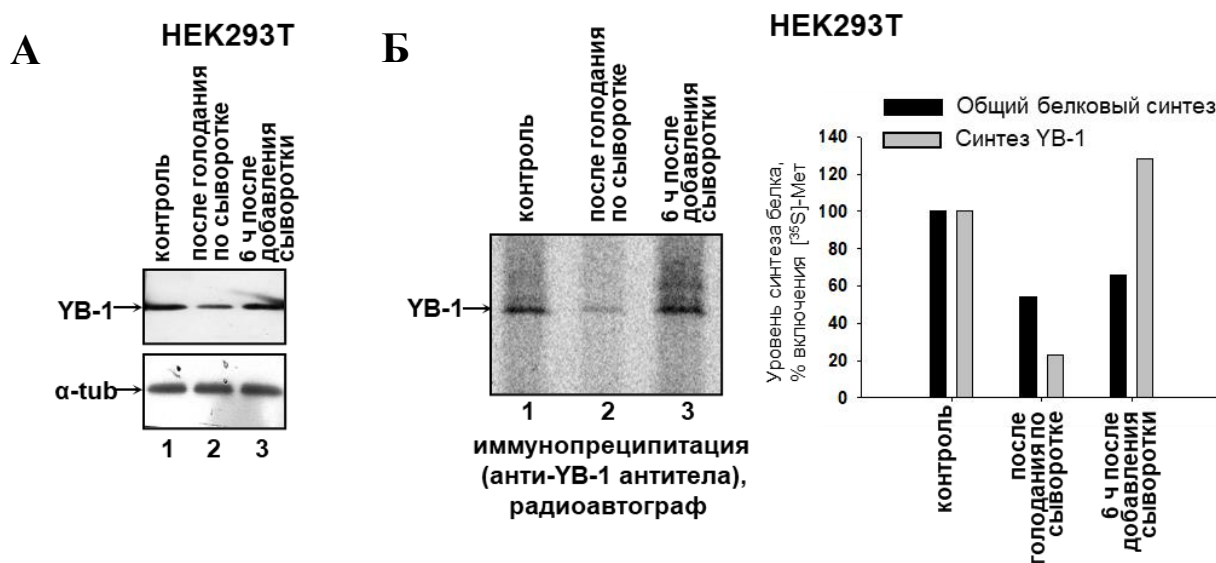


Рисунок 7. Восстановление количества YB-1 и синтеза YB-1 после отмены голодания по сыворотке. А. Клетки HEK293Т культивировали в среде без сыворотки в течение 48 часов. Клетки собирали через указанные промежутки времени после добавления сыворотки, лизировали и анализировали лизаты методом иммуноблоттинга. **Б.** Клетки HEK293Т культивировали в среде без сыворотки в течение 48 часов. В контрольных клетках, лишенных сыворотки клетках и стимулированных сывороткой клетках (6 часов) анализировали уровень синтеза YB-1 методом метаболического мечения белков [³⁵S]-метионином (левая панель). Относительную радиоактивность полос определяли с использованием Packard Cyclone Storage Phosphor System (Packard Instrument Company, Inc.). Уровень синтеза YB-1 в клетках без сывороточного голодания принимали за 100% (правая панель).

Синтез YB-1 зависит от активности mTOR-сигнального каскада

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

Наиболее подходящим кандидатом является mTOR-сигнальный каскад. Ключевым белком этого сигнального пути является киназа mTOR, которая действует как своеобразный сенсор на питательные вещества, факторы роста, стрессовые воздействия. При достаточности ресурсов и в отсутствие стрессов киназа mTOR активирована и фосфорилирует некоторые субстраты, такие как S6-киназа и 4EVP. В

итоге это приводит к повышению уровня белкового синтеза, росту и делению клеток. Интересно также, что mTOR-сигнальный каскад ингибируется при контактном торможении пролиферации.

Возникло предположение, что мРНК *YB-1* относится к набору мРНК, чья трансляция сильно зависит от активности mTOR-сигнального пути. Чтобы это проверить, клетки обрабатывали специфическим ингибитором mTOR-киназы – веществом PP242 в течение 3 часов и исследовали, как это отразится на синтезе YB-1. Оказалось, что PP242 слабо повлиял на включение [³⁵S]-метионина в тотальный белок в клетках HeLa, а синтез YB-1 при этом заметно снизился (Рис 8 А-В). Более того, если использовать другие ингибиторы mTOR-сигнального каскада, то можно увидеть, что вортманнин (ингибитор PI3K, находящейся «наверху» сигнального каскада), как и PP242, ингибирует синтез YB-1 (Рис. 8Б и В). U0126 – ингибитор другого сигнального пути (Erk1/2), одним из последствий активации которого является фосфорилирование eIF4E, eIF4G и последующая стимуляция трансляции, не повлиял на синтез YB-1 (Рис. 8Б и В). Но что особенно интересно, рапамицин, препятствующий фосфорилированию S6 киназы, но слабо действующий на активность 4EBP, не повлиял на синтез YB-1 (Рис. 8Б и В). Следует также отметить, что на тотальный белковый синтез использованные ингибиторы оказывали незначительное действие (Рис. 8А и В).

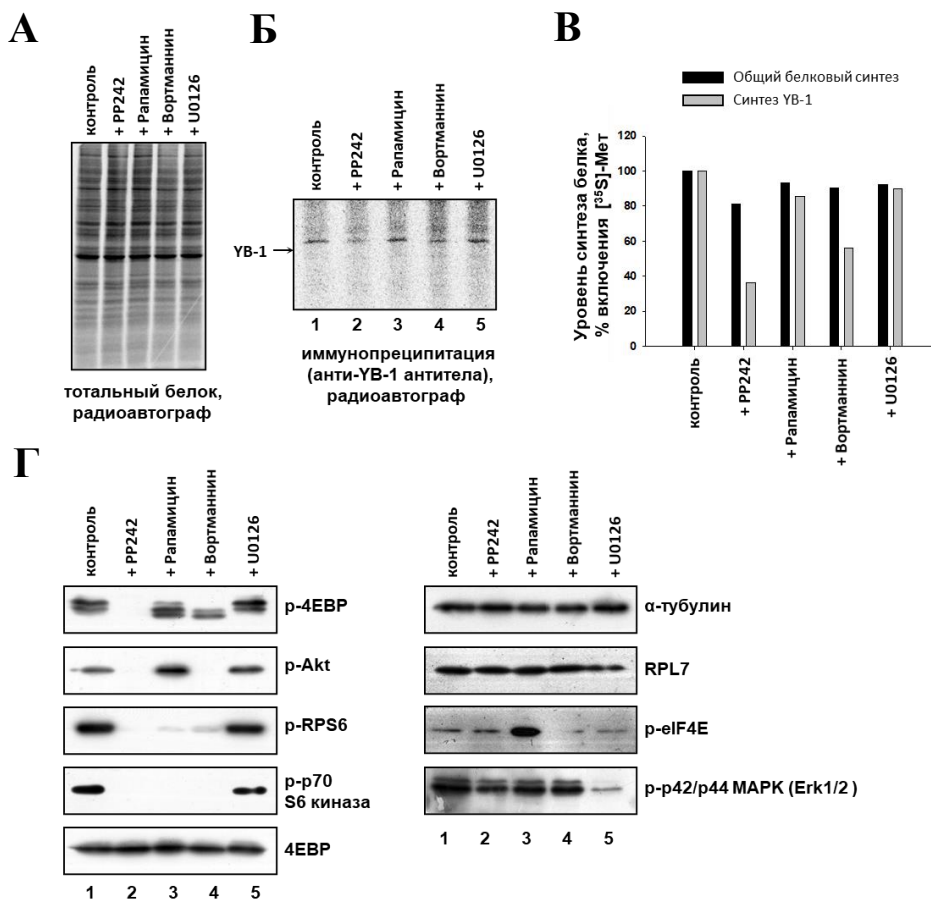


Рисунок 8. Влияние ингибиторов различных клеточных сигнальных путей на синтез YB-1 в клетках. Лизаты клеток HeLa, необработанных (дорожка 1) или обработанных 1 мкМ PP242 (дорожка 2), или 0,1 мкМ рапамицина (дорожка 3), или 0,5 мкМ вортманнина (дорожка 4), или 10 мкМ U0126 (дорожка 5), уравнивали по общему белку и использовали для иммуноблоттинга (Г), автордиографии (А – уровень синтеза тотального белка клеток) или для анализа уровня синтеза YB-1 методом метаболического мечения белков [³⁵S]-метионином (Б). Относительную радиоактивность определяли с использованием Packard Cyclone Storage Phosphor System (Packard Instrument Company, Inc.) (В). Уровень синтеза YB-1 в клетках без обработки ингибиторами принимали за 100%.

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

5'НТО мРНК YB-1 обуславливает чувствительность её трансляции к ингибиторам mTOR

При снижении активности mTOR-сигнального каскада снижается общий уровень белкового синтеза, однако трансляция довольно большого набора мРНК ингибируется при этом значительно сильнее (Thoreen et al., 2017), что обусловлено особенностями 5' НТО этих мРНК.

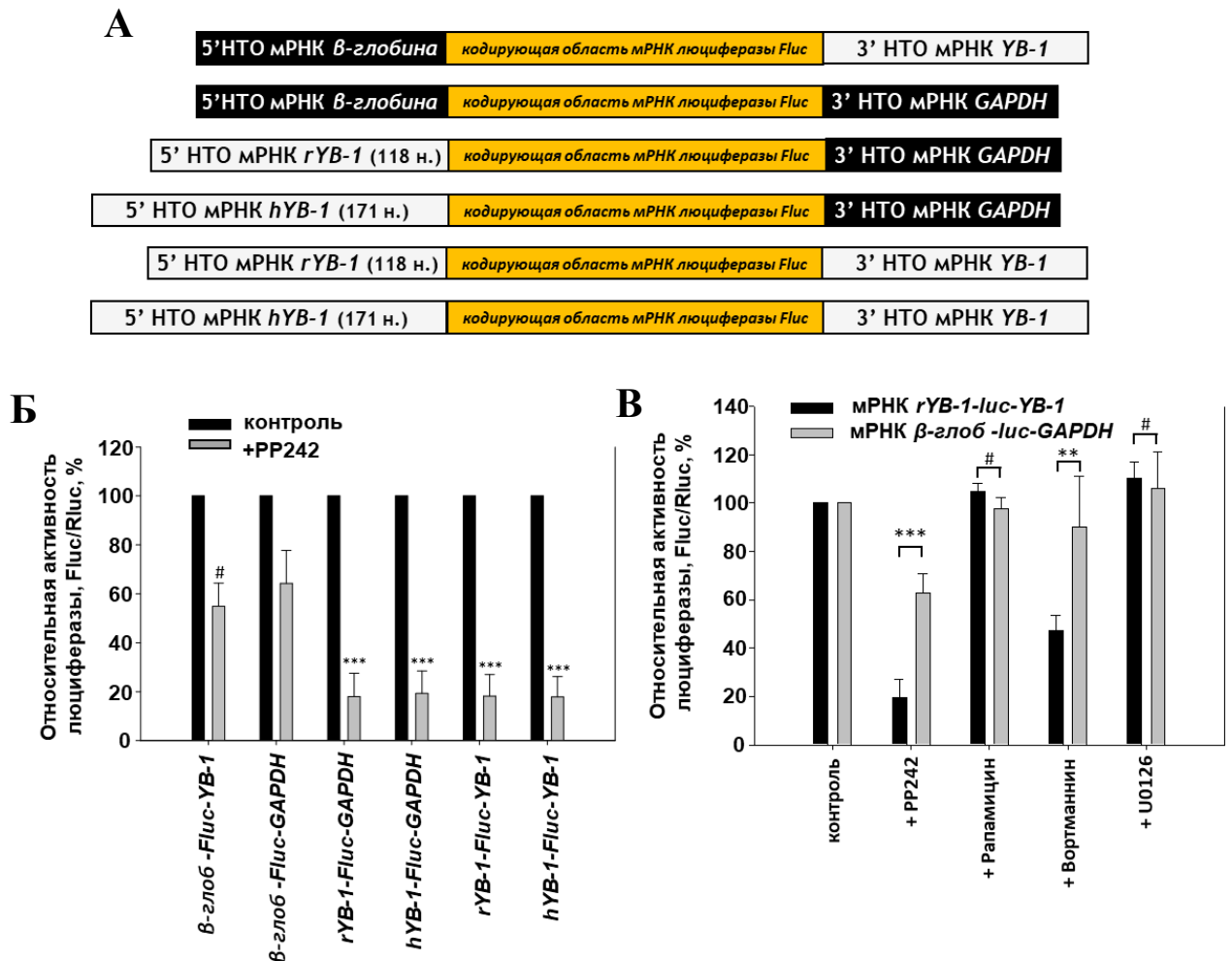


Рисунок 9. Влияние PP242 и других ингибиторов клеточных сигнальных путей на трансляцию репортерной мРНК в клетках. А. Схемы мРНК, используемых в эксперименте. 5'НТО мРНК rYB-1 – 5'НТО мРНК YB-1 кролика (118 нт), 5'НТО мРНК hYB-1 – 5'НТО мРНК YB-1 человека (171 нт), 3'НТО мРНК GAPDH – 3'НТО мРНК глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Б. Необработанные или обработанные PP242 (1 мкМ) клетки HeLa трансфицировали указанными репортерными мРНК люциферазы *Fluc* и мРНК люциферазы *Renilla* (*Rluc* в качестве внутреннего контроля), культивировали в течение 2 часов, собирали и детектировали активность *Fluc* и *Rluc*. В. Необработанные или обработанные PP242 (1 мкМ), или рапамицином (0,1 мкМ), или вортманнином (0,5 мкМ), или U0126 (10 мкМ) клетки HeLa трансфицировали репортерной мРНК *FLuc* с НТО мРНК YB-1 (rYB-1-luc-YB-1) и мРНК *Rluc* (в качестве внутреннего контроля), культивировали в течение 2 часов, собирали и детектировали активность *Fluc* и *Rluc*. На панелях представлено отношение *Fluc/Rluc*. Соотношение *Fluc/Rluc* для контроля (необработанные клетки) принимали за 100%. Значения получены на основании по крайней мере трех независимых экспериментов. Ошибки – 2 стандартных отклонения. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний t-критерий Стьюдента; ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$, # - недостоверно.

В случае мРНК YB-1 зависимость её трансляции от активности mTOR-киназы, по-видимому, также должна обуславливаться 5'НТО. Это было решено проверить с помощью репортерной мРНК, кодирующей люциферазу светлячка (Firefly luciferase, *Fluc*) и обладающей 5'НТО и/или 3'НТО из мРНК

YB-1. Согласно базе данных NCBI, 5'НТО мРНК *YB-1* может содержать от 118 до 171 нуклеотидов. Было использовано 2 варианта этого 5'НТО: один минимальной длины - от мРНК кролика (118 н., (NM_001082785.1)) и другой максимальной длины - от мРНК человека (171 н., (NM_004559.3)).

Этими мРНК или контрольной мРНК люциферазы *Fluc* с другими 5' и 3' нетранслируемыми областями (Рис. 9А) трансфицировали клетки HeLa, предварительно обработанные ингибитором mTOR – PP242, и измеряли активности люциферазы *Fluc*. Как видно на рисунке 9Б, ингибитор mTOR селективно ингибировал трансляцию репортерных мРНК, содержащих 5'НТО кроличьей или человеческой мРНК *YB-1*, но не контрольные репортерные мРНК, содержащие либо оба контрольных НТО (из мРНК β -глобина и мРНК *GAPDH*), либо 3'НТО мРНК *YB-1*. Вортманнин, также как и PP242, сильно и селективно ингибировал трансляцию репортерной мРНК *Fluc* с 5'- и 3'НТО кроличьей мРНК *YB-1* (Рис. 9В). Этот результат полностью согласуется с результатами, полученными при исследовании синтеза эндогенного YB-1 (Рис. 8).

Эффект 4EBP1 на трансляцию репортерной мРНК с 5'НТО мРНК *YB-1*

Согласно литературным данным, чувствительность мРНК к ингибированию mTOR опосредована 4EBP (Thoreen et al., 2012). В пользу этого также говорит тот факт, что синтез YB-1 и трансляция репортерной мРНК с 5' НТО мРНК *YB-1* подавляются PP242, но не рапамицином (Рис. 8Б, 9В). Возникает вопрос, достаточно ли одного 4EBP1 для ингибирования трансляции мРНК *YB-1*.

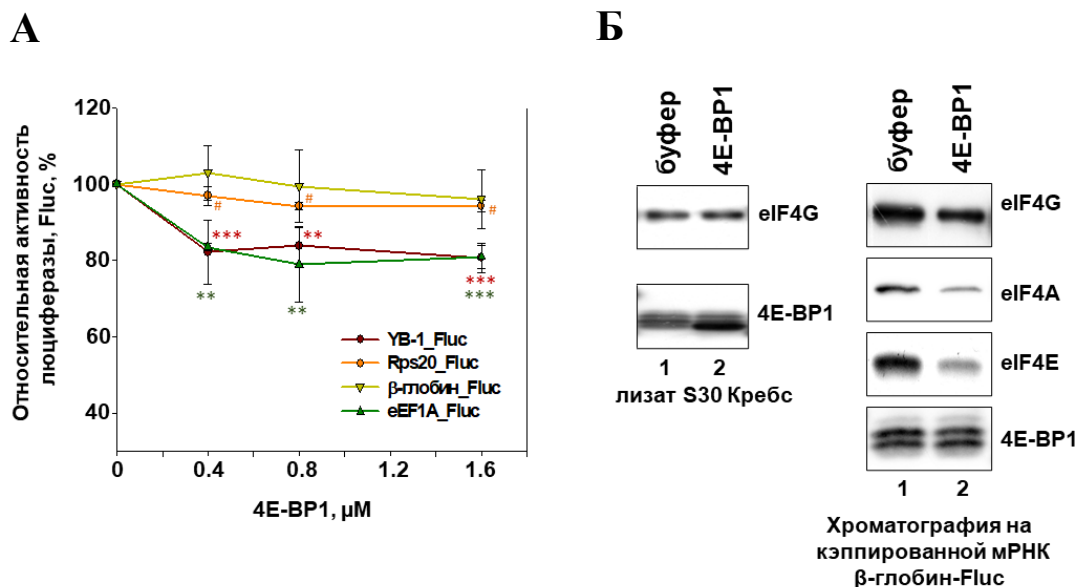


Рисунок 10. Влияние 4EBP1 на трансляцию репортерных мРНК в бесклеточной системе трансляции. А. 0,1 пмоль K+A+ репортерной мРНК *Fluc* с указанными 5'НТО транслировали в экстракте клеток асцитной опухоли Krebs-2 в присутствии возрастающих количеств рекомбинантного 4EBP1 (0,4, 0,8 и 1,6 пмоль) или без него. Активность *Fluc* в реакционной смеси анализировали после 45 мин инкубации при 30 °С. Активность *Fluc* без добавления 4EBP1 принимали за 100%. Значения получены на основании по крайней мере трех независимых экспериментов. Ошибки – 2 стандартных отклонения. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний t-критерий Стьюдента; ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$, # - недостоверно. Сравнение проводилось с активностью люциферазы, синтезируемой с мРНК β -глоб_*Fluc*. **Б.** Левая панель – трансляционную смесь с добавлением 4EBP1 (1,6 µM) или без него анализировали методом иммуноблоттинга; правая панель – биотинилированную, кэпированную мРНК *Fluc* с 5'НТО мРНК β -глобина (0,1 пмоль) инкубировали в 10 мкл реакционной смеси для трансляции (экстракт клеток Krebs-2) с 4EBP1 (1,6 µM) или без него и иммобилизовали на стрептавидин-сефарозе. Связанные с мРНК белки элюировали, разделяли с помощью ДСН-гель-электрофореза и анализировали методом иммуноблоттинга с помощью антител против указанных факторов инициации трансляции.

Как видно на рисунке 10А, добавление 4ЕВР1 (синтезированного в *E.coli* и следовательно нефосфорилированного) в систему трансляции на основе экстракта клеток Кребс-2 приводило к несколько большему снижению трансляции репортерной мРНК с лидерами мРНК *YB-1* и *eEF1A* по сравнению с контрольными mTOR-нечувствительными мРНК. Однако ингибиторный эффект 4ЕВР1 был весьма скромным и достигал лишь 20% даже в случае mTOR-чувствительных мРНК, что резко отличается от картины ингибирования трансляции репортерных мРНК в клетках HeLa при подавлении mTOR и в БСТ при добавлении ингибиторов кэп-зависимой инициации трансляции.

Кроме того, на рисунке 10Б видно, что рекомбинантный 4ЕВР1, в наибольшей концентрации добавленный к системе трансляции, вызывал значительное снижение связывания факторов инициации 4F-группы даже в случае мРНК люциферазы, содержащей 5'НТО из мРНК β -глобина (Рис. 10Б). Тем не менее, трансляция этой мРНК фактически не подавлялась. Возможно, причина незначительного эффекта 4ЕВР1 заключалась в том, что изначально в экстракте клеток асцитной опухоли Кребс-2 была высока доля гипофосфорилированного 4ЕВР (преобладание нижних полос на иммуноблоте на рисунке 10Б, левая панель, дорожка 1), и инициация трансляции уже была несколько подавлена.

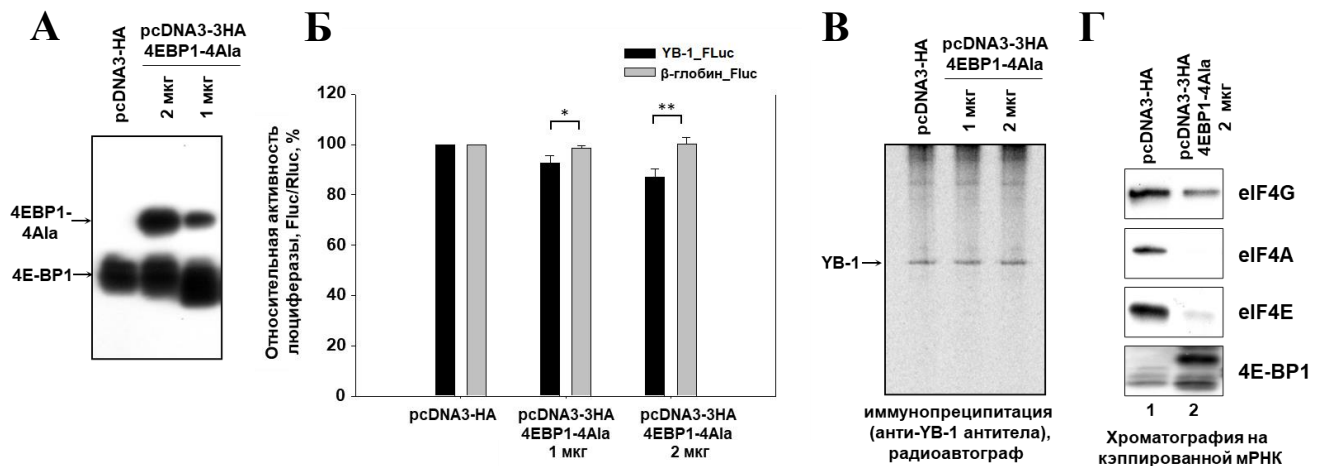


Рисунок 11. Влияние 4ЕВР-4Ala на трансляцию репортерных мРНК и на синтез YB-1 в клетках HeLa. А. Клетки HeLa трансфицировали 1 или 2 мкг плазмиды pcDNA3-3HA-4EBP1-4Ala или 2 мкг pcDNA3-HA (в качестве контроля), культивировали в течение 36 ч. Лизаты клеток анализировали методом иммуноблоттинга с антителами против 4ЕВР1. **Б.** Клетки HeLa, экспрессирующие или не экспрессирующие 4ЕВР1-4Ala, трансфицировали репортерными мРНК *Fluc* с 5'НТО мРНК *YB-1* или мРНК β -глобина и мРНК *Rluc* (в качестве внутреннего контроля), культивировали 2 часа, собирали и детектировали активность *Fluc* и *Rluc*. Соотношение *FLuc*/*RLuc* для контроля (трансфекция pcDNA3-HA) принимали за 100%. Значения получены на основании по крайней мере трех независимых экспериментов. Ошибки – 2 стандартных отклонения. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний t-критерий Стьюдента; * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$. **В.** Лизаты клеток HeLa, экспрессирующих или не экспрессирующих 4ЕВР1-4Ala, уравнивали по общему белку и использовали для анализа уровня синтеза YB-1 методом метаболического мечения белков [35 S]-метионином с последующей иммунопреципитацией антителами против YB-1, разделением белков электрофорезом в кислотном мочевином ПААГ и автордиографией. **Г.** Бiotинилированную, кэпированную мРНК *Fluc* с 5'НТО мРНК *YB-1* (0,32 пмоль) инкубировали со 150 мкл лизата клеток HeLa, экспрессирующих или не экспрессирующих 4ЕВР-4Ala, и иммобилизовали на стрептавидин-сефарозе. Белки, связавшиеся с РНК, элюировали, разделяли с помощью ДСН-гель-электрофореза и анализировали методом иммуноблоттинга.

Далее были проведены эксперименты на клетках HeLa как на более приближенной к реальности системе для изучения влияния 4ЕВР1 на трансляцию репортерных мРНК. Экспрессия в клетках HeLa нефосфорилируемого варианта 4ЕВР1 (4ЕВР1-4Ala) на уровне, сопоставимом с уровнем эндогенного

4EBP1 (Рис. 11А), не привела ни к сколько-нибудь значительному ингибированию трансляции репортерной мРНК люциферазы с 5' лидером мРНК *УВ-1* (Рис. 11Б), ни к ингибированию синтеза эндогенного белка *УВ-1* (Рис. 11В).

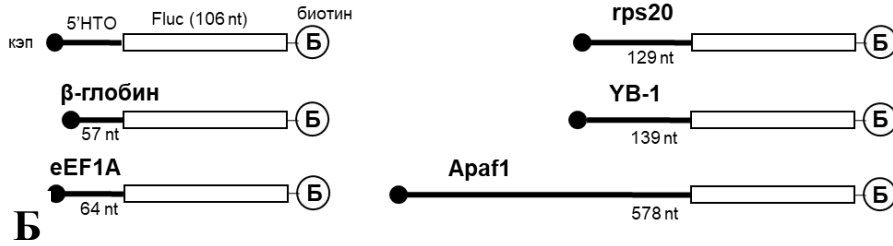
Данные результаты поставили вопрос об ингибиторной активности экспрессируемого клетками белка 4EBP1-4A1a. Однако на рисунке 14Г видно, что 4EBP1-4A1a эффективно связывается с кэпированной биотинилированной репортерной мРНК, несущей 5'НТО мРНК *УВ-1*. Это связывание, вероятно, вызвано взаимодействием 4EBP1-4A1a с eIF4E, связанным с кэп-структурой мРНК. Но самое важное, это связывание предотвращает взаимодействие между eIF4E и eIF4G-eIF4A (Рис. 11Г), что говорит о том, что экспрессированный 4EBP1-4A1a действительно действует как ингибитор трансляции.

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

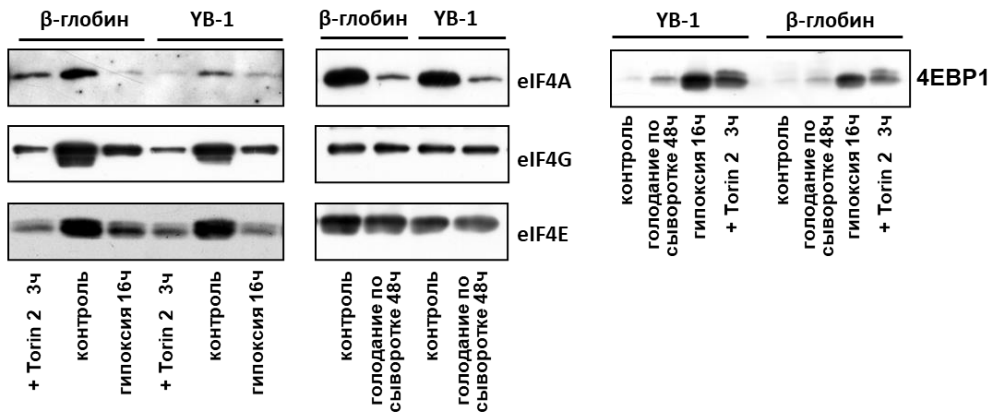
Считается, что при ингибировании mTOR-киназы подавляется в первую очередь кэп-зависимая трансляция (Thoreen et al., 2017). Это означает, что трансляция мРНК *УВ-1* и подобных ей мРНК будет более чувствительна к ингибированию кэп-зависимой трансляции, то есть более зависима от факторов инициации группы 4F. В этой связи важно было исследовать, как изменяется при подавлении активности mTOR-киназы связывание канонических факторов инициации трансляции (4E, 4A и 4G) с кэпированными мРНК, обладающих различной чувствительностью к ингибиторам mTOR.

Для этого фрагменты мРНК *Fluc* с различными 5'НТО (Рис. 12А) были биотинилированы, кэпированы и использованы для выделения белков из лизатов клеток HeLa, выращенных в нормальных условиях, в условиях голодания по сыворотке (48 часов), в условиях гипоксии (1% O₂, 16 часов) или обработанных Torin 2. Все эти обработки напрямую или косвенно влияют на активность mTOR-киназы. Белки, связавшиеся с РНК, элюировали и анализировали методом иммуноблоттинга на присутствие факторов инициации трансляции 4E, 4G, 4A и белка 4EBP1. Как видно на рисунках 12Б и 12В, eIF4A, eIF4E и eIF4G связываются со всеми использованными кэпированными фрагментами с 5'НТО в экспериментах с контрольным лизатом. В то же время 4EBP1, как и ожидалось, практически не взаимодействует с РНК. В лизатах, обработанных ингибитором mTOR Torin 2, связывание факторов инициации трансляции снижалось, а связывание 4E-связывающего белка заметно возрастало. Таким образом, при ингибировании mTOR наблюдается снижение связывания eIF4E с кэпированной матрицей, а также возрастание связывания 4EBP1 с оставшимся на кэп-структуре eIF4E, который, вероятно, препятствует связыванию eIF4G. Связывание eIF4A может падать как за счет уменьшения связывания eIF4G, так и по PDCD4-опосредованному механизму. Белок PDCD4 (Programmed Cell Death 4) является ингибитором eIF4A (предотвращает связывание с РНК), но при активации mTOR-киназы он фосфорилируется и перестает связываться с eIF4A. Нужно отметить, что eIF4A может действовать не только в составе комплекса eIF4F, но и отдельно от него, как многие РНК-хеликазы, и соответственно влиять на трансляцию определенного набора мРНК.

A



B



B

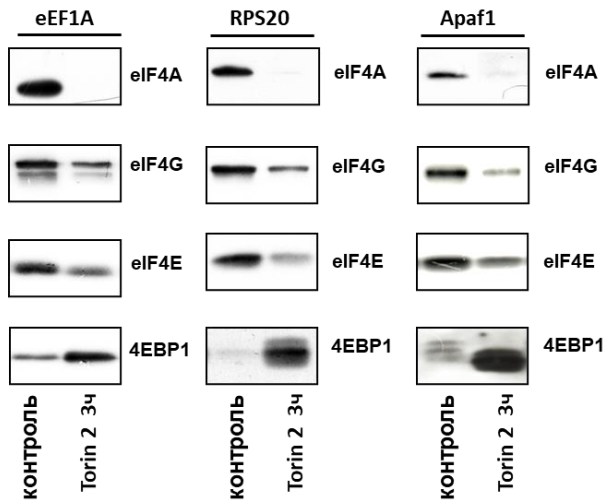


Рисунок 12. Связывание факторов инициации трансляции 4 группы с 5'НТО различных мРНК в лизатах клеток HeLa, обработанных ингибиторами mTOR или подвергшихся сывороточному голоданию или гипоксии. **А.** Схема фрагментов, использованных в эксперименте. Фрагменты РНК, содержащие указанные 5'НТО и 106-нуклеотидную последовательность кодирующей области мРНК *Fluc*, были 3'-биотинилированы и 5'-кэпированы. **Б-В.** Биотинилированные, кэпированные фрагменты РНК (по 2 пмоль) иммобилизовали на стрептавидин-сефарозе и инкубировали с лизатами клеток HeLa, выращенных в различных условиях. Связавшиеся с РНК белки элюировали, разделяли с помощью ДСН-гель электрофореза, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и детектировали с использованием соответствующих антител.

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

подвергшихся голоданию по сыворотке, можно было ожидать картины, схожей с ингибированием Torin 2, поскольку считается, что отсутствие факторов роста в конечном итоге отражается на mTOR-сигнальном каскаде. Однако, как видно на рисунке 12Б, драматических изменений в связывании eIF4E, eIF4G и 4EBP1 не происходило, а значительно упало лишь связывание фактора eIF4A. Это, по-видимому, означает, что сывороточное голодание влияет на трансляцию не только, а может и не столько через mTOR-сигнальный каскад. В пользу этого также говорит и то, что при голодании по сыворотке не наблюдается снижение уровня фосфорилирования mTOR-киназы и уровня фосфорилирования 4EBP (см. полный текст диссертации).

Важно отметить, что изменения в связывании факторов группы eIF4 и 4EBP1 были одинаковы как для мРНК, трансляция которых подавляется при ингибировании mTOR (мРНК с лидерами мРНК *YB-1*, *eEF1A*), так и тех мРНК, трансляция которых слабо реагирует на ингибирование mTOR (мРНК с лидерами мРНК *β -глобина*, *Rps20*, *Araf1*). Это может означать, что ингибирование активности mTOR одинаково снижает связывание канонических факторов инициации трансляции с любой мРНК, однако для некоторой группы мРНК это снижение драматически влияет на трансляцию, а для другой нет. Возможно, менее чувствительные к ингибиторам mTOR мРНК способны использовать альтернативные механизмы инициации, при которых достаточно низких количеств канонических факторов трансляции или эти факторы заменяются иными участниками инициации, недоступными для мРНК, чувствительных к ингибиторам mTOR.

Возникает противоречие: ингибиторы mTOR-сигнального каскада подавляют трансляцию мРНК *YB-1* и репортерной мРНК с лидерами мРНК *YB-1*, но при этом основная мишень этого каскада – 4EBP – не играет в этом существенной роли.

Простейшее объяснение этого противоречия заключается в том, что ингибиторы mTOR-киназы оказывают более широкое воздействие на аппарат трансляции, которое затрагивает не только канонические факторы инициации трансляции, входящие в состав комплекса eIF4F. Ингибирование связывания 4E с мРНК при оверэкспрессии 4EBP-4Ala оказывает слабое воздействие на общую трансляцию и на трансляцию мРНК *YB-1* в частности, поскольку действует только на этот фактор трансляции и на соответствующий ему путь инициации трансляции.

В совокупности это говорит о том, что и в случае снижения активности eIF4E, клетки способны поддерживать нормальный уровень инициации трансляции. По какому механизму это происходит, сказать трудно. Это может быть кэп-зависимый механизм, для которого необходимы другие кэп-связывающие белки, хотя сказать что это за белки сложно. В основном белки, связывающие кэп (4E-H, LARP1), участвуют в подавлении трансляции. Впрочем, существуют данные о том, что субъединица фактора инициации трансляции eIF3 (3d) способна связывать кэп и участвовать в инициации трансляции некоторых мРНК без привлечения eIF4F (Lee et al., 2016). Не стоит сбрасывать со счетов и гомологи eIF4E - eIF4E2 и eIF4E3, которые не связывают фактор eIF4G и, вероятно, иначе участвуют в инициации трансляции. Возможен механизм 5'-конец-мРНК-зависимый, но вовсе не зависящий от кэп-структуры,

для которого могут быть необходимы РНК-хеликазы, в том числе свободный фактор eIF4A (не в комплексе eIF4F), или требоваться не eIF4G1, а его гомолог eIF4G2 (DAP5).

Однако в любом случае важно, что ингибиторы mTOR-киназы способны подавлять и эти механизмы. И поэтому Toin 2 или PP242 ингибируют трансляцию мРНК *YB-1* и подобных мРНК, а 4ЕРВ-4А1а - нет. При этом другие (большинство) мРНК менее чувствительны и к ингибиторам mTOR, и к ингибиторам кэп-зависимой трансляции, поскольку могут нуждаться в меньшем количестве канонических факторов инициации трансляции или использовать другие механизмы инициации трансляции, менее зависящие от активности mTOR.

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

Предпосылками к этой части работы послужили несколько противоречий относительно длины 5' НТО мРНК *YB-1* в публикациях (см. полный текст диссертации), в связи с чем необходимо было выяснить, какова длина 5' НТО мРНК *YB-1* в клетках. Несколькими методами было показано, что длина 5' НТО мРНК *YB-1* различных линий клеток и организмов не имеет заметных отличий и составляет примерно 140 н. База данных GenBank, по-видимому, содержит неполноразмерную мРНК *YB-1* кролика (NM_001082785.1) с укороченной 5' НТО. Возникает вопрос, как транслируется такая мРНК *YB-1* в бесклеточной системе трансляции и отличается ли эффективность её трансляции по сравнению с трансляцией мРНК *YB-1* с укороченной 5' НТО.

Кэпированные мРНК *YB-1* с 5' НТО 103 н. и 140 н. транслировали в БСТ на основе лизата ретикулоцитов кролика в присутствии [³⁵S]-метионина. В БСТ синтез основного продукта (белка YB-1) идёт с обеих форм мРНК *YB-1* (Рис. 13А). Однако при этом выяснилось, что как с укороченной, так и с полноразмерной мРНК *YB-1* синтезируется дополнительный продукт, имеющий меньшую электрофоретическую подвижность (отмечен звездочкой). Доля этого продукта от основного составляет примерно 5 %. Следует отметить, что в некоторых клеточных лизатах с помощью высокоспецифичных антител против С-концевого пептида YB-1 помимо основной формы белка YB-1 можно детектировать белок с электрофоретической подвижностью около 60 кДа, соответствующий минорному продукту трансляции мРНК *YB-1* в БСТ (Рис. 13Б).

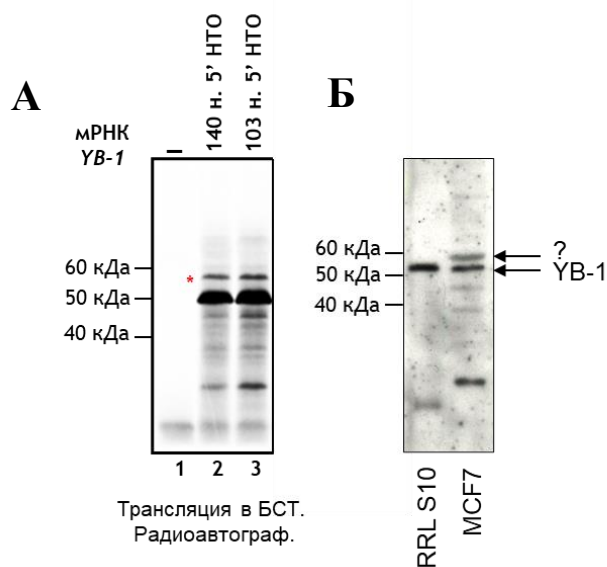
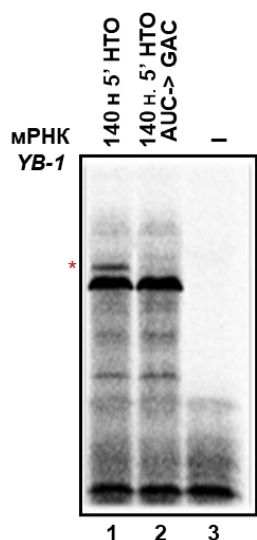


Рисунок 13. Трансляция мРНК *YB-1* с полноразмерной и укороченной 5' НТО в бесклеточной системе трансляции. **А.** 0,1 пмоль K⁺A⁺ мРНК *YB-1* с 5' НТО длиной 140 н., дорожка 2) или 103 н. (дорожка 3), транслировали в бесклеточной системе трансляции на основе лизата ретикулоцитов кролика в присутствии [³⁵S]-метионина. [³⁵S]-меченные продукты трансляции разделяли с помощью ДСН-гель-электрофореза и детектировали с помощью автордиографии. Дорожка 1 – система трансляции без экзогенной мРНК. **Б.** Лизат ретикулоцитов кролика или лизат клеток MCF7 анализировали методом иммуноблоттинга с использованием антител против С-концевого пептида YB-1.

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

Наиболее подходящим кодоном оказался кодон AUC в положении $-(60-58)$. Чтобы удостовериться в правильности этого предположения, была получена мРНК *YB-1*, в которой этот кодон был заменен на кодон GAC, и исследована её трансляция. Как видно на рисунке 14, такая замена привела к полному исчезновению дополнительного продукта трансляции мРНК *YB-1* и не повлияла на синтез основного. Таким образом, при трансляции мРНК *YB-1* в клетке наряду с основным продуктом может синтезироваться дополнительный удлиненный с N-конца белок.



Трансляция в БСТ.
Радиоавтограф.

Рисунок 14. Трансляция мРНК *YB-1* с заменой кодона AUC на GAC в положении $-(60-58)$ в 5'НТО в бесклеточной системе трансляции. 0,1 пмоль K+A+ мРНК *YB-1* с 5'НТО длиной 140 н. (WT, дорожка 1) или 5'НТО той же длины, но с заменой AUC→GAC в положении $-(60-58)$ (дорожка 2) транслировали в бесклеточной системе трансляции на основе лизата ретикулоцитов кролика в присутствии [³⁵S]-метионина. [³⁵S]-меченные продукты трансляции разделяли с помощью ДСН-гель-электрофореза и детектировали с помощью автордиографии. Дорожка 3 – система трансляции без экзогенной мРНК.

Альтернативные формы мРНК *YB-1*

По данным полногеномного анализа сайтов начала транскрипции (TSS) (Kanamori-Katayama et al., 2001), ген *YBX1* имеет альтернативные TSS, два из которых обнаружены в первом интроне *YB-1* в положениях 404 и 547 (относительно начала интрона) (Рис. 15А). мРНК *YB-1*, синтезируемая с этих стартов транскрипции, не содержит первый экзон и находящийся в нём стартовый кодон трансляции. Существование укороченной и полноразмерной форм мРНК *YB-1*, синтезированных с этих TSS, было подтверждено методом ОТ-ПЦР с использованием выделенной из клеток НЕК293Т и МСF7 тотальной РНК и специфичных праймеров (Рис. 15Б и В). Далее было выяснено, что альтернативная мРНК *YB-1* присутствует во фракции полисом, а это указывает на ее вероятную трансляцию в клетках (см. полный текст диссертации).

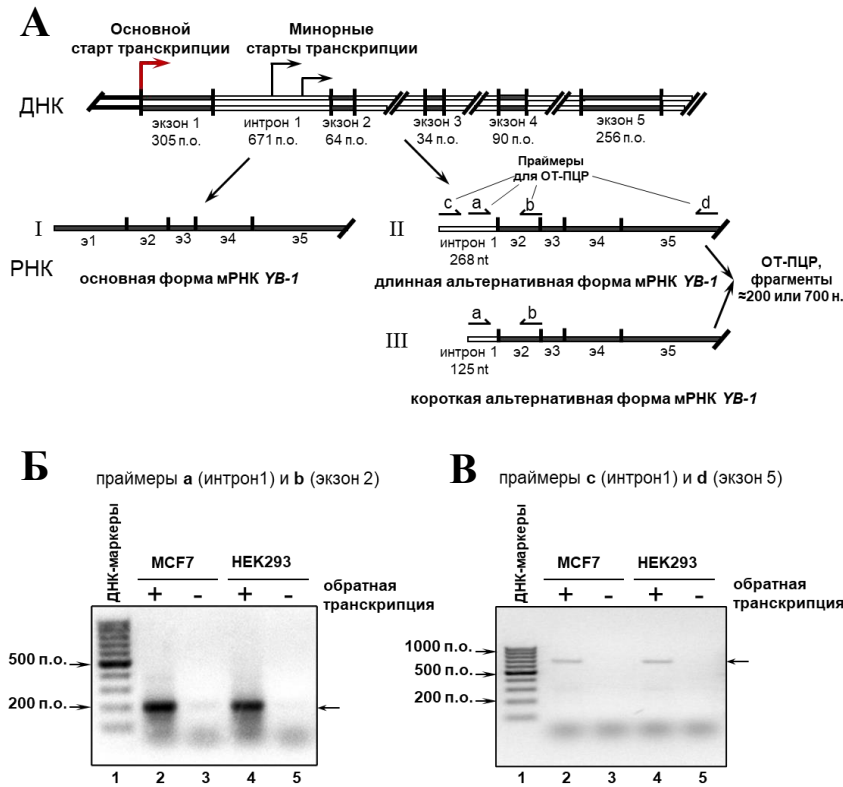


Рисунок 15. Альтернативные формы мРНК *YB-1* детектируются в клетках MCF7 и HEK293T. **А.** Схема предсказанной альтернативной формы мРНК *YB-1*. **Б** и **В.** Тотальная РНК из клеток MCF7 (дорожки 2 и 3) и HEK293T (дорожки 4 и 5) использовали в реакции обратной транскрипции с последующей ПЦР (дорожки 2 и 4) или только в ПЦР (дорожки 3 и 5) с праймерами а и б, специфичными к интрону 1 и экзону 2 гена *YBX1* (**Б**), или праймерами с и д, специфичными к интрону 1 и экзону 5 гена *YBX1* (**В**). Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 2% агарозном геле. Детекцию проводили бромистым этидием. На дорожке 1 показаны маркеры ДНК.

Кроме того, длинную и короткую альтернативные формы мРНК *YB-1* (Рис. 16А) транслировали в бесклеточной системе трансляции. Оказалось, что как длинная, так и короткая форма может транслироваться в БСТ. При этом в обоих случаях синтезируется белок, имеющий электрофоретическую подвижность, соответствующую белку примерно 40 кДа, то есть меньшую, чем обычный белок *YB-1* (Рис. 16Б). Это означает, что стартовый кодон скорее всего находится в пределах части интрона 1 короткой формы альтернативной мРНК *YB-1*. В этой области подходящих канонических стартовых кодонов для синтеза такого длинного продукта нет. Однако есть AUG - в плохом контексте, но в рамке к нему имеется стоп-кодон (Рис. 16В). Чтобы выяснить, на каком кодоне альтернативной формы мРНК *YB-1* может происходить инициация трансляции и образовываться преинициаторный 48S комплекс, был применен метод тупринтинга (toeprinting), который показал (см. полный текст диссертации), что, вероятно, синтез длинного 40 кДа-продукта начинается с одного из двух кодонов (неканонических), находящихся в хорошем козакковском контексте в 3' концевой области интрона, AUC или GUG, в рамке по отношению к остальной части мРНК *YB-1*, начинающейся со 2 экзона (Рис. 16В).

Были получены мутантные альтернативные мРНК *YB-1*, в которых кодон AUG был заменен на AGA, либо стоп-кодон UAG на глутаминовый кодон CAG, либо AUCGUG (наиболее вероятные кодоны старта трансляции) заменены на AUUUUG (Рис. 16В).

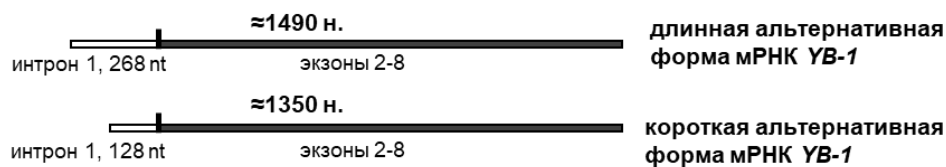
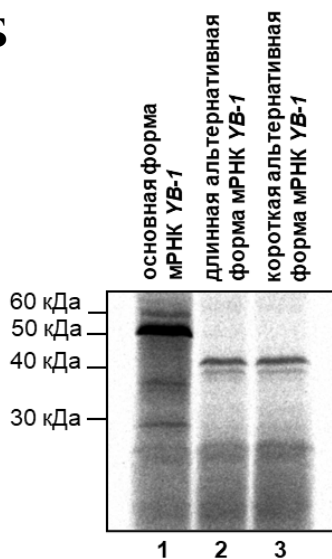
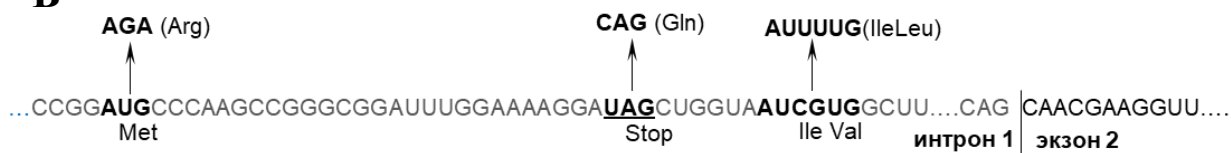
A**Б**

Рисунок 16. Альтернативные мРНК *YB-1* могут транслироваться в бесклеточной системе трансляции.

А. Схема длинной и короткой альтернативных мРНК *YB-1*. **Б.** 0,1 пмоль К+А+ основной формы мРНК *YB-1* с 5'НТО длиной 140 н. (дорожка 1) или длинной альтернативной мРНК *YB-1* (дорожка 2) или короткой альтернативной мРНК *YB-1* (дорожка 3) транслировали в бесклеточной системе на основе ретикулоцитов кролика в присутствии [35 S]-метионина. [35 S]-меченные продукты трансляции разделяли с помощью ДЖ-гель-электрофореза и детектировали с помощью автордиографии. **В.** Схема предполагаемых стартовых и стоп-кодона в интроне 1 альтернативной мРНК *YB-1*, а также мутации в них.

В

Эти мРНК и контрольную альтернативную мРНК *YB-1* без замен транслировали в БСТ (Рис. 17). Согласно результатам этого эксперимента, трансляцию альтернативной мРНК *YB-1* можно описать следующим образом. Сканирующая 40S-субъединица достигает кодона AUG и инициирует синтез полипептида, который останавливается на ближайшем стоп-кодоне UAG. Затем рибосома (или ее субъединица 40S после диссоциации 60S), скорее всего, находит другой близко расположенный стартовый кодон (AUC или GUG) и инициирует синтез альтернативной формы *YB-1*. Нельзя также исключать, что рибосома может пропускать AUG-кодон, поскольку он находится в «слабом» контексте, и инициировать синтез белка сразу с AUC или CUG кодонов.

Таким образом, можно утверждать, что с части интрона 1 синтезируется 10-11 аминокислотный фрагмент, за которым следует последовательность белка *YB-1*, кодируемая частью мРНК *YB-1*, начинающейся со второго экзона, т.е. фактически домен холодового шока и С-концевой домен обычного белка *YB-1*. Интересно, что анализ клеточно-специфической транскрипционной активности, проведенный методами высокопроизводительного секвенирования Консорциумом FANTOM, показал, что интронные старты начала транскрипции (TSS) *YB-1* очень активны в некоторых типах клеток, включая как раковые, так и нормальные клетки. Предположительно, существуют механизмы, регулирующие количество альтернативного *YB-1* в клетке. Однако этот вопрос требует

дополнительного исследования. Так же как вопрос о возможных функциях альтернативных форм белка YB-1.

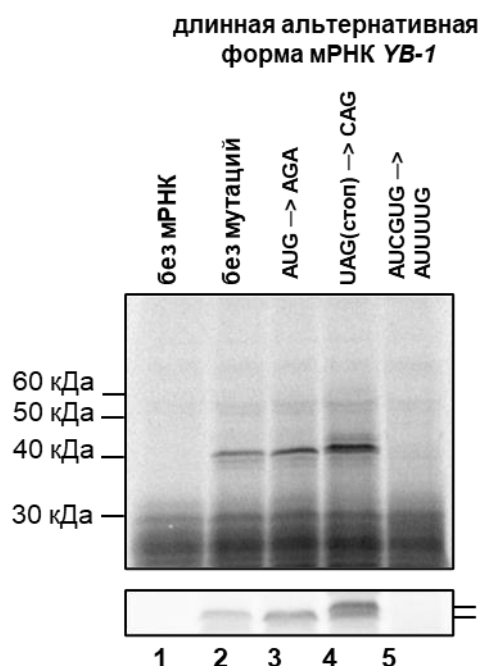


Рисунок 17. Анализ трансляции мутантных форм альтернативной мРНК YB-1. А. 0,1 пмоль K+A+ длинной альтернативной мРНК YB-1 (дорожка 2) или длинной альтернативной мРНК YB-1 с мутацией AUG→AGA (дорожка 3), или мутацией UAG(stop)→CAG (дорожка 4), или AUCGUG →Мутация AUUUUG (дорожка 5) транслировали в бесклеточной системе на основе ретикулоцитов кролика в присутствии [³⁵S]-метионина. [³⁵S]-меченые продукты трансляции разделяли с помощью ДСН-гель-электрофореза и детектировали с помощью автордиографии. На дорожке 1 показана трансляция системы без экзогенной мРНК. На нижней панели показаны те же образцы, но после более длительного электрофореза.

II. ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА БЕЛКА YB-1 НА ТРАНСКРИПТОМ И ТРАНСЛАТОМ КЛЕТОК

На современном этапе исследования функций YB-1 можно утверждать, что этот белок участвует во множестве клеточных процессов, включая пролиферацию, дифференцировку и ответ на стрессовые воздействия. Однако вопрос о том, каким образом, на каких этапах передачи генетической информации действует YB-1, остается дискуссионным.

В этой части диссертационной работы методами высокопроизводительного секвенирования планировалось выяснить изменения в транскриптом и транслятоме клеток HEK293T, а также клеток HEK293T, в которых экспрессия YB-1 выключена с помощью системы редактирования генома CRISPR-Cas9.

1. Влияние оверэкспрессии и нокаута YB-1 на транскриптом и транслятоме клеток HEK293T

В клетках HEK293T YB-1 действует как ингибитор общей трансляции

Одной из многих предполагаемых функций YB-1 является глобальный контроль трансляции. Чтобы выяснить, действительно ли это так для клеточных мРНК, были выполнены эксперименты по рибосомному профилингу (Ribo-Seq), секвенированию РНК (RNA-Seq) и иммунопреципитации мРНК за антитела против YB-1 с последующим высокопроизводительным секвенированием (RIP-Seq) для оценки взаимосвязи между занятостью рибосом (эффективностью трансляции) и эффективностью связывания YB-1 с мРНК в масштабе транскриптома клеток HEK293T (эффективностью иммунопреципитации).

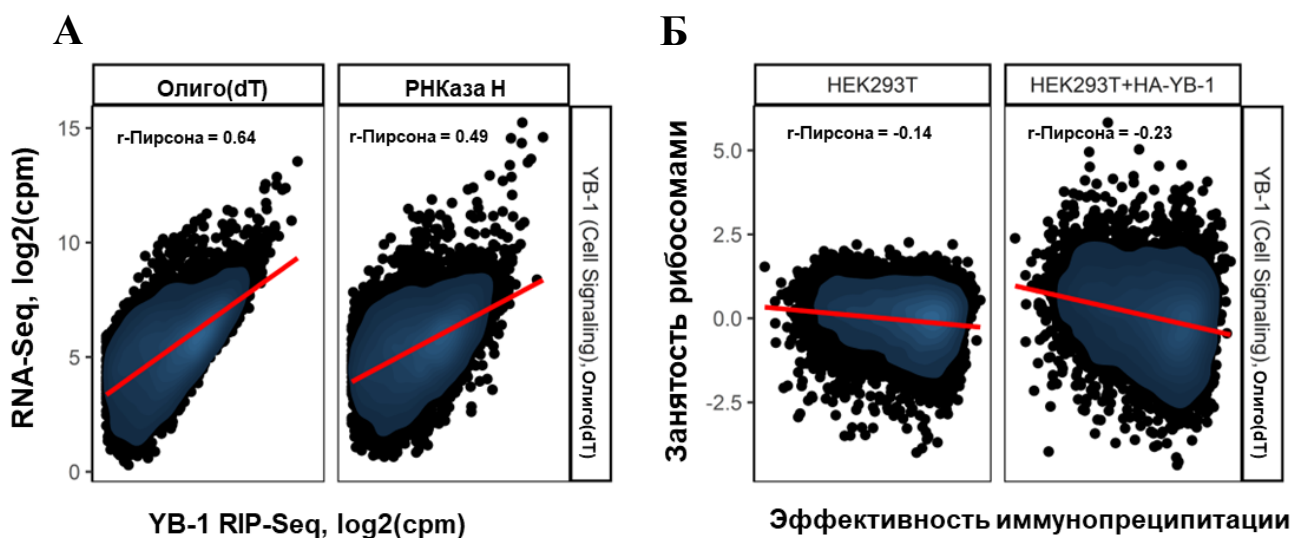


Рисунок 18. YB-1 действует в клетках HEK293T как ингибитор общей трансляции. А. Корреляция между количеством прочтений YB-1-RIP-Seq и RNA-Seq. Эксперимент RIP-Seq проведен с использованием различных способов удаления рРНК (олиго(dT) – очистка от рРНК с помощью олиго(dT) (NEBNext Poly(A) (NEB)), РНКаза Н – с помощью РНКаза Н и олигонуклеотидов, комплементарных рРНК (NEBNext rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) (NEB)). Б. Корреляция между занятостью рибосом в клетках HEK293T (слева, ось Y) или клетках HEK293T, сверхэкспрессирующих YB-1 (справа, ось Y) и эффективностью иммунопреципитации за антитела против YB-1 в клетках HEK293T (ось X). Для каждого гена занятость рибосомами оценивали в кодирующих сегментах, исключая нетранслируемые области. Цвет отражает относительную плотность точек. Показана прямая линейной регрессии и коэффициент корреляции г-Пирсона. Все r значимы (значение $P < 10^{-15}$).

При сопоставимой глубине секвенирования RNA-Seq и RIP-Seq количество прочтений (reads) в них хорошо коррелируют между собой (коэффициент корреляции г-Пирсона от 0,49 до 0,89 в зависимости от антител и протокола удаления рРНК (Рис. 18А, а также см. полный текст диссертации). Для более чем 80% генов экспрессируемые транскрипты обнаруживаются во фракции транскриптома, связанного с YB-1. Таким образом, YB-1 действительно следует рассматривать как универсальный мРНК-ассоциированный белок, способный связывать очень широкий спектр РНК.

Кроме того, сравнивая занятость рибосом и эффективность иммунопреципитации мРНК антителами против YB-1, можно обнаружить значимую отрицательную корреляцию (г-Пирсона = от -0,13 до -0,2, $P < 10^{-15}$), а при сверхэкспрессии *YBX1* даже более сильную зависимость (г-Пирсона = от -0,23 до -0,34, $P < 10^{-15}$) (Рис. 18Б, а также см. полный текст диссертации). Таким образом, YB-1 связывает большую часть транскриптома, и его связывание отрицательно связано с эффективностью трансляции мРНК. Это согласуется с литературными данными, полученными в системе бесклеточной трансляции, где YB-1 способен служить неспецифическим ингибитором трансляции.

При сверхэкспрессии YB-1 транскриптом клеток HEK293T не изменяется.

Данные RNA-Seq, полученные в настоящей работе, указывают на то, что YB-1 влияет на транскрипцию в небольшой степени. В частности, не обнаруживается дифференциально экспрессируемых генов (при FDR 5%) при сверхэкспрессии *YBX1*. Однако можно отметить слабую, но значимую положительную корреляцию (Рис. 19., г-Пирсона = 0,23, $P < 10^{-15}$) между эффективностью иммунопреципитации YB-1 и изменениями в RNA-Seq при сверхэкспрессии *YBX1* в HEK293T.

Такая корреляция между вызванными сверхэкспрессией изменениями в содержании РНК и эффективностью иммунопреципитации косвенно намекает, что YB-1, вероятно, может контролировать стабильность РНК, но не транскрипцию РНК как таковую. Это предположение согласуется с данными о том, что YB-1 может упаковывать и стабилизировать РНК в форме нетранслируемых мРНК (Evdokimova et al., 2001).

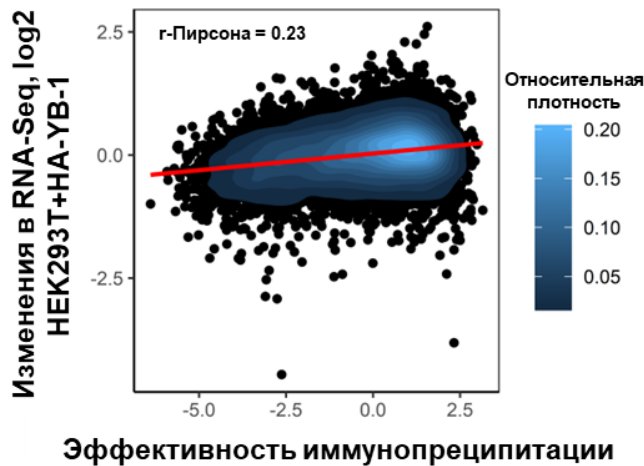
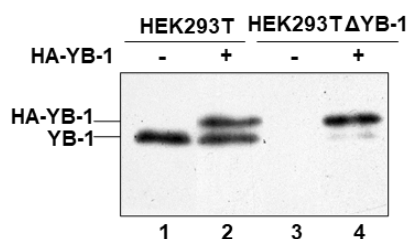


Рисунок 19. Корреляция между изменениями содержания РНК (в клетках HEK293T, сверхэкспрессирующих YB-1, по сравнению с исходными клетками HEK293T) и эффективностью иммунопреципитации YB-1 в HEK293T. Цвет отражает относительную плотность точек. Показана прямая линейной регрессии и коэффициент корреляции г-Пирсона. r значим (значение $P < 10^{-15}$).

Нокаут YBX1 приводит к незначительным изменениям в транслатоме.

Данные высокопроизводительного секвенирования показали, что YB-1 является глобальным ингибитором трансляции. С другой стороны, в работе Lu и соавт. (Lu et al., 2001) анализ уровня тотального белкового синтеза в эмбриональных фибробластах мыши не показал практически никаких изменений при нокауте YBX1. Чтобы прояснить это несоответствие, была создана клеточная линия HEK293TΔYB-1, в которой экспрессия гена *YB-1* была выключена с использованием системы редактирования генома CRISPR/Cas9.

А



Б

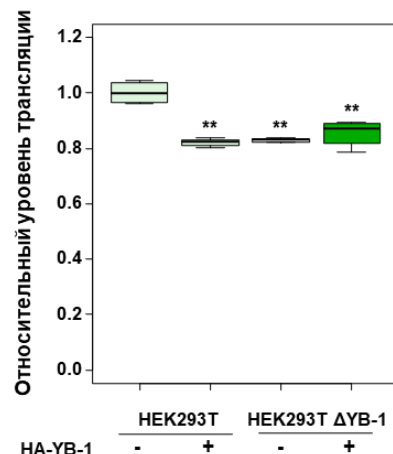


Рисунок 20. Нокаут YBX1 приводит к слабому подавлению глобальной трансляции. **А.** Изменения количества YB-1 в клетках HEK293T и HEK293TΔYB-1 после трансфекции плазмидами pcDNA-HA или pcDNA-HA-YB-1, выявленные методом иммуноблоттинга. **Б.** Общий уровень трансляции в клетках HEK293T и HEK293TΔYB-1, трансфицированных плазмидами pcDNA3-HA или pcDNA3-HA-YB-1 (HA-YB-1), оценивали по включению азидогомоаланина. Ошибки – стандартное отклонение. Для оценки статистической значимости по сравнению с клетками HEK293T, трансфицированными плазмидой pcDNA3-HA, использовали двусторонний t-критерий Стьюдента. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, # – не значимо.

Во-первых, было исследовано влияние нокаута *YBX1* на уровень общей трансляции в клетках НЕК293Т методом метаболического мечения белков аналогом метионина - азидогомоаланином (Рис. 20). Уровень общей трансляции в расчете на клетку в случае нокаута *YBX1* снижается лишь незначительно, примерно на 15%. Экспрессия НА-УВ-1 в клетках НЕК293ТΔУВ-1 повышала уровень трансляции, но только на 5-10% (статистически незначимо). Если рассматривать УВ-1 как глобальный ингибитор трансляции, снижение уровня общей трансляции при нокауте *YBX1* интуитивно противоречиво. Данное наблюдение предполагает наличие некоего сильного компенсаторного механизма, который будет обсуждаться ниже.

При незначительном влиянии нокаута гена *YBX1* на глобальную трансляцию можно ожидать более выраженное изменение трансляции в НЕК293ТΔУВ-1 для конкретных мРНК, чья трансляция сильно зависит от УВ-1. Для того, чтобы это выяснить, был проведен эксперимент по рибосомному профайлингу клеток НЕК293ТΔУВ-1, а его результаты сравнили с аналогичным экспериментом на клетках НЕК293Т.

На рисунке 21А представлена корреляция между изменениями Ribo-Seq и изменениями в RNA-Seq (r -Пирсона = 0,76, $P < 10^{-15}$) в клетках НЕК293ТΔУВ-1. Как видно, она очень сильна, что говорит о том, что в большинстве случаев изменения в занятости рибосомами в клетках НЕК293ТΔУВ-1 обусловлены изменениями в количестве мРНК, а не её транскрируемости. Дальнейший дифференциальный анализ занятости рибосом, направленный на выявление изменений трансляции отдельных транскриптов, не выявил статистически значимых генов после поправки на множественное тестирование. Однако анализ обогащения набора генов к ранжированным спискам генов позволил обнаружить несколько функциональных групп РНК с повышенной занятостью рибосом в клетках НЕК293ТΔУВ-1. В частности, увеличение уровня трансляции было обнаружено для мРНК, связанных с клеточным циклом и клеточным дыханием, что компенсировало снижение количества мРНК (Рис. 21Б). Такая картина была типична для некоторых других важных терминов генной онтологии и функциональных групп.

Однако можно было заметить и иную картину: гены, вовлеченные в ответ клетки на стимуляцию факторами роста, в частности TGF- β , активируются на уровне транскрипции и немного на уровне трансляции. Это представляет особый интерес, поскольку известно, что УВ-1 действует как антагонист в передаче сигналов TGF- β до некоторой степени (Dooley et al., 2006) и, более того, УВ-1 и TGF- β противодействуют друг другу (Fraser et al., 2008). Таким образом, не было обнаружено генов с значимыми изменениями на уровне трансляции, но было обнаружено несколько значимых функциональных групп генов, которые демонстрировали небольшие, но согласованные изменения. Это свидетельствует об активном компенсаторном механизме, активированном в отсутствие УВ-1.

Хотя никакие мРНК не показали статистически значимых изменений уровня трансляции в клетках НЕК293ТΔУВ-1, было замечено несколько так называемых выбросов на диаграмме Volcano (диаграмма зависимости статистической значимости от амплитуды изменения) (Рис. 21В), из которых особое внимание на себя обращает ген *YBX3*, который показал наиболее значимое повышение уровня

трансляции мРНК. В пользу этого говорит и повышение количества белка YB-3 в клетках HEK293TΔYB-1 (Рис. 21Г). YB-3 является гомологом YB-1 и, не исключено, может иметь перекрывающиеся функции с YB-1.

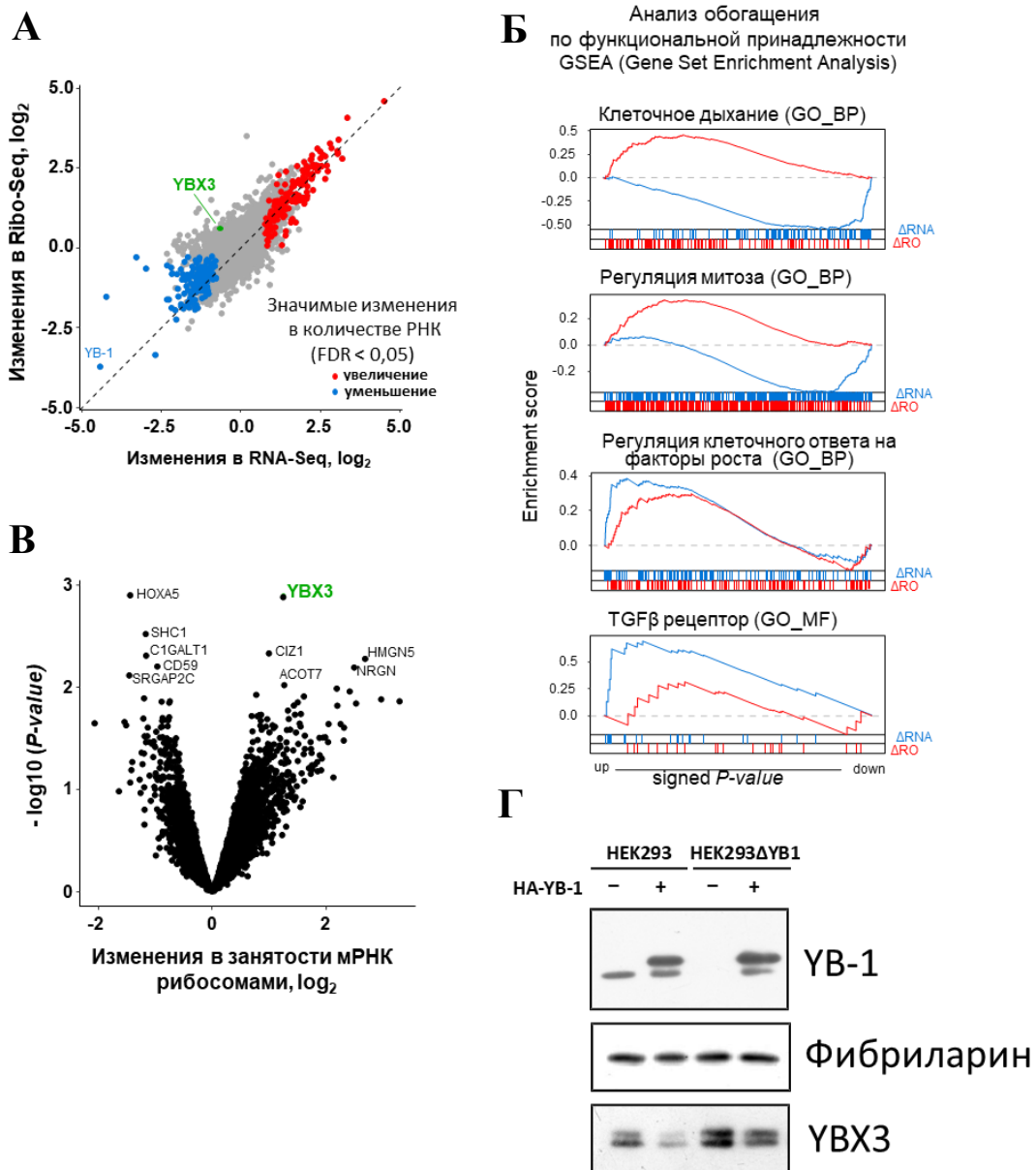


Рисунок 21. Нокаут гена *YBX1* приводит к небольшим изменениям в транскриптом и транслятоме. А. Диаграмма рассеяния изменений количества футпринтов рибосом (Ribo-Seq), построенная в зависимости от содержания РНК (RNA-Seq) в клетках HEK293TΔYB-1 по сравнению с клетками HEK293T. Гены со значительно измененным содержанием РНК (значения P с поправкой на множественное тестирование $< 0,05$) выделены красным (повышенная регуляция) или синим (пониженная регуляция). **Б.** Анализ обогащения набора генов (GSEA) изменений содержания РНК (синяя линия) или занятости рибосом (красная линия). Гены были отсортированы по P -значению слева направо в соответствии с изменениями содержания РНК (Δ RNA, синяя линия) или занятости рибосом (Δ RO, красная линия) в HEK293TΔYB-1 по сравнению с HEK293T. Вертикальные полосы указывают расположение генов из определенной группы генов в отсортированном списке. **В.** Volcano-диаграмма изменений занятости рибосом в клетках HEK293TΔYB-1 по сравнению с HEK293T; *YBX3* выделен зеленым цветом. Гены с значением $P < 0,01$ помечены. **Г.** Анализ лизатов клеток HEK293T и HEK293TΔYB-1, экспрессирующих и не экспрессирующих HA-YB-1 с плазмиды, на количество YB-3 методом иммуноблоттинга. Фибрилларин использовался в качестве контроля.

2. YB-3 заменяет YB-1 в клетках HEK293TΔYB-1 при связывании мРНК

В клетках, нокаутных по гену *YBX1*, можно было ожидать повышенного уровня трансляции мРНК с высокой эффективностью связывания YB-1 и пониженного для других мРНК. Однако наблюдался противоположный эффект, аналогичный эффекту, наблюдаемому в клетках при сверхэкспрессии *YBX1* (Рис. 22), то есть, отрицательная корреляция между эффективностью связывания YB-1 и дифференциальной занятостью рибосом.

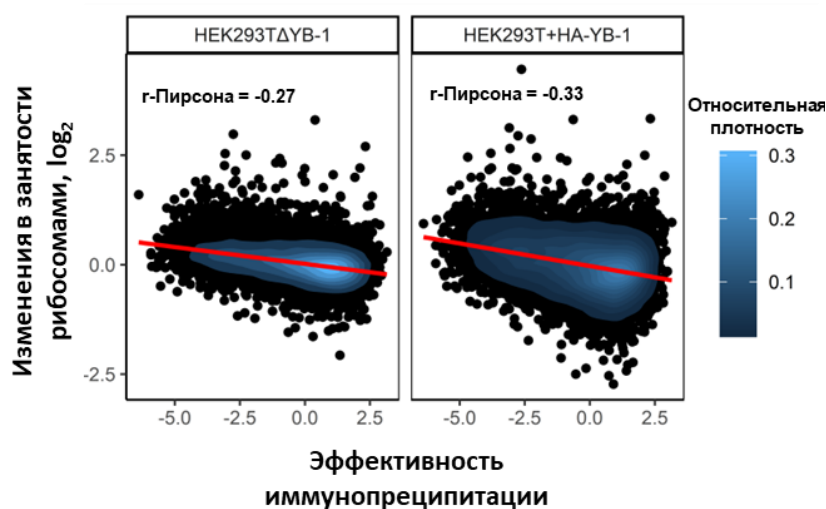


Рисунок 22. Корреляция между изменениями занятости рибосомами в клетках HEK293TΔYB-1 (слева) или клетках HEK293T, сверхэкспрессирующих YB-1 (справа) и эффективностью иммунопреципитации за антитела против YB-1 (по данным, полученным на клетках HEK293T). Цвет отражает относительную плотность точек. Показана прямая линейной регрессии и коэффициент корреляции r -Пирсона. r значим (значение $P < 10^{-15}$).

Было предположено, что данное противоречие возникает из-за повышения синтеза гомолога YB-1 – белка YB-3 – в клетках HEK293TΔYB-1. Белки YB-1 и YB-3 высокогомологичны: они имеют почти идентичные домены холодового шока, неупорядоченные N- и C-концы с аналогичным аминокислотным составом и аналогичное распределение заряженных аминокислотных остатков в C-концевом домене (Eliseeva et al., 2011). Специфическое сродство YB-1 к мРНК, как полагают, определяется доменом холодового шока, и можно ожидать аналогичного набора мРНК, связанных с YB-1 и YB-3, а также сходства функций этих белков. Например, способности YB-3 участвовать в регуляции трансляции мРНК.

Для проверки этого предположения была, во-первых, проведена иммунопреципитация мРНК из клеток HEK293T и HEK293TΔYB-1 с помощью антител против YB-3, а мРНК из иммунопреципитата просеквенирована (RIP-Seq). Действительно, оказалось, что YB-1 и YB-3 имеют очень сходный набор мРНК, с которыми они связываются (Рис. 23А). RIP-Seq YB-3 обнаруживает около 80% транскрибируемых мРНК, при этом эффективность иммунопреципитации YB-3 сильно и положительно коррелирует с эффективностью иммунопреципитации YB-1 (r -Пирсона = 0,9, $P < 10^{-15}$). Интересно, что эффективность связывания YB-3 с мРНК глобально увеличивается в клетках HEK293TΔYB-1 по сравнению с исходными клетками HEK293T (Рис. 23Б).

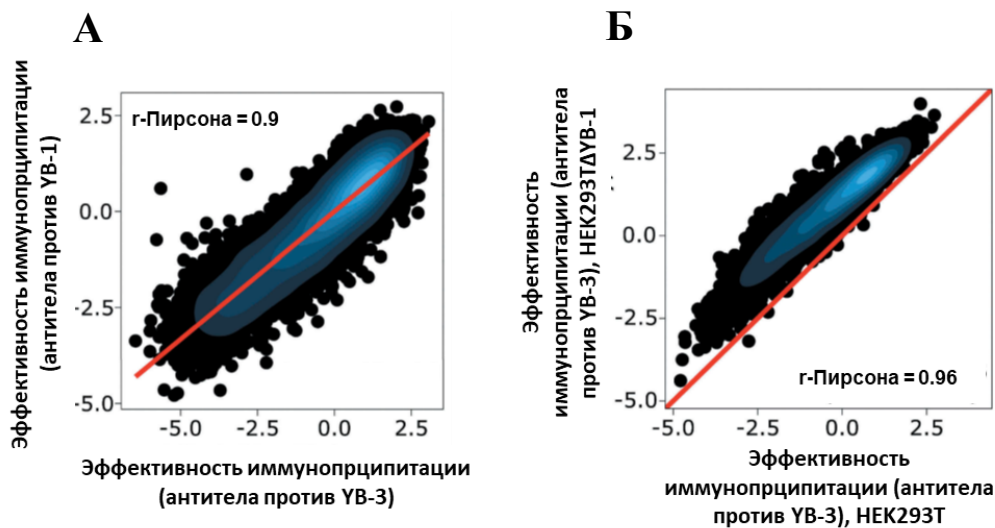


Рисунок 23. YB-3 заменяет YB-1 в связывании с мРНК в клетках HEK293TΔYB-1. **А.** Корреляция между эффективностью иммунопреципитации РНК за антитела против YB-3 и YB-1 в клетках HEK293T. Эксперимент RIP-Seq проведен с двумя антителами против YB-1 и с использованием различных способов удаления рРНК (олиго(dT) – очистка от рРНК с помощью олиго(dT), РНКазы Н – с помощью РНКазы Н и олигонуклеотидов, комплементарных рРНК). Цвет отражает относительную плотность точек. Показана прямая линейной регрессии и коэффициент корреляции г-Пирсона. r значимы (значение $P < 10^{-15}$). **Б.** Корреляция между эффективностью иммунопреципитации РНК за антитела против YB-3 в клетках HEK293T и HEK293TΔYB-1. Цвет отражает относительную плотность точек. Показана прямая линейной регрессии, коэффициент корреляции г-Пирсона и эталонная диагональная линия ($y = x$). r значимы (значение $P < 10^{-15}$).

Во-вторых, сравнение занятости рибосом и эффективности иммунопреципитации YB-3 (Рис. 24А правая панель) показало ту же картину, что и в случае YB-1 – отрицательную корреляцию. Интересно, что в клетках HEK293TΔYB-1 отрицательная корреляция между эффективностью иммунопреципитации YB-3 и занятостью рибосом была даже сильнее, чем в случае клеток с YB-1 (Рис. 24А). Это означает, что YB-3, также как и YB-1, может являться ингибитором трансляции.

Важно также и то, что была обнаружена значительная положительная корреляция при сравнении изменений RNA-Seq и Ribo-Seq при оверэкспрессии *YBX1* и нокауте *YBX1*, оцениваемых относительно HEK293T (r -Пирсона = 0,39 и 0,35, $P < 10^{-15}$) (Рис. 24Б). Корреляция еще выше для изменений занятости рибосом (r -Пирсона = 0,59, $P < 10^{-15}$) (Рис. 24Б). Эти данные указывают на то, что клетки с нокаутом по гену *YBX1* имеют молекулярный фенотип, сходный с фенотипом клеток, оверэкспрессирующих YB-1. Вероятно, в отсутствие регуляции синтеза YB-3 белком YB-1 в клетках HEK293TΔYB-1 достигается избыточная экспрессия *YBX3*, что может быть причиной глобального снижения трансляции в клетках HEK293TΔYB-1.

Чтобы подтвердить это предположение, в клетках HEK293T был оверэкспрессирован с плазмиды ген *YBX3*. Оказалось, что это приводит к общему снижению белкового синтеза примерно в той же степени, что и оверэкспрессия YB-1 (Рис. 24В,Г).

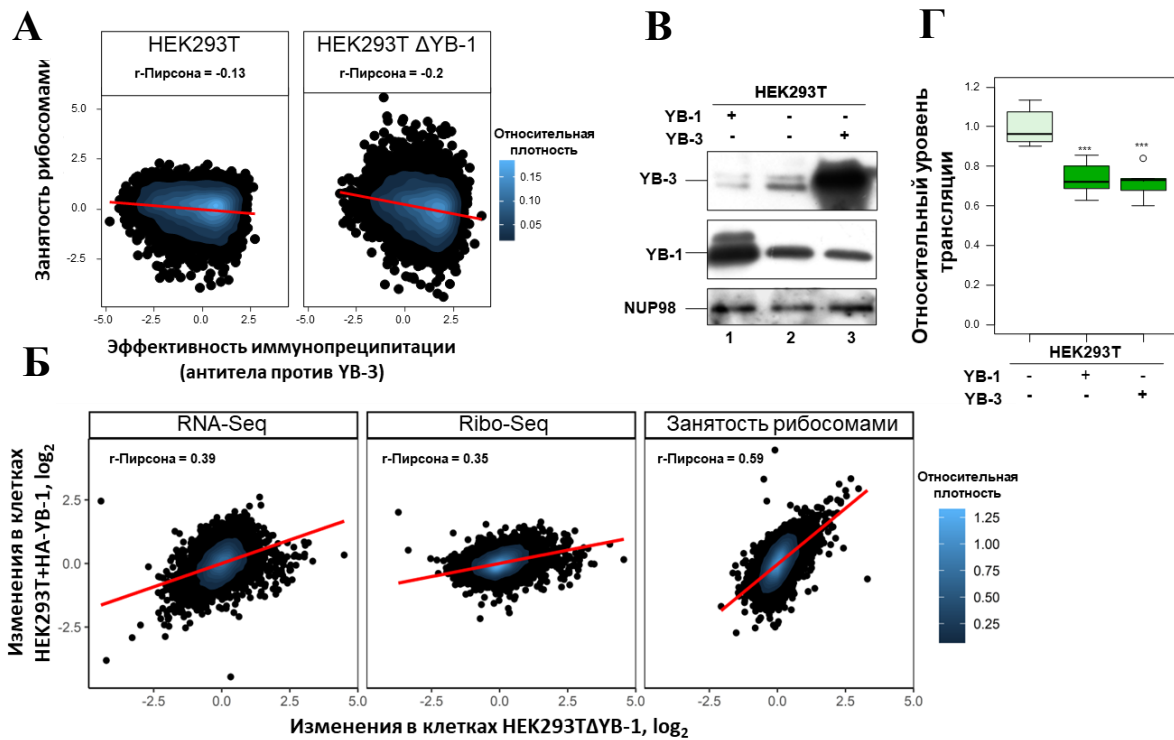


Рисунок 24. YB-3, как и YB-1, является ингибитором общей трансляции. А. Корреляция между занятостью рибосомами (ось Y) и эффективностью иммунопреципитации мРНК за антитела против YB-3 в клетках HEK293T (слева) и HEK293T Δ YB-1 (справа). Для каждого гена оценивалась занятость рибосомами в кодирующих областях (т.е., исключая НТО). Цвет отражает относительную плотность точек. Показана прямая линейной регрессии и коэффициент корреляции r -Пирсона. r значим (значение $P < 10^{-15}$). Б. Корреляция изменений (относительно клеток HEK293T) содержания РНК (RNA-Seq, слева), количества футпринтов рибосом (Ribo-Seq, в центре) или занятости рибосомами (справа) между клетками HEK293T Δ YB-1 и HEK293T+NA-YB-1. Цвет отражает относительную плотность точек. Показана прямая линейной регрессии и коэффициент корреляции r -Пирсона. r значим (значение $P < 10^{-15}$). В. Изменения в количестве YB-1 и YB-3 в клетках HEK293T после оверэкспрессии YB-1 или YB-3 с плазмиды, проанализированные методом иммуноблоттинга. NUP98 использовали в качестве контроля на нагрузку. Г. Общий уровень трансляции в клетках HEK293T, трансфицированных либо пустым вектором pcDNA3.1-puro, либо pcDNA3.1-puro-YB-1 (YB-1), либо pcDNA3.1-puro-YB-3 (YB-3), определенный по включению азидогомоаланина. Ошибки – стандартное отклонение. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний t-критерий Стьюдента. *** $p < 0,001$.

3. Регуляция синтеза YB-3 при участии YB-1

На следующем этапе исследований было решено сосредоточиться на более подробном изучении механизма регуляции синтеза YB-3 при участии YB-1. И по данным Ribo-Seq, и по данным анализа распределения мРНК между фракциями свободных и полисомных мРНК, и по данным иммуноблоттинга трансляция мРНК YB-3 и количество белка YB-3 возрастает в клетках HEK293T Δ YB-1 (Рис. 25А,Б). При этом количество мРНК YB-3 уменьшается при нокауте YB-1 в клетках HEK293T (Рис. 25В). Все это говорит о возможном участии YB-1 в регуляции синтеза YB-3 на уровне трансляции, а возможно и на уровне синтеза и стабилизации мРНК YB-3.

В отсутствие YB-1 стабильность мРНК YB-3 снижается

Для сравнения стабильности мРНК *YB-3* в клетках HEK293T, экспрессирующих и не экспрессирующих YB-1, применялся метод метаболического мечения клеточных мРНК бромуридином по типу «пульс-чейз» с последующей иммунопреципитацией бромуридин-меченной РНК за антитела против бромдезоксиридина. Детекцию мРНК в иммунопреципитате проводили методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Очевидно, что изменение содержания бромуридина в конкретной мРНК с течением времени будет зависеть от её стабильности. Оказалось, что стабильность мРНК *YB-3* (Рис. 26А) достоверно снижается в клетках HEK293TΔYB-1 в отличие от стабильности мРНК *BTF3*, *SMAD3* и *GAPDH* (Рис. 26Б-Г).

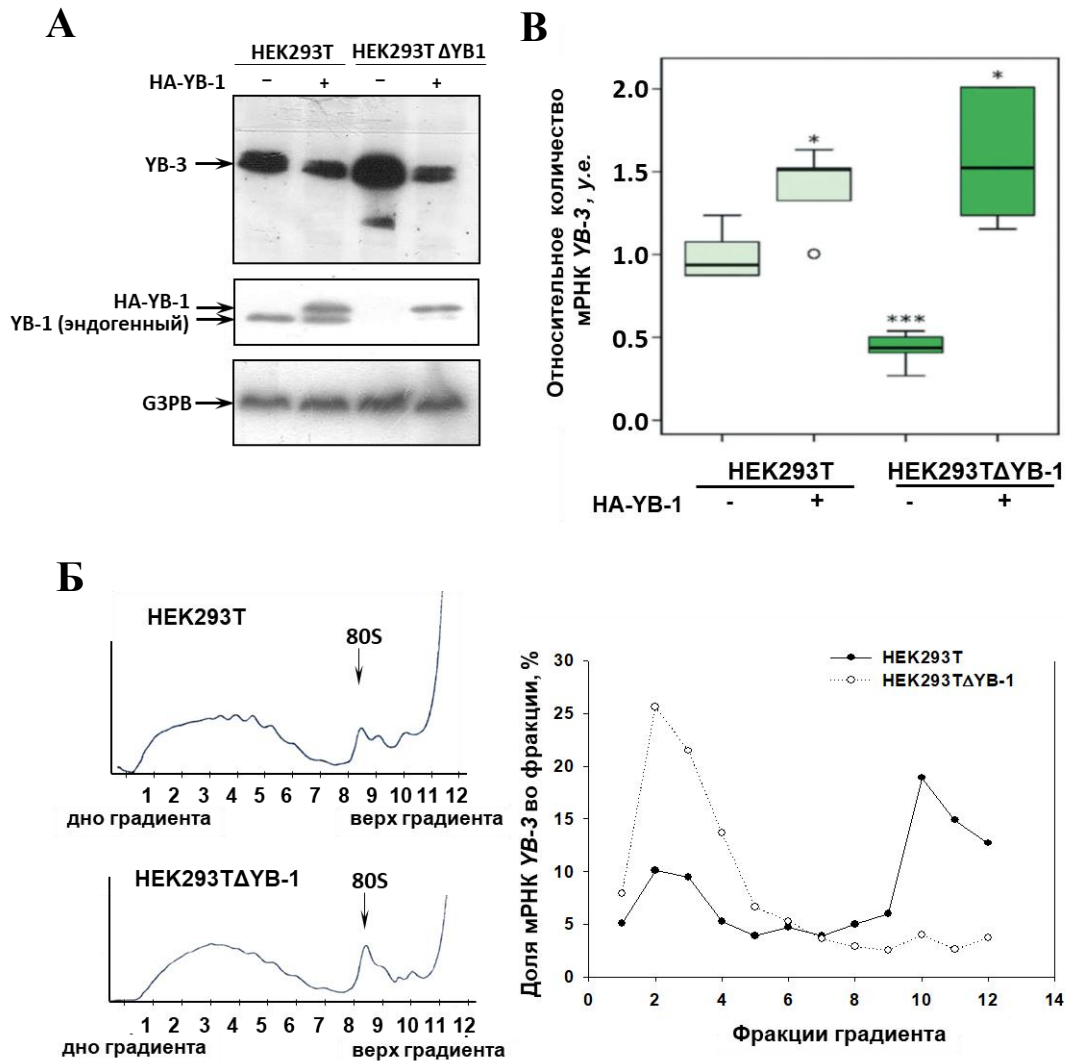


Рисунок 25. YB-1 регулирует синтез YB-3. А. Анализ количества YB-3 в клетках HEK293T и HEK293TΔYB-1, экспрессирующих и не экспрессирующих HA-YB-1 с плазмиды, методом иммуноблоттинга. Фибрилларин использовали в качестве контроля. Б. Лизаты клеток HEK293T и HEK293TΔYB-1 центрифугировали в линейном градиенте сахарозы (15-45%) в течение 1 часа при 45000 об/мин в роторе SW-60. Показаны полисомные профили (A₂₅₄) (панели слева). мРНК *YB-3* во фракциях детектировали методом ОТ-ПЦР в реальном времени (правая панель). В. Анализ количества мРНК *YB-3* в клетках HEK293T и HEK293TΔYB-1, экспрессирующих и не экспрессирующих HA-YB-1 с плазмиды, методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Данные нормализовали по 18S рРНК и мРНК *BTF3*. Для оценки статистической значимости отличий по сравнению с клетками HEK293T, трансфицированными пустым вектором, использовали двусторонний t-критерий Стьюдента. ***p < 0,001, *p < 0,05.

Для приблизительной оценки уровня синтеза мРНК *YB-3* было проанализировано количество мРНК *YB-3* в иммунопреципитате из лизатов клеток HEK293T и клеток HEK293TΔYB-1, полученных сразу после мечения бромуридином (0 часов). На рисунке 27 видно, что синтез мРНК *YB-3* несколько снижен в клетках HEK293TΔYB-1 по сравнению с контрольными, но в той же степени, что и синтез контрольной мРНК *BTF3* и мРНК *GAPDH*.

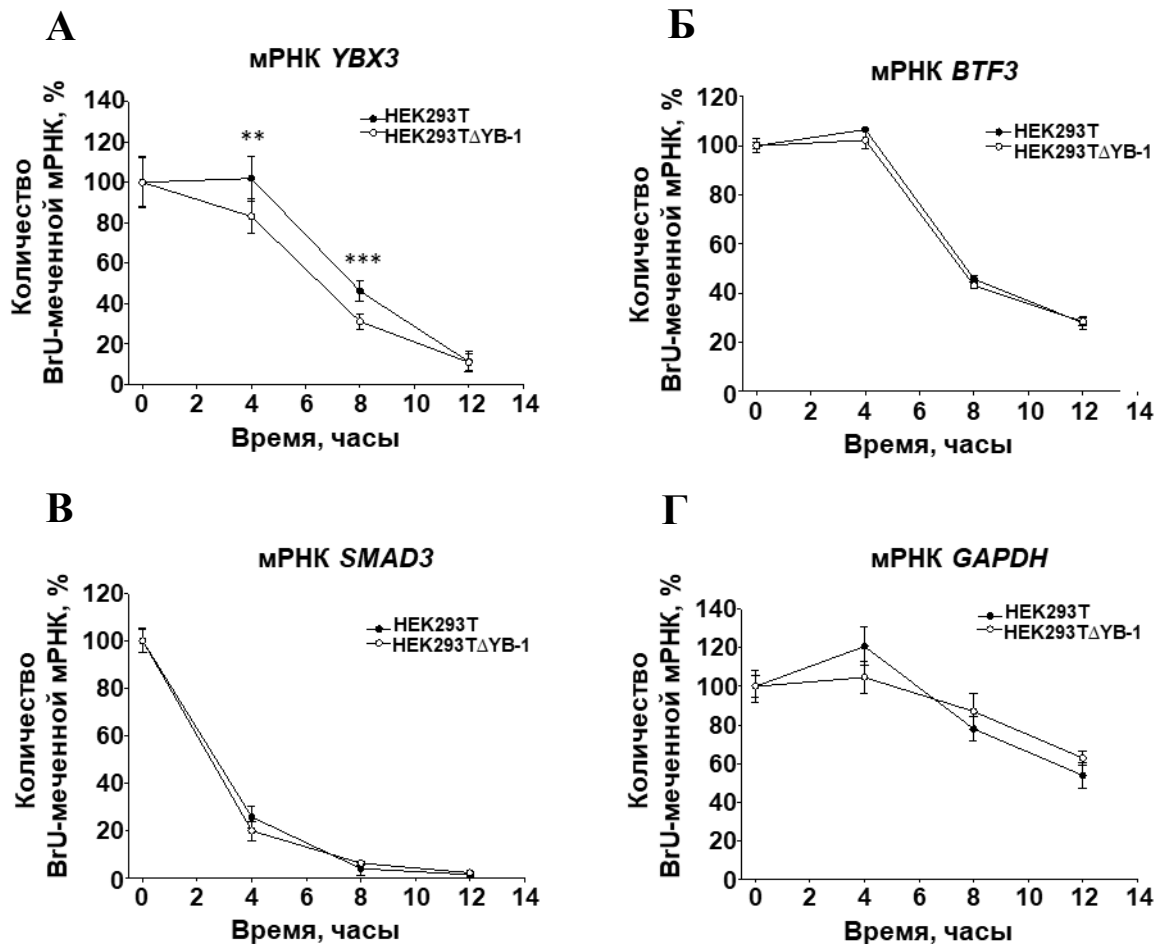


Рисунок 26. Подавление экспрессии *YB-1* приводит к снижению стабильности мРНК *YB-3*. А-Е Клетки HEK293T и HEK293TΔYB-1 инкубировали в среде DMEM с бромдезоксисуридином (BrU) в течение 24 часов, а затем в стандартной среде в течение 0, 4, 8 или 12 часов. Далее выделяли тотальную РНК и использовали её для иммунопреципитации антителами против BrU. В иммунопреципитате избранные мРНК детектировали методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Для каждой клеточной линии количество мРНК в точке 0 ч принимали за 100%. Ошибка – два стандартных отклонения. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний t-критерий Стьюдента. *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$.

Можно, вероятно, говорить о небольшом общем снижении уровня транскрипции этих клеточных мРНК, причины которого напрямую связать с отсутствием *YB-1* пока сложно. Интересно, что синтез мРНК *SMAD3* возрос, что предполагает участие *YB-1* в специфической регуляции синтеза этой мРНК, вероятно на уровне регуляции транскрипции.

Таким образом, можно говорить о том, что уменьшение количества мРНК *YB-3* при нокауте *YB-1* в клетках HEK293T обусловлено как снижением синтеза этой мРНК, так и снижением стабильности этой РНК.

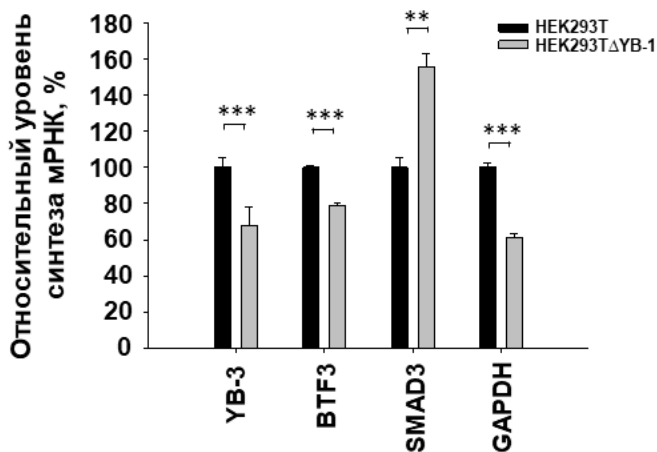


Рисунок 27. Клетки HEK293T и HEK293TΔYB-1 инкубировали в среде DMEM с бромдезоксипурином (BrU) в течение 24 часов. Далее выделяли тотальную РНК и использовали её для иммунопреципитации антителами против BrU. В иммунопреципитате избранные мРНК детектировали методом ОТ-ПЦР в реальном времени. В клетках HEK293T количество мРНК в точке 0 ч принимали за 100%. Ошибка – два стандартных отклонения. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний t-критерий Стьюдента. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

5' и 3'НТО мРНК YB-3 необходимы для регуляции трансляции и стабильности репортерных мРНК *ex vivo*.

Поскольку регуляция трансляции и стабильности мРНК идет зачастую при участии нетранслируемых областей мРНК, было предположено, что и в случае мРНК YB-3 важную роль играют 5' и/или 3'НТО этой мРНК. Для этого исследовалась трансляция репортерных мРНК люциферазы *NLucP* с 5'- и 3'-нетранслируемыми областями мРНК YB-3 и/или мРНК BTF3 (в качестве контроля) в клетках HEK293TΔYB-1 и клетках HEK293TΔYB-1, стабильно экспрессирующих YB-1 (HEK293TΔYB-1+YB-1, см. материалы и методы). Плазмидами pNL2.2, кодирующими мРНК *NLucP* с различными комбинациями НТО мРНК YB-3 трансфицировали указанные клетки. При трансфекции в клетки вводилась не только плазида pNL2.2, но и плазида, кодирующая мРНК люциферазы светлячка *Fluc* с 5' и 3'НТО мРНК BTF3, в качестве внутреннего контроля. Во всех полученных конструкциях репортерные последовательности находятся под контролем промотора β-актина (АСТВ), что должно обеспечивать одинаковую эффективность их транскрипции.

На рисунке 28А видно, что активность люциферазы, синтезируемой любой из четырех конструкций (нормализованная по активности внутреннего контроля *Fluc*), как таковая практически не изменяется при удалении из клеток белка YB-1. При этом количество мРНК *NLucP* (нормализованное по количеству мРНК BTF3_*Fluc*_BTF3) существенно различается в зависимости от нетранслируемых областей мРНК (Рис. 28Б). Одновременное наличие 5' и 3'НТО мРНК YB-3 приводит к значительному падению количества репортерной мРНК в отсутствие YB-1 в клетках. К снижению количества репортерной мРНК приводит также и наличие только 5'НТО или только 3'НТО мРНК YB-3. Таким образом, в условиях подавленной экспрессии YB-1 в клетках наличие обеих НТО мРНК YB-3 приводит к тому, что репортерной мРНК становится меньше, но при этом она транслируется значительно лучше (Рис. 28В), т.е., с неё синтезируется примерно столько же активной люциферазы, сколько с гораздо большего количества контрольной мРНК.

По-видимому, обе НТО необходимы для обеспечения чувствительности трансляции репортерной мРНК к YB-1, поскольку в отдельности 3'НТО не способен этого делать, а 5'НТО способствует этому в меньшей степени (Рис. 28В).

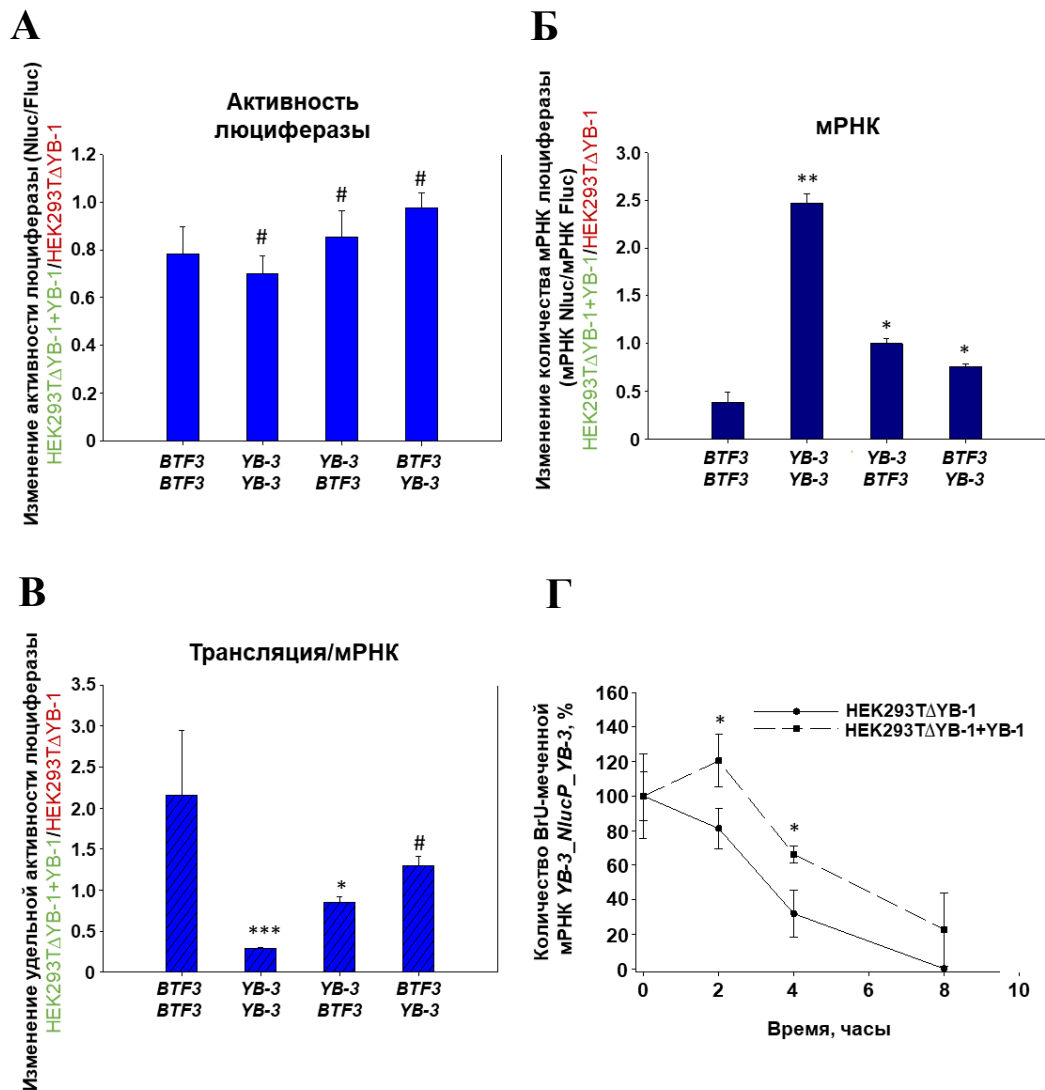


Рисунок 28. 5'- и 3'НТО мРНК YB-3 необходимы для регуляции трансляции и стабильности репортерных мРНК в клетках HEK293T. Через 24 ч после трансфекции плазмидами pNL2.2 (рис. 59) клетки собирали и делили на две части. Одну часть использовали для выделения тотальной РНК для измерения количества мРНК *NlucP* и *Fluc* методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Другую часть использовали для определения активности *NlucP* и *Fluc*. **А.** Активность люциферазы *NlucP* (нормализованная по активности *Fluc*, синтезированной с плазмиды pNL2.2BTF3_Fluc_BTF3) в клетках HEK293TΔYB-1 и HEK293TΔYB-1+YB-1 для плазмид pNL2.2, кодирующих репортерные мРНК *NlucP* с различными НТО мРНК YB-3 и мРНК BTF3. **Б.** Количество мРНК *NlucP* (нормированное к количеству мРНК *Fluc*, синтезированной с плазмиды pNL2.2BTF3_Fluc_BTF3) в клетках HEK293TΔYB-1 и HEK293TΔYB-1+YB-1 для плазмид pNL2.2, кодирующих репортерные мРНК *NlucP* с различными НТО мРНК YB-3 и BTF3. **В.** Активность *NlucP* в перерасчете на количество мРНК, полученная на основе данных, приведенных на панелях Б и В. **Г.** Клетки HEK293TΔYB-1 и HEK293TΔYB-1+YB-1 трансфицировали плазмидами pNL2.2, кодирующими репортерную мРНК *NlucP* с НТО мРНК YB-3. Через 6 ч после трансфекции в среду DMEM добавляли BrU для дальнейшей инкубации в течение 24 ч. Затем меняли среду на стандартную и инкубировали клетки в течение 0, 2, 4 или 8 ч. Далее выделяли тотальную РНК и использовали её для иммунопреципитации антителами против BrU. В иммунопреципитате мРНК YB-3_Nluc_YB-3 детектировали методом ОТ-ПЦР в реальном времени с помощью праймеров к последовательности *Nluc*. Для каждой клеточной линии количество мРНК в точке 0 ч принимали за 100%. Ошибка – два стандартных отклонения. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний t-критерий Стьюдента. *** p<0,001; **p < 0,01; * p < 0,05; # - статистически незначимые отличия. Сравнение проводилось относительно мРНК BTF3_NlucP_BTF3.

Кроме того, вероятно, за уменьшение количества мРНК ответственны обе НТО мРНК *YB-3*, так как наличие только 5'НТО или только 3'НТО мРНК *YB-3* ведет к меньшему снижению количества репортерной мРНК в отсутствие *YB-1*. Влияние НТО мРНК *YB-3* на стабильность репортерных мРНК подтверждается экспериментом по изучению стабильности мРНК *YB-3_NlucP_YB-3* в клетках НЕК293ТΔ*YB-1* и НЕК293ТΔ*YB-1*+*YB-1*. Плазмидой *pNL2.2_YB-3_NlucP_YB-3* трансфицировали указанные клетки и через 12 часов проводили метаболическое мечение клеточных мРНК бромуридином по типу «пульс-чейз» как описано выше. На рисунке 28Г можно увидеть, что стабильность мРНК *YB-3_NlucP_YB-3* достоверно снижается примерно в 2 раза в клетках НЕК293ТΔ*YB-1* по сравнению с клетками НЕК293ТΔ*YB-1*+*YB-1*.

Таким образом, можно говорить о том, что нетранслируемые области мРНК *YB-3* достаточны для регуляции трансляции и стабильности мРНК *YB-3* белком *YB-1*.

5'НТО мРНК *YB-3* необходим для регуляции трансляции репортерных мРНК *in vitro*

Другим способом показать влияние *YB-1* на трансляцию репортерных мРНК с НТО мРНК *YB-3* являются эксперименты в бесклеточной системе трансляции на основе экстрактов клеток НЕК293Т. Было исследовано влияние экзогенного белка *YB-1* на трансляцию репортерных мРНК люциферазы светлячка *FLuc* с 5'- и 3'-нетранслируемыми областями мРНК *YB-3* и/или мРНК *BTF3* или с 5' НТО мРНК β -глобина (Рис. 29А) в бесклеточной системе трансляции на основе лизата клеток НЕК293ТΔ*YB-1*Δ*YB-3*, не экспрессирующих и *YB-1* и *YB-3*. Такие клетки были выбраны, чтобы избежать влияния эндогенных белков *YB-1* и *YB-3* на трансляцию репортерных мРНК (см. полный текст диссертации).

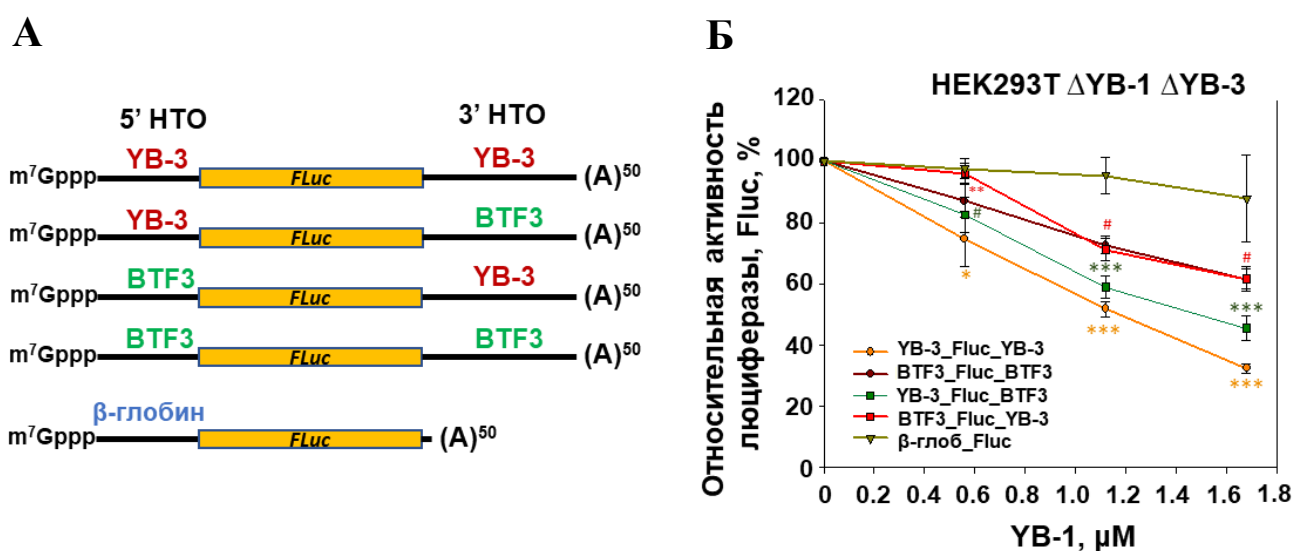


Рисунок 29. 5'НТО мРНК *YB-3* опосредует регуляцию трансляции репортерных мРНК в бесклеточной системе трансляции. А. Схема используемых репортерных мРНК. Б. 0,1 пмоль К+А+ репортерной мРНК *Fluc* с указанными 5'НТО транслировали в бесклеточной системе трансляции на основе экстрактов клеток НЕК293Т Δ*YB-1* Δ*YB-3* в присутствии возрастающего количества рекомбинантного белка *YB-1* (0,56, 1,12 и 1,68 мкМ) или без него. В реакционной смеси анализировали активность люциферазы светлячка после 45 мин инкубации при 30 °С. Активность *Fluc* без добавления *YB-1* принимали за 100%. Значения получены на основании по крайней мере трех независимых экспериментов. Ошибка – стандартное отклонение. Для оценки статистической значимости использовали двусторонний t-критерий Стьюдента. *** - $p < 0,001$, ** - $p < 0,01$, * - $p < 0,05$, # означает статистически незначимые отличия. Сравнение проводилось с активностью люциферазы, синтезируемой с мРНК *BTF3_Fluc_BTF3*.

Оказалось, что трансляция репортерной мРНК с НТО мРНК *УВ-3* более чувствительна к добавлению в систему трансляции *УВ-1*, чем контрольные мРНК с НТО мРНК *ВТФЗ* и мРНК β -глобина (Рис. 29Б). Более того, оказалось, что наличие только 5'НТО, но не 3'НТО мРНК *УВ-3* делало трансляцию такой мРНК более чувствительной к добавлению в систему белка *УВ-1*. Следует отметить, что наблюдаемая чувствительность к *УВ-1* матрицы только с 5'НТО мРНК *УВ-3* несколько слабее, чем у матрицы и с 5', и с 3'НТО мРНК *УВ-3* (Рис. 29Б). Это позволяет говорить о том, что, по-видимому, за регуляцию белком *УВ-1* трансляции мРНК *УВ-3* отвечает в большей степени 5'НТО этой мРНК, но наличие 3'НТО усиливает её эффект.

Связывание *УВ-1* с НТО мРНК *УВ-3*

Итак, наличие белка *УВ-1* в клетках и в системе *in vitro* влияет на трансляцию и стабильность мРНК *УВ-3* или репортерных мРНК с НТО мРНК *УВ-3*. По данным RIP-Seq с использованием антител против *УВ-1*, мРНК *УВ-3* является одной из взаимодействующих с *УВ-1* мРНК. Кроме того, наши PAR-CLIP данные указывают, что *УВ-1* имеет сайт связывания в 3'НТО мРНК *УВ-3* (см. полный текст диссертации). ОТ-ПЦР-анализ препарата мРНК, иммунопреципитирующих с *УВ-1*, показал наличие в нём мРНК *УВ-3* (см. полный текст диссертации). Однако возникает вопрос, взаимодействует ли сам *УВ-1* с этими областями или его влияние опосредовано другими белками.

Чтобы прояснить ситуацию, были проведены эксперименты по ультрафиолетовым сшивкам радиоактивно меченных НТО мРНК *УВ-3* и *ВТФЗ* с белками из лизатов клеток, экспрессирующих *УВ*-белки, не экспрессирующих *УВ-1* или не экспрессирующих *УВ-1* и *УВ-3*. Как видно на рисунке 30А, с 5'НТО мРНК *УВ-3* перешиваются 3 белка лизата клеток НЕК293Т. Один из них (отмечен как 2) вероятно *УВ-1*, поскольку данная полоса исчезает в лизатах клеток без *УВ-1* и появляется при добавлении в лизат белка *УВ-1*. Можно отметить, что *УВ-1* перешивается и с контрольной 5'НТО мРНК *ВТФЗ*, однако интенсивность полосы в случае 5'НТО мРНК *УВ-3* заметно выше, что может указывать на большее сродство *УВ-1* именно к 5'НТО мРНК *УВ-3*. Другой белок молекулярной массой около 35-40 кДа (отмечен как 1), вероятно специфически перешивается только с 5'НТО мРНК *УВ-3*. Интересно, что интенсивность полосы этого белка возрастает при удалении из лизата *УВ-1*, и еще больше при удалении *УВ-1* и *УВ-3*. При добавлении *УВ-1* интенсивность сигнала снижается, что говорит о возможной конкуренции между этим белком и *УВ-1* за связывание с 5'НТО мРНК *УВ-3*. Такое же возрастание интенсивности полосы при удалении *УВ*-белков характерно для белка, отмеченного как 3, но в этом случае можно говорить о неспецифическом взаимодействии, поскольку такая картина наблюдается и в случае контрольной 5'НТО мРНК *ВТФЗ*.

Эксперименты по ультрафиолетовым сшивкам с радиоактивно меченной 3'НТО мРНК *УВ-3* и фрагментом 3'НТО мРНК *УВ-3*, в котором, согласно нашим предварительным данным, находится сайт связывания *УВ-1*, показал, что *УВ-1* способен взаимодействовать с 3'НТО (Рис. 30Б). При этом интенсивность полосы, соответствующей *УВ-1*, была высокой в случае фрагмента 3'НТО и довольно слабой в случае полноразмерной 3'НТО. Примечательно, что в случае полноразмерной 3'НТО мРНК

YB-3, как и в случае с 5'НТО, детектируется два белка молекулярной массы 35-40 кДа, однако об их идентичности пока сказать ничего нельзя.

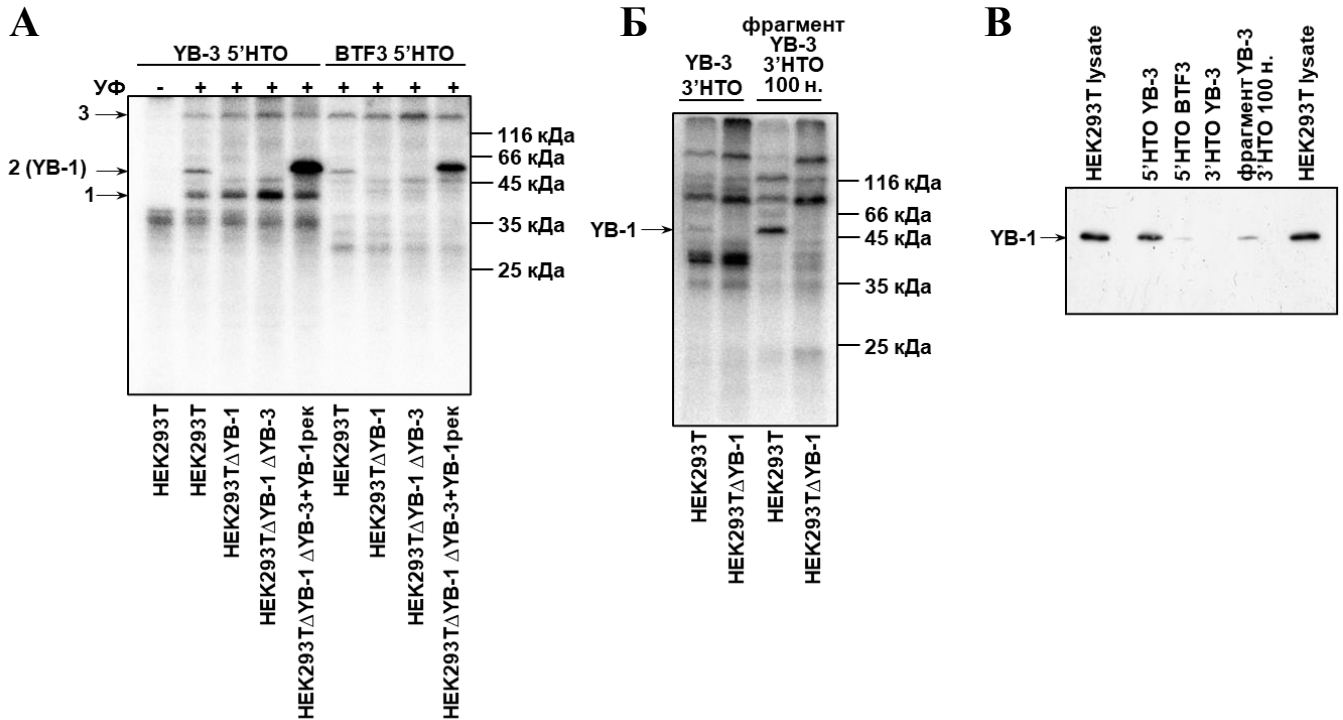


Рисунок 30. Связывание YB-1 с НТО мРНК *YB-3*. А. Экстракт клеток HEK293T, HEK293TΔYB-1, HEK293T ΔYB-1 ΔYB-3 или экстракта клеток HEK293T ΔYB-1 ΔYB-3 с добавлением 1 мкг рекомбинантного YB-1 инкубировали в течение 15 мин при 30 °С с [³²P]-меченой 5'НТО мРНК *YB-3* или 5'НТО мРНК *BTF3* (по 0,57 пмоль), обрабатывали ультрафиолетом, а затем смесью нуклеаз (РНКаза А и микрококковая нуклеаза). Далее образцы анализировали с помощью ДСН-гель-электрофореза и автордиографии. Цифры обозначают белки, специфически взаимодействующие с 5'НТО мРНК *YB-3*. Б. Экстракт клеток HEK293T HEK293TΔYB-1 инкубировали в течение 15 мин при 30 °С с [³²P]-меченой 3'НТО мРНК *YB-3* (0,6 пмоль) или 100 н. фрагментом 3'НТО мРНК *YB-3* (0,6 пмоль), обрабатывали ультрафиолетом, а затем смесью нуклеаз (РНКаза А и микрококковая нуклеаза). Далее образцы анализировали с помощью ДСН-гель-электрофореза и автордиографии. В. Белки экстракта клеток HEK293T (50 мкл) выделяли хроматографией на стрептавидин-сефарозе с иммобилизованной на ней биотинилированной 5'НТО мРНК *YB-3* или контрольной 5'НТО мРНК *BTF3* (по 60 пмоль). Белки, связавшиеся с РНК, разделяли с помощью ДСН-гель-электрофореза и детектировали YB-1 методом иммуноблоттинга с помощью антител против С-концевого пептида YB-1.

Чтобы дополнительно убедиться в специфичном связывании YB-1 с НТО мРНК *YB-3*, был проведен эксперимент по выделению белков лизатов клеток за биотинилированные фрагменты РНК. На рисунке 30В видно, что YB-1 действительно проявляет большее сродство к 5'НТО мРНК *YB-3*, чем к 5'НТО мРНК *BTF3*. Интересно, что в случае полноразмерной 3'НТО, YB-3 мРНК *YB-1* не детектируется вообще, но при этом фрагмент 100 н из 3'НТО мРНК *YB-3* имеет довольно высокое специфичное сродство к YB-1. Возможно, взаимодействие YB-1 с 3'НТО зависит от конкуренции с другими белками, взаимодействующими с 3'НТО, а также от конформации РНК. Нельзя исключить, что существует некое взаимодействие между 5' и 3'НТО мРНК *YB-3*, в результате которого связывание YB-1 с 3'НТО может меняться (в т.ч. усиливаться) в случае полноразмерной мРНК.

Таким образом, YB-1 связывается специфически с 5'НТО, что может обуславливать эффекты этого белка на трансляцию и стабильность репортерных мРНК с НТО мРНК *YB-3* и природной мРНК *YB-3*. Не исключено, что связывание YB-1 с 3'НТО мРНК *YB-3* также играет определенную роль в этих

процессах. Кроме того, с НТО мРНК *YB-3* связываются еще несколько белков, вероятно вовлеченных в регуляцию синтеза *YB-3*.

4. Функциональная взаимозаменяемость *YB-1* и *YB-3*

Предыдущие исследования показали возможность взаимозаменяемости *YB-1* и *YB-3* при выполнении их функций в клетке. По крайней мере тех, что основаны на взаимодействии с РНК. Действительно ли это так? Чтобы ответить на этот вопрос, было решено исследовать методами высокопроизводительного секвенирования изменения в количестве, трансляции и стабильности мРНК при экспрессии в клетках генов двух γ -бокс-связывающих белков или одного из них по сравнению с клетками, не экспрессирующими *YB-1* и *YB-3*. Для этого на основе клеток НЕК293ТΔΔ (с нокаутом генов *YB-1* и *YB-3*) были получены клетки, стабильно синтезирующие *YB-1*, *YB-3* или оба белка. Иммуноблот-анализ клеточных лизатов на количество белков *YB-1* и *YB-3* показал, что белок *YB-1* экспрессируется в клетках НЕК293ТΔΔ+*YB-1* и НЕК293ТΔΔ+*YB-1*+*YB-3* на том же уровне, что и в исходных клетках НЕК293Т (из которых получали НЕК293ТΔΔ) (Рис. 31). Важно, что в клетках НЕК293ТΔΔ+*YB-3* количество *YB-3* заметно выше, чем во всех остальных линиях.

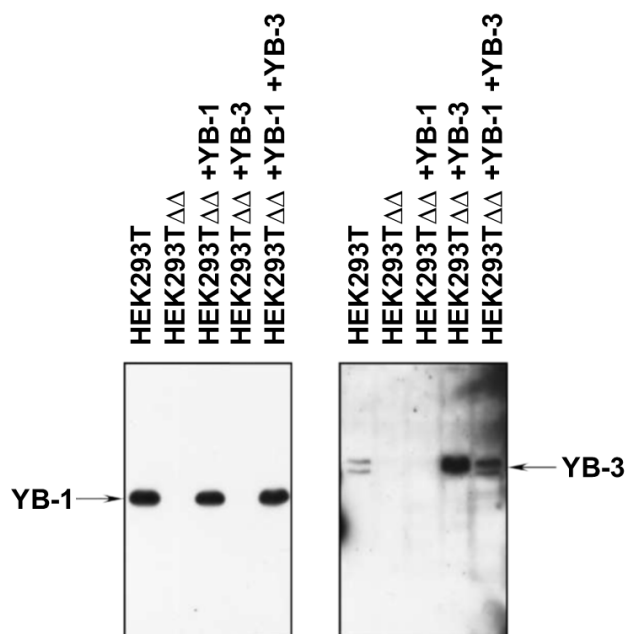


Рисунок 31. Анализ лизатов клеток НЕК293Т и клеток НЕК293ТΔΔ*YB-1*Δ*YB-3*, экспрессирующих *YB-1* и/или *YB-3*, методом иммуноблоттинга. Лизаты уравнированы по тотальному белку.

Это объясняется тем, что в этих клетках отсутствует *YB-1*, который, как было показано ранее, является ингибитором трансляции мРНК *YB-3*. Поэтому в таких клетках синтез *YB-3* не контролируется. Если же в клетках синтезируется еще и *YB-1* (как в клетках НЕК293ТΔΔ+*YB-1*+*YB-3*), то количество *YB-3* заметно снижается до примерно того же уровня как в исходных клетках НЕК293Т.

Анализ изменений транскриптома и транслатома клеток НЕК293Т с различным уровнем экспрессии *YB-1* и *YB-3*

Из клеток НЕК293Т с разным уровнем экспрессии *YB-1* и *YB-3* были получены лизаты для приготовления библиотек RNA-Seq и Ribo-Seq и их последующего секвенирования и анализа

дифференциальной экспрессии генов при восстановлении синтеза одного или обоих Y-боксов связывающих белков по сравнению с клетками с двойным нокаутом Y-боксов-связывающих белков.

Изменение эффективности трансляции оценивалось по изменению занятости рибосомами РНК (соотношение Ribo-Seq/RNA-Seq). Для всех клеточных линий характерны небольшие по амплитуде изменения как в RNA-Seq, так и в эффективности трансляции. При этом количество значимо изменившихся генов существенно выше для изменения в РНК (см. полный текст диссертации), что свидетельствует в пользу того, что Y-боксов связывающие белки вносят основной вклад в изменение экспрессии генов на уровне регуляции количества мРНК, то есть на уровне регуляции транскрипции или стабильности мРНК.

Полученный массив данных довольно велик и требует тщательного анализа. В этой же части работы основное внимание будет уделено ответу на вопрос о том, могут ли YB-1 и YB-3 функционально заменять друг друга. Была проанализирована согласованность изменения эффективности трансляции или количества РНК в клетках, экспрессирующих YB-1, YB-3 или оба белка, для чего была проведена кластеризация генов. На рисунке 32 представлены так называемые тепловые карты изменений количества РНК и эффективности трансляции. В анализ были взяты только те гены, которые наиболее значимо изменились ($FDR < 0.001$ для РНК, $FDR < 0.05$ для эффективности трансляции) хотя бы в одной клеточной линии. Видно, что в отличие от изменений в эффективности трансляции (2 кластера), изменения в количестве РНК значительно различаются между клетками (5 кластеров).

Все гены с изменившимся количеством транскрибируемой РНК (Рис. 32А) можно разделить на 5 кластеров:

1. Количество РНК наиболее сильно возросло в клетках с экспрессией обоих белков одновременно. Этот кластер обогащен генами, чьи продукты участвуют в трансляции, клеточном цикле и протеолизе;
2. Количество РНК возросло во всех клеточных линиях (экспрессирующих либо YB-1, либо YB-3, либо оба белка). В этом кластере много мРНК, чьи продукты участвуют в клеточном старении;
3. Количество РНК наиболее сильно возросло в клетках с экспрессией YB-3. Этот кластер обогащен мРНК, чьи продукты участвуют в клеточном цикле, р53-зависимой регуляции транскрипции, везикулярном транспорте;
4. Количество РНК упало в клетках с экспрессией YB-1 или обоих белков. К этому кластеру относятся мРНК, чьи продукты важны в таких процессах как метаболизм ДНК и РНК, репликация ДНК, ответ на повреждение ДНК и клеточный цикл;
5. Количество РНК упало во всех клеточных линиях, экспрессирующих хотя бы один YB-белок. В этом кластере много мРНК, чьи продукты участвуют в метаболизме аминокислот, в клеточном ответе на стресс и гормоны.

Видно, что некоторые процессы обогащены в нескольких различных кластерах, например, регуляция клеточного цикла. Это говорит о том, что различные гены, участвующие в этом процессе по-разному изменяют свою экспрессию при экспрессии разных Y-боксов-связывающих белков в клетке.

Важно отметить, что изменения в количестве РНК при экспрессии *YB-1* или *YB-3* слабо положительно коррелируют (r -Пирсона ~ 0.3 , см. полный текст диссертации), и лишь около 20% значимо изменившихся генов общие для клеточных линий, экспрессирующих только *YB-1* или только *YB-3*. Возможно, для этого набора РНК *YB-1* и *YB-3* могут функционально заменять друг друга либо на этапе транскрипции РНК, либо на уровне регуляции стабильности мРНК.

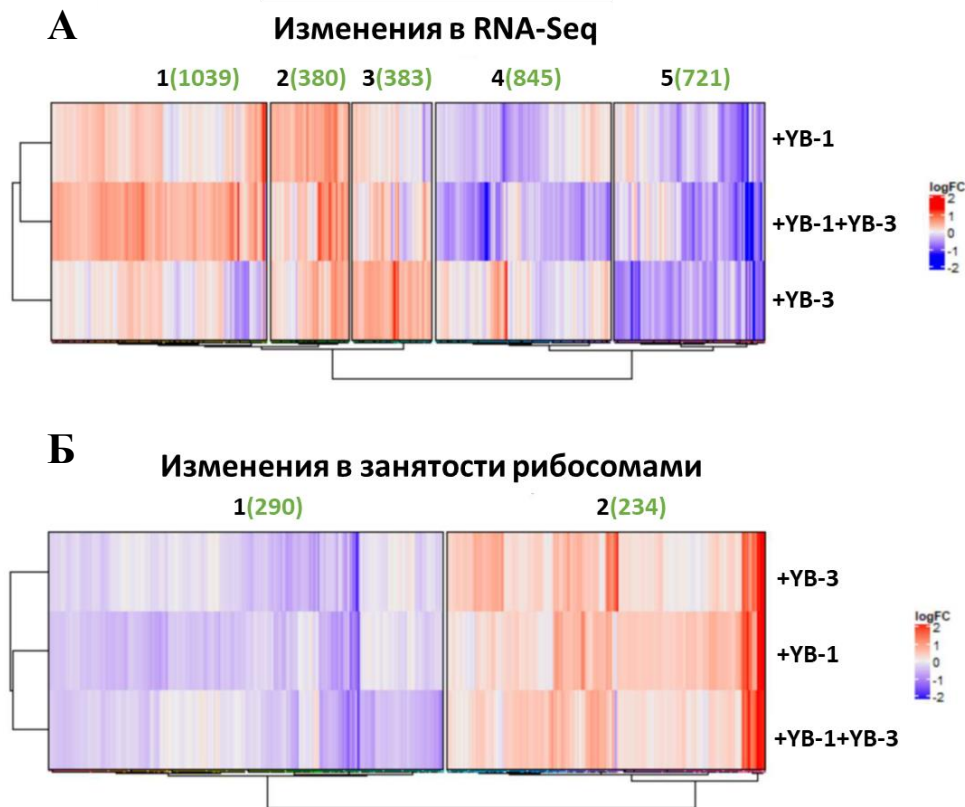


Рисунок 32. Тепловые карты изменений количества РНК (А) и эффективности трансляции (Б) в клетках, экспрессирующих различные Y-бокс-связывающие белки. Представлены гены, значимо изменившиеся ($FDR < 0.001$ для РНК, $FDR < 0.05$ для эффективности трансляции) хотя бы в одной клеточной линии. Сравнение проведено относительно клеток с двойным нокаутом Y-бокс-связывающих белков. Кластерный анализ сделан с помощью пакетов *dendextend* и *ComplexHeatmap* для R. Количество генов в кластере указано зеленым. Красный цвет – увеличение количества мРНК или занятости рибосомами, синий – уменьшение ($\log_{2}FC$ – логарифм кратности изменений).

Что касается трансляции, то изменения в эффективности трансляции при экспрессии Y-бокс-связывающих белков хорошо согласуются между всеми тремя клеточными линиями (экспрессирующими либо *YB-1*, либо *YB-3*, либо оба гена), а все гены с изменившейся эффективностью трансляции мРНК (Рис. 32Б) можно разделить всего на 2 кластера. Среди мРНК, чья трансляция активируется при экспрессии Y-бокс-связывающих белков (см. полный текст диссертации), мРНК белков, участвующих в сплайсинге, транспорте РНК и делении клеток (в том числе в анафазе и цитокинезе). Среди мРНК, чья трансляция снижается при экспрессии Y-бокс-связывающих белков, мРНК белков, участвующих в трансляции (в том числе рибосомных белков и белков биогенеза рибосом) и клеточном дыхании.

Но самое важное в контексте основной задачи этой части исследования состоит в том, что изменения в эффективности трансляции при экспрессии YB-1 или YB-3 коррелируют значительно лучше, чем изменения в РНК (r-Пирсона ~ 0.5, см. полный текст диссертации). Данные факты могут говорить о том, что белки YB-1 и YB-3 могут функционально заменять друг друга в большей степени в регуляции трансляции.

Эксперименты с клетками, не экспрессирующими YB-1 и YB-3 и экспрессирующими один из них или оба белка, показали, что функциональная взаимозаменяемость YB-1 и YB-3 – это возможное явление. Однако наиболее выражена она в трансляционных функциях YB-белков. Именно на этом этапе экспрессии генов наблюдается более сильная корреляция изменений, вызванных экспрессией YB-1 и YB-3. При этом наблюдается и совпадение модальности YB-1 и YB-3: они оба подавляют трансляцию некоторого набора мРНК и стимулируют трансляцию другого набора мРНК. Подобного нельзя сказать в отношении влияния YB-белков на транскриптом клеток. В этом случае помимо группы генов, чья экспрессия регулируется одинаковым образом и YB-1, и YB-3, имеют место и другие механизмы регуляции количества мРНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения настоящей работы решались две основные проблемы – регуляция синтеза белка YB-1 и его функционирование. Эти исследования «эволюционировали» от экспериментов *in vitro* до более сложных опытов на живых эукариотических клетках и привели к нескольким важным выводам.

Первый вывод состоит в том, что авторегуляцию трансляции мРНК *YB-1* можно наблюдать в культивируемых эукариотических клетках. На данный момент можно говорить, что ингибирующее действие YB-1 на трансляцию собственной мРНК опосредовано нетранслируемыми областями. Однако какая из НТО вносит решающий вклад в этот процесс, сказать до сих пор трудно. С одной стороны, эксперименты *in vitro* говорят о том, что регуляторного элемента в 3'НТО мРНК *YB-1* достаточно для ингибирующего влияния YB-1, но в экспериментах на культурах эукариотических клеток ситуация может быть сложнее. В литературе имеются данные, что в авторегуляцию синтеза YB-1, как негативную, так и позитивную, вовлечена 5'НТО мРНК *YB-1*. Вероятно, в зависимости от клеточного контекста и от дополнительных белков, взаимодействующих с НТО мРНК *YB-1*, эффект YB-1 на трансляцию собственной мРНК может меняться. Этими дополнительными белками, в частности, являются РАВР и hnRNP Q. В этой связи изучение механизма регуляции трансляции мРНК *YB-1* белком YB-1 всё еще требует внимательного изучения.

Второй важный вывод, который можно сделать из данной работы, состоит в том, что синтез белка YB-1 зависит от пролиферативного статуса клеток. Замедление клеточного деления, вызванного отсутствием стимулирующих его факторов, приводит к снижению синтеза YB-1 и впоследствии к снижению его количества. Ключевую роль в этом играет активность mTOR-сигнального каскада. Неактивный mTOR-сигнальный каскад приводит к снижению трансляции матриц, сильно зависящих в том числе от активности канонических факторов инициации трансляции (eIF4E, eIF4A). К таким мРНК относится и мРНК *YB-1*. Указанная зависимость мРНК *YB-1* обусловлена её 5'НТО, особенности

первичной или вторичной структуры которой, а также, вероятно, белки, взаимодействующие с ней, делают мРНК *YB-1* чувствительной в ключевым компонентам кэп-зависимой трансляции.

Интересно, что недавно на клетках глиобластомы было показано участие *YB-1* в стимуляции активности mTOR-киназного комплекса. Таким образом, можно проследить положительную обратную связь между активностью mTORC и количеством *YB-1*, а сам *YB-1* можно рассматривать не только как мишень сигнальных каскадов, регулирующих клеточный рост и деление, но и как компонент этих каскадов, контролирующей их активность.

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

Четвертый важный результат работы говорит о том, что нокаут гена *YBX1* в клетках не приводит к глобальным изменениям в транскриптоме и транслятоме благодаря повышению в клетках количества гомолога *YB-1* – белка *YB-3*, который способен заменять *YB-1* по крайней мере в РНК-зависимых функциях – в первую очередь, в трансляции. Кроме того, было установлено, что указанное повышение количества *YB-3* связано с регуляцией белком *YB-1* трансляции и стабильности мРНК *YB-3* за счет его прямого взаимодействия с нетранслируемыми областями этой мРНК. Белок *YB-1*, регулируя трансляцию собственной мРНК и мРНК *YB-3*, поддерживает уровень и соотношение двух Y-боксовсвязывающих белков на уровне, вероятно, оптимальном для регуляции экспрессии генов, зависящих от этих *YB*-белков. А это, в первую очередь, согласно предварительным результатам настоящей работы, гены, вовлеченные в прохождение клеточного цикла, РНК-зависимые процессы (трансляция, сплайсинг), репарацию ДНК и окислительное фосфорилирование.

Пятый значимый результат диссертационной работы, меняющий наши представления о *YB-1* как о глобальном регуляторе трансляции, состоит в том, что до определенного уровня эффект *YB-1* на трансляцию большинства мРНК незначителен или вовсе отсутствует. Лишь для небольшого набора мРНК (порядка нескольких сотен) *YB-1* является либо стимулятором их трансляции, либо ингибитором. Однако при увеличении количества *YB-1* в клетке выше этого уровня он оказывает неспецифическое ингибирующее действие на трансляцию подавляющего количества мРНК.

Наконец, важен еще один вопрос, который поднимает факт существования регуляции синтеза YB-3 белком YB-1: какие последствия может иметь такая регуляция в практическом, медицинском, смысле? Известно, что с количеством YB-1 и его ядерно-цитоплазматическим распределением коррелирует развитие таких процессов как множественная лекарственная устойчивость, эпителиально-мезенхимальный переход. Однако при изменении количества YB-1 количество YB-3 также должно изменяться. Возможно, это также вносит вклад в развитие вышеуказанных процессов, поскольку YB-3 может в них участвовать. Кроме того, предполагаемое использование при терапии некоторых заболеваний выключение синтеза YB-1 может повышать экспрессию YB-3, что может как компенсировать экспрессию YB-1, так и привносить новые неожиданные и, возможно, негативные эффекты.

ВЫВОДЫ

1. Авторегуляцию трансляции мРНК *YB-1*, ранее обнаруженную в бесклеточной системе трансляции, можно наблюдать в культивируемых эукариотических клетках. Ингибирующее действие YB-1 на трансляцию собственной мРНК опосредовано её нетранслируемыми областями.
2. Помимо YB-1 и PABP в регуляции трансляции мРНК *YB-1* может принимать участие белок гетерогенных ядерных мРНК Q (hnRNP Q). Усиливая взаимодействие YB-1 с 3'НТО мРНК *YB-1* и ослабляя взаимодействие с ней PABP, hnRNP Q ингибирует трансляцию мРНК *YB-1* в бесклеточной системе трансляции.
3. Синтез белка YB-1 зависит от пролиферативного статуса клеток. Замедление клеточного деления приводит к снижению синтеза YB-1. Ключевую роль в этом играют активность mTOR-сигнального каскада и 5' нетранслируемая область мРНК *YB-1*.
4. Альтернативные формы мРНК *YB-1* образуются за счет минорных стартов транскрипции в первом интроне гена *YBX1* и способны транслироваться. Инициация их трансляции происходит не на каноническом AUG-кодоне, а на смежной паре кодонов AUCGUG. Продуктом трансляции альтернативных форм мРНК *YB-1* является белок YB-1 без N-концевого домена. С основной формы мРНК *YB-1*, помимо основного продукта (белка YB-1), синтезируется удлиненная с N-конца форма белка YB-1, образующаяся за счет инициации трансляции на неканоническом стартовом кодоне AUC в 5'НТО, находящемся в той же рамке считывания, что и основной стартовый AUG-кодон.
5. Нокаут гена *YBX1* в клетках НЕК293Т не приводит к глобальным изменениям в транскриптоме и транслятоме благодаря повышению в клетках количества гомолога YB-1 – белка YB-3, который способен заменять YB-1 по крайней мере в РНК-зависимых функциях – в первую очередь, в трансляции.
6. Белок YB-1 регулирует трансляцию и стабильность мРНК *YB-3* за счет его прямого взаимодействия с нетранслируемыми областями этой мРНК.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Научные статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Scopus и WoS:

1. Skabkina, O. V., **Lyabin, D. N.**, Skabkin, M. A., and Ovchinnikov, L. P. (2005) YB-1 autoregulates translation of its own mRNA at or prior to the step of 40S ribosomal subunit joining. *Molecular and Cellular Biology* 25, 3317-3323, IF(WoS,2022) – 5.069;
2. Skabkin, M. A., **Lyabin, D. N.**, and Ovchinnikov, L. P. (2006) [Nonspecific and specific interaction of Y-box binding protein 1 (YB-1) with mRNA and posttranscriptional regulation of protein synthesis in animal cells]. *Mol Biol (Mosk)* 40, 620-633, IF(WoS,2022) – 1.540;
3. Eliseeva, I. A., Kim, E. R., Guryanov, S. G., Ovchinnikov, L. P., and **Lyabin, D. N.** (2011) Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions. *Biochemistry (Mosc)* 76, 1402-1433, IF(WoS,2022) – 2.824;
4. **Lyabin, D. N.**, Eliseeva, I. A., Skabkina, O. V., and Ovchinnikov, L. P. (2011) Interplay between Y-box-binding protein 1 (YB-1) and poly(A) binding protein (PABP) in specific regulation of YB-1 mRNA translation. *RNA Biol* 8, 883-892, IF(WoS,2022) – 4.766;
5. Eliseeva, I. A., Ovchinnikov, L. P., and **Lyabin, D. N.** (2012) Specific PABP effect on translation of YB-1 mRNA is neutralized by polyadenylation through a "mini-loop" at 3' UTR. *RNA Biol* 9, 1473-1487, IF(WoS,2022) – 4.766;
6. **Lyabin, D. N.**, Eliseeva, I. A., and Ovchinnikov, L. P. (2012) YB-1 synthesis is regulated by mTOR signaling pathway. *PLoS One* 7, e52527, IF(WoS,2022) – 3.752;
7. **Lyabin, D. N.**, Nigmatullina, L. F., Doronin, A. N., Eliseeva, I. A., and Ovchinnikov, L. P. (2013) Identification of proteins specifically interacting with YB-1 mRNA 3' UTR and the effect of hnRNP Q on YB-1 mRNA translation. *Biochemistry (Mosc)* 78, 651-659, IF(WoS,2022) – 2.824;
8. **Lyabin, D. N.**, Doronin, A. N., Eliseeva, I. A., Guens, G. P., Kulakovskiy, I. V., and Ovchinnikov, L. P. (2014) Alternative forms of Y-box binding protein 1 and YB-1 mRNA. *PLoS One* 9, e104513, IF(WoS,2022) – 3.752;
9. Bogolyubova, I. O., **Lyabin, D. N.**, Bogolyubov, D. S., and Ovchinnikov, L. P. (2014) Immunocytochemical study of YB-1 nuclear distribution in different cell types. *Tissue & Cell* 46, 457-461, IF(WoS,2022) – 2.586;
10. **Lyabin, D. N.**, Eliseeva, I. A., and Ovchinnikov, L. P. (2014) YB-1 protein: functions and regulation. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 5, 95-110, IF(WoS,2022) – 9.349;
11. **Lyabin, D. N.**, and Ovchinnikov, L. P. (2016) Selective regulation of YB-1 mRNA translation by the mTOR signaling pathway is not mediated by 4E-binding protein. *Sci Rep* 6, 22502, IF(WoS,2022) – 4.996;
12. **Lyabin, D. N.**, Eliseeva, I. A., Smolin, E. A., Doronin, A. N., Budkina, K. S., Kulakovskiy, I. V., and Ovchinnikov, L. P. (2020) YB-3 substitutes YB-1 in global mRNA binding. *RNA Biol* 17, 487-499, IF(WoS,2022) – 4.766;
13. Mordovkina, D., **Lyabin, D. N.**, Smolin, E. A., Sogorina, E. M., Ovchinnikov, L. P., and Eliseeva, I. (2020) Y-Box Binding Proteins in mRNP Assembly, Translation, and Stability Control. *Biomolecules* 10(4), 591, IF(WoS,2022) – 6.064;
14. **Lyabin, D. N.**, Smolin, E. A., Budkina, K. S., Eliseeva, I. A., and Ovchinnikov, L. P. (2021) Towards the mechanism(s) of YB-3 synthesis regulation by YB-1. *RNA Biol* 18, 1630-1641, IF(WoS,2022) – 4.766;
15. Eliseeva, I. A., Sogorina, E. M., Smolin, E. A., Kulakovskiy, I. V., and **Lyabin, D. N.** (2022) Diverse Regulation of YB-1 and YB-3 Abundance in Mammals. *Biochemistry-Moscow* 87, S48-S70, IF(WoS,2022) – 2.824.