

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Государственный Научный Центр Российской Федерации
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

на правах рукописи

Дерябин Александр Сергеевич

РОЛЬ БЕЛКОВ RPF1 И ESF1 В ПРОЦЕССИНГЕ ПРЕ-рРНК ЧЕЛОВЕКА

Специальность 1.5.3 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва-2024

Работа выполнена в лаборатории молекулярной онкологии отдела функционирования живых систем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН).

Научный руководитель:

Доктор биологических наук **Рубцов Юрий Петрович**

Официальные оппоненты:

Малыгин Алексей Аркадьевич, доктор химических наук, доцент, заведующий лабораторией структуры и функции рибосом Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Лябин Дмитрий Николаевич, доктор биологических наук, руководитель группы регуляции биосинтеза белка Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института белка РАН, г. Пушкино.

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН).

Защита состоится «4» декабря 2024 г. в 11 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и на сайте института www.ibch.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Биогенез рибосом – это сложный и упорядоченный во времени энергоемкий процесс, который оказывает решающее влияние на способность клеток к росту и делению. Исследования на дрожжах *S. cerevisiae* предоставили большое количество данных о фундаментальных принципах сборки рибосом, но во многом эти процессы отличаются у высших эукариот и дрожжей. Прерибосомные частицы клеток человека существенно крупнее, а их формирование и созревание происходит по двум альтернативным путям, в отличие от дрожжей. Помимо этого, многие факторы биогенеза рибосом, имеющие гомологов у дрожжей, по-видимому, обладают отличными или дополнительными функциями в клетках человека. Роль многих дрожжевых гомологов у человека в биогенезе рибосом мало или вовсе не изучена, а их связь с прерибосомными комплексами не подтверждена экспериментально.

Выявление особенностей биогенеза рибосом в клетках человека, а также расширение понимания деталей этого процесса необходимо для описания молекулярных основ наследственных заболеваний, сопряженных с дефектами в сборке рибосом (рибосомопатий). К таким патологиям относятся анемия Даймонда-Блэкфана (DBA), синдромы Швахмана-Даймонда и Тричера-Коллинза, X-сцепленный врожденный дискератоз (X-DC), изолированная врожденная аспления. Кроме этого, понимание молекулярных механизмов биогенеза, возможно, является путем для разработки селективных ингибиторов биогенеза рибосом опухолевых клеток, которые часто характеризуются нарушениями контроля сборки рибосом и включением дефектных или альтернативных форм рибосомных белков в состав образующихся субъединиц. В связи с этим, изучение биогенеза рибосом в клетках человека представляет существенный интерес как для фундаментальной биологии, так и для более прикладной биомедицины.

Цель исследования. Характеризация роли белков человека RPF1 и ESF1 в созревании рибосомных субъединиц.

Задачи исследования

1. Получить модифицированные клетки НЕК293 с пониженным уровнем факторов биогенеза рибосом RPF1 и ESF1;

2. Изучить влияние на жизнеспособность клеток и морфологию ядрышка нокдауна белков RPF1 и ESF1;
3. Оценить влияние нокдауна белков RPF1 и ESF1 на уровень рибосомных субъединиц/рибосом/полисом;
4. Изучить изменение профиля пре-рРНК в клетках с нокдауном белков RPF1 и ESF1;
5. Показать взаимодействие белков RPF1 и ESF1 с прерибосомными комплексами.

Научная новизна исследования

В ходе исследования получены новые данные о роли белков RPF1 и ESF1 в биогенезе рибосом человека и описаны эффекты, возникающие в клетках в ответ на снижение их уровня. Результаты демонстрируют выраженные количественные изменения профиля предшественников рибосомных РНК в клетках человека, вызванные нокдауном этих белков. Впервые показано, что один из ключевых мультифункциональных ядрышковых белков NPM1 (нуклеофозмин) изменяет свою локализацию и в клетках с нокдауном белков RPF1 и ESF1 переходит из ядрышка в нуклеоплазму, морфология ядрышка при этом не меняется. Неожиданным результатом является накопление 5'ETS-содержащих ранних пре-рРНК при нокдауне RPF1, которое может быть объяснено либо повышением активности РНК полимеразы I, либо нарушениями в процессинге этих пре-рРНК. Помимо этого, продемонстрировано ранее не установленное прямое взаимодействие факторов биогенеза RPF1 и ESF1 человека с прерибосомными 60S и 40S частицами, соответственно.

Полученные данные в совокупности расширяют понимание процесса биогенеза рибосом в клетках высших эукариот, а также показывают его лабильность и существование альтернативных путей, позволяющих клеткам осуществлять биогенез рибосом даже при существенном недостатке факторов биогенеза.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Клетки HEK293 с нокдауном факторов биогенеза рибосом RPF1 и ESF1 обладают пониженной жизнеспособностью по сравнению с контрольными клетками;
2. Морфология клеток и архитектура ядрышка при нокдауне белков RPF1 и ESF1 не меняется, однако происходит перемещение структурного белка ядрышка NPM1/B23 в нуклеоплазму;

3. Уровни свободных 40S, 60S рибосомных субъединиц, а также 80S рибосом и полисом при нокдауне белка RPF1 значимо не изменяются. При нокдауне белка ERF1 наблюдается снижение содержания 40S субъединицы;

4. Нокдаун белков человека RPF1 и ERF1 приводит к нарушениям процессинга пре-рРНК, которые свидетельствуют о нарушении разрезания по сайтам 4 и A0, соответственно;

5. Белки RPF1 и ERF1 входят в состав пре-60S и пре-40S частиц, соответственно, т.к. соосаждаются с ними при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 4 оригинальные статьи в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки России.

Объем и структура работы

Диссертационная работа изложена на 100 страницах, содержит 26 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 211 источников.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2024-536).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Нокдаун RPF1 или ESF1 не нарушает общую морфологию ядрышка, но индуцирует накопление NPM1 в нуклеоплазме

Rpf1 и Esf1 являются ядрышковыми белками, участвующими в биогенезе 60S и 40S субъединиц у *S. cerevisiae*, соответственно. Оба фактора имеют человеческие гомологи, RPF1 и ESF1, данные о функциях которых в клетках человека отсутствуют.

С целью изучения функций данных белков в данной работе был использован shRNA/siRNA-опосредованный нокдаун RPF1 и ESF1 в клетках HEK293 человека, которые являются стабильной трансформированной линией, для которой созданы надежные молекулярно-биологические и биохимические методы анализа. К последовательностям мРНК RPF1 и ESF1 были выбраны и протестированы 2 генетически-кодируемые малые шпилечные РНК (Рисунок 1а, б).

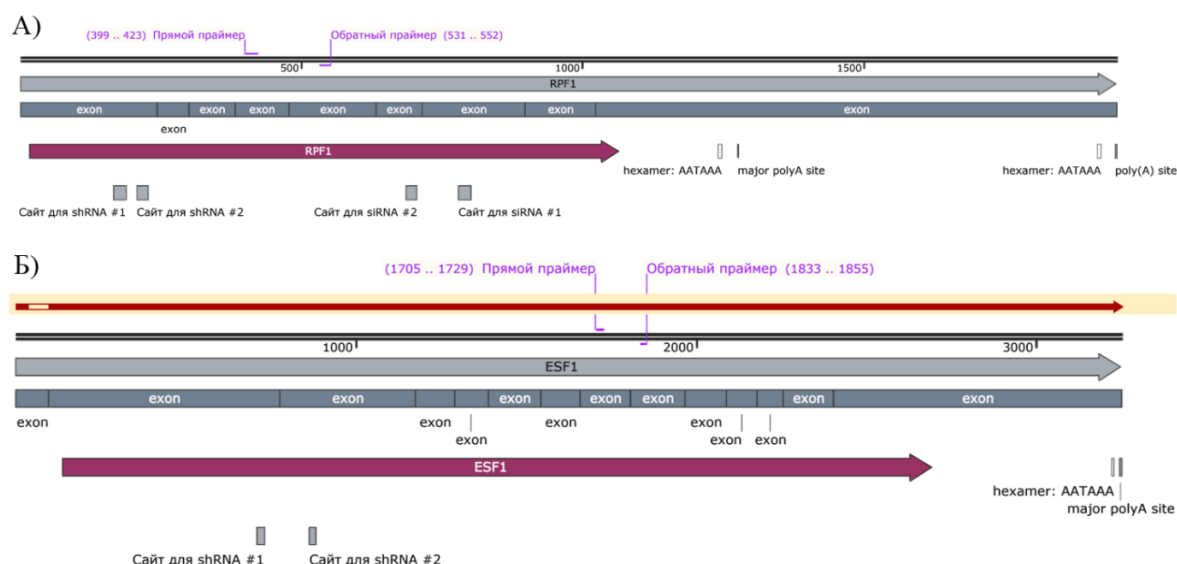


Рисунок 1. Расположение сайтов shRNA и siRNA, а также праймеров для ПЦР в реальном времени в транскриптах белков RPF1 и ESF1. а) Схема транскрипта белка RPF1; б) Схема транскрипта белка ESF1. Показано наложение двух аннотированных изоформ мРНК (красная и серая стрелки), демонстрирующие различие в области 5'UTR. Кодировующие последовательности RPF1 и ESF1 показаны бордовыми стрелками в нижних частях панелей.

В качестве контроля использовали контрольную РНК, не имеющую мишени в клетках человека (non-targeting control). Доставку генетических конструкций производили с помощью лентивирусной трансдукции. После отбора трансдуцированных клеток, экспрессирующих анти-RPF1 и анти-ESF1 малые шпилечные РНК, либо контрольную РНК, оценивали изменение содержания

транскриптов RPF1 и ESF1 методом обратной транскрипции-ПЦР в реальном времени. Изменение содержания исследуемых белков оценивали методом вестерн-блоттинга.

Уровень мРНК RPF1 был снижен на 87% и 78% (Рисунок 2а), в зависимости от используемой шпилечной РНК, при этом уровень белка - на 53% и 52%, соответственно (Рисунок 3а). Количество мРНК ESF1 при нокдауне было снижено на 64% и 72% для разных шпилек (Рисунок 2в), по сравнению с контролем, тогда как белка - на 77% (Рисунок 3в). Таким образом, нокдаун ESF1, судя по уровню белка, гораздо эффективнее, а для RPF1 удалось получить снижение по белку всего в 2 раза, несмотря на снижение мРНК RPF1 примерно в пять раз. Данный эффект может быть вызван адаптацией клеток со стабильным нокдауном RPF1 с помощью shRNA к потере фактора биогенеза за счет использования неустановленных компенсаторных механизмов. Поэтому было решено осуществить нокдаун RPF1 с помощью прямого введения малых интерферирующих РНК в клетки с помощью липосом. Было предположено, что введение больших доз siRNA и анализ результатов нокдауна вскоре (через 3-5 суток после введения) не даст клеткам возможности перестроить пути биогенеза и адаптироваться к потере данного фактора. Для оптимизации вводимых доз предварительно сформированные дуплексы siRNA вводили в клетки по отдельности в количестве 5 пмоль и 15 пмоль, а также дополнительно в виде смеси дуплексов с суммарным количеством РНК 5 пмоль и 15 пмоль (2,5 пмоль и 7,5 пмоль каждого дуплекса, соответственно). Как можно видеть (Рисунок 2б, рисунок 3б), временный нокдаун RPF1 с помощью малых РНК был эффективен как на уровне мРНК, так и на уровне белка, при этом наибольшая эффективность была достигнута при использовании siRNA#2 (90% относительное снижение по уровню мРНК и 95% - по уровню белка).

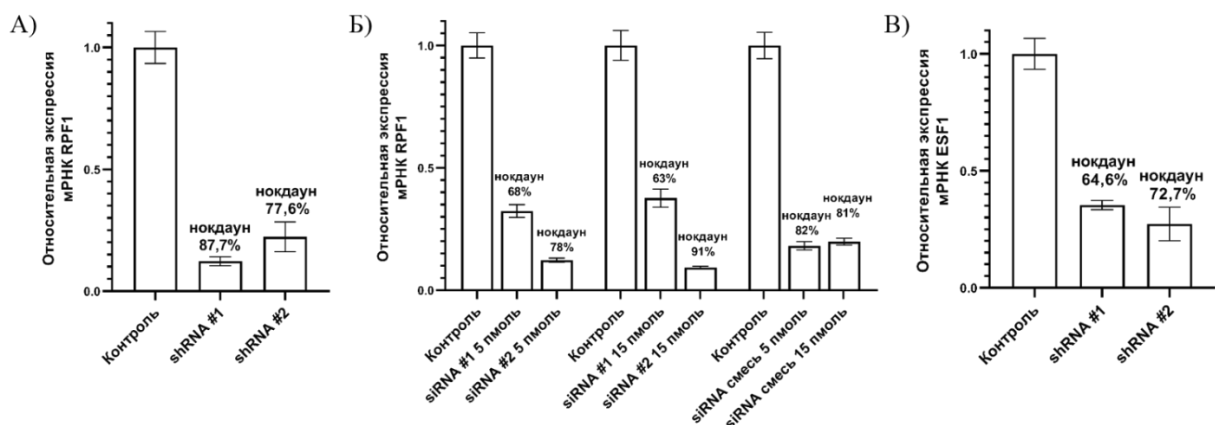


Рисунок 2. Уровни мРНК RPF1 и ESF1 уменьшаются при стабильной трансдукции shRNA или транзientной трансфекции с помощью siRNA клеток HEK293. а) Относительное уменьшение мРНК RPF1, определенное с помощью анализа тотальной

РНК методом ОТ-ПЦР в реальном времени для стабильных клеточных линий, экспрессирующих shRNA против RPF1 (shRNA#1 и shRNA#2) и контрольную shRNA, соответственно. б) Данные ПЦР в реальном времени для клеток линии HEK293, трансфицированных siRNA против RPF1 и контрольной siRNA (siRNA#1 и siRNA#2 отдельно или в смеси; количества дуплексов 5 пмоль или 15 пмоль); в) Данные ПЦР в реальном времени для стабильных клеточных линий, экспрессирующих shRNA против ESF1 (shRNA#1 и shRNA#2) и контрольную shRNA.

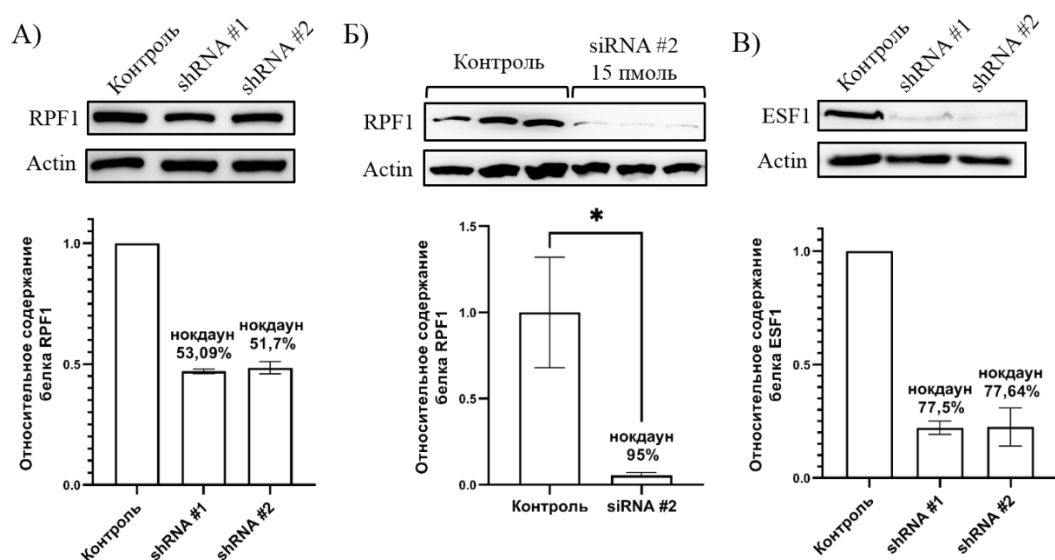


Рисунок 3. Уровень белков RPF1 и ESF1 уменьшается при введении shRNA или siRNA в клетки HEK293. а) Результаты вестерн-блота лизатов, полученных из стабильных клеточных линий, экспрессирующих shRNA против RPF1 (shRNA#1 и shRNA#2) и контрольную shRNA; б) Результаты вестерн-блота лизатов, полученных из клеток, трансфицированных siRNA против RPF1 (siRNA#2 в количестве 15 пмоль) и контрольной siRNA. Звезда показывает статистически значимые различия между контрольными клетками и клетками, трансфицированными анти-RPF1 siRNA ($p < 0,05$); в) Результаты вестерн-блота лизатов, полученных из стабильных клеточных линий, экспрессирующих shRNA против ESF1 (shRNA#1 и shRNA#2) и контрольную shRNA.

Истощение факторов биогенеза рибосом может вызывать ядрышковый стресс и нарушение структуры ядрышек из-за возникающего дисбаланса сборки прерибосомных частиц. Для оценки возможных изменений в архитектуре, которые могут выражаться как в изменении локализации ряда белков, так и в деградации данного компартмента, был использован метод иммунофлуоресцентного окрашивания и проведен анализ окрашенных клеток с помощью конфокальной микроскопии. Ядрышки клеток, в которых присутствуют shRNA против мРНК белков RPF1 и ESF1 или контрольная шпилечная РНК, окрашивали антителами анти-NPM1+анти-RPF1/анти-NPM1+анти-

ESF1 (нуклеофозмин/NPM1/B23 – белок-маркер гранулярного компонента) и анти-SURF6+анти-RPF1/анти-SURF6+анти-ESF1 (SURF6, согласно литературе, ко-локализуется с NPM1 в гранулярном компоненте). Оказалось, что выраженный переход NPM1 из ядрышка в нуклеоплазму происходит в клетках с нокдауном фактора биогенеза RPF1 (Рисунок 4), при этом похожий, но менее выраженный эффект наблюдается при нокдауне ESF1 (Рисунок 6). В то же время белок SURF6 преимущественно сохраняет локализацию в гранулярном компоненте (Рисунок 5, рисунок 7).

Для количественной оценки наблюдаемых изменений в клеточных популяциях с нокдауном RPF1 и ESF1 относительно контрольной клеточной линии рассчитывали коэффициенты вариации (CV) интенсивностей сигнала от NPM1 или SURF6 в ядрышках отдельных клеток. Чем ниже значение CV, тем более значимы выход из ядрышка и увеличение сигнала в нуклеоплазме. В результате проведенного анализа конфокальных снимков (не менее 56 клеток в каждой группе) доказано статистически значимое накопление NPM1 в нуклеоплазме клеток с нокдауном фактора биогенеза RPF1, при этом SURF6 преимущественно оставался в ядрышке (Рисунок 4а; рисунок 5а).

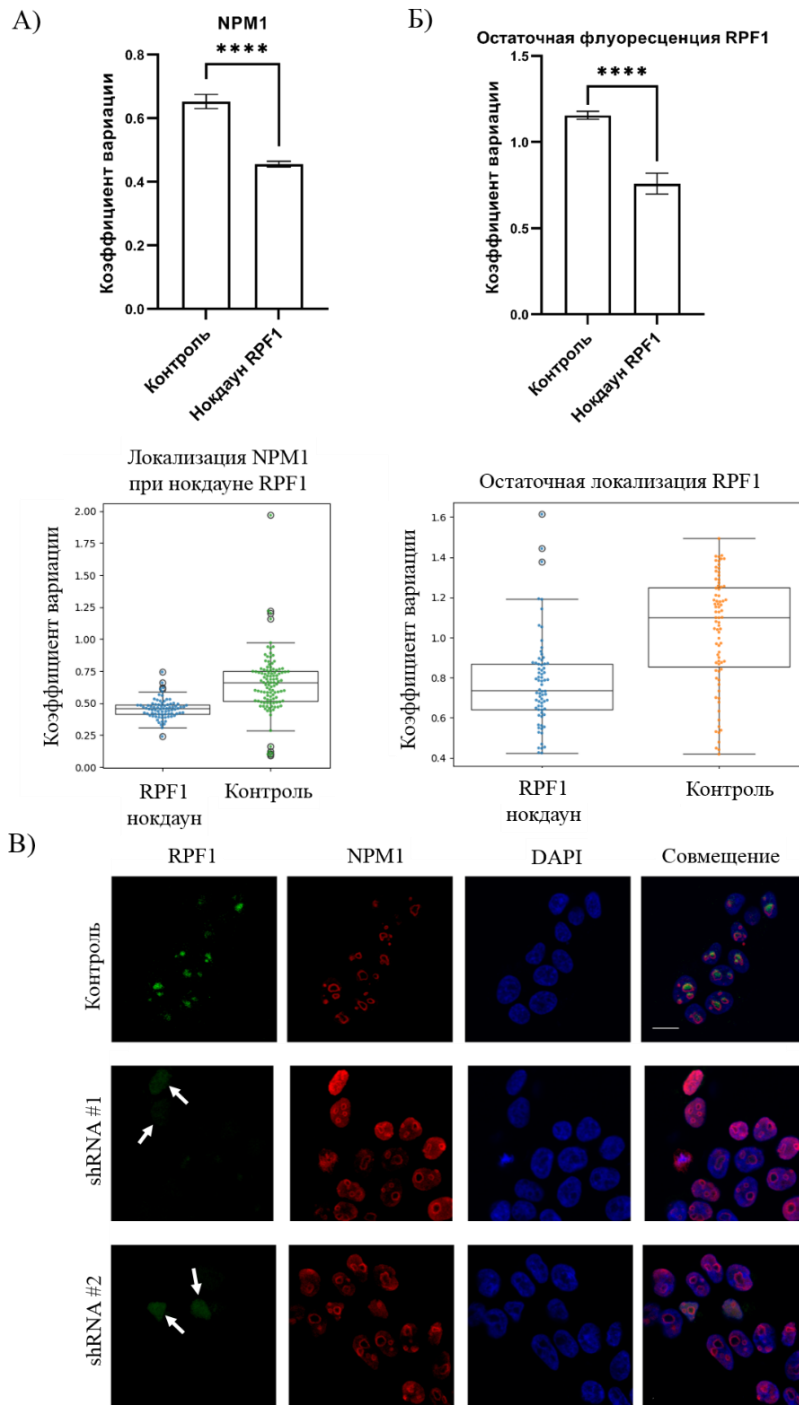


Рисунок 4. Переход NPM1 в нуклеоплазму в клетках стабильных клеточных линий, экспрессирующих shRNA против RPF1. Клетки были фиксированы и окрашены антителами к соответствующим белкам и DAPI для определения границ ядер. а) Коэффициенты вариации, характеризующие распределение NPM1 в ядрышках и нуклеоплазме контрольных клеток и клеток с нокадауном RPF1; б) Коэффициенты вариации, характеризующие распределение остаточного сигнала RPF1 в ядрышке и нуклеоплазме в контрольных клетках и в клетках с нокадауном RPF1; в) Конфокальные изображения клеток линии HEK293, стабильно экспрессирующих контрольную shRNA или shRNA против мРНК фактора биогенеза рибосом RPF1 (shRNA#1 и shRNA#2).

Стрелки указывают на свечение оставшегося вследствие неполного нокдауна RPF1 в нуклеоплазме.

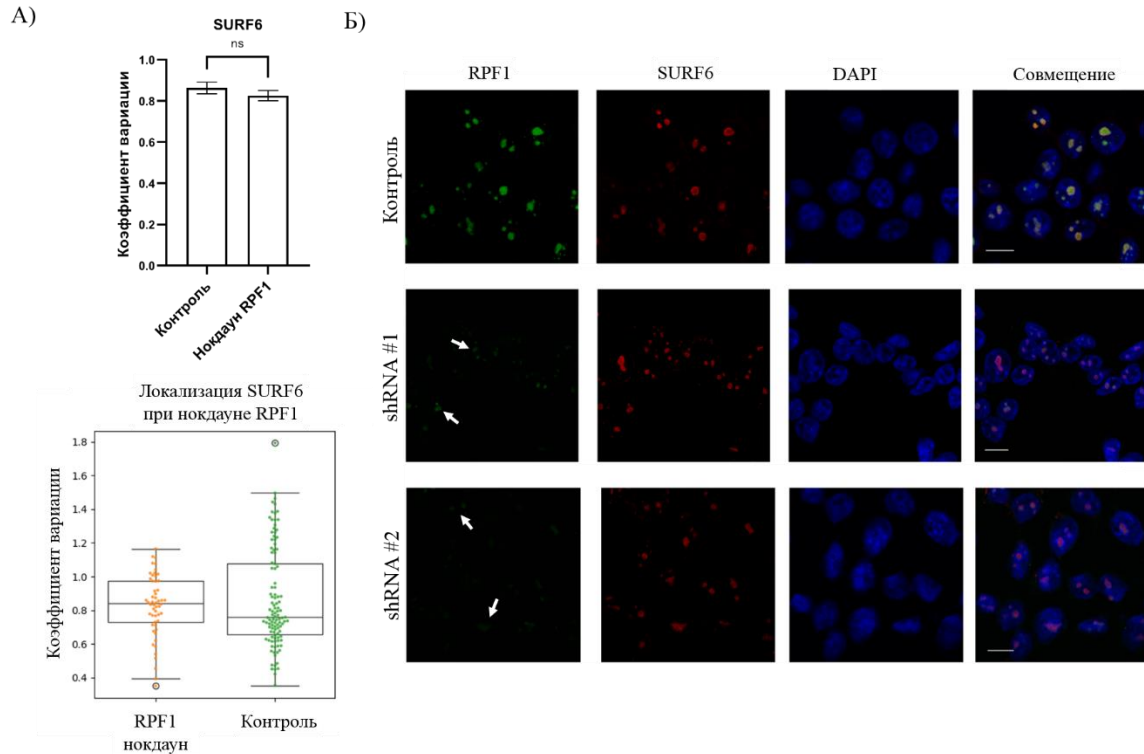


Рисунок 5. Локализация SURF6 в клеточных линиях с shRNA-опосредованным нокадауном RPF1. Клетки были фиксированы и окрашены антителами к соответствующим белкам и DAPI для определения границ ядер. а) Коэффициенты вариации, характеризующие распределение белка SURF6 в ядрышке и нуклеоплазме клеток, экспрессирующих контрольную shRNA и shRNA против мРНК фактора биогенеза рибосом RPF1; б) Конфокальные изображения клеток линии HEK293, стабильно экспрессирующих контрольную shRNA или shRNA против мРНК фактора биогенеза рибосом RPF1 (shRNA#1 и shRNA#2). Стрелки указывают на сигнал от остаточного RPF1 в нуклеоплазме.

В клеточных линиях с нокадауном фактора биогенеза ESF1 наблюдался аналогичный переход NPM1 в нуклеоплазму, хотя и менее выраженный (Рисунок 6). Белок SURF6 при этом также сохранял свою локализацию в гранулярном компоненте ядрышек (рисунок 7).

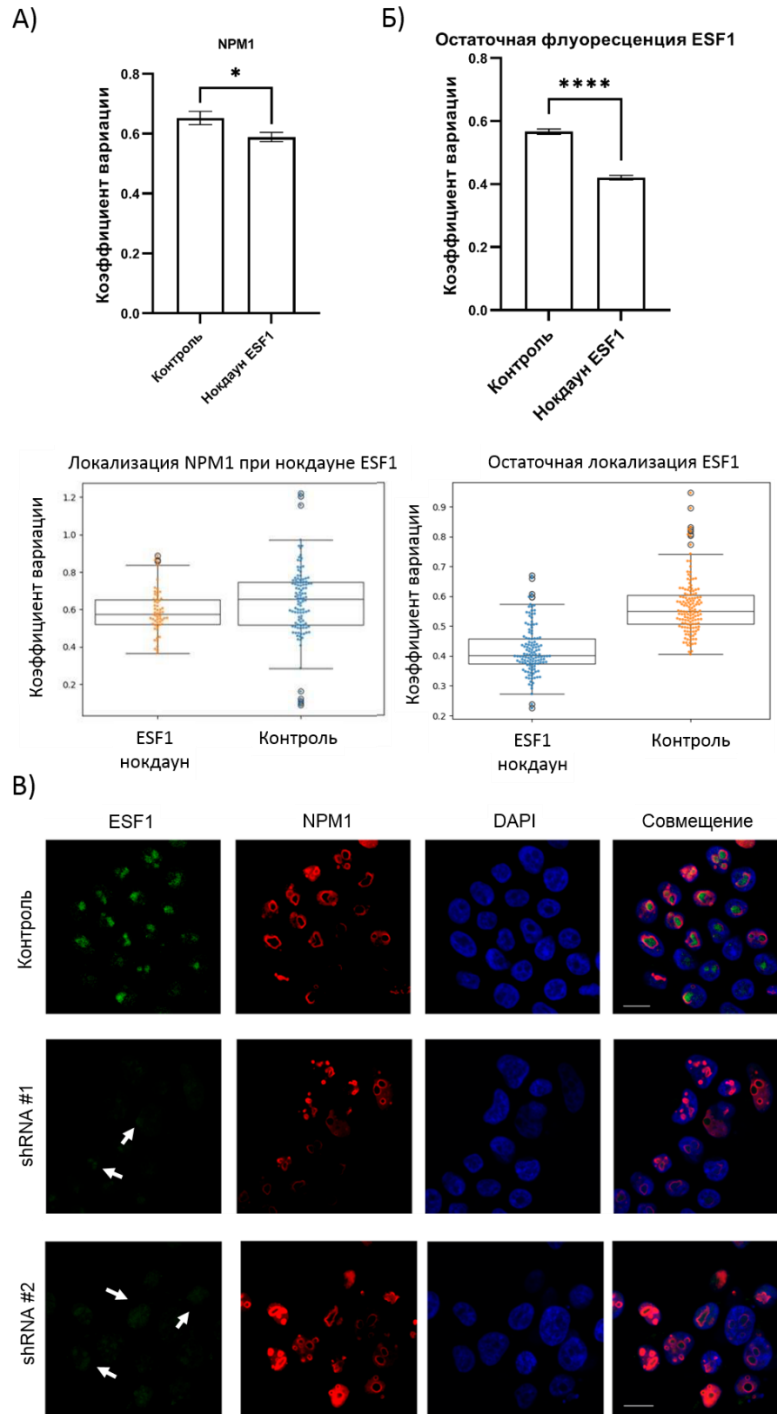


Рисунок 6. Переход NPM1 в нуклеоплазму в клетках стабильных клеточных линий, экспрессирующих shRNA против ESF1. а) Коэффициенты вариации, характеризующие распределение NPM1 в ядрышках и нуклеоплазме контрольных клеток и клеток с нокадауном ESF1; б) Коэффициенты вариации, характеризующие распределение остаточного сигнала ESF1 в ядрышке и нуклеоплазме в контрольных клетках и в клетках с нокадауном ESF1; в) Конфокальные изображения клеток линии HEK293, стабильно экспрессирующих контрольную shRNA или shRNA против мРНК фактора биогенеза рибосом ESF1 (shRNA#1 и shRNA#2). Стрелки указывают на сигнал ESF1 в нуклеоплазме.

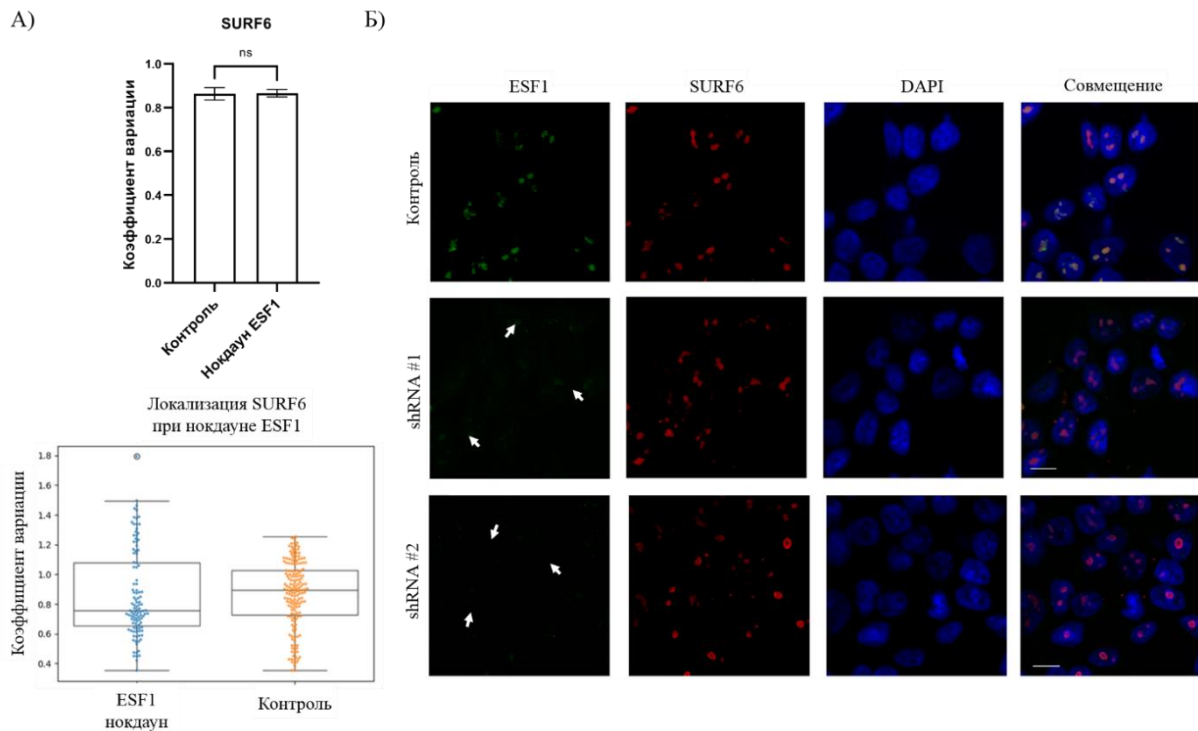


Рисунок 7. Локализация SURF6 в клеточных линиях с shRNA-опосредованным нокдауном ESF1. а) Коэффициенты вариации, характеризующие распределение белка SURF6 в ядрышке и нуклеоплазме клеток, экспрессирующих контрольную shRNA и shRNA против мРНК фактора биогенеза рибосом ESF1; б) Конфокальные изображения клеток линии HEK293, стабильно экспрессирующих контрольную shRNA или shRNA против мРНК фактора биогенеза рибосом ESF1 (shRNA#1 и shRNA#2). Стрелки указывают на сигнал ESF1 в нуклеоплазме.

Данные результаты позволяют заключить, что общая морфология ядрышек не нарушается. Одновременно с этим, определенные стадии процессинга пре-рРНК, сопряженные с участием NPM1, вероятно претерпевают изменения, приводящие к диссоциации и выходу этого важного белка в нуклеоплазму. Не исключено, что нокдаун, а также вызванное им изменение ядрышковой локализации остаточных RPF1 и ESF1 на ядерную, сказываются на биогенезе рибосом, особенно если учитывать критически важные функции их дрожжевых гомологов.

Нокдаун белка RPF1 увеличивает содержание 5'ETS-содержащих предшественников

NPM1 является наиболее распространенным ядрышковым белком, выполняющим множество функций. Изменение его локализации, в частности, может быть связано с снижением транскрипционной активности РНК полимеразы I. Как видно

из рисунка 4, нокдаун RPF1 приводит к выраженному переходу NPM1 в нуклеоплазму. Чтобы исключить возможный эффект нокдауна белка RPF1 на РНК полимеразу I провели пульс-мечение РНК стабильных клеточных линий с помощью этилилуридина с последующим выделением тотальной клеточной РНК и клик-биотинилированием РНК, в которые включился этилилуридин. Последовательности рибосомной ДНК – это наиболее активно транскрибируемые участки генома, поэтому рибосомные РНК – это наиболее представленные РНК. Соответственно, встраивание этилилуридина в них должно быть очень эффективным по сравнению с другими клеточными РНК. Выделение молекул РНК, меченых биотином, с использованием магнитных частиц, покрытых стрептавидином, позволило обогатить образцы РНК, в которые встроился этилилуридин. Активность РНК полимеразы I оценивали по содержанию наиболее раннего рРНК предшественника, содержащего непротессированный 5'ETS спейсер. Для этого провели синтез кДНК на матрице РНК, которые были связаны с магнитными частицами, а затем ПЦР в реальном времени с праймерами, которые комплементарны близкой к 5' концу области 5'ETS. В качестве положительного контроля использовали клетки HEK293, которые инкубировали в течение 1 часа в среде, содержащей актиномицин D в рабочей концентрации 50 нг/мл. Обработка актиномицином в данной дозе должна селективно ингибировать РНК полимеразу I. Полученные результаты демонстрируют достоверное снижение содержания раннего 5'ETS предшественника, примерно в 5 раз в клетках, обработанных актиномицином D, по сравнению с контролем (Рисунок 8б). Полученные результаты также свидетельствуют, что содержание раннего непротессированного короткоживущего предшественника 5'ETS значительно повышено в клетках с нокдауном RPF1. Можно сделать вывод, что, вопреки ожиданиям, количество непротессированного предшественника значительно повышено, что указывает либо на дефект процессинга пре-рРНК, либо на увеличение активности РНК полимеразы I.

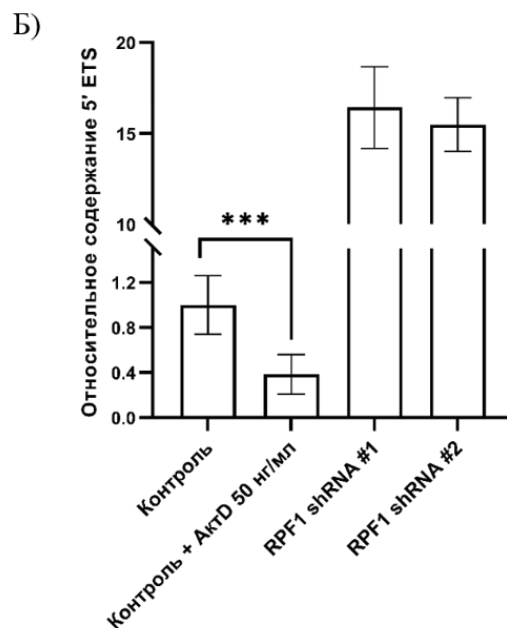
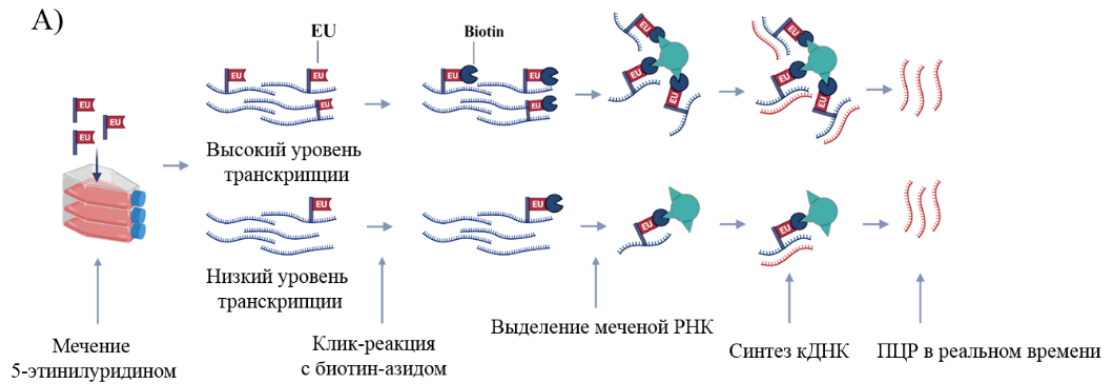


Рисунок 8. Мечение стабильных клеточных линий, экспрессирующих контрольную shRNA или shRNA против мРНК RPF1 (shRNA#1 и shRNA#2), с помощью этилилуридина. а) Схема эксперимента; б) Данные ПЦР в реальном времени, характеризующие содержание 5'ETS пре-рРНК в стабильных клеточных линиях, экспрессирующих shRNA против RPF1 (shRNA#1 и shRNA#2) и контрольную shRNA. Звезды обозначают статистически значимые различия между контролем и клетками, обработанными актиномицином D в концентрации 50 нг/мл (***) $p < 0,001$).

Нокдаун RPF1 преимущественно приводит к изменению профиля пре-рРНК в биогенезе 60S субъединицы

Ввиду того, что процессинг пре-рРНК представляет собой серию последовательных событий, наблюдаемые изменения стационарных уровней пре-рРНК могут являться результатом нескольких молекулярных событий, происходящих на разных стадиях биогенеза. Конкретизация молекулярных событий, приводящих к накоплению/снижению определенных пре-рРНК, требует детального анализа

соотношений между различными предшественниками. Во-первых, рассчитывают отношение интенсивности сигнала каждого предшественника к общему, 45/47S. Во-вторых, рассчитывают отношения интенсивности сигнала определенной пре-рРНК к ее ближайшему предшественнику. Такой анализ (RAMP анализ) позволяет с высокой точностью определить, нарушения какой стадии процессинга приводят к изменению уровня конкретной пре-рРНК.

В результате, нами обнаружено, что нокдаун RPF1 с помощью shRNA приводит к увеличению отношения 32S, 30S и 26S к предшественнику 47S, а также отношения 32S к предшественнику 41S. Кроме того, наблюдалось уменьшение отношения 12S к 32S и 26 к 30S (Рисунок 9). Изменения уровней 32S/47S, 32S/41S и 12S/32S свидетельствует об ингибировании процессинга предшественника 32S по сайту 4 региона ITS2 (См. схему на рисунке 15). Наблюдаемое повышение отношения предшественников 30S и 26S к первичному транскрипту 47S может быть связано со снижением уровня предшественника 47S в клетках с дефицитом RPF1 или с изменениями в процессинге раннего 5'ETS предшественника, увеличение содержания которого было продемонстрировано ранее.

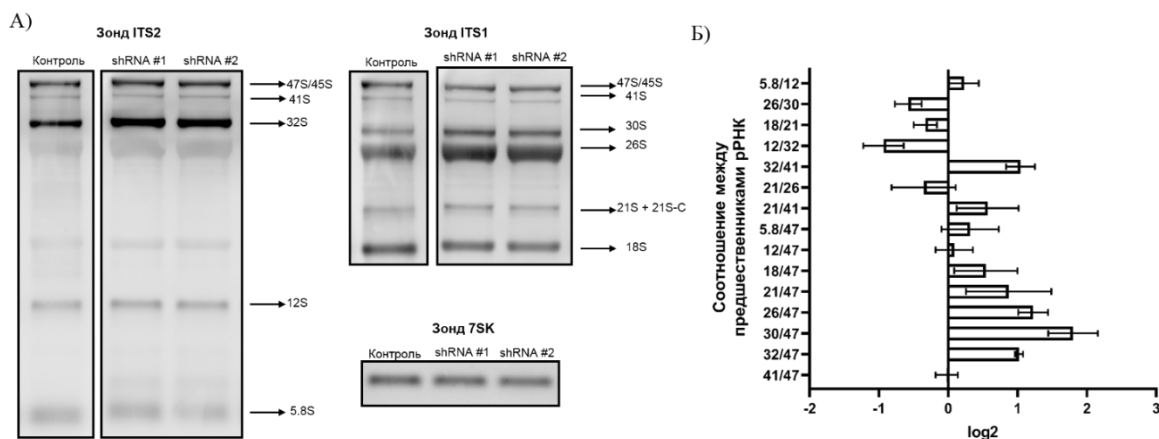


Рисунок 9. Изменение процессинга пре-рРНК в стабильных клеточных линиях, экспрессирующих shRNA против мРНК RPF1. а) Нозерн-блоттинг образцов тотальной РНК из контрольных клеток и клеток с нокдауном RPF1. Гибридизация с биотинилированными зондами ITS1, ITS2 и 7SK. Показан один репрезентативный эксперимент из трех. б) Результаты RAMP-анализа. Графики показывают нормированные средние значения соотношений между различными предшественниками рРНК.

Нокдаун RPF1 с помощью shRNA, показал эффективность ~ 50%, а siRNA-опосредованный нокдаун был значительно более эффективен (95% по сравнению с

контролем). Поэтому было принято решение изучить эффект от нокдауна RPF1 с помощью siRNA на профиль пре-рРНК. Согласно анализу содержания пре-рРНК предшественников, а также по данным RAMP анализа, общий эффект нокдауна RPF1 с помощью siRNA характеризуется снижением соотношений уровней 12S/32S, 12S/47S, 32S/41S и 30S/47S, а также небольшим увеличением отношения 26S/30S (Рисунок 10). Хотя эти эффекты отличаются от тех, которые наблюдаются для стабильных клеточных линий, в совокупности они указывают на изменения процессинга в направлении 41S–32S–12S биогенеза рибосом (См. схему на рисунке 15). Следует отметить, что, вопреки ожиданиям, эффекты от siRNA нокдауна были слабее, чем от shRNA. Возможно это связано с тем, что клетки в течение короткого времени после введения ингибирующих РНК не успевают приспособиться к дефициту RPF1, что вероятно происходит в случае конститутивного нокдауна с помощью shRNA.

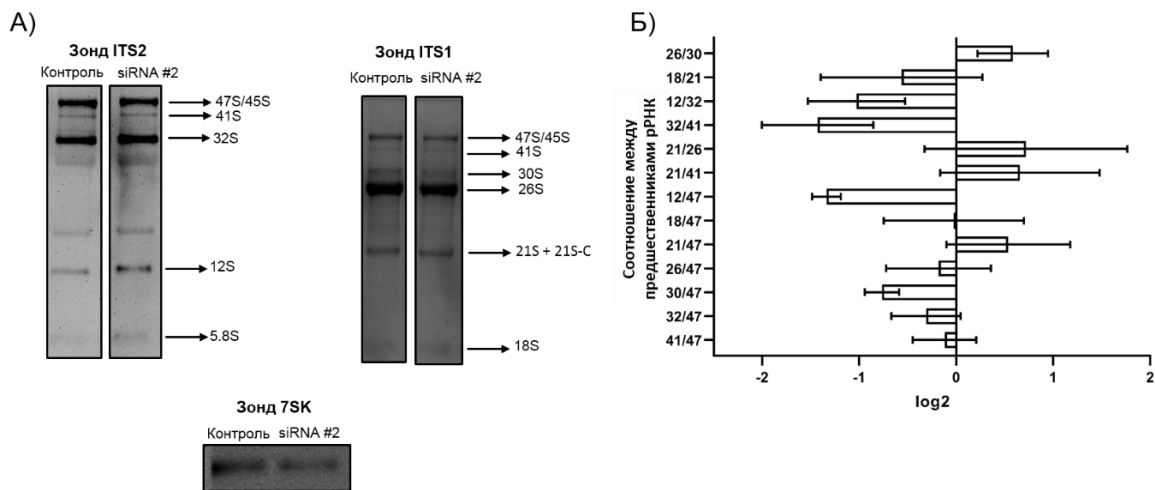


Рисунок 10. Изменения процессинга пре-рРНК в HEK293 с нокдауном RPF1 с помощью siRNA. а) Нозерн-блоттинг образцов тотальной РНК из контрольных клеток и клеток с нокдауном RPF1. Гибридизация с биотинилированными зондами ITS1, ITS2 и 7SK. Показан один репрезентативный эксперимент из трех; б) Результаты RAMP-анализа нозерн-гибридизации. Графики показывают нормированные средние значения соотношений между различными предшественниками рРНК.

Нокдаун ERF1 вызывает изменения в профиле предшественников 18S рРНК и ускорение пути биогенеза 2

Нокдаун ERF1 демонстрирует двойственный эффект на профиль пре-рРНК, оказывая влияние либо на процессинг предшественников 18S, либо на переключение путей биогенеза.

Накопление предшественника 30S приводит к увеличению соотношения 30S/47S и уменьшению соотношения 26S/30S (Рисунок 11). В совокупности эти данные

убедительно демонстрируют ингибирование расщепления пре-рРНК преимущественно в сайте A0 в пределах 5'ETS (См. схему на рисунке 15). В клетках дрожжей *S. cerevisiae* Esf1 участвует в процессинге пре-рРНК не только в сайте A0, но и в сайте A2. Согласно принятой в настоящее время модели процессинга пре-рРНК, нарушение расщепления по сайту E должно сопровождаться разобщением превращений 21S-C – 18S-E и/или 41S – 18S-E + 36S. В клетках дикого типа предшественник 36S либо не образуется при расщеплении пре-рРНК, либо очень быстро процессируется, что делает невозможным его детекцию с помощью нозерн-блоттинга. Тем не менее, в ходе скрининга факторов, вовлеченных в биогенез рибосом у высших эукариот, нокдаун некоторых белков приводил к выраженному накоплению 36S пре-рРНК. В наших условиях мы не наблюдали появления 36S пре-рРНК, но отмечали небольшое снижение соотношения 18S/21S, что может свидетельствовать о слабом ингибирующем эффекте нокдауна ESF1 на сайт E в клетках человека (См. схему на рисунке 15).

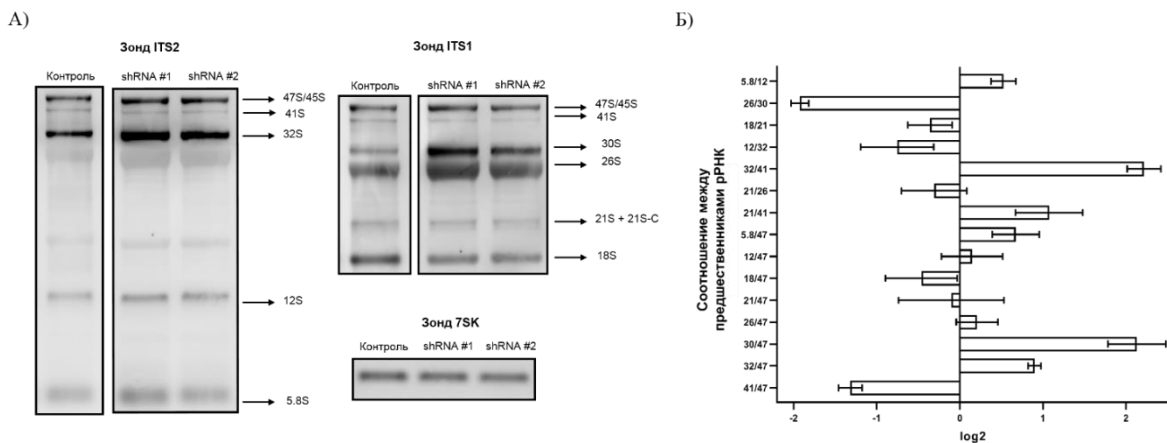


Рисунок 11. Изменение процессинга пре-рРНК в стабильных клеточных линиях, экспрессирующих shRNA против мРНК ESF1. а) Нозерн-блоттинг образцов тотальной РНК из контрольных клеток и клеток с нокдауном ESF1. Гибридикация с биотинилированными зондами ITS1, ITS2 и 7SK. Показан один репрезентативный эксперимент из трех. б) Результаты RAMP-анализа нозерн-гибридикации. Графики показывают нормированные средние значения соотношений между различными предшественниками рРНК.

Помимо вышеописанных изменений процессинга пре-рРНК при нокдауне фактора ESF1 RAMP анализ выявил уникальные эффекты, не описанные на моделях биогенеза рибосом у низших эукариот. Согласно полученным результатам, наблюдается увеличение соотношений 32S/47S, 32S/41S и 21S/41S, а также уменьшение соотношения 41S/47S (Рисунок 11). Подобные изменения указывают на ускорение пути процессинга 2, который, вероятно, включает альтернативные стадии, необходимые либо для

расщепления в сайте A0, либо для его пропуска с целью поддержания уровня зрелой 18S рРНК (См. схему на рисунке 15).

Факторы биогенеза рибосом RPF1 и ESF1 ко-седиментируют с предшественниками 60S и 40S субъединиц, соответственно

Теоретически, нокдаун белков RPF1 и ESF1 с помощью shRNA может оказывать косвенное влияние на сцепленные с биогенезом рибосом внутриклеточные процессы и, тем самым, вызывать наблюдаемые изменения профиля прерибосомных РНК. Следовательно, чтобы доказать, что RPF1 и ESF1 непосредственно участвуют в биогенезе рибосом, необходимо продемонстрировать их прямое связывание с прерибосомами 60S и 40S.

Для подтверждения включения белков RPF1 и ESF1 в состав ранних прерибосомных частиц, было использовано центрифугирование ядрышковой фракции клеток НЕК293 дикого типа в градиенте сахарозы. Для этого сначала выделяли ядра путем гипосмотического лизиса, а затем полученные препараты ядер пропускали через 10% сахарозную подушку. Очищенные ядра обрабатывали буфером, содержащим 0,1% неионного детергента и ДНКазу I для разрушения ядерной мембраны и отделения геномной ДНК. Полученные экстракты ядер, содержащие преимущественно фракцию растворимых и нерастворимых компонентов ядрышка, наносили на линейный градиент сахарозы 10%-50% с последующим ультрацентрифугированием (результатирующий профиль представлен на рисунке 12). С целью характеристики профиля пре-РНК и подтверждения содержания белков RPF1 и ESF1 в конкретных фракциях РНК и белки выделяли отдельно из каждой фракции и анализировали с помощью нозерн- и вестерн-блоттинга. Результаты нозерн-гибридизации с зондами, комплементарными 28S и 18S сегментам пре-рРНК, демонстрируют эффективное разделение предшественников 60S и 40S субъединиц в градиенте плотности сахарозы (Рисунок 12б). Гибридизация с зондом, комплементарным сегменту ITS2 пре-рРНК, выявила обогащение выделяемого и наносимого на градиент образца предшественниками рибосом. Полученные результаты демонстрируют наличие прерибосомных частиц, содержащих 32S и 12S пре-рРНК, что предполагает эффективное удаление зрелых субъединиц, присутствующих в цитоплазме (Рисунок 12б). Результаты вестерн-блоттинга с антителами против RPF1 и против ESF1 позволяют сделать вывод о ко-седиментации RPF1 с пре-60S частицей, а ESF1 – с пре-40S частицей (Рисунок 12а).

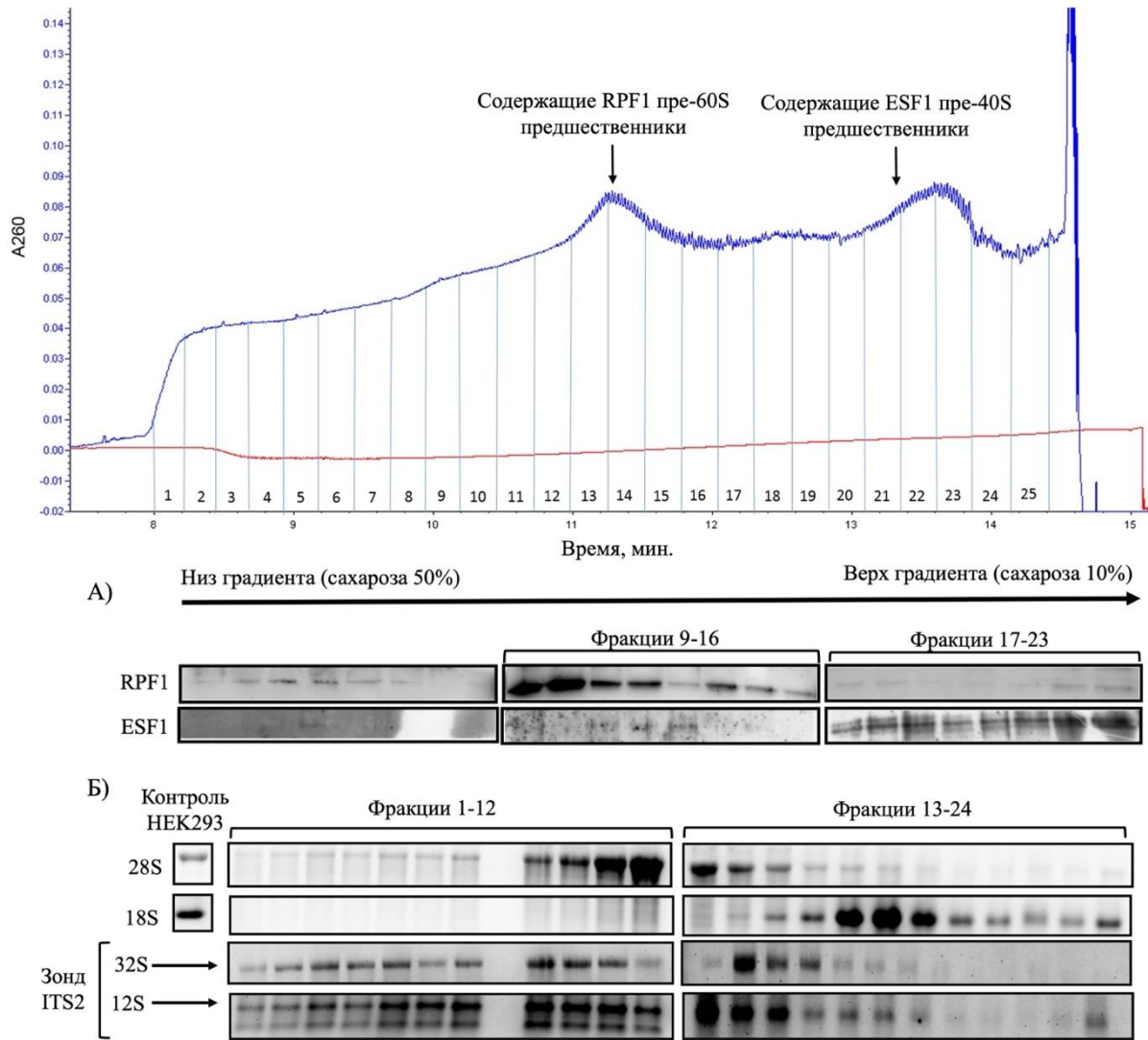


Рисунок 12. Профиль градиента сахарозы ядрышковой фракции клеток HEK293 дикого типа. а) Результаты вестерн-блоттинга белков, выделенных из фракций градиента; б) Образцы РНК из отдельных фракций анализировали с помощью нозерн-блоттинга и окрашивали зондами на 28S и 18S рРНК, а также зондом ITS2 для визуализации рибосом.

Нокдаун факторов биогенеза рибосом RPF1 и ESF1 не приводит к заметному изменению профиля полисом в клетках

Истощение факторов биогенеза рибосом теоретически должно влиять на сборку соответствующих субъединиц и приводить к уменьшению фракции полисом из-за недостаточного образования трансляционно-компетентных рибосом. Для оценки влияния нокдауна факторов биогенеза рибосом RPF1 и ESF1 на профиль полисом с помощью сахарозных градиентов были проанализированы лизаты клеток HEK293, обработанных циклогексимидом (ингибитор стадии элонгации в процессе синтеза белка).

Согласно полученным результатам, нокдаун RPF1 не приводит к значимому снижению общего содержания 60S-80S рибосомных частиц (Рисунок 13а). В свою очередь, в результате нокдауна ESF1 наблюдается заметное снижение содержания 40S рибосомных субъединиц, а активность shRNA#1 приводит к небольшому уменьшению содержания 80S частиц (Рисунок 13б). При этом, как в случае нокдауна RPF1, так и в случае нокдауна ESF1 не отмечено глобальных изменений в профиле полисом. Таким образом, полученные данные демонстрируют, что клетки с истощением RPF1 или ESF1, в целом, сохранили трансляционную активность, необходимую для поддержания синтеза белка. Данный вывод подкрепляется результатами оценки метаболической активности клеток с помощью теста AlamarBlue (Рисунок 14). Интересно отметить, что клетки с нокдауном белка RPF1, сопровождающимся отсутствием изменений в профиле полисом и 60S-80S частиц, более выражено снижают свою метаболическую активность, в отличие от клеток с нокдауном ESF1 (Рисунок 14б). Такие наблюдения позволяют с осторожностью предположить, что более ранние нарушения процессинга могут купироваться клетками более эффективно, возможно, за счет высокой структурной пластичности ранних комплексов-предшественников.

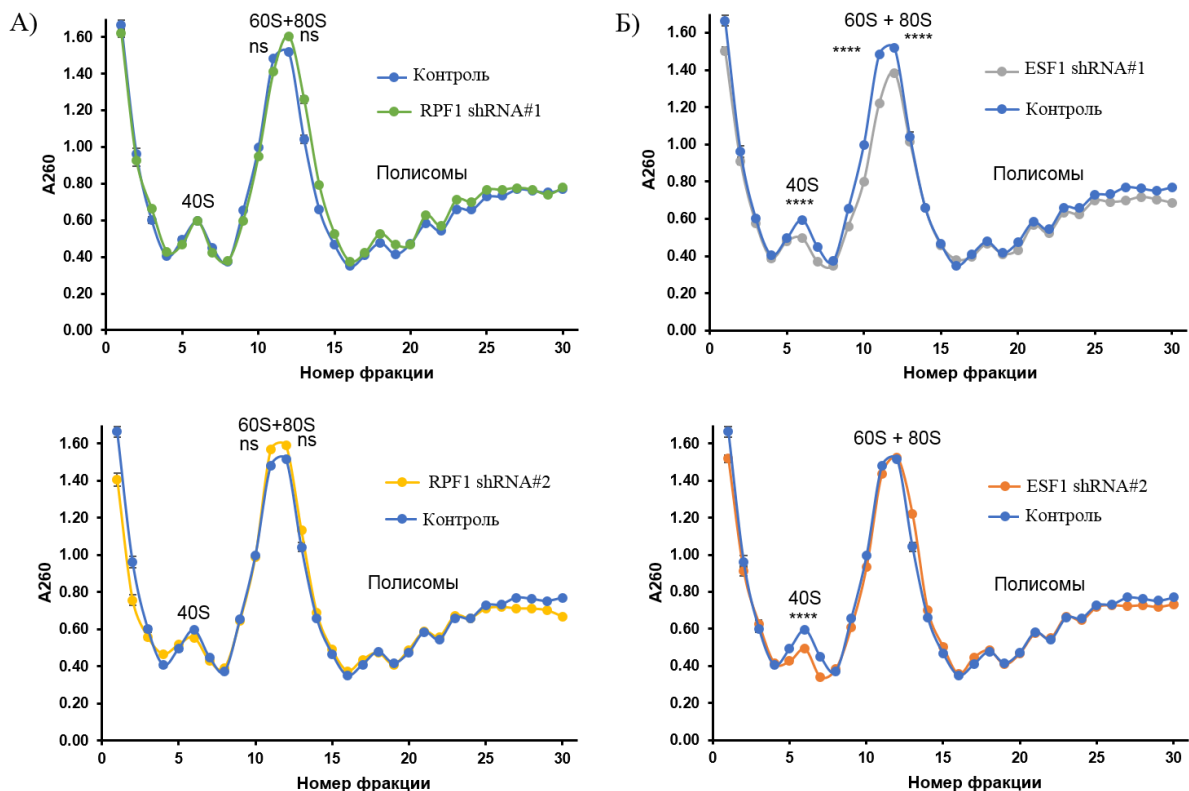


Рисунок 13. Профили полисом из цитоплазматической фракции контрольных клеток HEK293 и клеток HEK293 с нокдауном RPF1 или ESF1. а) Профили сахарозных градиентов, полученных из клеток с нокдауном RPF1 и контрольных клеток. б) Профили

сахарозных градиентов, полученных из клеток с нокдауном ESF1 и контрольных клеток. Фракции собирали вручную и измеряли A260 с помощью спектрофотометра. Показаны средние значения трех независимых экспериментов. Звезды указывают на статистически значимые различия между контролем и клетками с нокдауном RPF1/ESF1 (**** $p < 0,0001$).

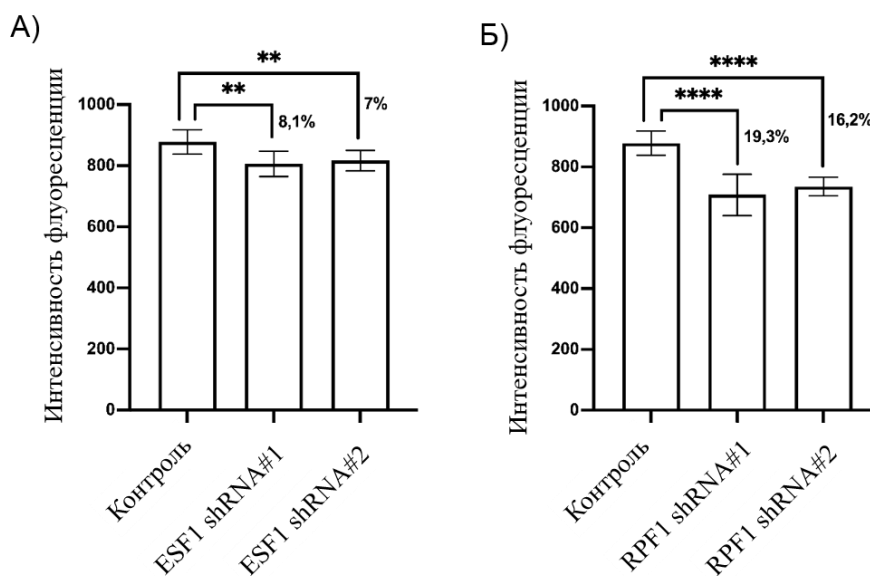


Рисунок 14. Оценка метаболической активности клеток, стабильно трансдуцированных контрольной shRNA или shRNA против мРНК белков RPF1 или ESF1 (shRNA#1 и shRNA#2) с помощью теста AlamarBlue. а) Результаты теста AlamarBlue, полученные на клетках с нокдауном ESF1 и контрольных клетках, представленные в виде гистограмм. б) Результаты теста AlamarBlue, полученные на клетках с нокдауном RPF1 и контрольных клетках, представленные в виде гистограмм. На графике показаны значения оптической плотности при 570 нм. Показаны средние значения трех независимых экспериментов. Звезды указывают на статистически значимые различия между контролем и клетками с нокдауном RPF1/ESF1 (** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$).

Продукт транскрипции РНК полимеразы I

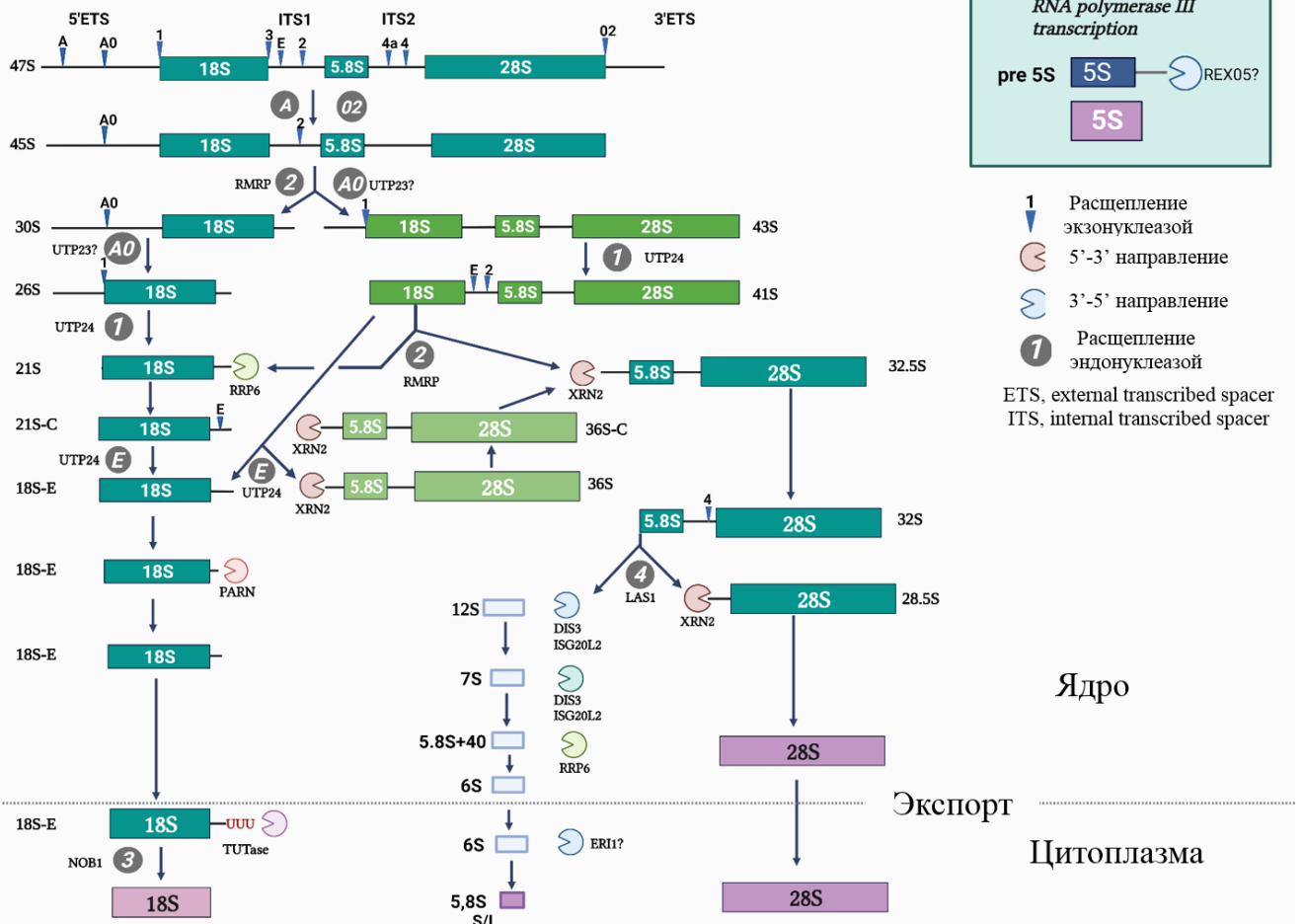


Рисунок 15. Схема процессинга пре-рРНК в клетках млекопитающих.

Выводы

1. Клетки НЕК293 с нокдауном факторов биогенеза рибосом человека RPF1 и ESF1 обладают пониженной жизнеспособностью по сравнению с контрольными клетками.
2. Морфология клеток и архитектура ядрышка при нокдауне белков RPF1 и ESF1 не меняется, однако происходит перемещение структурного белка ядрышка NPM1/B23 в нуклеоплазму.
3. Уровни свободных 40S, 60S рибосомных субъединиц, а также 80S рибосом и полисом при нокдауне белка RPF1 значимо не изменяются. При нокдауне белка ESF1 наблюдается снижение содержания 40S субъединицы.
4. Нокдаун белков человека RPF1 и ESF1 приводит к нарушениям процессинга прерибосомной РНК, которые свидетельствуют о нарушении разрезания по сайтам 4 и A0, соответственно.
5. Белки RPF1 и ESF1 входят в состав пре-60S и пре-40S частиц, соответственно, т.к. соосаждаются с ними при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Deryabin A., Moraleva A., Dobrochaeva K., Kovaleva D., Rubtsova M., Dontsova O., Rubtsov Y. Human RPF1 and ESF1 in Pre-rRNA Processing and the Assembly of Pre-Ribosomal Particles: A Functional Study // *Cells*. – 2024. – Vol. 13. – No. 4. – P. 326-344.
2. Moraleva A.*, Deryabin A.*, Kordyukova M.*, Polzиков M., Shishova K., Dobrochaeva K., Rubtsov Y., Rubtsova M., Dontsova O., Zatsepina O. Human nucleolar protein SURF6/RRP14 participates in early steps of pre-rRNA processing // *PLoS One*. – 2023. – Vol. 18. – No. 7.
(* обозначает равный вклад авторов)
3. Moraleva A., Deryabin A., Rubtsov Y., Rubtsova M., Dontsova O. Eukaryotic Ribosome Biogenesis: The 60S Subunit // *Acta Naturae*. – 2022. – Vol. 14. – No. 2. – P. 39-49.
4. Moraleva A., Deryabin A., Rubtsov Y., Rubtsova M., Dontsova O. Eukaryotic Ribosome Biogenesis: The 40S Subunit // *Acta Naturae*. – 2022. – Vol. 14. – No. 1. – P. 14-30.