

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 ERF1 В ПРОЦЕССИНГЕ ПРЕ-рРНК ЧЕЛОВЕКА**

Специальность 1.5.3. – Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
Доктор биологических наук  
Рубцов Юрий Петрович

**Москва – 2024**

## Оглавление

Список сокращений .....	5
Введение .....	7
Глава 1. Обзор литературы. ....	10
1.1. Эукариотическая рибосома.....	10
1.1.1. Строение эукариотической рибосомы .....	10
1.2. Биогенез рибосом эукариот.....	12
1.2.1. Биогенез рибосом – общие положения .....	12
1.2.2. Транскрипция 47S рибосомной РНК полимеразой I .....	19
1.2.3. Посттранскрипционные модификации пре-рРНК.....	22
1.2.4. Процессинг пре-рРНК.....	23
1.2.5. Созревание предшественников рибосом в ядрышке и нуклеоплазме ....	25
1.2.6. Финальные стадии созревания предшественников рибосом в цитоплазме .....	31
1.3. Ранние факторы биогенеза рибосом RPF1 и ERF1.....	35
1.3.1. RPF1 – фактор биогенеза 60S субъединицы.....	35
1.3.2. ERF1 – фактор биогенеза 40S субъединицы .....	36
Заключение.....	37
Глава 2. Материалы и методы. ....	38
2.1. Материалы. ....	38
2.1.1. Химические реактивы, буферные растворы и сопутствующие материалы .....	38
2.2. Методы. ....	40
2.2.1. Получение генетических конструкций .....	40
2.2.2. Культивирование клеток, трансфекция, получение лентивирусных частиц и лентивирусная трансдукция .....	41
2.2.3. Выделение РНК из клеток и реакционных смесей .....	42

2.2.4. Конъюгирование тотальной РНК с биотин-азидом с помощью клик-реакции .....	43
2.2.5. Электрофорез РНК в агазорном геле в денатурирующих условиях и нозерн-блоттинг .....	44
2.2.6. Анализ профиля предшественников рРНК.....	44
2.2.7. Выделение белка из образцов клеток и фракций сахарозных градиентов, электрофорез в денатурирующих условиях и вестерн-блоттинг .....	45
2.2.8. Синтез кДНК и ПЦР в реальном времени .....	46
2.2.9. Иммуноцитохимия и конфокальная микроскопия.....	46
2.2.10. Выделение ядерных прерибосомных комплексов и их центрифугирование в градиенте сахарозы .....	47
2.2.11. Профиль полисом .....	48
2.2.12. Обсчет изображений, полученных с помощью конфокальной микроскопии .....	48
2.2.13. Тест метаболической активности клеток с использованием аламарового синего.....	49
2.2.14. Статистический анализ .....	49
Глава 3. Результаты и их обсуждение .....	50
Введение.....	50
3.1. Нокдаун RPF1 или ERF1 не нарушает общую морфологию ядрышка, но индуцирует накопление NPM1 в нуклеоплазме .....	51
3.2. Нокдаун белка RPF1 увеличивает содержание 5'ETS-содержащих предшественников .....	61
3.3. Нокдаун RPF1 преимущественно приводит к изменению профиля пре-рРНК в биогенезе 60S субъединицы.....	63
3.4. Нокдаун ERF1 вызывает изменения в профиле предшественников 18S рРНК и ускорение пути биогенеза 2 .....	67
3.5. Факторы биогенеза рибосом RPF1 и ERF1 ко-седиментируют с предшественниками 60S и 40S субъединиц, соответственно .....	69

3.6. Нокаун факторов биогенеза рибосом RPF1 и ESF1 не приводит к заметному изменению профиля полисом в клетках.....	71
3.7. Обсуждение результатов .....	74
Выводы .....	80
Список литературы.....	81

## Список сокращений

АТФ - аденозинтрифосфат

АТФаза - аденозинтрифосфатаза

ГТФ - гуанозинтрифосфат

ГТФаза - гуанозинтрифосфатаза

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТТ - дитиотреитол

кБ – килобаза, 1000 нуклеотидов РНК/одноцепочечной ДНК или пар нуклеотидов  
двухцепочечной ДНК

Крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия

МДа - мегадальтон

мРНК – матричная РНК

мякРНК – малая ядрышковая РНК

Пре-рРНК – предшественник рибосомной РНК

ПТЦ – пептидилтрансферазный центр

рДНК – рибосомная ДНК

РНК – рибонуклеиновая кислота

РНИ – рибонуклеопротеиновый комплекс

рРНК – рибосомная РНК

тРНК – транспортная РНК

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЯОР – ядрышковый организатор

DEPC – diethyl pyrocarbonate

DMEM – Dulbeccos's Modified Eagle Medium

ETS – external transcribed spacer

HEK293 – human embryonic kidney, clone 293

IGS – intergenic spacer

ITS – internal transcribed spacer

LB – lysogeny broth

PMSF - phenylmethylsulfonyl fluoride

RNA – ribonucleic acid

SDS – sodium dodecyl sulphate

shRNA – short hairpin RNA

siRNA – small interfering RNA

SOB – super optimal broth

SOC - super optimal broth with catabolite repression

TBE - Tris-borate-EDTA buffer

TBST - tris-buffered saline and Polysorbate 20 buffer

TE – Tris-EDTA buffer

## Введение

Биогенез рибосом – это направленный процесс формирования компетентных к трансляции рибосомных субъединиц. Он начинается с транскрипции генов, кодирующих 47S предшественник рибосомной РНК в ядрышке, который, по мере перемещения в ядро, а затем в цитоплазму, подвергается процессингу экзо- и эндонуклеазами, посттранскрипционным модификациям (метилованию, псевдоуридилрованию, ацетилированию и другим) и образует сложные рибонуклеопротеидные комплексы с факторами биогенеза и рибосомными белками, что, в итоге, приводит к формированию необходимой третичной структуры 28S и 18S зрелых рибосомных РНК. Долгое время дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* были главным модельным организмом в исследованиях биогенеза рибосом, что позволило получить большой объем данных о фундаментальных принципах сборки рибосом. Но прерибосомные частицы высших эукариот, например, человека, имеют больший размер, а процессинг прерибосомных РНК имеет альтернативные пути, которые модулируют сборку и функционирование рибосом. Помимо этого, ядрышки в клетках высших эукариот устроены значительно сложнее, чем у дрожжей, ядрышковый протеом высших эукариот также значительно усложнен (1652 белка у дрожжей против ~4500 белков у человека). Более того, первичный транскрипт высших эукариот значительно длиннее (13,3 т.н. у человека против 6,7 т.н. у дрожжей), внутри пре-рРНК обнаружены дополнительные сайты расщепления, которых нет у дрожжей. Удлинение первичного 47S транскрипта высших эукариот произошло за счет значительного увеличения 5'ETS (~1000 нуклеотидов у дрожжей против ~3600 нуклеотидов у человека), что предполагает дополнительные стадии процессинга в ходе его удаления. Кроме того, у млекопитающих есть факторы биогенеза, которые не имеют дрожжевых гомологов, при этом гомологи млекопитающих нередко обладают отличными или дополнительными функциями, в отличие от белков дрожжей. Таким образом, несмотря на эволюционную консервативность, биогенез

рибосом высших эукариот и человека имеет существенные отличия от биогенеза рибосом дрожжей, которые в настоящее время плохо охарактеризованы.

Белки RPF1 и ESF1 являются ранними факторами биогенеза рибосом как у дрожжей, так и у человека. Функции человеческих белков RPF1 и ESF1 в значительной степени не охарактеризованы, хотя показано, что RPF1 определенно участвует в биогенезе 60S. В данной работе был использован опосредованный shRNA/siRNA нокдаун этих белков с целью определения их роли в биогенезе рибосом человека. Полученные результаты показывают, что RPF1 и ESF1 связаны с пре-60S и пре-40S частицами, соответственно, а также позволяют предположить, какие именно этапы процессинга пре-рРНК в значительной степени зависят от RPF1 и ESF1. Мы предполагаем, что оба фактора напрямую не участвуют в расщеплении пре-рРНК, а, по-видимому, помогают пре-рРНК приобрести конформацию, способствующую ее расщеплению другими факторами.

**Цель исследования:**

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

**Задачи исследования:**

1. Получить модифицированные клетки HEK293 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 настоящее время получены структурные данные, демонстрирующие архитектуру различных предшественников рибосом как низших эукариот (на



примере *S. Cerevisiae*), так и высших эукариот (на примере *H. Sapiens*). При этом для множества белков, входящих в состав прерибосомных частиц, отсутствуют функциональные данные.

В ходе исследования были получены новые данные о роли белков RPF1 и ESF1 в биогенезе рибосом человека. Результаты демонстрируют количественные изменения различных пре-рРНК, изменение поведения некоторых ядрышковых белков вследствие нокдауна RPF1 и ESF1, изменение активности РНК полимеразы I при нокдауне RPF1, а также полисомные профили клеток с нокдауном данных факторов. Эти данные дополняют и расширяют понимание биогенеза рибосом в клетках высших эукариот, а также показывают его лабильность и тонкую регулировку в зависимости от условий существования клетки.

#### **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 ESF1 наблюдается снижение содержания 40S субъединицы;
4. Нокдаун белков человека RPF1 и ESF1 приводит к нарушениям процессинга пре-рРНК, 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.

**Публикации.** Методологические основы данной работы представлены в публикации в журнале PLOS One (doi: 10.1371/journal.pone.0285833). Основные

результаты диссертации опубликованы в 4 оригинальных статьях в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах.

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.

**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.

## **Глава 1. Обзор литературы.**

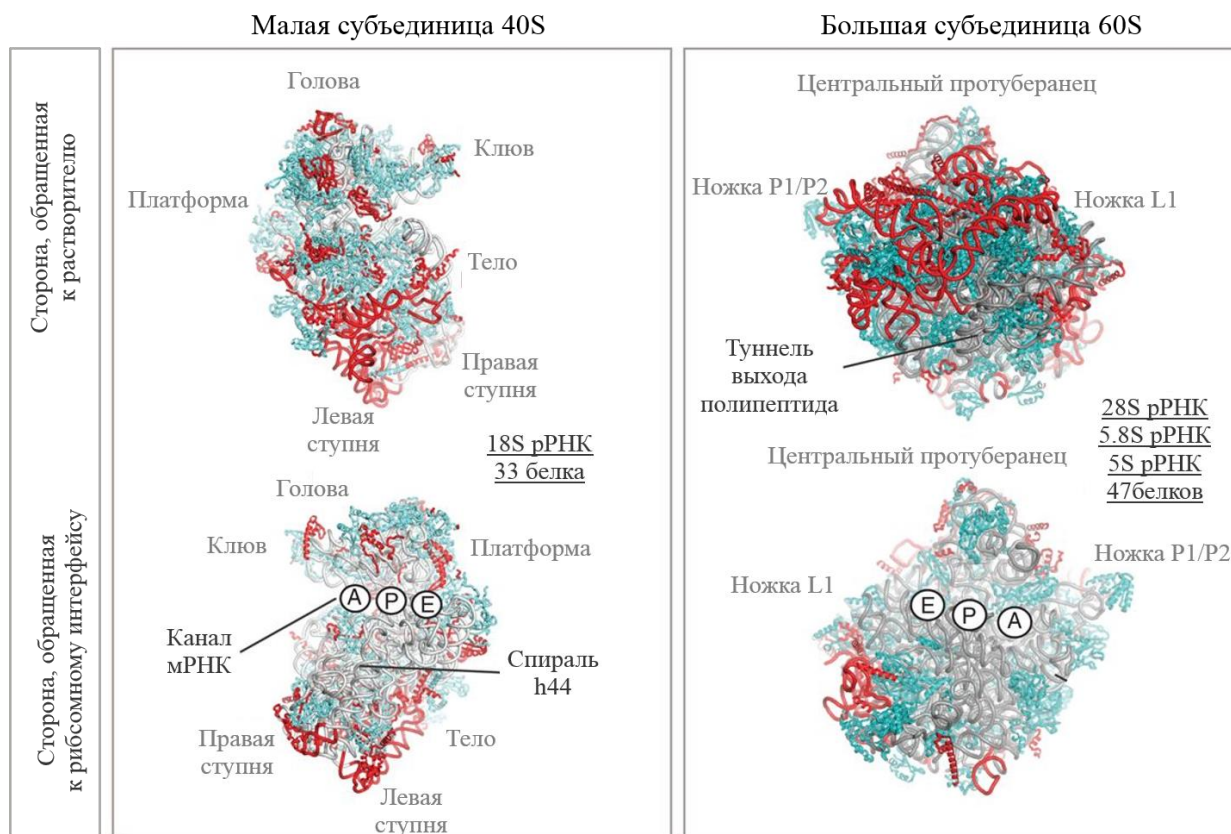
### **1.1. Эукариотическая рибосома.**

#### **1.1.1. Строение эукариотической рибосомы**

Эукариотическая рибосома представляет собой высокомолекулярный РНК-белковый комплекс массой 3.5 МДа у низших эукариот (например, у *S. cerevisiae*) или 4.5 МДа у высших эукариот (например, у *H. sapiens*), состоящий из двух разных субъединиц. Малая субъединица 40S содержит одну молекулу 18S рРНК и 33 рибосомных белка. Большая субъединица 60S, в свою очередь, состоит из трех

молекул рРНК (25S *S. cerevisiae*/28S *H. sapiens*, 5.8S и 5S) и 47 белков [1, 2]. Белковый состав рибосом может меняться, в зависимости от потребностей клеток и их типа [3].

Каждая из рибосомных субъединиц содержит функциональные центры, необходимые для трансляции мРНК (Рисунок 1).



**Рисунок 1.** Строение эукариотической рибосомы.

Во время синтеза белка мРНК укладывается в мРНК-туннель в составе малой 40S субъединицы, в которой также находится центр декодирования, предназначенный для спаривания кодона мРНК с антикодоном аминоксил-тРНК. В большой субъединице находится пептидилтрансферазный центр (ПТЦ), в котором происходит каталитическое образование пептидной связи. Растущая пептидная цепь попадает в туннель выхода полипептида, представляющий собой полость, идущую от ПТЦ к обращенной наружу части большой субъединицы. В пространстве между двумя субъединицами находятся три сайта связывания тРНК: А (участок, занимаемый входящей аминоксил-тРНК), Р (участок, в котором

находится тРНК с растущей полипептидной цепью) и Е (участок, в котором происходит диссоциация тРНК от рибосомы) [4, 5, 6].

Сворачивание рРНК в третичные структуры в ходе их ассоциации с рибосомными белками приводит к формированию нескольких характерных структурных мотивов в каждой субъединице. Для малой 40S субъединицы – это «голова», «шея», «платформа», «тело», «левая ступня», «правая ступня», «плечо» и «клюв», а также спираль h44 18S рРНК, в основании которой находится центр декодирования. Для большой 60S субъединицы – это «центральный выступ», «ножка L1» и «ножка P1/P2» [7].

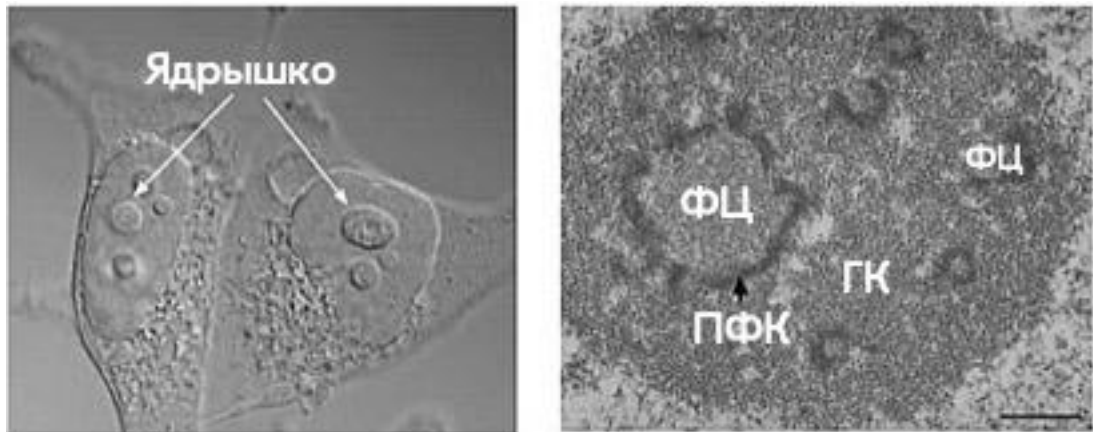
Несмотря на значительный прогресс в понимании биогенеза рибосом у низших эукариот, в частности, у дрожжей *S. cerevisiae*, усложнение структуры ядрышка и предшественников рибосом у высших эукариот ограничивает получение структурных и функциональных данных об этом процессе в клетках человека. Процессинг 47S пре-рРНК требует участия многих белков, которые не имеют гомологов с *S. cerevisiae*, тем самым подразумевая, что многие этапы и роль участников биогенеза рибосом млекопитающих недостаточно изучены, либо вообще неизвестны.

## **1.2. Биогенез рибосом эукариот.**

### **1.2.1. Биогенез рибосом – общие положения**

Биогенез рибосом начинается в специализированной ядерной органелле – ядрышке, которая не отделена от ядра липидной мембраной. В делящихся клетках ядрышко начинает формироваться в ранней телофазе вокруг участков хромосом, содержащих tandemные повторы генов рибосомной РНК и называемых ядрышковыми организаторами (ЯОР). В интерфазе ядрышко низших эукариот (например, *S. cerevisiae*) состоит из 2 субкомпарментов: плотного фибриллярного центра и гранулярного компонента. У высших эукариот (например, *H. sapiens*) ядрышко имеет более сложную архитектуру и состоит из 3 субкомпарментов: фибриллярного центра, плотного фибриллярного компонента и гранулярного компонента (Рисунок 2). К гранулярному компоненту прилегают упакованные

преимущественно в гетерохроматин участки ДНК, которые в ряде работ называют перинуклеарным компонентом [8, 9, 10, 11].

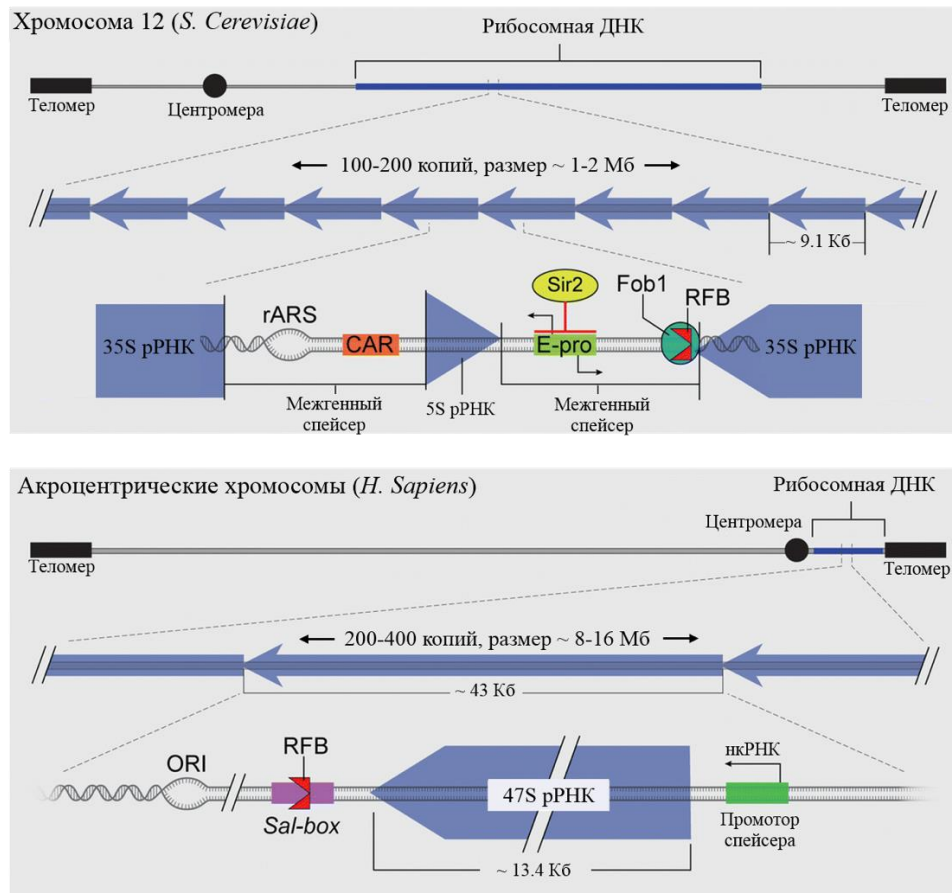


**Рисунок 2.** Строение ядрышка высших эукариот. На рисунке представлены результаты просвечивающей электронной микроскопии, демонстрирующие ультраструктуру ядрышка клеток HeLa. ФЦ – фибриллярный центр, ПФК – плотный фибриллярный компонент, ГК – гранулярный компонент.

Фибриллярный компонент высших эукариот насыщен рибосомной ДНК, комплексами, в состав которых входит РНК полимеразы I, а также транскрипционными факторами, необходимыми для работы полимеразы I (например, UBF), и топоизомеразой I [12]. При этом активная транскрипция рибосомных РНК происходит на границе фибриллярного и плотного фибриллярного компонентов [13]. Плотный фибриллярный компонент, в свою очередь, насыщен растущими или полностью транскрибированными 47S предшественниками рРНК, белковыми факторами и малыми ядрышковыми РНК-белковыми комплексами, участвующими в раннем биогенезе рибосом. Гранулярный компонент представлен, в основном, предшественниками рибосомных субъединиц на поздних стадиях созревания, а также белками-факторами биогенеза, координирующими данный процесс [14].

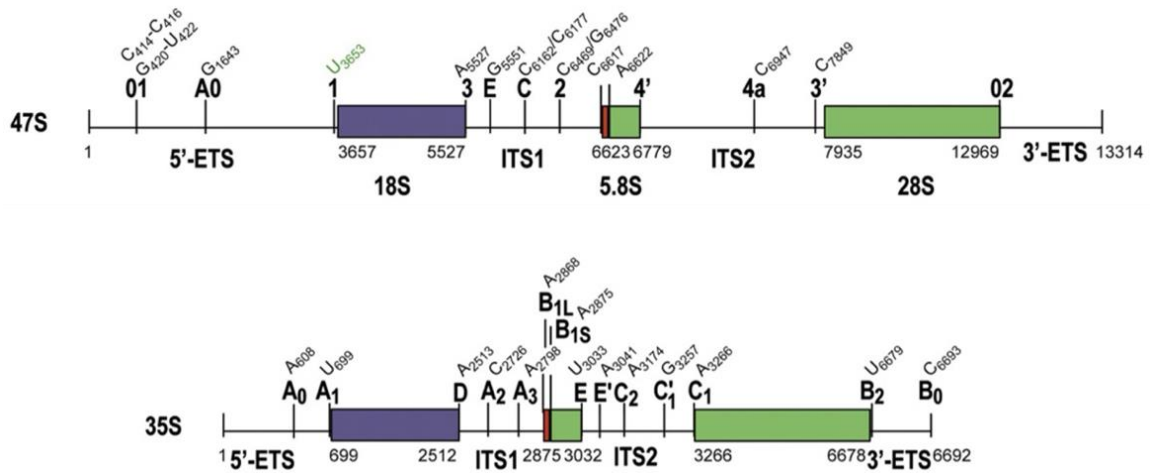
В геноме дрожжей *S. cerevisiae* находится около 200 копий генов, кодирующих предшественник рРНК, размером ~9.1 кБ, располагающихся на хромосоме 12 в ориентации. В свою очередь, в геноме человека присутствуют 300-400 копий генов рРНК размером ~43 кБ, которые расположены в коротких плечах

акроцентрических хромосом 13, 14, 15, 21 и 22, и взаимно ориентированы как и у дрожжей «голова к хвосту» (Рисунок 3) [15, 16, 17, 18].



**Рисунок 3.** Организация генов рибосомной РНК у дрожжей *S. cerevisiae* и человека *H. sapiens*.

Каждая транскрипционная единица рДНК кодирует последовательность транскрипта-предшественника рибосомной РНК (пре-рРНК), называемого 35S (у дрожжей) или 47S (у человека), который в результате процессинга превращается в три молекулы рРНК – 18S, 5.8S и 25S/28S. Кодирующие рРНК области отделены от других компонентов рДНК локуса внешними транскрибируемыми спейсерами (5'ETS и 3'ETS) и разделены между собой внутренними транскрибируемыми спейсерами (ITS1 и ITS2) (Рисунок 4) [15, 19].

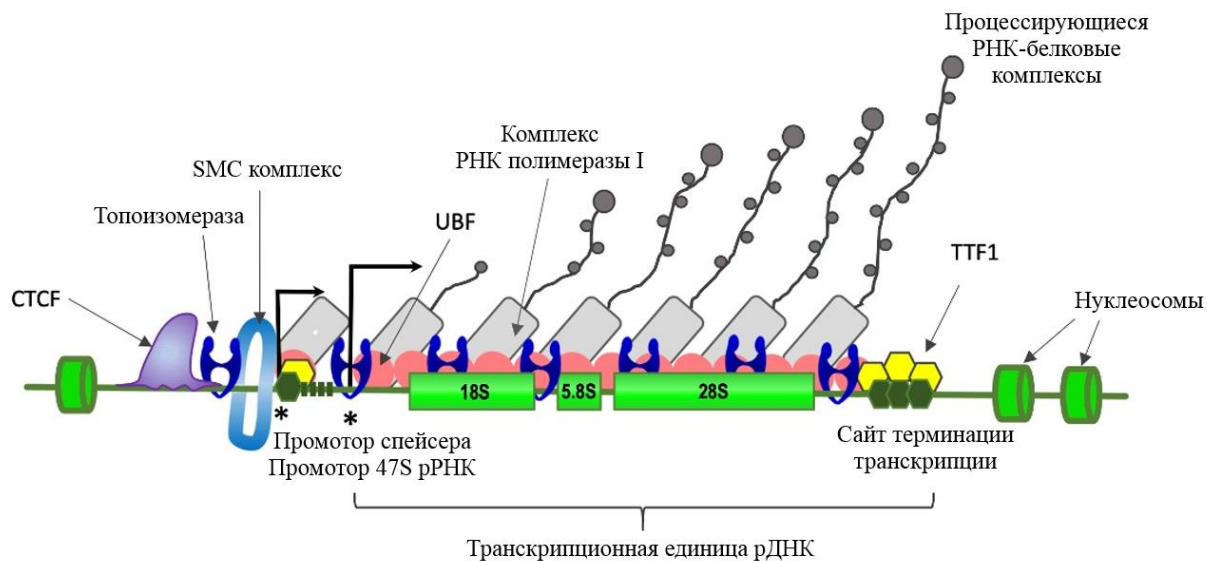


**Рисунок 4.** Структура первичных транскриптов предшественников рРНК человека (47S) и дрожжей (35S). На рисунке показаны первичные транскрипты человека (47S) и дрожжей (35S), включающие в себя последовательности 18S, 5.8S и 28S/25S рРНК, транскрибируемых спейсеров, а также известными на данный момент сайтами расщепления (обозначены 01, A0, 1 и т.д.).

Значительное удлинение первичного транскрипта в клетках человека связано с увеличением длины спейсерных участков, что, в свою очередь, приводит к появлению дополнительных сайтов расщепления, а также участков связывания факторов биогенеза рибосом [19].

Последовательности, кодирующие пре-рРНК, разделены длинными межгенными спейсерами (IGS) длиной примерно 30 тысяч п.н. у человека. Единицы транскрипции рДНК млекопитающих фланкированы на концах одной или несколькими терминаторными последовательностями, которые останавливают удлинение транскрипта РНК полимеразой I. Последовательности будущих 18S, 5.8S и 25S/28S рРНК высококонсервативны у животных, растений и грибов, а последовательности IGS менее консервативны и содержат регуляторные элементы, включающие промоторы и повторяющиеся энхансерные элементы. В каждом гене рРНК позвоночных расположены два промотора: промотор гена рРНК и промотор спейсера. Активность промотора спейсера, расположенного внутри IGS, может приводить к образованию некодирующей РНК, которая, как полагают, участвует в подавлении транскрипции генов рРНК посредством взаимодействия с ядрышковым

комплексом ремоделирования хроматина, которое приводит к метилированию основного промотора рДНК (Рисунок 5) [20, 21, 22].



**Рисунок 5.** Организация транскрипционных комплексов, связывающих и транскрибирующих предшественник рДНК. СТСФ – СССТС-связывающий фактор; SMC – комплекс белков структурной поддержки хромосом; TTF1 – тиреоидный фактор транскрипции 1; UBF – upstream связывающийся фактор.

Транскрипция генов рибосомных РНК (~30-50% от общего числа генов рДНК) может начинаться как с промотора спейсера, так и с промотора 47S рРНК. При этом синтез РНК в первом случае, по-видимому, немедленно останавливается TTF1 в ближайшем сайте терминации внутри спейсера [23]. Область, дистальная от спейсерного промотора, содержит элементы-энхансеры. Остальная часть IGS, вероятно, лишена известных регуляторных элементов и содержит простые повторяющиеся последовательности и мобильные элементы [20].

Гены рибосомной 5S РНК транскрибирует РНК полимеразы III. У дрожжей гены 5S РНК расположены на 12-й хромосоме в ориентации голова к голове относительно генов 35S рРНК и являются частью транскрипционного локуса (Рисунок 3). У человека гены 5S рРНК расположены на хромосоме 1 и представляют собой 50-300 (в зависимости от типа клеток) тандемных копий, разделенных не транскрибируемыми спейсерами [15, 24].



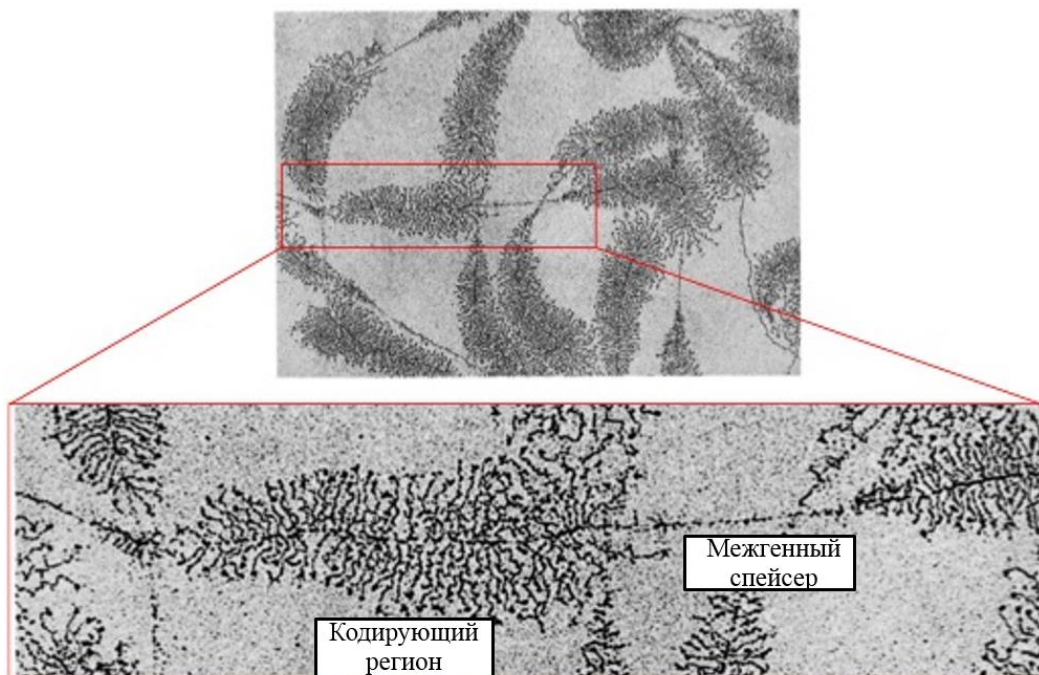
В настоящее время у дрожжей идентифицированы 258 белков и 76 малых ядрышковых РНК, принимающих участие в биогенезе рибосом. Идентификация широкого спектра факторов сборки рибосом человека, в том числе, не имеющих гомологов у дрожжей, была выполнена с помощью высокопроизводительных скринингов на основе РНК интерференции, а также анализа ядрышкового протеома [25, 26, 27, 28, 29, 30]. Многие человеческие факторы биогенеза рибосом, найденные в ходе подобных скринингов, в настоящее время уже обнаружены в структурах рибосомных предшественников и/или функционально охарактеризованы, но, несмотря на это, существует много белков, роль которых в сборке рибосом еще неизвестна [31, 32, 33]. При этом важно отметить, что не все белки, истощение которых вызывает изменения в профиле рибосомных предшественников, напрямую участвуют в формировании прерибосомных комплексов – они могут регулировать белки/пути, которые опосредованно модулируют биогенез рибосом. В клетках человека, как и в клетках дрожжей, ряд факторов биогенеза рибосом, в первую очередь, опосредуют белок-белковые взаимодействия и действуют как структурные компоненты, тогда как другие напрямую связывают рРНК [34]. Многие факторы биогенеза рибосом являются ферментами, такими как нуклеазы, фосфатазы, ГТФазы, AAA-АТФазы или РНК-хеликазы. Например, шесть активных ГТФаз (Nog1, Nog2, Nug1, Bms1, Lsg1, Efl1) участвуют в биогенезе дрожжевых рибосом, и, хотя человеческие гомологи каждого из этих белков были обнаружены при скрининге факторов биогенеза в клетках человека, функция ни одного из этих белков не исследована в клетках человека. Три дрожжевых AAA-АТФазы (Rea1/Mdn1, Rix7, Drg1) участвуют в высвобождении пула факторов биогенеза пре-60S субъединицы, известны человеческие гомологи каждого из этих белков (MDN1, NVL2 и AFGH2 соответственно) [35]. Но при этом показано, что NVL2 связан с не только с ядерной экзосомой но и с теломеразой, что указывает на то, что он обладает дополнительными функциями помимо биогенеза рибосом [35, 36, 37]. Хотя функции некоторых РНК-хеликаз схожи у дрожжей и человека (например, Dhr1 дрожжей и DHX37 человека опосредуют высвобождение мякРНК U3), некоторые РНК-хеликазы человека имеют дополнительные функции

в процессинге пре-рибосомных частиц [38, 39]. Например, DDX51 участвует в высвобождении мякРНК U8 из комплексов пре-60S субъединицы [40], DDX21 – в сопряжении транскрипции и процессинга пре-рРНК, а также в облегчении доступа малых ядрышковых РНК к комплексам пре-40S. События ремоделирования, опосредуемые ферментативной активностью факторов биогенеза, часто служат важными контрольными точками в процессе сборки рибосом и, тем самым, помогают поддерживать направленность биогенеза рибосом, а также выбраковывать дефектные прерибосомные комплексы. Хотя многие белки биогенеза независимо друг от друга связываются с прерибосомными частицами, отличительной чертой сборки эукариотических рибосом является их преимущественно модульная сборка. Как у человека, так и у дрожжей комплексы UTP-A, UTP-B и UTP-C, а также мякРНК U3, гетеродимер RCL1-BMS1 и комплексы IMP3-IMP4-MPP10 и EMG1 или их гомологи на ранних стадиях рекрутируются к растущим пре-рРНК транскриптам и образуют ядро процессомы малой субъединицы. Аналогичным образом комплексы PeBoW (Nop7-Erb1-Ytm1 у дрожжей) и PELP1-TEX10-WDR18 (Rix1-Ipi3-Ipi1 у дрожжей) участвуют в формировании и раннем процессинге пре-60S частицы. Несмотря на эволюционную консервативность этих комплексов, их состав варьирует у разных видов, а в клетках человека идентифицировано несколько дополнительных компонентов. Например, DDX21 и DDX27 – дополнительные компоненты человеческих комплексов UTP-B и PeBoW, соответственно, которые являются РНК-хеликазами, что, возможно, указывает на необходимость дополнительных этапов ремоделирования прерибосомных комплексов человека на ранних стадиях [41, 42]. Другой пример – белок DHX15, компонент комплекса XND (NKRF, РНК-хеликазы DHX15, XRN2), для которого характерна АТФ-азная и хеликазная активности, проявляющиеся в ходе процессинга спейсера 5'ETS. Эти свойства отличают белок млекопитающих от его дрожжевого гомолога Ppr43, принимающего участие в высвобождении мякРНК из пре-60S частиц, а также облегчающего расщепление 3'-конца 18S рРНК в цитоплазме путем повышения доступности сайта D для эндонуклеазы Nob1 [43, 44, 45]. Кроме того, обнаружено,

что гетеродимер NF45-NF90, который первоначально считали связывающимся с промотором интерлейкина-2, является компонентом комплексов пре-60S человека [46]. Показано, что взаимодействие NF45-NF90 с частицами пре-60S опосредовано связывающими двуцепочечную РНК доменами NF90, что подразумевает прямую ассоциацию с рРНК. Хотя явного дефекта процессинга пре-рРНК при истощении NF45 или NF90 не наблюдали, отсутствие этих факторов вызывает изменения в морфологии ядрышек и накопление комплексов пре-60S в нуклеоплазме, подтверждая участие этого комплекса в биогенезе большой субъединицы [46].

### 1.2.2. Транскрипция 47S рибосомной РНК полимеразой I

Биогенез рибосом в клетках человека начинается с транскрипции 47S предшественника (35S у дрожжей). Гены 47S рРНК являются наиболее транскрибируемым участком генома, в результате чего рРНК составляет практически 80% тотальной РНК клеток. Активная транскрипция данных участков является результатом плотной посадки комплексов РНК полимеразы I на промоторы генов рРНК. Детали организации хроматина в районе генов рРНК визуализируют с помощью метода окрашивания по Миллеру (Рисунок 6).



**Рисунок 6.** Участки активной транскрипции рРНК, а также межгенные спейсерные участки, окрашенные по методу Миллера [47, 48].

На рисунке 6 видны структуры, которые носят название “Christmas tree” и представляют собой активно растущие транскрипты 47S рРНК. Доступные 5' концы этих транскриптов ко-транскрипционно процессируют факторы биогенеза рибосом, формируя промежуточные РНК-белковые комплексы [47, 48].

Ключевыми компонентами аппарата, синтезирующего пре-рРНК являются: РНК-полимераза I, мультисубъединичный комплекс предварительной инициации SL1 и основной фактор транскрипции рДНК UBF. Терминация транскрипции пре-рРНК контролируется фактором терминации транскрипции 1 (ТТФ1), специфическим ДНК-связывающим белком, который останавливает элонгацию, а также действует как барьер репликационной вилки, предотвращая столкновение комплексов, осуществляющих репликацию ДНК и её транскрипцию (Рисунок 5). С основными компонентами взаимодействует множество других белков, необходимых для точной регуляции транскрипции пре-рРНК в зависимости от условий и потребностей клетки [14, 20].

UBF — это главный белок, определяющий структуру и активность генов рДНК. Он связывает рДНК за счет нескольких ДНК-связывающих доменов, рекрутирует компоненты транскрипционного аппарата, а также способствует ремоделированию хроматина путем вытеснения нуклеосом, особенно в кодирующей области рДНК [23, 49, 50, 51, 52]. Эксперименты по интеграции в геном дополнительных копий генов рДНК, полученных в виде рекомбинантных молекул, показали, что связывание UBF с рДНК и транскрипция рРНК достаточны для формирования ядрышка. Этот белок остается связанным с ДНК и во время митоза, когда транскрипция временно прекращается, обеспечивая быстрое восстановление ядрышка и повторную инициацию транскрипции в следующей интерфазе [53, 54].

Границы повторов рДНК ограничены местами, где связаны другие структурные белками, такие как SMC, CTCF и топоизомеразы. Участки связывания этих молекул расположены в непосредственной близости от промоторов (Рисунок 5) [23, 55, 56]. Данные белки не уникальны для рДНК и формально не входят в

состав транскрипционных комплексов, но играют важную роль в правильной организации структуры и топологии рДНК.

СССТС-связывающий фактор CTCF — это ДНК-связывающий белок, который содержит 11 доменов «цинковые пальцы». Считается, что CTCF является одним из основных регуляторов поддержания глобальной структурной организации генома. Он может действовать как активатор или репрессор транскрипции, а также может быть инсулятором, предотвращающим долгосрочные взаимодействия между удаленными участками генома, такими как промоторы и энхансеры [57]. Протеомные данные демонстрируют, что CTCF связывает UBF и другие компоненты комплекса РНК полимеразы I. Подобное взаимодействие увеличивает присутствие UBF в локусах рДНК, а уменьшение уровня CTCF в клетках млекопитающих снижает эффективность транскрипции рДНК [58, 59]. Точный механизм влияния CTCF на транскрипцию рРНК еще не расшифрован, но возможно, что этот белок стабилизирует структуру хроматина в участках рДНК, которая необходима для эффективной транскрипции.

Ранние исследования продемонстрировали роль топоизомеразы I в транскрипции рДНК [60, 61, 62]. Позже было показано, что топоизомераза II также важна для транскрипции рДНК, возможно, вызывая топологические изменения в промоторе рДНК и способствуя образованию пре-инициаторного комплекса [63]. Дальнейшие работы на *S. cerevisiae* выявили, что топоизомераза I разрешает отрицательную суперспирализацию позади активной РНК полимеразы I, тогда как топоизомераза II разрешает положительную суперспирализацию перед ней [64]. У высших эукариот имеются две структурно и каталитически сходные топоизомеразы II типа — топоизомераза II $\alpha$  и топоизомераза II $\beta$ . Было показано, что топоизомераза II $\alpha$  взаимодействует с компонентами комплекса РНК полимеразы I, а также с промотором рДНК [63]. Показано, что топоизомераза II $\beta$  локализуется по длине транскрибируемой области рДНК вместе с комплексом РНК полимеразы I, а также в промоторной области межгенного спейсера, где ее сайты связывания точно перекрываются с сайтами связывания когезина и CTCF [56]. Совместная локализация топоизомераз с транскрипционным аппаратом рДНК и структурными

белками на границах генов рДНК может означать, что топоизомеразы участвуют в трехмерной организации хроматина рДНК. В свете модели организации хроматина с экструзией петель топоизомеразы возможно необходимы для коррекции топологии ДНК.

### 1.2.3. Посттранскрипционные модификации пре-рРНК

Рибосомная РНК является одной из наиболее сильно модифицированных клеточных РНК, в которой ко/посттранскрипционным модификациям подвергаются примерно 2% нуклеотидов. рРНК приобретает множественные модификации в ходе транскрипции и последующего созревания в ядрышке, ядре и цитоплазме [65].

У эукариот наиболее распространенными модификациями рРНК являются 2'-О-метилирование рибозы, которое может происходить в любом нуклеотиде, а также изомеризация уридина в псевдоуридин (Ψ). На сегодняшний день в рРНК дрожжей *S. cerevisiae* идентифицировано 55 сайтов 2'-О-метилирования и 45 сайтов Ψ, и примерно около 100 модификаций каждого типа обнаружено в рРНК человека [66, 67, 68, 69].

Введение 2'-О-метилирования и псевдоуридинов в основном осуществляется двумя классами малых ядрышковых РНК: С/D и Н/АСА [70, 71, 72, 73]. Эукариотические малые ядрышковые РНК образуют с белками рибонуклеопротеиновые комплексы, в которых РНК основания взаимодействуют с пре-рРНК и направляют каталитический белковый компонент для модификации определенного остатка [74]. Хотя большинство мякРНК С/D и Н/АСА осуществляют модификацию только конкретного нуклеотида рРНК, было показано, что некоторые мякРНК опосредуют модификацию нескольких положений пре-рРНК [72, 75]. мякРНК могут способствовать введению двух модификаций как в один и тот же участок пре-рРНК, так и в разные [76]. Помимо мякРНК, имеющих несколько потенциальных мишеней в пре-рРНК, существуют также примеры, когда один и тот же нуклеотид может быть модифицирован разными мякРНК [77, 78]. Помимо множества 2'-О-метилирований и псевдоуридилаций, эукариотические рибосомы могут содержать и другие типы модификаций

нуклеотидов: N<sup>7</sup>-метилгуанозин, N<sup>6</sup>-диметиладенозин, ацетилованный цитозин, N<sup>1</sup>-метил-N<sup>3</sup>-аминокарбокситропилпсевдуридин, N<sup>1</sup>-метиладенозин, N<sup>3</sup>-метилуридин, C<sup>5</sup>-метилцитозин [79].

В настоящее время в клетках человека для 76 мякРНК (~17% от известных мякРНК) мишени в пре-рРНК еще не идентифицированы [80]. Это может говорить как о вырожденности мякРНК, так и о выраженной внерибосомной функции мякРНК в клетках человека [81, 82, 83]. Некоторые ферменты, необходимые для модификации нуклеотидов рРНК у дрожжей, консервативны у высших эукариот, в то время другие, по-видимому, не имеют гомологов у человека (например, Vmt2, Vmt5 и Vmt6) [84]. Интересно, что жизненно необходимыми для клеток дрожжей являются только те ферменты, для которых известны человеческие гомологи. Это указывает на то, что модификации, катализируемые неконсервативными ферментами, играют менее важную роль в функции рибосом. Некоторые из эволюционно консервативных ферментов (например, Dim1/DIM1TL, Emg1/EMG1, Bud23/WBSCR22), по-видимому, выполняют дополнительные функции в сборке рибосомных субъединиц. С использованием их каталитически дефектных аналогов было показано, что для процессинга пре-рРНК достаточно присутствие этих белков в прерибосомных комплексах без их ферментативной функции [85, 86, 87, 88, 89, 90].

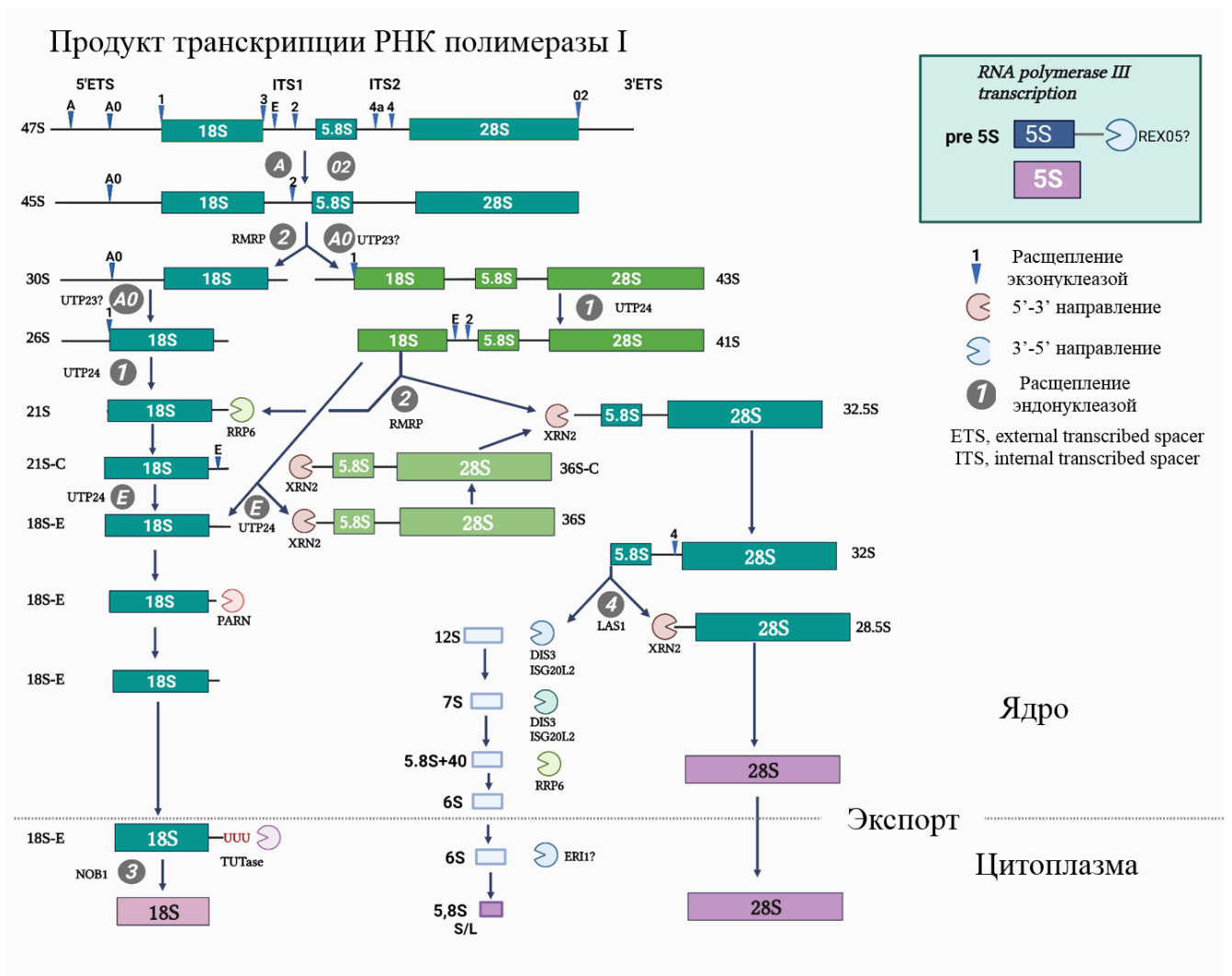
#### 1.2.4. Процессинг пре-рРНК

Сворачивание протяженных рРНК – сложная задача, поскольку размер позволяет этим молекулам находиться в альтернативных стабильных нефункциональных структурах. В отличие от относительно слабых взаимодействий, которые поддерживают пространственную структуру белков (например, альфа-спиралей и бета-листов), примерно половина рРНК со сформированной третичной структурой состоит из прочных двойных спиралей в А-форме [91]. Около половины длины первичного транскрипта рРНК представлено протяженными транскрибируемыми спейсерами ETS и ITS, которые дополнительно усложняют структуру раннего предшественника. По-видимому,

роль внешних спейсерных областей состоит в том, чтобы снизить вероятность мутаций рРНК в результате ошибок РНК-полимераз, которые чаще возникают в 5'- и 3'-концевых частях транскриптов. Хотя последовательности спейсеров различаются, их концы эволюционно консервативны и складываются в несколько шпильчатых структур [92]. Последовательности некодирующего спейсера ITS1 менее консервативны, что затрудняет предсказание сайтов расщепления даже у близких видов [93]. Последовательности ITS1 млекопитающих обычно в 2–3 раза длиннее, они содержат гораздо больший процент GC, чем ITS1 дрожжей (мыши – 70.1%; дрожжи – 35.2%) [94, 95]. Поскольку рРНК выполняет одновременно структурную и каталитическую функцию, то неудивительно, что ключевые аспекты созревания рибосомных субъединиц – это формирование структурных доменов в рРНК, сворачивание корректной трехмерной структуры, а также сопутствующие этим процессам вырезание и удаление спейсеров.

Первым этапом процессинга первичного транскрипта 47S является укорочение с обоих концов по сайтам A0 (или 01) и 02 с высвобождением 5'- и 3'-ETS, соответственно, и образованием предшественника 45S пре-рРНК, который затем укорачивается по двум альтернативным путям. В клетках человека расщепления в сайтах A0 и 02 скоординированы во времени [96]. Нарушение этой координации приводит к накоплению интермедиата 46S. Процессинг образовавшейся 45S пре-рРНК осуществляется параллельными путями 1 и 2 с образованием многочисленных промежуточных продуктов (Рисунок 7). Помимо гидролиза по сайтам, номенклатура которых отлична от дрожжевой, в процессинге важную роль (помимо эндонуклеаз) играют экзонуклеазы, укорачивающие рРНК с концов [19].





**Рисунок 7. Процессинг пре-рРНК в клетках млекопитающих.**

Часть молекул пре-рРНК человека расщепляются, по-видимому, котранскрипционно, как и у дрожжей [97]. Стоит отметить, что порядок расщепления предшественников зависит от вида и типа клеток, физиологических условий и стадий клеточного цикла и нарушается при патологиях [19, 98, 99].

### 1.2.5. Созревание предшественников рибосом в ядрышке и нуклеоплазме

Растущие транскрипты пре-рРНК связывают ранние факторы биогенеза уже в процессе транскрипции. Первыми с пре-рРНК взаимодействуют факторы биогенеза 40S и их мРНК партнеры, что приводит к образованию 90S предшественника или процессомы малой субъединицы. Ранние этапы процессинга у большинства эукариот заключаются в котранскрипционном расщеплении сайтов

$A_0$ ,  $A_1$  в области 5'ETS и  $A_2$  в ITS1, что приводит к высвобождению 90S комплекса (Рисунок 8). У дрожжей в нормальных условиях культивирования котранскрипционное расщепление данных сайтов происходит в 70-80% ранних пре-рРНК транскриптов. Структура дрожжевого 90S комплекса была охарактеризована с помощью Кримо-ЭМ [100].

В клетках высших эукариот также существует равновесие между ко- (сопровождается расщеплением по сайтам  $A_0$ , 1 и 2) и пост-транскрипционным процессингом первичного 47S транскрипта, но в настоящее время ранние этапы биогенеза в клетках человека охарактеризованы менее детально. Несмотря на это, человеческий 90S предшественник был выделен и охарактеризован с помощью Кримо-ЭМ, что позволяет предположить смещение равновесия процессинга в сторону котранскрипционного расщепления [32].

Формирование 90S комплекса начинается со связывания белков Utp-A с областью 5'ETS растущего 35S транскрипта, которые образуют интерфейс для взаимодействия следующих факторов биогенеза [101, 102]. Далее к комплексу присоединяются белки Utp-B, мякРНК U3 и Mpp10, формирующие коровую структуру 90S частицы и привлекающие остальные факторы Bms1-Rcl1, модуль Nat10/Kre33, белки Utp-C и мякРНК U14, snR30/U17 и snR10 [103, 104, 105, 106, 107, 108]. U3 РНП служит ключевым организатором пространственной структуры комплекса 90S, взаимодействуя одновременно с участками 5'ETS и 18S пре-рРНК [32, 109, 110].

При переходе от низших эукариот к высшим наблюдается значительное удлинение участка 5'ETS от ~700 нуклеотидов у дрожжей до ~3600 у человека. Показано, что укорочение 5'ETS до 25% общей длины с сохранением высококонсервативных участков достаточно для биогенеза рибосом. Предполагается, что такое удлинение связано не только с усложнением всего пути биогенеза у высших эукариот, но и с усложнением строения ядрышка и необходимостью фазового разделения компартментов ядрышка [32]. В ходе сборки 90S комплекса происходит расщепление сайта  $A_0$  в 5'ETS, что, в конечном итоге,

приводит к образованию стабильного промежуточного продукта, называемого частицей «пре- $A_1$ », в котором сайт  $A_1$  еще не разрезан [111].

Чтобы инициировать расщепление в сайте  $A_1$ , которое необходимо для формирования зрелого 5' конца 18S рРНК, эндонуклеаза Utp24/UTP24 должна получить доступ к данному сайту процессинга [32, 95, 108, 111, 112]. После этого происходит серия событий, начинающихся с высвобождения Lcp5/NGDN (формируется состояние пре- $A_1^*$ ), за которым следует структурное ремоделирование 90S частицы, связанное с высвобождением факторов Utp24/UTP24, Faf1/C1ORF131 и модуля Kre33/NAT10 (формируется состояние пост- $A_1$ ) [32, 113, 114].

Комплекс белков под названием «ядерная экзосома» играет важную роль в ремоделировании 90S комплекса [114]. Структурные и биохимические данные, полученные недавно на клетках дрожжей, показали, что экзосома связывает 90S частицы до расщепления в сайте  $A_1$  [114, 115]. Однако в клетках человека экзосома связывается только с 90S предшественником в пост- $A_1$  состоянии, так как ее сайты связывания заблокированы в пре- $A_1$  состоянии [32]. Дальнейшее ремоделирование 90S комплекса активирует хеликазу Dhr1/DHX37, которая стимулирует высвобождение U3 РНП и формирование консервативного псевдоузла в 18S рРНК [39, 116, 117].

Расщепление участка ITS1 приводит к разделению пре-40S и пре-60S частиц, которые впоследствии независимо созревают в ядрышках и нуклеоплазме. И у дрожжей, и у человека ITS1 расщепляется в двух сайтах (сайт  $A_2$  и  $A_3$ , E и 2, соответственно) консервативными нуклеазами Utp24/UTP24 (сайт  $A_2$ , E) и RMRP (сайт  $A_3$ , 2). Однако порядок расщеплений различается: в клетках дрожжей доминирует расщепление Utp24 в сайте  $A_2$ , а в клетках человека большая часть пре-рРНК сначала процессируется в сайте 2 с помощью RMRP [118, 119].

После расщепления участка ITS1 предшественники 60S субъединицы содержат пре-рРНК 27S (у дрожжей) или 32S (у человека) [120]. Последовательность 25/28S рРНК в составе 27S/32S принято подразделяется на шесть доменов, которые укладываются последовательно [121, 122]. Структуры

ранних ядрышковых пре-60S частиц пока не удалось получить методом Крио-ЭМ, предположительно из-за высокой подвижности и гетерогенности этих комплексов, в которых ещё не установились стабильные взаимодействия РНК-РНК и РНК-белок [123, 124]. Анализ структуры самых ранних визуализированных в высоком разрешении пре-рибосомных субъединиц дрожжей показал, что биогенез 60S начинается с сворачивания доменов I и II под влиянием окружающего раствора (сольвента), которые затем стабилизируются белковым комплексом Nsa1 (Рисунок 9) [125]. На более поздних стадиях биогенеза пре-60S в ядре домены III, IV и V постепенно сворачиваются, что приводит к образованию пептидилтрансферазного центра и туннеля выхода полипептида [120, 126, 127]. Важно отметить, что направленность процесса сборки пре-60S частицы обеспечивается активностью энергозависимых факторов биогенеза, таких как АТФ-зависимые РНК-хеликазы (например, Has1/DDX18 и Dpb10/DDX54), AAA-АТФазы (например, Rix7/NVL2 и Rea1/MDN1) и ГТФазы (включая Nug1/GNL3 и Nog1/GTPBP4) [128, 129]. Многие факторы, участвующие в биогенезе пре-60S, содержат множественные РНК-связывающие домены, которые обеспечивают поддержание правильной структуры и уменьшают конформационную нестабильность рРНК в процессе компактизации структуры.

Расщепление в участке ITS2 (по сайту C<sub>2</sub> у дрожжей или сайту 4 у человека) разделяет рРНК на пре-5.8S и пре-25/28S [130, 131]. Удаление остатка спейсера ITS1 происходит посредством расщепления эндонуклеазами в сайте A<sub>3</sub> у дрожжей, тогда как в клетках человека он удаляется исключительно экзонуклеазами [95]. Скрининговые исследования дрожжевых факторов биогенеза рибосом показали, что 12 дрожжевых белков (Ytm1, Erb1, Nop7, Rlp7, Cic1, Nop15, Has1, Drs1, Rpf1, Pwp1, Nop12 и Rrp1) необходимы для процессинга сайта A<sub>3</sub>, поэтому их называют факторами A<sub>3</sub> [132, 133, 134]. Согласно структурным данным, сайты связывания большинства из этих факторов расположены не вблизи, а на удалении от фрагмента ITS1, свидетельствуя, что они скорее необходимы как структурные компоненты для правильного сворачивания пре-60S комплекса перед расщеплением сайта A<sub>3</sub> [125, 135, 136, 137, 138]. Интересно, что расщепление по сайту A<sub>3</sub> связано с терминацией

транскрипции РНК полимеразой I и процессингом 3'ETS, что указывает на сопряжение сборки пре-60S и транскрипции пре-рРНК [121, 139, 140]. После удаления ITS1 процессинг пре-рРНК приводит к разделению предшественника 27SB/32S на 7/12S и 26/28.5S пре-рРНК путем расщепления в ITS2. Прежде чем происходит расщепление ITS2 пре-60S субъединицы подвергаются серьезным структурным перестройкам, управляемым AAA-АТФазами Rix7/NVL2 и Rea1/MDN1. Rix7 высвобождает Nsa1, который покидает частицу вместе с Rpf1, Rrp1 и Mak16 [141, 142], что позволяет сформировать внешнюю часть туннеля выхода полипептида [120, 125, 138]. Erb1, вероятно, стабилизирует переходные состояния на этой стадии благодаря N-концу, глубоко утопленному в теле созревающей субчастицы [143]. Его удаление с помощью Rea1, по-видимому, способствует ключевым структурным перестройкам и изменению молекулярного состава субчастиц, происходящего при их перемещении из ядрышка в нуклеоплазму. Высвобождение Erb1 также позволяет рекрутировать ГТФазу Nog2 непосредственно перед расщеплением ITS2 и переходом в нуклеоплазму [144, 145, 146]. Наконец, расщепление сайта C2/4 в ITS2 происходит с помощью эндонуклеазы Las1/LAS1, которая функционирует в комплексе с полинуклеотидкиназой Grc3 [147, 148].

В процессе биогенеза происходит включение комплекса 5S РНП (5S РНК, Rpl5/uL18, Rpl11/uL5) в состав пре-60S предшественника. Формирование 5S РНП комплекса происходит в цитоплазме, после чего он импортируется в ядро с помощью шаперона Syo1/HEATR3. В ядрышке 5S РНП связывается с пре-60S посредством взаимодействия с комплексом Rpf2-Rrs1 [149]. В зрелых 60S субъединицах 5S РНП образует центральный выступ. В отличие от дрожжей, в клетках млекопитающих включение 5S РНП в пре-60S частицу служит важной контрольной точкой биогенеза рибосом [150].

Переход пре-60S частиц из ядрышка в нуклеоплазму сопровождается высвобождением большого числа ядрышковых факторов биогенеза и приходом поздних белков процессинга [120, 138, 151]. Включение в структуру комплекса Rix1-Iri3-Iri1 инициирует формирование центрального выступа и рекрутирует

АТФазу Rea1. Rea1 катализирует диссоциацию комплекса Rpf2-Rrs1 за счет гидролиза АТФ [126, 152, 153], что приводит к повороту 5S РНП на 180° и его окончательному закреплению в субчастице [154]. Описываемые структурные перестройки приводят к ГТФ зависимому высвобождению Nog2, что приводит к привлечению экспортного адаптера Nmd3 [153]. Помимо участия в транспорте пре-60S частицы в цитоплазму правильное присоединение Nmd3 является контрольной точкой, подтверждающей правильное формирование Е- и Р-сайтов, а также стебля L1 [155, 153, 156].

Недавно описаны структуры поздних ядерных человеческих пре-60S частиц, связанных с фактором NMD3 [157]. Структуры пре-60S частиц млекопитающих по архитектуре и составу схожи с дрожжевыми пре-субчастицами, причем это сходство сохраняется на ключевых этапах биогенеза, доказывая значительную консервативность поздних стадий процессинга.

Данные о полученных с помощью Крио-ЭМ высокого разрешения структурах нуклеоплазматических предшественников 40S субъединицы дрожжей и человека опубликованы недавно [158]. Промежуточные комплексы, покинувшие ядрышко, обладают многими чертами зрелых субъединиц 40S, за исключением того, что область «головы» и спираль h18 18S рРНК сохраняются в «недозрелой» конформации [158]. Стабилизация области «головы» предшествует экспорту из ядра пре-40S частиц, тогда как формирование «клюва» завершается позже в цитоплазме. По сравнению с дрожжами, процессинг ITS1 значительно сложнее у высших эукариот и включает дополнительную стадию расщепления эндонуклеазами, приводя к образованию пре-рРНК 21S. Более того, созревание пре-рРНК 21S также требует участия экзонуклеаз, а именно экзосомы с каталитическими субъединицами DIS3 и EXOSC10 и поли(А)-специфической рибонуклеазы PARN [28, 159, 119, 160]. Связывание нескольких консервативных факторов биогенеза рибосом Nob1/NOB1, Rio2/RIOK2, Ltv1/LTV1, Slx9/C21orf70/FAM207A и Tsr1/TSR1 с предшественником 40S во время стадии созревания 40S в ядре открывают путь для экспорта пре-40S из ядра в цитоплазму. [161, 162]. Считается, что связывание факторов экспорта с пре-рибосомными

частицами является одним из этапов контроля качества созревающих субъединиц [163]. И у дрожжей, и у млекопитающих экспорт субъединиц зависит от белка-экспортинина Crm1/XPO1, который взаимодействует с малой ГТФазой Ran [27, 164, 165]. Дрожжевые факторы биогенеза 40S Dim2, Rio2 и Ltv1 содержат последовательности ядерного экспорта (NES) и, как предполагается, служат адаптерами для связывания Crm1 с малой субъединицей [166, 167]. Дополнительными факторами, связанными с экспортом пре-40S у дрожжей, являются факторы экспорта мРНК Mex67/Mtr2 [168], Rrp12 и Slx9, причем последний, предположительно, играет роль посредника в связывании Crm1 с Rio2 [169]. Его человеческий гомолог SLX9/C21orf70/FAM207A также связан с частицами пре-40S в нуклеоплазме, но не доказано, что он участвует в перемещении субъединицы пре-40S в цитоплазме [170]. Как и у дрожжей, экспорт пре-40S человека зависит от протеинкиназы RIOK2, которая служит адаптером для XPO1 [171]. Принято считать, что некоторые другие содержащие NES факторы биогенеза рибосом могут способствовать рекрутированию XPO1 [171], среди них PDCD2L, который, согласно выдвинутым предположениям, нужен для экспорта пре-40S млекопитающих из ядра [172].

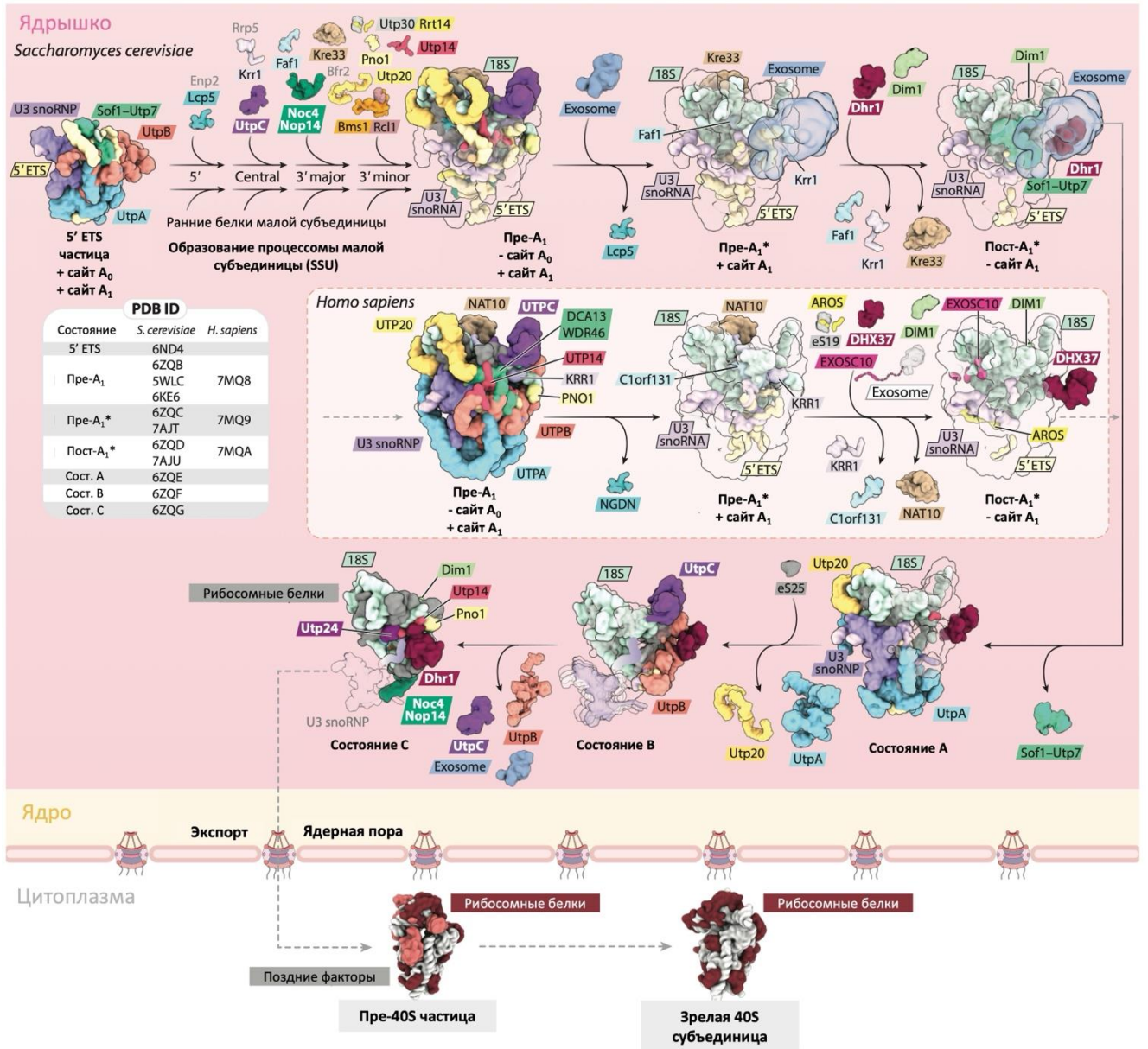
### **1.2.6. Финальные стадии созревания предшественников рибосом в цитоплазме**

Заключительные стадии биогенеза пре-60S частиц происходят в цитоплазме и сопряжены с активностью ГТФаз и AAA-АТФаз Drg1, SPATA5, SPATA5L1 и Nog1 [173]. Эти ферменты обеспечивают своевременное высвобождение оставшихся факторов сборки Rlp24/RSL24D1, Nog1/GTPBP4, Nmd3/NMD3, Arx1/PA2G4 и Tif6/EIF6, а также включение в пре-60S недостающих белков. Согласно предсказаниям, эти цитоплазматические факторы препятствуют преждевременному связыванию цитоплазматических пре-60S частиц со зрелыми субъединицами 40S [174, 175, 176]. После включения RPL40/eL40 и RPL10/uL16 Nmd3 диссоциирует с помощью ГТФазы Lsg1/LSG [127, 155, 177]. Наконец, удаление Tif6 опосредовано активностью ГТФазы Efl1/EFTUD1 и фактора обмена гуаниновых нуклеотидов Sdo1/SBDS [178, 179, 180].

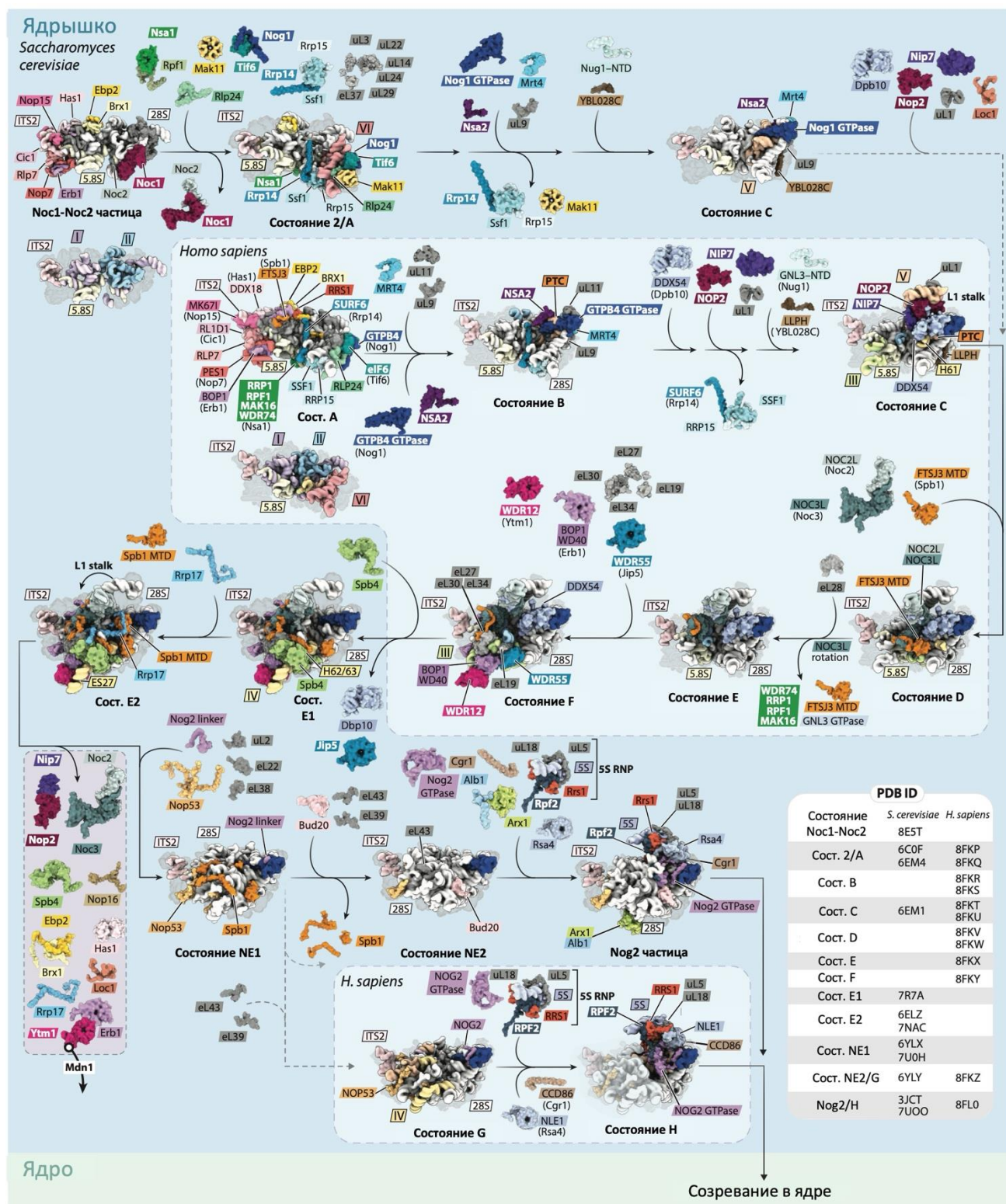
Большинство факторов, участвующих в цитозольном созревании пре-60S у дрожжей, имеют человеческие гомологи, а недавно полученные структуры пре-60S субъединиц человека показали, что наблюдаемые человеческие гомологи дрожжевых факторов биогенеза рибосом связываются в сходных положениях и, вероятно, являются функциональными гомологами [157]. Заметным исключением является PA2G4/EBP1, который значительно меньше своего дрожжевого гомолога Arg1. PA2G4 участвует как в биогенезе рибосом, так и в трансляции, поскольку было показано, что он связывается с пре-60S частицами, а также с зрелыми 80S рибосомами *in vivo* [157, 181, 182].

У дрожжей экспортирующиеся пре-40S частицы связаны с комплексом белков Dim1, Dim2, Ebp1, Nob1, Hrr25, Rio2, Rrp12 и Tsr1 [183]. Функции этих факторов консервативны в клетках млекопитающих за исключением DIM1, который, в отличие от своего дрожжевого гомолога, участвует в ранних стадиях биогенеза малой субъединицы и не является частью поздних комплексов пре-40S человека. Недавно опубликованные Крио-ЭМ структуры цитоплазматических дрожжевых и человеческих пре-40S частиц показали, что в цитоплазме созревание 40S, в основном, включает структурные изменения в области «головы» и «клюва», образование декодирующего центра путем перестройки спирали h44 и финальный процессинг 18S рРНК [184, 185, 186, 187, 188, 189]. Эти этапы координируются консервативными киназами Hrr25/CKId/e, Rio2/RIOK2 и Rio1/RIOK1 [190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197], а также дополнительной киназой RIOK3, осуществляющей процессинг 18S пре-рРНК в клетках млекопитающих [193, 198].





**Рисунок 8.** Структурные превращения предшественников малой 40S субъединицы. На рисунке представлены известные промежуточные состояния дрожжевых и человеческих предшественников.



**Рисунок 9.** Структурные превращения предшественников большой 60S субъединицы. На рисунке представлены известные промежуточные состояния ядрышковых дрожжевых и человеческих предшественников.

### 1.3. Ранние факторы биогенеза рибосом RPF1 и ESF1.

#### 1.3.1. RPF1 – фактор биогенеза 60S субъединицы

Белок RPF1 относится к суперсемейству IMP4/ $\sigma^{70}$  факторов, которое объединяет семейства консервативных белков-факторов биогенеза Rpf1, Imp4, Rpf2, Vrx1, и Ssf, имеющих в своем составе домен helix-turn-helix (спираль-поворот-спираль), гомологичный домену 4.2 прокариотических факторов транскрипции  $\sigma^{70}$  [199]. В ранних работах продемонстрировано, что Rpf1 может связывать одноцепочечные нуклеиновые кислоты. Помимо этого, представители данного семейства в экспериментах по иммунопреципитации выделяются в комплексе с рибосомными РНК – предшественниками зрелой 25S рРНК.

Результаты исследования структуры предшественников 60S субъединицы человека методом Крио-ЭМ позволили установить расположение RPF1 в ряде комплексов. Согласно полученным данным, RPF1 присутствует в интермедиатах A1, B1, C1 и D1 и диссоциирует при связывании NVL2 (Рисунок 9) [31]. Не ясно, требуется ли он для стадий расщепления пре-рРНК или обеспечивает структуру, способствующую изменению конформации пре-рРНК, упомянутой выше (раздел 1.2.5). Работа Karen A. Wehner и Susan J. Baserga впервые продемонстрировала связь Rpf1 с пре-рРНК в клетках дрожжей [199]. Эксперименты по ко-иммунопреципитации RPF1-РНК демонстрируют его связь с прерибосомными РНК 35S, 27SA и 27SB в сайтах ITS1 и ITS2 (Рисунок 10). Нокдаун Rpf1 у дрожжей приводит к накоплению предшественника 27SA3 и снижению уровня предшественника 7S, что позволяет предположить его возможное взаимодействие с сайтом A3 в сайтах ITS1 и C2 в ITS2. Более того, Rpf1 считается фактором нуклеации комплекса пре-66S у дрожжей [199]. Более поздние работы Keqiong Ye и Sebastian Klinge содержат Крио-ЭМ структуры ядрышковых предшественников дрожжевой 60S субъединицы с входящим в их состав Rpf1. Авторы показывают, что в обнаруженных прерибосомных частицах только 3 домена (I, II и VI) 25S рРНК из 6 находятся в зрелом состоянии. Согласно полученным данным Rpf1 и его белковые

партнеры Rgp1, Mak16 и Nsa1 образуют комплекс, который связывает сформированные домены I и II [125, 138].

### **1.3.2. ESF1 – фактор биогенеза 40S субъединицы**

Esf1 представляет собой высококонсервативный белок, содержащий в своей структуре coiled-coil домен [200].

Нокаун Esf1 у дрожжей приводит к резкому снижению количества пре-рРНК 27SA2 и 20S, что указывает на его роль в расщеплении сайта A2 (Рисунок 10). Кроме того, наблюдалось накопление 35S и aberrантных 23S прерибосомных РНК, что указывает на возможное ингибирование расщепления A0 и A1. Согласно этим данным, Esf1 является ранним фактором биогенеза малой субъединицы, но при этом, видимо, необходим в процессах, не задействующих SSU процессому. В экспериментах по иммунопреципитации он выделяется с белками, не входящими в состав SSU процессомы, но при этом в составе комплекса обнаруживается мякРНК U3. Также вместе с белком Esf1 совыделяются следовые количества содержащей 5'ETS пре-рРНК [200].

Некоторые эффекты недостаточности Esf1 были также проанализированы в рыбах (*Danio rerio*). На биаллельно нокаутированных по Esf1 с помощью CRISPR/Cas9 эмбрионах в возрасте 48 часов показано снижение 18S рРНК в ~2 раза относительно контроля, а также существенное увеличение содержания раннего, содержащего 5'ETS, предшественника (в ~2 раза). Фракционирование экстрактов, полученных из эмбрионов в возрасте 72 часа, показало значительное уменьшение 40S и 80S рибосомных частиц. При этом, несмотря на то, что дрожжевые клетки нежизнеспособны при полном нокауте Esf1, эмбрионы Данио-рерио продолжают свое развитие, которое сопровождается нарушениями формирования краниального нервного гребня и области глоточной дуги [201].

Между тем, биохимические или структурные данных о вкладе человеческого ESF1 в биогенез рибосом человека пока отсутствуют. Крио-ЭМ структуры дрожжевых прерибосомных частиц, содержащих Esf1, также еще не получены.

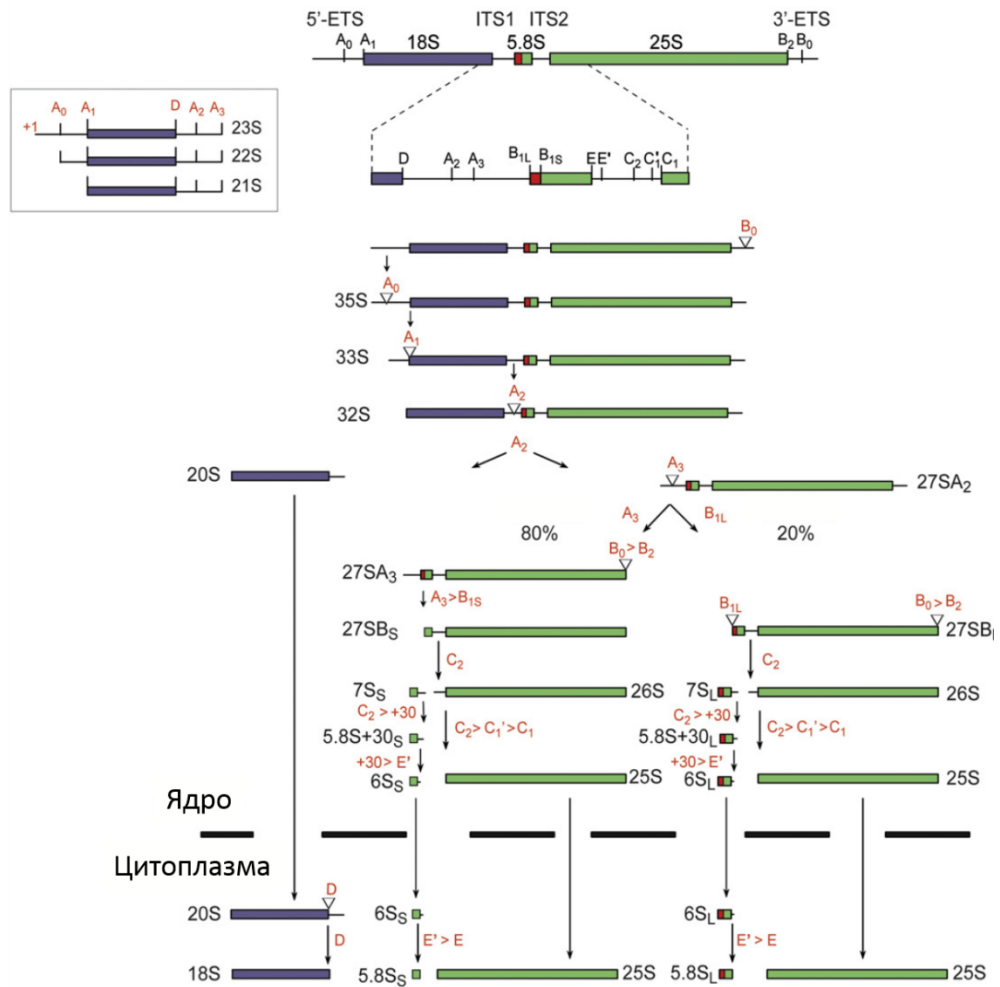


Рисунок 10. Процессинг пре-рНК в клетках дрожжей.

### Заключение

Отсутствие литературных данных о функциональной роли белков RPF1 и ESF1 человека послужили причиной нашего интереса к их исследованию в контексте клеточных линий. Для этого нами был использован генетический подход, позволяющий с помощью малых РНК добиться стабильного или временного снижения уровня RPF1 и ESF1 для выяснения их функций в биогенезе человеческих рибосом. Полученные результаты, как будет представлено ниже, действительно говорят о важном вкладе этих ядрышковых белков в процессинг пре-рНК и формирование зрелых субъединиц рибосом.

## Глава 2. Материалы и методы.

### 2.1. Материалы.

#### 2.1.1. Химические реактивы, буферные растворы и сопутствующие материалы

##### Среды

Среда LB: 10 г/л бактотриптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl.

Среда SOB: 10 г/л бактотриптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl, 250 мМ KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>.

Среда SOC: 10 г/л бактотриптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl, 250 мМ KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ глюкозы.

Среда для ведения клеточных культур HEK293: DMEM (ПанЭко) с добавлением эмбриональной бычьей сыворотки (10%), антибиотиков пенициллина/стрептомицина 50-100 ед./мл и 2 мМ глутамина.

##### Растворы

Буфер для отжига олигонуклеотидов (10X): 1М NaCl, 100 мМ Трис-HCl, pH 7,4.

Буфер ТВ для приготовления высокоэффективных компетентных клеток E. Coli Stb13: 55 мМ MnCl<sub>2</sub>, 15 мМ CaCl<sub>2</sub>, 250 мМ KCl, 10 мМ Pipes, pH 6,7.

TE: 10 мМ Трис-HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0.

TBE (10x): 0,89 М Трис, 0,89 М борная кислота, 20 мМ ЭДТА, pH 8,0.

Буфер для нанесения образцов для электрофореза в агарозном геле (10x): 0,1% бромфеноловый синий, 50% глицерин.

PBS: 8,0 г/л NaCl, 0,2 г/л KCl, 1,15 г/л Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 г/л KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2.

Концентрирующий гель: 5% смеси акриламид-бисакриламид (29:1), 0,1% SDS, 0,125 М Трис-HCl, pH 6,8.

Разделяющий гель: 12% смеси акриламид-бисакриламид (29:1), 0,1% SDS, 0,375 М Трис-HCl, pH 8,9.

Буфер для нанесения образцов для электрофореза по Леммли (2X): 5% 2-меркаптоэтанол, 4% SDS, 0,25 М Трис-НСl, 4 мМ ЭДТА, 10% глицерин, 0,25 мг/мл бромфенолового синего, рН 6,8.

Электродный буфер для электрофореза по Леммли (5X): 72 г/л глицин, 5 г/л SDS, 6,5 г/л Трис-НСl, рН 8,3.

Раствор для окрашивания полиакриламидного геля: 15% этанол, 25% уксусная кислота, 0,3 г/л краситель Кумасси синий R-250 и 0,45 г/л пятиводный сульфат меди.

Буфер TBST: 20 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl, 0.1% Tween 20, рН 7,6.

Блокирующий буфер для вестерн-блоттинга: TBST, 2% обезжиренного сухого молока.

Конъюгатный буфер для вестерн-блоттинга: TBST, 0,2% обезжиренного сухого молока.

Буфер для переноса для иммуноблоттинга: 39 мМ глицин, 48 мМ Трис-НСl, 0,0375% SDS, 20% этанола.

Лизирующий буфер для эукариотических клеток: 50 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl, 10% глицерин, 1% Тритон X-100, 1 мМ PMSF, 1 мМ ДТТ, рН 7,5.

Буфер для агарозного геля для РНК электрофореза: 1,8 М формальдегид, 20 мМ MOPS, 4 мМ ацетат натрия, 0,5 мМ ЭДТА, рН 7,0.

Электродный буфер для РНК электрофореза (MOPS буфер, 10X): 200 мМ MOPS, 5 мМ EDTA, 40 мМ ацетат натрия, рН 7,0.

Цитратный буфер (2X): 0,3 М NaCl, 30 мМ цитрат натрия, рН 7,0.

Буфер для денатурации РНК: 660 мкл формамида, 210 мкл 37% формальдегида, 130 мкл 10X MOPS буфера, рН 7,0.

Промывочный буфер для нозерн-блоттинга: 0,3 М NaCl, 30 мМ цитрат натрия, 0,5% SDS, рН 7,0.

Гипоосмотический буфер для выделения ядер: 10 мМ Трис-НСl, 10 мМ NaCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, рН 7,4.

Сахароза для выделения ядер: 250 мМ/340 мМ/880 мМ сахароза, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ Трис-НСl, 10 мМ NaCl, рН 7,4.

Буфер для мягкого разрушения ядер: 10 мМ HEPES, 10 мМ NaCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Igepal CA-630, 0,5 мг/мл гепарин, 600 ед./мл ингибитор РНКаз, ингибитор протеаз, ДНКазы I 333 ед./мл, рН 7,5.

Буфер для сахарозного градиента ядерных лизатов: 20 мМ of HEPES, 200 мМ NaCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Igepal CA-630, 0,1 мг/мл гепарин, 1 мМ ДДТ.

Полисомный буфер: 20 мМ Трис-НСl, 250 мМ NaCl, 15 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ ДДТ, 0,5% Triton X-100, циклогексимид 100 мкг/мл, 20 ед./мл ДНКазы I, ингибитор РНКаз 1 ед./мкл, рН 7,5.

Буфер для сахарозного градиента полисом: 20 мМ Трис-НСl, 250 мМ NaCl, 15 мМ MgCl<sub>2</sub>, рН 7,5.

Click-буфер: 2 мМ CuSO<sub>4</sub>, 10 мМ ТНРТА, 10 мМ аскорбат натрия, ингибитор РНКаз 40 ед., 1X MOPS буфер, DEPC вода, рН 7,0.

Связывающий/промывочный буфер для магнитных частиц: 10 мМ Трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, 2 мМ NaCl, рН 7,5.

### **Антибиотики**

Раствор ампициллина в воде с концентрацией 100 мг/мл.

Раствор пурамицина в фосфатно-солевом буфере с концентрацией 10 мкг/мл.

### **Линии клеток и штаммы бактерий, использованные в работе**

Линия клеток HEK293 (номер ATCC CRL 1573).

Штамм E. coli Stb13 (F-mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(StrR) xyl-5 λ-leu mtl-1).

## **2.2. Методы.**

### **2.2.1. Получение генетических конструкций**

Последовательности, кодирующие малые шпилечные РНК, комплементарные мРНК белков RPF1 или ERF1, а также контрольная шпилечная РНК (non-targeting control), были выбраны из библиотеки Sigma MISSION® и получены в виде ДНК олигонуклеотидов длиной 21 нуклеотид, кодирующих плюс



и минус цепи в получающейся shRNA. Олигонуклеотиды отжигали попарно, и клонировали дуплексы в вектор pLKO.1-TRC (Addgene #10878) в соответствии с протоколом производителя. Штамм *E. coli* Stbl3 (F–mcrB mrr hsdS20(rB–, mB–) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(StrR) xyl-5 λ-leu mtl-1) использовали для получения ультракомпетентных клеток для рутинного клонирования конструкций для снижения рекомбинации и увеличения выхода плазмид.

### **2.2.2. Культивирование клеток, трансфекция, получение лентивирусных частиц и лентивирусная трансдукция**

Линия клеток HEK293 (номер ATCC CRL 1573) получена из Российского банка клеточных линий (Институт цитологии РАН, Россия). Клетки культивировали в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки HyClone (Cytiva, США), 2 mM L-глутамина и смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина (250 ед./мл каждого, все ПанЭко, Россия) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Для получения лентивирусных частиц клетки HEK293 котрансфицировали плазмидами, кодирующими малые шпилечные РНК, pMDLg/pRRE (Addgene #12251; кодирует белки HIV Gag и Pol), pRSV-Rev (Addgene #12253; кодирует белок HIV Rev) и pMD2.G (Addgene #12259; кодирует белок VSV G), с использованием Lipofectamine 2000 (ThermoFisher, США) согласно протоколу (<http://www.LentiGO-Vectors.de>). Супернатант, содержащий лентивирусные частицы, пропускали через фильтр с размером пор 0,45 мкм и использовали сразу или замораживали и хранили при -80°C. Клетки HEK293 при 60% конфлюэнтности трансдуцировали полученными лентивирусными частицами с использованием реагента Polybrene, добавленного в конечной концентрации 10 мкг/мл (Milteny Biotec, Германия). Плазмиду pCDH-copGFP (10% от общего количества ДНК) добавляли к смеси ДНК для проверки эффективности трансдукции. Через 24 ч после трансдукции среду заменяли на свежую, не содержащую вирусных частиц. Через 3 дня после трансдукции добавляли пурамицин до конечной концентрации 10 мкг/мл для отбора клеток с

интегрированными в геном последовательностями. После отбора эффективность нокдауна анализировали с помощью RT-PCR и вестерн-блоттинга.

Дополнительно был проведен дизайн и синтез двух малых интерферирующих РНК к мРНК RPF1 с дополнительными модификациями для повышения их внутриклеточной стабильности (ГенТерра, Россия). Клетки НЕК293 при 70% конfluence были трансфицированы малыми интерферирующими РНК по отдельности или вместе в рабочих количествах 5 пмоль и 15 пмоль в соответствии с протоколом Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher, США). Анализ уровня мРНК и белка, а также нозерн-блоттинг проводили через 3 дня после трансфекции.

Стабильные клеточные линии, экспрессирующие короткие шпилечные РНК #1/#2 против мРНК RPF1, а также контрольные клетки выращивали до 70% конfluence в 6-луночных планшетах. Для мечения РНК этилилуридин (Jena Bioscience, Германия) добавляли до конечной концентрации 0,5 мМ и инкубировали клетки в течение 1 часа.

### **2.2.3. Выделение РНК из клеток и реакционных смесей**

Тотальную РНК выделяли из клеток с помощью реагента TRIzol в соответствии с протоколом производителя (ThermoFisher, США). Чистоту, качество и концентрацию РНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop OneC (ThermoFisher, США) при длинах волн 260/280 нм, а также с помощью электрофореза в агарозном геле в денатурирующих условия.

Для выделения РНК из фракций сахарозных градиентов к 500 мкл каждой фракции добавляли 500 мкл смеси фенол:хлороформ:изоамиловый спирт 25:24:1 и центрифугировали при 12 000 g в течение 15 мин при 4°C. К водной фазе добавляли 200 мкл хлороформа и центрифугировали при 12 000 g в течение 15 мин при 4°C. К полученной водной фазе добавляли 500 мкл изопропилового спирта, инкубировали при комнатной температуре 10 мин и центрифугировали при 12 000 g в течение 15 мин при 4°C. Осадки РНК дважды промывали 1,5 мл 75% этанола, после промывок центрифугировали 5 мин при 4°C. Полученные осадки высушивали при комнатной температуре и растворяли в 5 мкл воды, обработанной DEPC.

#### 2.2.4. Конъюгирование тотальной РНК с биотин-азидом с помощью клик-реакции

Для проведения реакции клик-химии тотальной РНК, меченой этинилуридином, был разработан следующий протокол: 5 мкг тотальной РНК, выделенной из клеток после инкубации с этинилуридином, инкубировали в реакционном буфере (конечный объем реакционной смеси 50 мкл; биотин-азид (ПЭГ4-карбоксамид-6-азидогексанил-биотин, ThermoFisher, США), 2 mM CuSO<sub>4</sub>, 10 mM ТНРТА, 10 mM аскорбат натрия, ингибитор РНКаз 40 ед., 1X MOPS буфер, DEPC вода, pH 7,0) при 25°C, 600 об/мин в термошейкере в течение 45 мин.

При выделении РНК после клик-реакции к смеси добавляли 1 мкл гликогена (20 мкг/мкл, New England Biolabs, США), 50 мкл 3 M ацетата натрия (pH 5,2) и 700 мкл холодного 96% этанола. Образцы инкубировали в течение ночи при -80°C. РНК осаждали центрифугированием при 13 000 g в течение 20 мин при 4°C. Супернатанты удаляли, а осадки РНК дважды промывали 75% этанолом, а затем центрифугировали при 13 000 g 5 мин при 4°C. Осадки сушили на воздухе в течение 5 мин при комнатной температуре и ресуспендировали в 10 мкл воды. Качество РНК проверяли электрофорезом в агарозном геле в денатурирующих условиях.

Для выделения РНК, содержащей этинилуридин, конъюгированный с биотин-азидом, использовали 1 мкг биотинилированной РНК. К РНК добавляли 50 мкл суспензии магнитных частиц, покрытых стрептавидином (ThermoFisher, США), предварительно уравновешенных буфером для связывания (10 mM Трис-НСl, 1 mM ЭДТА, 2 mM NaCl, pH 7,5). Связывание производили в объеме 250 мкл, использовали 125 мкл 2× буфера для связывания, 2 мкл ингибитора РНКаз и DEPC воду. РНК в связывающем буфере нагревали при 68°C в течение 5 минут для расплавления вторичных структур и добавляли к 50 мкл магнитных шаров. Суспензию инкубировали при 25°C в термошейкере в течение 45 мин при 900 об/мин, затем последовательно промывали 5 раз 1× буфером для связывания и 5 раз низкосолевым буфером (0,1 M NaCl).

### **2.2.5. Электрофорез РНК в агарозном геле в денатурирующих условиях и нозерн-блоттинг**

Электрофорез РНК проводили в 1,2% агарозном геле, содержащем 1,8 М формальдегида (состав буфера: 20 мМ MOPS, 4 мМ ацетата натрия, 0,5 мМ ЭДТА, рН 7,0). На каждую дорожку наносили ~ 3 мкг тотальной РНК и проводили электрофорез при 2 В/см в течение 6 часов на холоде. РНК переносили на положительно заряженную нейлоновую мембрану BrightStar®-Plus (ThermoFisher, США) в течение 6 ч с помощью щелочного переноса (состав буфера для переноса: 1 М NaCl, 10 мМ NaOH). Затем мембрану промывали буфером 2× SSC (0,3 М NaCl, 30 мМ цитрата натрия, рН 7,0) и запекали при 80°C в течение 15 минут в сухожаровом шкафу. Гибридизацию с зондами, мечеными биотином (конечная концентрация 10 нг/мл), проводили в буфере ULTRAhyb®-Oligo при температуре 42°C (ThermoFisher, США) в соответствии с протоколом производителя. После гибридизации мембрану дважды промывали в буфере 2× SSC с добавлением 0,5% SDS в течение 30 мин при 42°C. Визуализацию сигналов осуществляли с помощью Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module Kit (ThermoFisher, США) при комнатной температуре в соответствии с протоколом производителя с использованием рентгеновской пленки (Cytiva, Amersham, Hyperfilm ECL) или системы визуализации ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories, США). Денситометрический анализ полученных изображений проводили с помощью программного обеспечения ImageLab 5.0.

### **2.2.6. Анализ профиля предшественников рРНК**

Анализ предшественников рРНК проводят с помощью построения RAMP профилей (Ratio Analysis of Multiple Precursors). Соотношение сигналов предшественников (пре-рРНК 41S/45-47S, 12S/32S и т.д.) рассчитывали на основании данных, полученных путем денситометрического анализа изображений после нозерн-блоттинга. Нормализованные значения  $\log_2$  оцифрованных сигналов были представлены в виде гистограмм, на которые нанесены отношения сигналов отдельных предшественников к общему сигналу 47S и соотношения между парами предшественников субстрат-продукт, например, 18SE/21S и 12S/32S.

### 2.2.7. Выделение белка из образцов клеток и фракций сахарозных градиентов, электрофорез в денатурирующих условиях и вестерн-блоттинг

Для получения клеточных лизатов  $\sim 1 \times 10^6$  клеток лизировали на льду в 200 мкл лизирующего буфера (50 mM трис-HCl, 150 mM NaCl, 10% глицерин, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 1 mM ДТТ, pH 7,5). Концентрацию белка в лизатах определяли с помощью реакции Брэдфорда по стандартному протоколу. Для выделения белков из фракций сахарозных градиентов к 500 мкл каждой фракции добавляли смесь фенол:хлороформ:изоамиловый спирт 25:24:1 и центрифугировали при 12 000 g в течение 15 мин при 4°C. Далее к органической фазе добавляли 1,5 мл изопропилового спирта и центрифугировали 12 000 g в течение 5 мин при 4°C. Осадок белков трижды промывали путем добавления 1 мл раствора гуанидина гидрохлорида в абсолютном этаноле и центрифугирования при 12 000 g в течение 5 мин при 4°C. Полученные белковые осадки высушивали при комнатной температуре, растворяли в 10% SDS, после чего сразу использовали для вестерн-блоттинга или замораживали при -20°C.

Препараты лизатов или очищенных белков инкубировали с буфером Лэммли 10 мин при 100°C и наносили на 12% полиакриламидный гель с SDS. Перенос осуществляли на нитроцеллюлозную мембрану с порами 0,2 мкм (Bio-Rad, США). Мембрану блокировали в 5% обезжиренном молоке в TBST (20 mM Трис-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% Твин 20, pH 7,6) в течение 1 часа при комнатной температуре и инкубировали с кроличьими анти-RPF1 (Sigma, Великобритания, разведение 1:1000), анти-ESF1 (Sigma, Великобритания, разведение 1:1000) или анти-Актин (Sigma, Великобритания, разведение 1:1000) первичными антителами. После трех 5-минутных промывок в TBST мембрану инкубировали со вторичным антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Sigma, Великобритания, 1:20 000 в TBST + 5% обезжиренное молоко) в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем мембрану трижды промывали TBST, после чего сигналы визуализировали с помощью системы детекции ECL (Cytiva, США) в соответствии с протоколом производителя на приборе ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories, США).

Денситометрический анализ изображений проводили с помощью программного обеспечения ImageLab 5.0.

### **2.2.8. Синтез кДНК и ПЦР в реальном времени**

Синтез кДНК на матрице тотальной клеточной РНК (1 мкг) проводили с помощью обратной транскриптазы SuperScript IV RT (ThermoFisher, США). Полученные образцы кДНК разводили в 10 раз и проводили ПЦР в реальном времени с праймерами к кДНК RPF1, ESF1 и GAPDH, комплементарными участкам границ между экзонами. ПЦР в реальном времени проводили, используя 5X qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) по протоколу производителя.

Для получения кДНК из РНК, меченой этилилуридином и иммобилизованной на магнитных частицах (см. раздел 2.2.4 в «Материалах и методах»), 50 мкл магнитных шаров инкубировали в буфере для отжига праймеров (состав буфера: смесь праймеров (согласно протоколу RNAScribe RT), ингибитор РНКаз 40 ед., DEPC вода) при 70°C в течение 3 мин. Затем добавляли обратную транскриптазу RNAScribe RT (Биолабмикс, Россия) в реакционном буфере, получившуюся смесь инкубировали в соответствии с протоколом производителя. 2,5 мкл полученной кДНК использовали для ПЦР в реальном времени с праймерами к 5'ETS или GAPDH.

### **2.2.9. Иммуоцитохимия и конфокальная микроскопия**

Стабильные клеточные линии, экспрессирующие малые шпилечные РНК к мРНК RPF1, ESF1 или контрольную малую шпилечную РНК, культивировали на покровных предметных стеклах. Клетки фиксировали в абсолютном ацетоне при -20°C в течение 10 мин, 3 раза по 5 мин промывали холодным фосфатно-солевым буфером и инкубировали со смесью двух антител: кроличьего анти-RPF1/анти-ESF1 (разведение 1:100) и мышинового анти-NPM1/нуклеофозмин или мышинового анти-SURF6 (разведение 1:200, Sigma, UK) в течение 1 часа при комнатной температуре. Клетки промывали фосфатно-солевым буфером 3 раза по 5 минут и инкубировали со смесью козьих антител к мышинным IgG (HCL), конъюгированных с AlexaFluor 488 (ThermoFisher, США, для NPM1 или SURF6), и козьих антител к

кроличьим IgG (H+L), конъюгированных с AlexaFluor 568 (ThermoFisher, США, для RPF1 или ESF1), в течение 1 часа при комнатной температуре.

После инкубации со вторичными антителами клетки 3 раза по 5 минут промывали фосфатно-солевым буфером, окрашивали ДНК-связывающим красителем DAPI (1 мг/мл в фосфатно-солевом буфере) при комнатной температуре в течение 10 минут и фиксировали в Vectashield (Vector Laboratories, США). Препараты анализировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа DuoScan-Meta LSM510 (Carl Zeiss Meditec AG, Германия), оснащенного объективом Plan-Apochromat 63 × 1,40 (числовая апертура) Ph3.

#### **2.2.10. Выделение ядерных прерибосомных комплексов и их центрифугирование в градиенте сахарозы**

Клетки НЕК293 культивировали в десяти флаконах T-75 до конfluenceности ~ 80% (суммарно ~ 200 млн клеток) в стандартных условиях (см. раздел 2.2.2 «Материалов и методов»), снимали раствором трипсина (0,05%) и ЭДТА (0,5 мМ), промывали фосфатно-солевым буфером, замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до использования. Осадок клеток размораживали на льду, и ядра экстрагировали согласно протоколу [202]. Очищенные ядра обрабатывали буфером (10 мМ HEPES, 10 мМ NaCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Igepal CA-630, 0,5 мг/мл гепарин, 600 ед./мл ингибитор РНКаз, рН 7.5) с добавлением ДНКазы I для разрушения ядерной мембраны и дестабилизации ядрышка. Лизаты центрифугировали при 12 300 g в течение 10 мин при 4°C. Полученные супернатанты наносили на линейный 10–50% градиент сахарозы в буфере, содержащем 20 мМ HEPES-NaOH (рН 7,5), 200 мМ NaCl, 4 мМ ЭДТА, 0,1% Igepal CA-630, 0,1 мг/мл гепарина и 1 мМ ДТТ. Ультрацентрифугирование проводили с использованием ротора SW40Ti (Beckman Coulter, США) при 36 000 об/мин в течение 6 часов при 4°C. Фракции (0,5 мл) собирали с помощью коллектора фракций (Bio-Rad Laboratories), после чего экстрагировали РНК и белки (см. разделы 2.2.3 и 2.2.7 «Материалов и методов»). нозерн- и вестерн-блоттинг проводили согласно разделам 2.2.5 и 2.2.7 «Материалов и методов».

### 2.2.11. Профиль полисом

Контрольные клеточную линию, а также линии с нокдауном RPF1 или ESF1 культивировали в трех флаконах T-75 до конfluence ~ 70–80% (суммарно ~ 60 млн клеток). В каждый флакон добавляли циклогексимид до конечной концентрации 100 мкг/мл, и клетки инкубировали CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 30 мин. После этого флаконы вынимали из CO<sub>2</sub>-инкубатора и сразу помещали на лед. Культуральную среду удаляли полностью, а клетки промывали 10 мл ледяного фосфатно-солевого буфера с циклогексимидом (100 мкг/мл), после чего добавляли 500 мкл буфера для лизиса (20 mM Трис-HCl, 250 mM NaCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ДТТ, 0,5% Тритон X-100, циклогексимид в концентрации 100 мкг/мл, 20 ед./мл ДНКазы I, 1 ед./мкл ингибитор РНКаз, pH 7,5). Полученные лизаты переносили в пробирки объемом 2 мл, инкубировали 20 мин на льду и центрифугировали при максимальной скорости в течение 10 мин при 4°C. После измерения оптической плотности при длине волны 260 нм 15 OD (приблизительно 350 мкл) каждого образца загружали на линейный градиент сахарозы 10–60% (состав буфера: 20 mM Трис-HCl, 250 mM NaCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5). Образцы центрифугировали при 35 000 об/мин в течение 3 ч при температуре 4°C. После центрифугирования градиенты фракционировали вручную (по 0,5 мл) и измеряли оптическую плотность каждого образца при 260 нм. На основании полученных значений строили график зависимости оптической плотности от номера фракции.

### 2.2.12. Обсчет изображений, полученных с помощью конфокальной микроскопии

Сигналы NPM1, RPF1, ESF1 или SURF6 на конфокальных изображениях были количественно оценены с использованием специального скрипта Python 3. Изображения были предварительно обработаны с помощью ImageJ для преобразования каналов DAPI и NPM1 в отдельные 16-битные изображения в оттенках серого. Для каждой группы анализировали минимум 56 единичных клеток. Сегментацию ядер определяли на изображениях DAPI с использованием функций определения порога Li в пакете Scikit-Image Python. CV для отдельных ядер, определяемый как стандартное отклонение интенсивности пикселей,



деленное на среднюю интенсивность пикселей, рассчитывали на основе изображений NPM1 с использованием пакета SciPy Python. Все данные были нормированы на контроль в каждом эксперименте. Данные представлены в виде коробчатых диаграмм с усами, для построения диаграмм применяли софт Matplotlib и Seaborn Python.

### **2.2.13. Тест метаболической активности клеток с использованием аламарового синего**

Контрольную клеточную линию, а также линии с нокдауном RPF1 или ESF1 инкубировали в 96-луночной планшете до конfluence ~ 50%. В культуральную среду добавляли реагент AlamarBlue (ThermoFisher, США) в соответствии с протоколом производителя и клетки инкубировали в течение 4 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Поглощение среды измеряли при длине волны 570 нм на планшетном ридере Thermo Scientific Multiskan EX ELISA (ThermoFisher, США).

### **2.2.14. Статистический анализ**

Результаты на гистограммах представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM). Для статистического анализа данных использовали программное обеспечение Microsoft Excel и GraphPad Prism 9.0. Все эксперименты выполнены в 3 повторах, если не указано иначе. Значения  $p < 0,05$  считали статистически значимыми.

## Глава 3. Результаты и их обсуждение

### Введение

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. Недавнее исследование методами Крио-ЭМ позволило разрешить небольшую альфа-спиральную часть RPF1 в структуре предшественников субъединицы 60S человека, перекрывающую формирующийся туннель выхода полипептида (Рисунок 9, состояние А). Однако неясно, требуется ли он для стадий расщепления или обеспечивает структуру, способствующую изменению конформации пре-рРНК или укладки РНК-белковых комплексов. Изучение RPF1 у дрожжей выявило как биохимические, так и структурные детали. Эксперименты по иммунопреципитации RPF1 и его партнеров у дрожжей демонстрируют связывание белка с пре-рРНК 35S, 27SA и 27SB в сайтах ITS1 и ITS2 (Рисунок 10). Нокдаун Rpf1 у дрожжей приводит к накоплению предшественника 27SA3 и снижению уровня предшественника 7S, что позволяет предположить его возможное взаимодействие с сайтом A3 в ITS1 и C2 в ITS2. Кроме того, считается, что RPF1 вместе с своими белковыми партнерами способствует образованию комплекса пре-66S у дрожжей.

О белке ESF1 известно гораздо меньше, чем о RPF1. Нокдаун Esf1 у дрожжей приводит к резкому снижению количества пре-рРНК 27SA2 и 20S, что указывает на его роль в расщеплении сайта A2 (Рисунок 10). Более того, наблюдалось накопление 35S и aberrantных 23S прерибосомных РНК, что указывает на возможное ингибирование расщепления сайтов A0 и A1. Между тем, нет биохимических или структурных данных о человеческом ESF1 и его вкладе в биогенез рибосом человека.

В данной работе мы показали, что RPF1 и ESF1 человека непосредственно участвуют в созревании субъединиц рибосом. Мы оценили влияние нокдауна RPF1 и ESF1 на их внутриклеточную локализацию, профили прерибосомных РНК и ассоциацию с предшественниками 60S и 40S. Доказано, что и RPF1, и ESF1

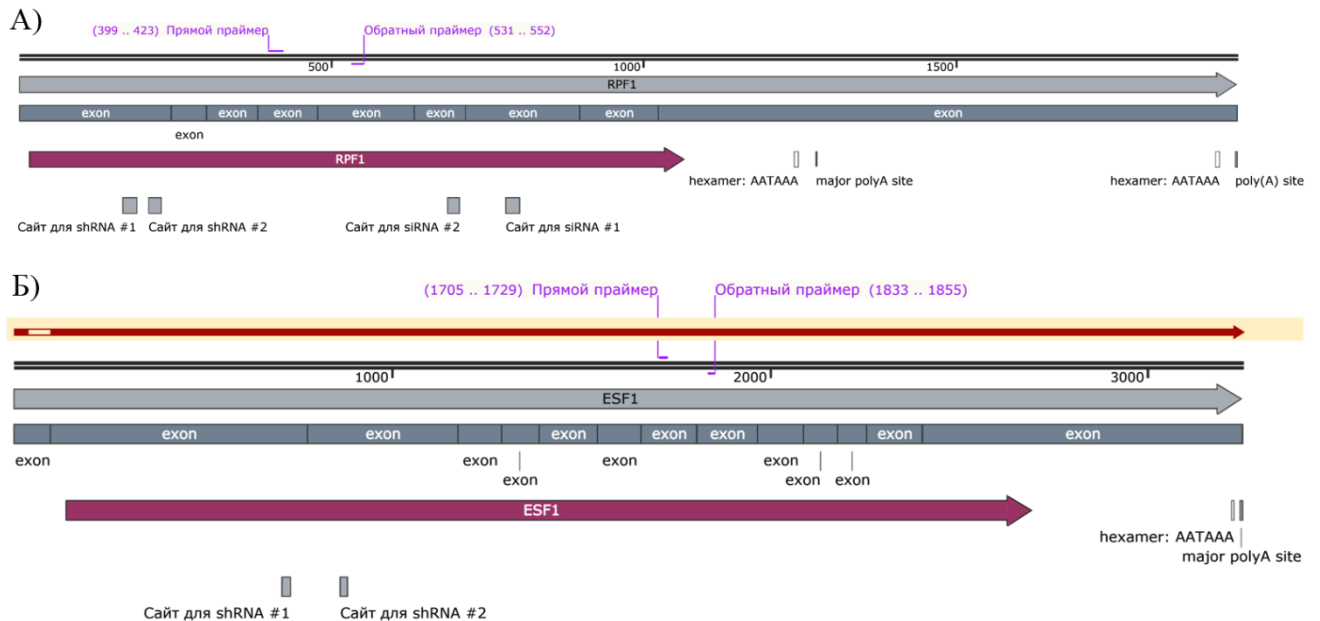
взаимодействуют с предшественниками больших и малых рибосомных субъединиц соответственно и, таким образом, участвуют в ранних этапах их биогенеза.

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

Как было указано ранее (см. раздел «Заключение» в обзоре литературы), функции белков RPF1 и ESF1 в клетках человека не известны. В качестве основных методов изучения роли белков в биогенезе рибосом используются сверхэкспрессия и нокдаун. Сверхэкспрессия при этом является менее физиологичным подходом, особенно учитывая, что RPF1 является РНК-связывающим белком. Поэтому в данном исследовании мы использованы shRNA/siRNA-опосредованный нокдаун мРНК белков RPF1 и ESF1 с целью изучения их функций в клетках человека.

Для подавления синтеза факторов биогенеза рибосом RPF1 и ESF1 использовали метод РНК интерференции. В настоящее время аннотированы 2 варианта мРНК белка ESF1 (NM\_001276380.2, NM\_016649.4), которые отличаются размером 5' UTR области, и 1 вариант мРНК белка RPF1 (NM\_025065.7). К последовательностям мРНК ESF1 и RPF1 были выбраны и протестированы 2 генетически-кодируемые малые шпилечные РНК (Рисунок 11а, б; см. раздел 2.2.1 «Материалов и методов»; в случае ESF1 – к общим для обеих мРНК участкам). В качестве контроля использовали последовательность, не имеющую мишени в клетках человека (non-targeting control). Доставку генетических конструкций производили с помощью лентивирусной трансдукции. После отбора трансдуцированных клеток в среде, содержащей антибиотик пуромицин, методом ПЦР в реальном времени оценивали содержание транскриптов RPF1 и ESF1 в клетках, экспрессирующих анти-RPF1 и анти-ESF1 малые шпилечные РНК, а также в клетках, экспрессирующих контрольную последовательность. Полученные результаты нормировали на содержание мРНК GAPDH, после чего рассчитывали соотношение между содержанием транскриптов RPF1 и ESF1 в клетках, экспрессирующих анти-RPF1 и анти-ESF1 малые шпилечные РНК, а также в клетках, экспрессирующих контрольную последовательность. Содержание белка

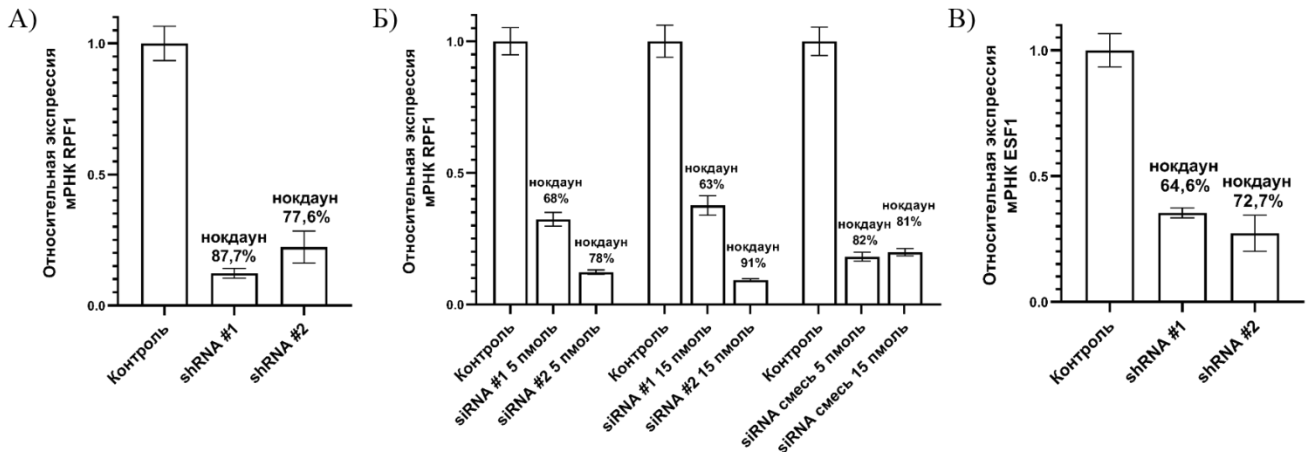
оценивали методом вестерн-блоттинга. Подавление экспрессии белка RPF1 также осуществляли с помощью siRNA (Рисунок 11а).



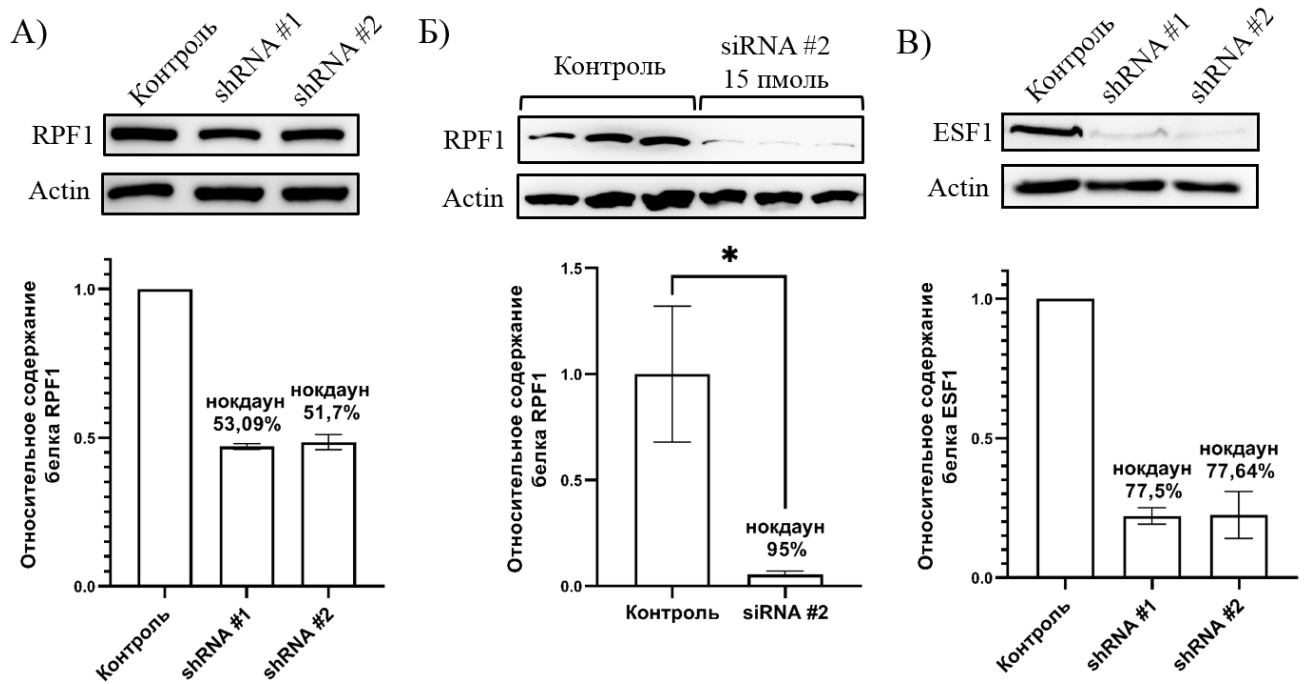
**Рисунок 11.** Расположение сайтов shRNA и siRNA, а также праймеров для ПЦР в реальном времени в транскриптах белков RPF1 и ESF1. а) Схема транскрипта белка RPF1; б) Схема транскрипта белка ESF1. Показано наложение двух аннотированных изоформ мРНК (красная и серая стрелки), демонстрирующие различие в области 5' UTR. Кодировующие последовательности RPF1 и ESF1 показаны бордовыми стрелками в нижних частях панелей.

Уровень мРНК RPF1 был снижен на 87% и 78% (Рисунок 12а), при этом уровень белка снизился на 53% и 52% (Рисунок 13а). Содержание мРНК ESF1 было снижено на 64% и 72% (Рисунок 12в), тогда как уровень белка снизился на 77% (Рисунок 13в). В целом нокдаун ESF1 можно считать эффективным, а в случае RPF1 интересно отметить его снижение только в ~ 2 раза, несмотря на более эффективное снижение мРНК RPF1. Такой эффект может быть вызван адаптацией клеток с стабильным нокдауном RPF1 с помощью shRNA. Поэтому мы также осуществили нокдаун RPF1 с помощью временной трансфекции малыми интерферирующими РНК, что должно было снизить время, за которое клетки могли адаптироваться к потере данного фактора. В ходе работы мы протестировали каждую малую

интерферирующую РНК отдельно в количестве 5 пмоль и 15 пмоль, а также их смесь с суммарным количеством РНК 5 пмоль и 15 пмоль (2,5 пмоль и 7,5 пмоль каждой соответственно). Как можно видеть (Рисунок 12б, рисунок 13б), временный нокдаун RPF1 с помощью малых РНК был эффективен как на уровне мРНК, так и на уровне белка, при этом наибольшая эффективность наблюдалась для siRNA#2 (90% относительное снижение по уровню мРНК и 95% - по уровню белка).



**Рисунок 12.** Уровень мРНК RPF1/ESF1 уменьшается при shRNA-транскрипции или siRNA-транскрипции клеток HEK293. а) Данные ПЦР в реальном времени для стабильных клеточных линий, экспрессирующих shRNA против RPF1 (shRNA#1 и shRNA#2) и контрольную shRNA. б) Данные ПЦР в реальном времени для клеток линии HEK293, трансфицированных siRNA против RPF1 (siRNA#1 и siRNA#2 отдельно или в смеси; количества дуплексов 5 пмоль или 15 пмоль) и контрольной siRNA. в) Данные ПЦР в реальном времени для стабильных клеточных линий, экспрессирующих shRNA против ESF1 (shRNA#1 и shRNA#2) и контрольную shRNA.



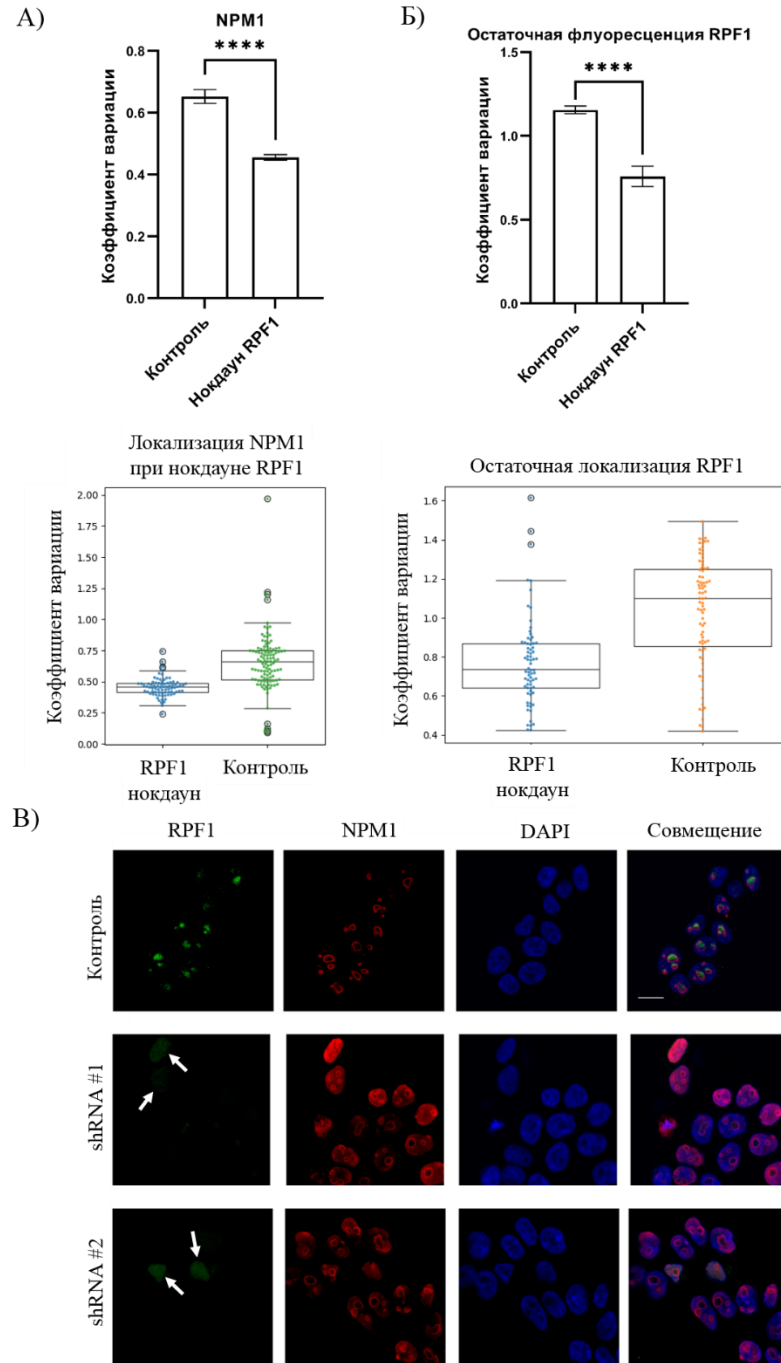
**Рисунок 13.** Уровень белков RPF1 и ESF1 уменьшается при введении shRNA или siRNA в клетки HEK293. а) Результаты вестерн-блота с лизатов, полученных из стабильных клеточных линий, экспрессирующих shRNA против RPF1 (shRNA#1 и shRNA#2) и контрольную shRNA. Показано окрашивание белков, разделенных в ПААГ и перенесенных на мембрану, анти-RPF1 IgG антителами. В качестве контроля нанесения и нормализации использовали окрашивание анти-Актин антителами. Показаны средние значения двух независимых экспериментов; б) Результаты вестерн-блота лизатов, полученных из клеток, трансфицированных siRNA против RPF1 (siRNA#2 в количестве 15 пмоль) и контрольной siRNA. Показано окрашивание белков, разделенных в ПААГ и перенесенных на мембрану, анти-RPF1 IgG антителами. В качестве контроля нанесения и нормализации использовали окрашивание анти-Актин антителами. Показаны средние значения трех независимых экспериментов. Звездочка показывает статистически значимые различия между контрольными клетками и клетками, трансфицированными анти-RPF1 siRNA ( $p < 0,05$ ); в) Результаты вестерн-блота с лизатов, полученных из стабильных клеточных линий, экспрессирующих shRNA против ESF1 (shRNA#1 и shRNA#2) и контрольную shRNA. Показано окрашивание белков, разделенных в ПААГ и перенесенных на мембрану, анти-ESF1 IgG антителами. В качестве

контроля нанесения и нормализации использовали окрашивание анти-Актин антителами. Показаны средние значения двух независимых экспериментов.

Известно, что истощение факторов биогенеза рибосом может вызывать ядрышковый стресс и нарушение структуры ядрышек из-за возникающего дисбаланса сборки прерибосомных частиц. Мы использовали метод конфокальной микроскопии, чтобы оценить возможные изменения в архитектуре ядрышка, которые могут выражаться как в изменении локализации ряда белков, так и в полной деградации данного компартмента. Ядрышки стабильных клеточных линий, стабильно синтезирующие короткие шпилечные РНК против белков RPF1 и ESF1 или контрольную шпилечную РНК, окрасили парами антител анти-NPM1+анти-RPF1/анти-NPM1+анти-ESF1 (NPM1/B23 - маркерный белок гранулярного компонента) и анти-SURF6+анти-RPF1/анти-SURF6+анти-ESF1 (SURF6 по нашим данным ко-локализуется с NPM1 в гранулярном компоненте [203]). Было показано, что наиболее выраженный переход NPM1 из ядрышка в нуклеоплазму происходит в клетках с нокдауном фактора биогенеза RPF1, значительно меньший, но похожий эффект наблюдается при нокдауне ESF1. При этом белок SURF6 преимущественно сохраняет свою локализацию в гранулярном компоненте.

При визуальном анализе полученных изображений видно, что клетки различаются по степени перехода NPM1 и SURF6 в нуклеоплазму, что, вероятно, зависит от уровня нокдауна белков RPF1 и ESF1 в каждой клетке. Для количественной оценки наблюдаемых изменений в клеточных популяциях с нокдауном RPF1 и ESF1 относительно контрольной клеточной линии рассчитывали коэффициенты вариации (CV) интенсивностей пикселей NPM1 или SURF6 в ядрышках каждой отдельно взятой клетки (детально методика расчета представлена в разделе 2.2.12 «Материалов и методов»). Получаемые значения CV были нормализованы на среднее значение CV для контрольных клеток и представлены в виде коробчатых диаграмм. Более низкое значение CV указывает на более значимый выход из ядрышка и появление в нуклеоплазме NPM1 или SURF6.

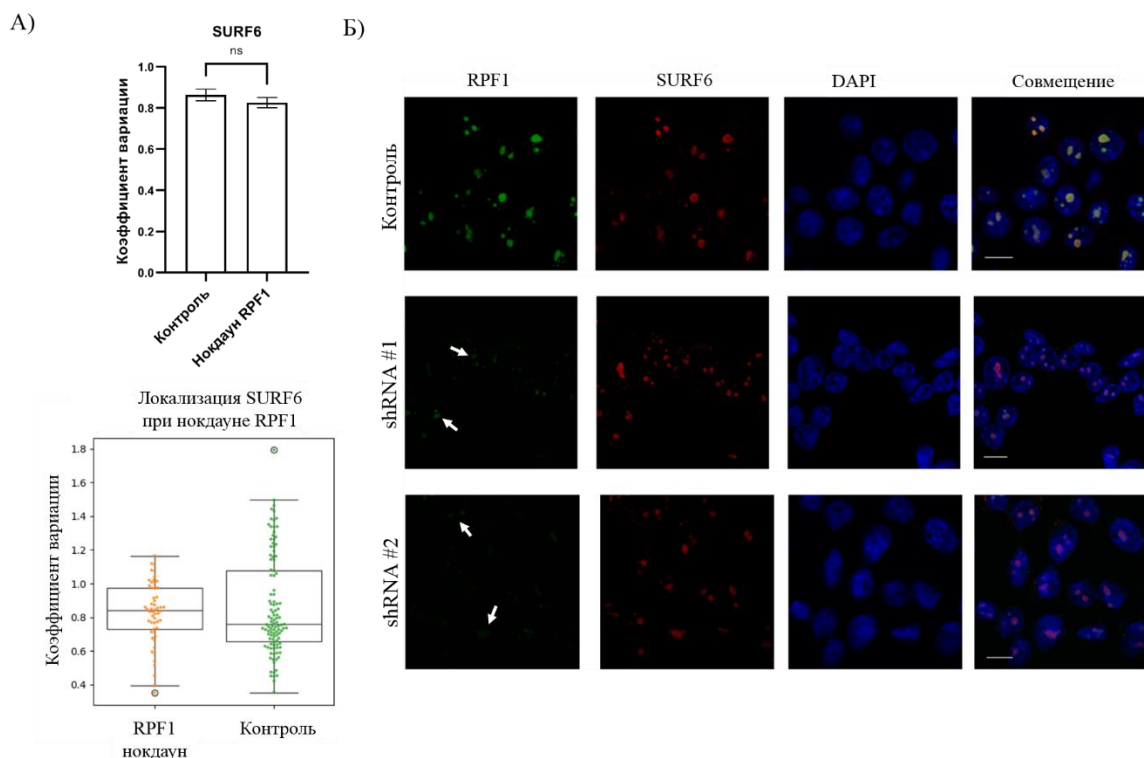
В результате проведенного анализа конфокальных снимков (не менее 56 индивидуальных клеток в каждой группе) было продемонстрировано значительное накопление NPM1 в нуклеоплазме клеток с нокаутом фактора биогенеза RPF1, тогда как для SURF6 такого эффекта не наблюдалось (Рисунок 14а-в, Рисунок 15а, б).



**Рисунок 14.** Переход NPM1 в нуклеоплазму в клетках стабильных клеточных линий, экспрессирующих shRNA против RPF1. а) Коэффициент вариации, характеризующий распределение NPM1 в ядрышках и нуклеоплазме контрольных



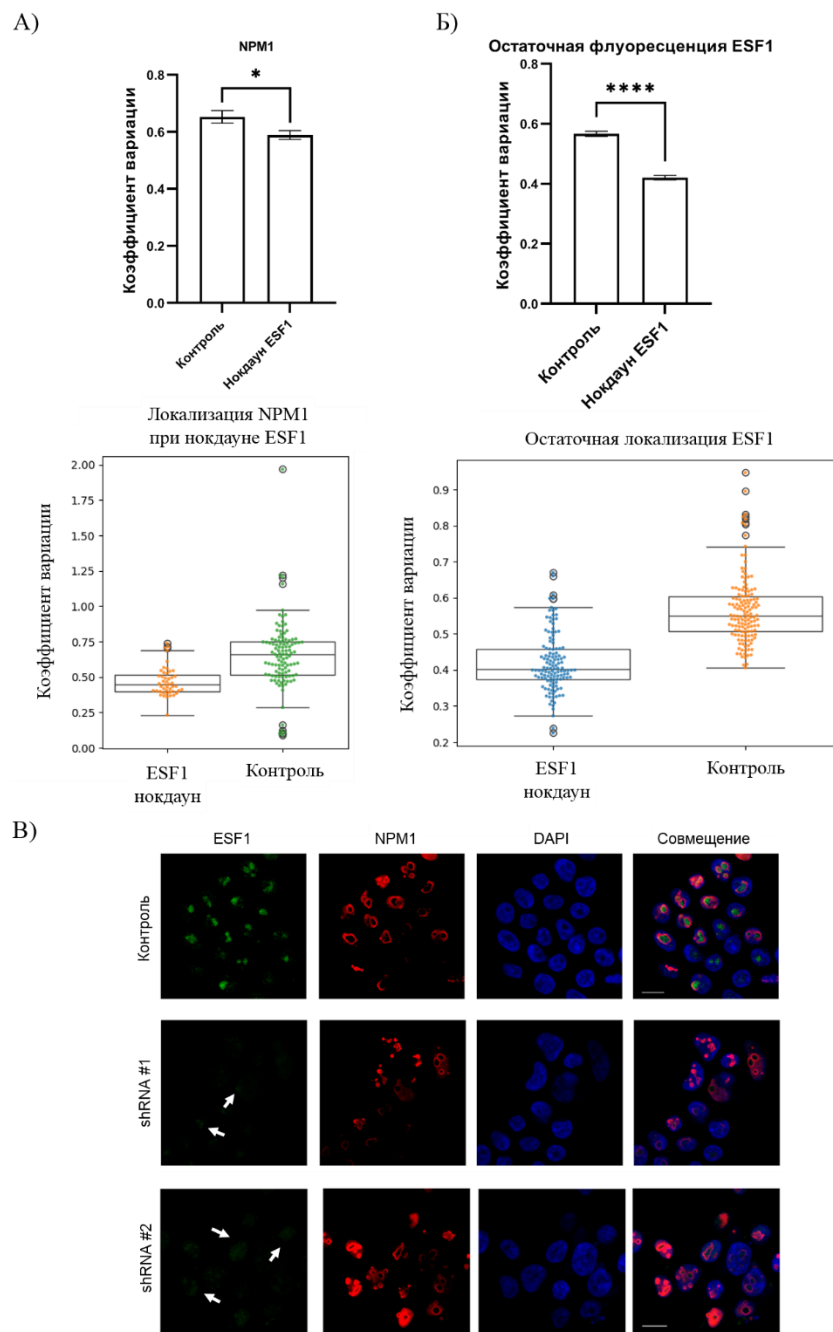
клеток и клеток с нокдауном; б) Коэффициент вариации, характеризующий распределение остаточного сигнала RPF1 в ядрышке и нуклеоплазме в контрольных клетках и в клетках с нокдауном RPF1; в) Конфокальные изображения клеток линии HEK293, стабильно экспрессирующих контрольную shRNA или shRNA против мРНК фактора биогенеза рибосом RPF1 (shRNA#1 и shRNA#2). Клетки выращивали на покровных стеклах, фиксировали, пермеабелизировали и окрашивали антителами против NPM1, RPF1. DAPI использовали для визуализации ядер. Стрелки указывают на видимые сигналы RPF1 в нуклеоплазме.



**Рисунок 15.** Локализация SURF6 в клеточных линиях с shRNA-опосредованным нокдауном RPF1. а) Коэффициент вариации, характеризующий 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). Клетки выращивали на покровных стеклах, фиксировали, пермеабелизировали и окрашивали антителами против NPM1, RPF1. DAPI

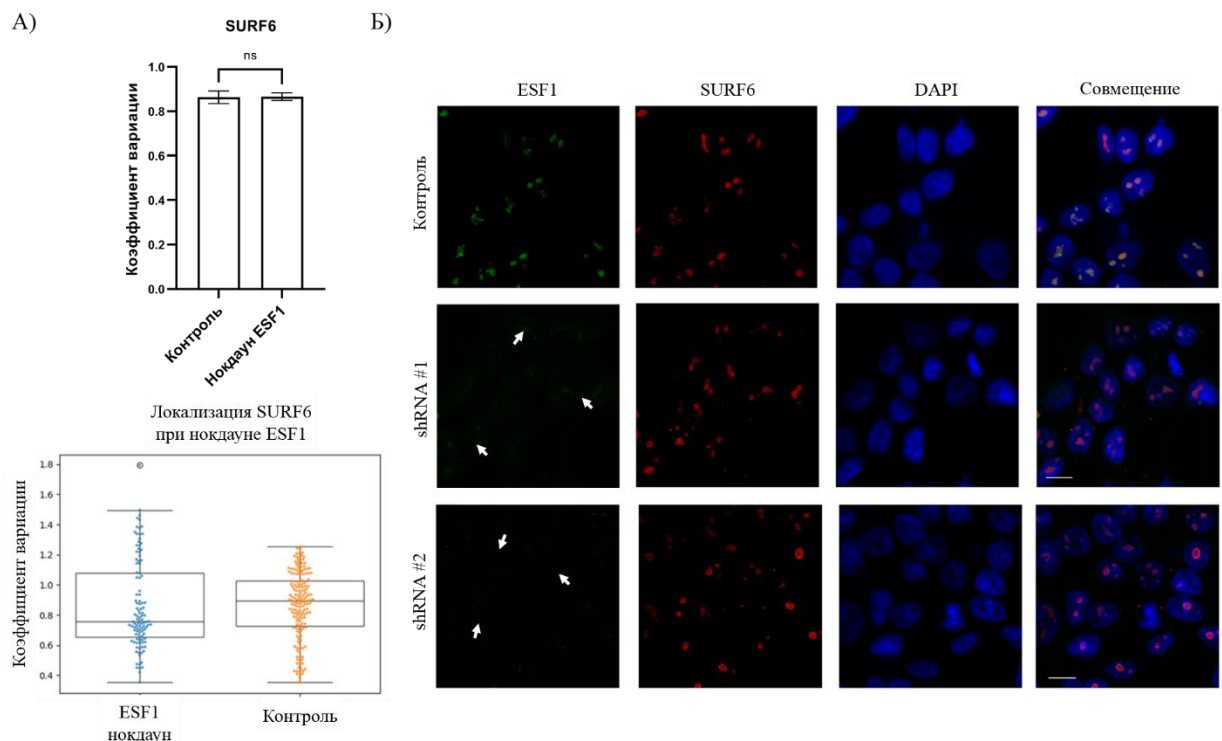
использовался для визуализации ядер. Стрелки указывают на видимые сигналы RPF1 в нуклеоплазме.

В клеточных линиях с нокаутом фактора биогенеза ERF1 наблюдался аналогичный переход NPM1 в нуклеоплазму, хотя и менее выраженный. Белок SURF6 при этом также сохранял свою локализацию в гранулярном компоненте ядрышек (Рисунок 16а-в, Рисунок 17а, б).



**Рисунок 16.** Переход NPM1 в нуклеоплазму в клетках стабильных клеточных линий, экспрессирующих shRNA против ERF1. а) Коэффициент вариации,

характеризующий распределение NPM1 в ядрышках и нуклеоплазме контрольных клеток и клеток с нокдауном; б) Коэффициент вариации, характеризующий распределение остаточного сигнала ESF1 в ядрышке и нуклеоплазме в контрольных клетках и в клетках с нокдауном ESF1; в) Конфокальные изображения клеток линии HEK293, стабильно экспрессирующих контрольную shRNA или shRNA против мРНК фактора биогенеза рибосом ESF1 (shRNA#1 и shRNA#2). Клетки выращивали на покровных стеклах, фиксировали, пермеабилizировали и окрашивали антителами против NPM1, ESF1. DAPI использовался для визуализации ядер. Стрелки указывают на видимые сигналы ESF1 в нуклеоплазме.



**Рисунок 17.** Локализация SURF6 в клеточных линиях с shRNA-опосредованным нокдауном ESF1. а) Коэффициент вариации, характеризующий 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). Клетки выращивали на покровных стеклах, фиксировали, пермеабилizировали и окрашивали антителами против NPM1, ESF1. DAPI использовался для визуализации ядер. Стрелки указывают на видимые сигналы ESF1 в нуклеоплазме.

использовался для визуализации ядер. Стрелки указывают остаточные сигналы белка ERF1 в нуклеоплазме.

Ранее было показано, что SURF6 имеет множество белковых партнеров среди ядрышковых белков, а также взаимодействует с процессирующимися прерибосомными комплексами, что несомненно доказывает его важную роль в организации структуры ядрышка. Вместе с тем, ядрышковая локализация SURF6 при нокдауне RPF1 и ERF1 сохраняется, в то время как NPM1 перемещается в нуклеоплазму. Данные результаты позволяют заключить, что общая морфология ядрышек не нарушается. Одновременно с этим, определенные стадии процессинга пре-рРНК, сопряженные с участием NPM1, могут претерпевать изменения, приводящие к его диссоциации и выходу в нуклеоплазму.

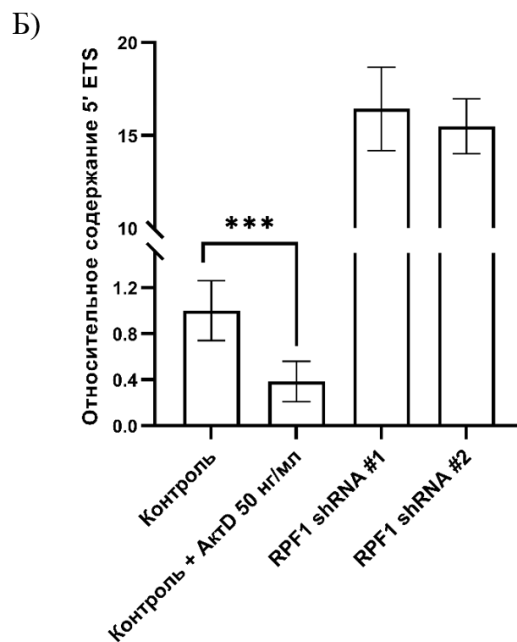
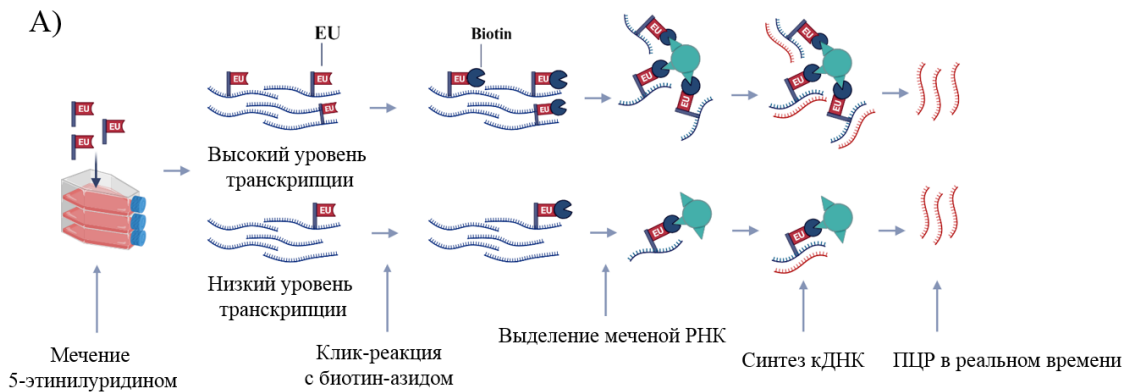
Кроме того, с помощью конфокальной микроскопии было визуализировано изменение внутриклеточной локализации RPF1 или ERF1, часть которых остается в клетках вследствие неполного нокдауна (50% для RPF1 по данным вестерн-блоттинга при стабильном нокдауне). Окрашивание антителами клеток со стабильным нокдауном показало, что остатки RPF1 находятся главным образом в нуклеоплазме (Рисунок 14, 15). Похожий эффект удалось обнаружить и в клетках с нокдауном белка ERF1, остаточные количества которого также присутствуют в основном в нуклеоплазме (Рисунок 16, 17). Для оценки достоверности наблюдаемых изменений был рассчитан коэффициент вариации, сильное уменьшение которого при нокдауне RPF1 и ERF1 подтверждает статистически достоверное изменение локализации данных факторов биогенеза рибосом с ядрышковой на нуклеоплазматическую.

Описываемые наблюдения позволяют предположить, что нокдаун, а также вызванное им изменение ядрышковой локализации остаточных RPF1 и ERF1 на ядерную, вероятно, будут влиять на биогенез рибосом, если принимать во внимание функции их дрожжевых гомологов.

### **3.2. Нокдаун белка RPF1 увеличивает содержание 5'ETS-содержащих предшественников**

NPM1 является наиболее распространенным ядрышковым белком, выполняющим множество функций. Он перемещается между ядрышком и нуклеоплазмой, а в некоторых случаях может покидать ядро и проникать в цитоплазму. Более того, NPM1 может играть роль шаперона гистонов в ядрышке и способствовать поддержанию динамики хроматина рибосомной ДНК. Как видно из рисунка 14, нокдаун RPF1 приводит к выраженному переходу NPM1 в нуклеоплазму, что, возможно, негативно влияет на транскрипцию РНК полимеразой I. Чтобы оценить возможные изменения активности РНК полимеразы I, вызванные нокдауном интересующих нас белков, проводили мечение РНК стабильных клеточных линий, синтезирующих контрольную shRNA и shRNA против мРНК RPF1, с помощью этинилуридина с последующим выделением тотальной клеточной РНК и ее клик-биотинилированием. В качестве положительного контроля были использованы клетки линии HEK293, которые инкубировали в течение 1 часа в среде, содержащей актиномицин D в рабочей концентрации 50 нг/мл. Низкие дозы актиномицина D (12,5-75 нг/мл [204]) позволяют снижать активность РНК полимеразы I с эффективностью до 95%. Полученные результаты демонстрируют достоверное снижение содержания раннего 5'ETS предшественника ~ в 5 раз в клетках, обработанных актиномицином D, относительно контроля (Рисунок 18б). Полученные результаты нормировали на содержание мРНК актина, содержание которой не изменялось под действием актиномицина D. Последовательности рибосомной ДНК являются наиболее транскрибируемыми участками генома, вследствие чего рибосомные РНК имеют высокую представленность внутри клеток, и в них как правило происходит наиболее активное встраивание этинилуридина. Выделение молекул РНК, меченых биотином, с использованием магнитных частиц, покрытых стрептавидином, позволило обогатить образцы преимущественно по рибосомной РНК. Активность РНК полимеразы I наиболее целесообразно оценивать по содержанию раннего рРНК предшественника, содержащего непротранскрибированный 5'ETS спейсер (схема

представлена на рисунке 18а). Для этого была синтезирована кДНК с магнитных частиц, содержащих иммобилизованную меченую РНК, а также подобраны праймеры для ПЦР в реальном времени, охватывающие близкую к 5' концу область 5'ETS. Полученные данные демонстрируют, что содержание раннего непроцессированного короткоживущего предшественника 5'ETS значительно повышено в клетках с нокаутом RPF1 (Рисунок 18б).



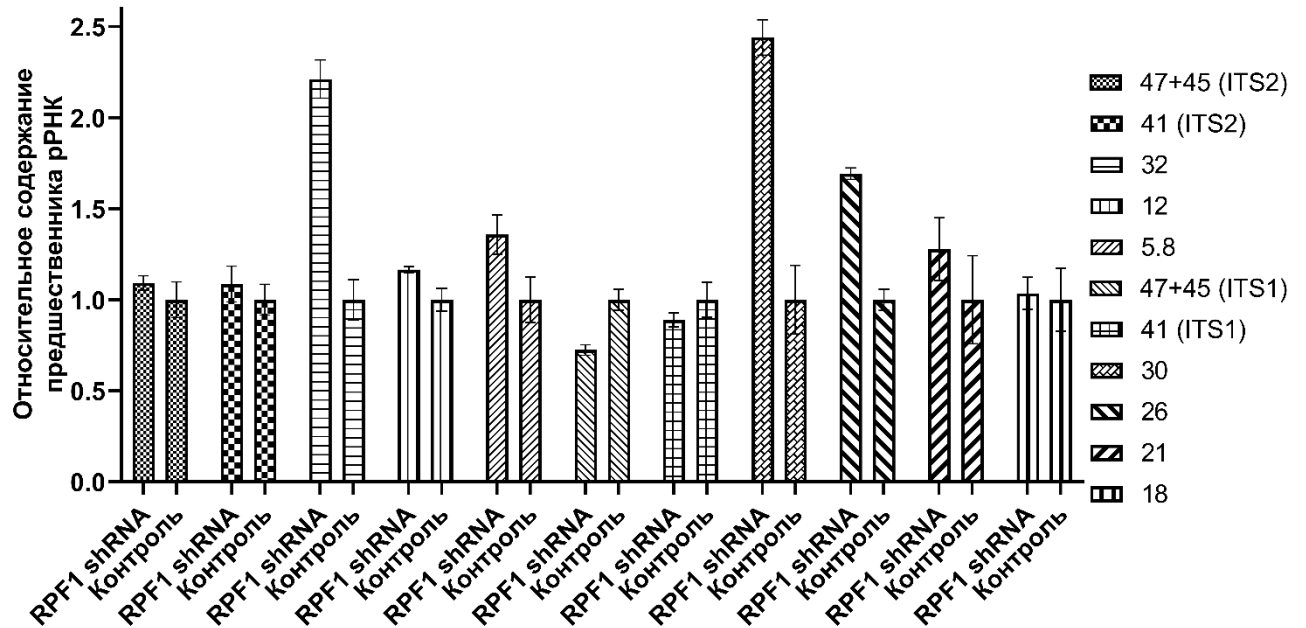
**Рисунок 18.** Мечение стабильных клеточных линий, экспрессирующих контрольную shRNA или shRNA против мРНК RPF1 (shRNA#1 и shRNA#2), с помощью этилиуридина. а) Схема эксперимента. б) Данные ПЦР в реальном времени, характеризующие содержание 5'ETS пре-рРНК в стабильных клеточных линиях, экспрессирующих shRNA против RPF1 (shRNA#1 и shRNA#2) и контрольную shRNA. Обработку актиномицином D (рабочая концентрация 50

нг/мл) использовали для ингибирования РНК полимеразы I. Показаны средние значения трех независимых экспериментов. Звездочки обозначают статистически значимые различия между контролем и клетками, обработанными актиномицином D в концентрации 50 нг/мл (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

### **3.3. Нокдаун RPF1 преимущественно приводит к изменению профиля пре-рРНК в биогенезе 60S субъединицы**

Как упоминалось выше, структурные и протеомные характеристики ядрышка высших эукариот предполагают существование дополнительных стадий созревания предшественников рибосомных субчастиц, а также неизвестных в настоящее время функций человеческих гомологов дрожжевых белков. Чтобы оценить функциональную роль RPF1 в биогенезе рибосом человека, был проведен нозерн-блоттинг и RAMP-анализ (Ratio Analysis of Multiple Precursors) образцов тотальной РНК, полученных из стабильных клеточных линий, экспрессирующих контрольную shRNA или shRNA против мРНК RPF1.

Был проведен анализ интенсивностей оцифрованных сигналов, полученных в ходе гибридизации иммобилизованной на мембране РНК с зондами ITS1/ITS2 и нормализованных на сигнал внутреннего контроля РНК 7SK. При нокдауне RPF1 наблюдалось небольшое снижение содержания первичного 45S/47S пре-рРНК транскрипта, что можно было обнаружить путем гибридизации со специфичным для ITS1 зондом (Рисунок 19). Также было отмечено выраженное накопление 32S, 30S и 26S пре-рРНК (Рисунок 19).



**Рисунок 19.** Изменения количества предшественников пре-рРНК в стабильных клеточных линиях с нокдауном RPF1 по сравнению с контрольными клетками. Показаны средние значения трех независимых экспериментов.

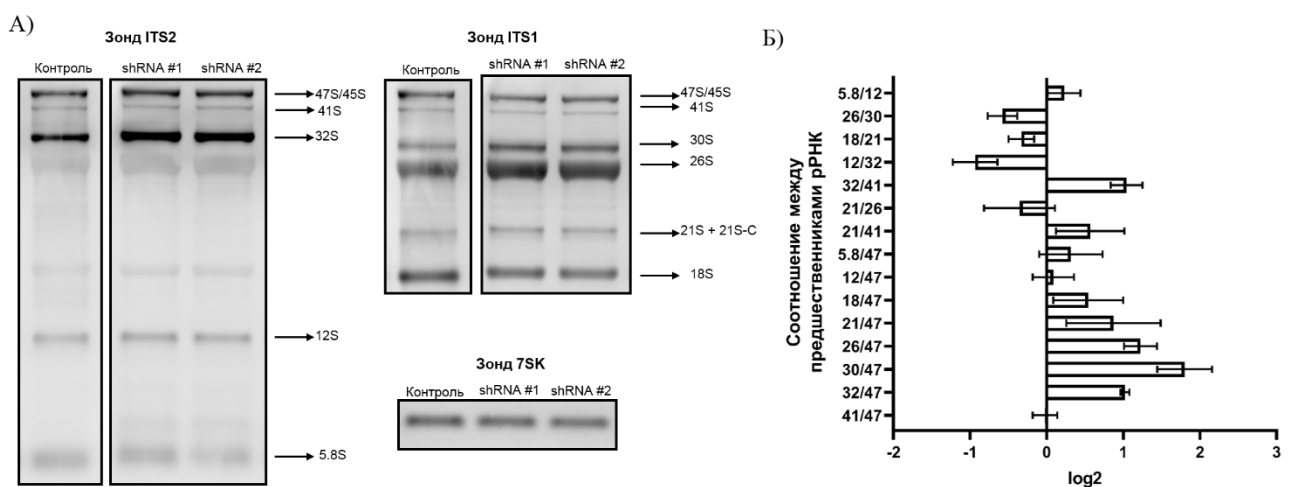
Ввиду того, что процессинг пре-рРНК представляет собой серию нелинейных последовательных событий, наблюдаемые изменения стационарных уровней пре-рРНК могут являться результатом нескольких молекулярных событий, происходящих на разных стадиях биогенеза. Конкретизация молекулярных событий, приводящих к 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 [93]. Такой анализ позволяет с высокой точностью определить, нарушения какой стадии процессинга приводят к изменению уровня конкретной пре-рРНК.

В ходе работы образцы тотальной РНК из контрольных клеток и из клеток с shRNA-опосредованным нокдауном RPF1 разделяли в денатурирующем агарозном геле, иммобилизовали на мембране, после чего детектировали сигналы молекул



пре-рРНК с помощью биотинилированных зондов, комплементарных участкам ITS1 или ITS2. В качестве контроля использовали малую ядерную РНК 7SK, для которой не показано участие в биогенезе рибосом.

В результате обнаружено, что нокдаун RPF1 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 20). Изменения уровней 32S/47S, 32S/41S и 12S/32S свидетельствует об ингибировании процессинга предшественника 32S по сайту 4 региона ITS2 (см. рисунок 7; соответствует сайту C2 у дрожжей). Наблюдаемое повышение отношения предшественников 30S и 26S к первичному транскрипту 47S может быть связано с снижением уровня предшественника 47S в клетках с дефицитом RPF1 или с изменениями в процессинге раннего 5'ETS предшественника, увеличение содержания которого было продемонстрировано ранее.

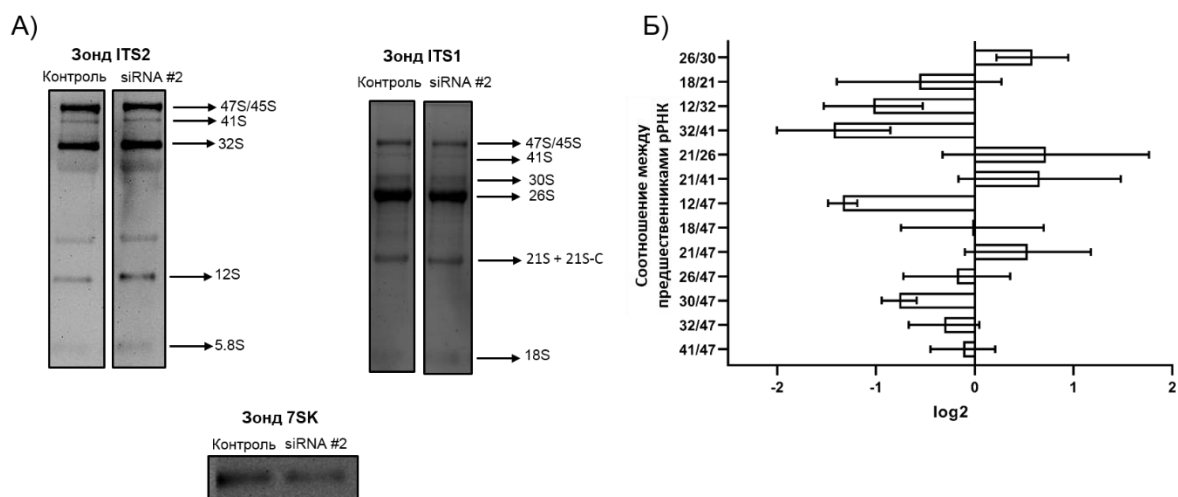


**Рисунок 20.** Изменение процессинга пре-рРНК в стабильных клеточных линиях, экспрессирующих shRNA против мРНК RPF1. а) Нозерн-блоттинг образцов тотально РНК из контрольных клеток и клеток с нокдауном RPF1. Гибридизация с биотинилированными зондами ITS1, ITS2 и 7SK. Показан один репрезентативный эксперимент из трех. б) Результаты RAMP-анализа нозерн-гибридизации (подробнее см. «Материалы и методы» и основной текст). Графики показывают

нормированные средние значения соотношений между различными предшественниками рРНК.

Нокдаун RPF1 с помощью shRNA, в наших условиях показал эффективность ~ 50%, а опосредованный активностью siRNA – ~ 95%. На основании этих данных было принято решение изучить эффект от нокдауна RPF1 с помощью siRNA на профиль пре-рРНК. Согласно анализу содержания пре-рРНК предшественников, а также результатам RAMP анализа, общий эффект нокдауна RPF1 с помощью siRNA характеризуется менее выраженными фенотипическими изменениями по сравнению с эффектом нокдауна shRNA. Кроме того, наблюдалось снижение уровней 12S/32S, 12S/47S, 32S/41S и 30S/47S, а также небольшое увеличение отношения 26S/30S (Рисунок 21). 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.

Отличия в профиле пре-рРНК предшественников, наблюдаемые под действием siRNA, могут объясняться адаптацией клеток к временному дефициту RPF1, приводящему к активации альтернативных механизмов процессинга рРНК и сборки рибосом. Вероятно, активности siRNA в течении выбранного промежутка времени оказывается недостаточно для отбора клеток с компенсаторными изменениями. Исходя из этого можно предположить, что временный нокдаун, вероятно, выявляет более ранние стадии/эффекты, связанные с недостаточностью RPF1 в НЕК293.

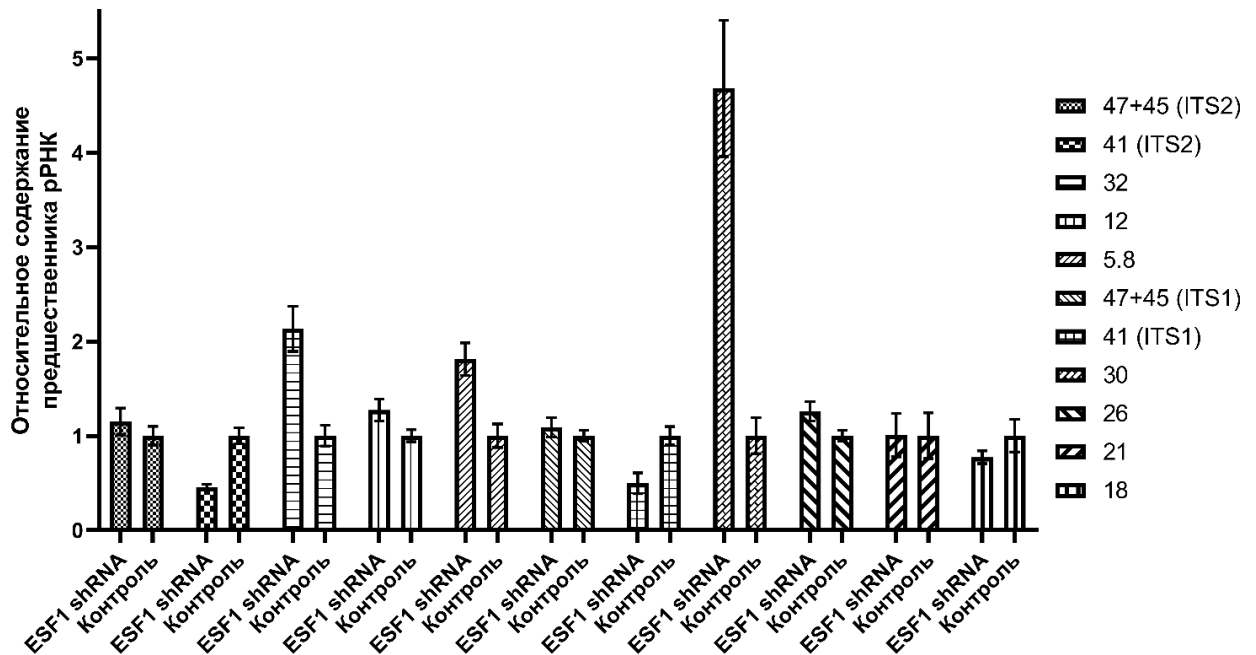


**Рисунок 21.** Изменения процессинга пре-рРНК в НЕК293 с нокдауном RPF1 с помощью siRNA. а) Нозерн блоттинг образцов тотальной РНК из контрольных клеток и клеток с нокдауном RPF1. Гибридизация с биотинилированными зондами ITS1, ITS2 и 7SK. Показан один репрезентативный эксперимент из трех; б) Результаты RAMP-анализа нозерн-гибридизации (подробнее см. раздел 2.2.6 «Материалов и методов» и основной текст). Графики показывают нормированные средние значения соотношений между различными предшественниками рРНК.

### 3.4. Нокдаун ESF1 вызывает изменения в профиле предшественников 18S рРНК и ускорение пути биогенеза 2

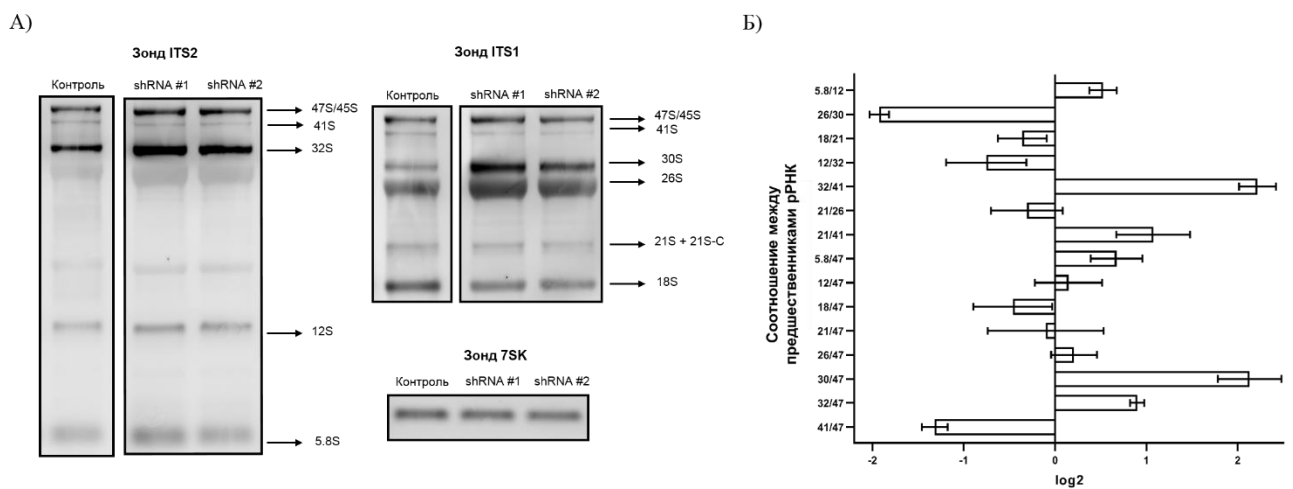
Нокдаун ESF1 демонстрирует двойственный эффект на профиль пре-рРНК, оказывая влияние либо на процессинг предшественников 18S, либо на переключение путей биогенеза.

Анализ изменения профиля пре-рРНК предшественников показал накопление предшественников 32S, 30S рРНК, сохранение уровня 47S рРНК, а также снижение содержания 41S (Рисунок 22).



**Рисунок 22.** Изменение содержания пре-рРНК предшественников в стабильных клеточных линиях с нокдауном ESF1 по сравнению с контрольными клетками. Показаны средние значения трех независимых экспериментов.

Накопление 30S предшественника приводит к увеличению соотношения 30S/47S и уменьшению соотношения 26S/30S (Рисунок 23). В совокупности эти данные убедительно демонстрируют ингибирование расщепления пре-рРНК преимущественно в сайте A0 в пределах 5'ETS (см. рисунок 7, соответствует сайту A0 у дрожжей [19]). В клетках дрожжей *S. cerevisiae* недостаточность функции Esf1 ингибирует процессинг пре-рРНК не только в сайте A0, но и в сайте A2 (соответствует сайту E у человека [95]). 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 (Рисунок 7, рисунок 23). В клетках дикого типа 36S предшественник 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 (Рисунок 23), что может свидетельствовать о незначительном ингибирующем эффекте нокдауна ESF1 на сайт E в клетках человека.



**Рисунок 23.** Изменение процессинга пре-рРНК в стабильных клеточных линиях, экспрессирующих shRNA против мРНК ESF1. а) Нозерн блоттинг образцов тотально РНК из контрольных клеток и клеток с нокдауном ESF1. Гибридизация с

биотинилированными зондами ITS1, ITS2 и 7SK. Показан один репрезентативный эксперимент из трех. б) Результаты RAMP-анализа нозерн-гибридизации (подробнее см. раздел 2.2.6 «Материалов и методов» и основной текст). Графики показывают нормированные средние значения соотношений между различными предшественниками рРНК.

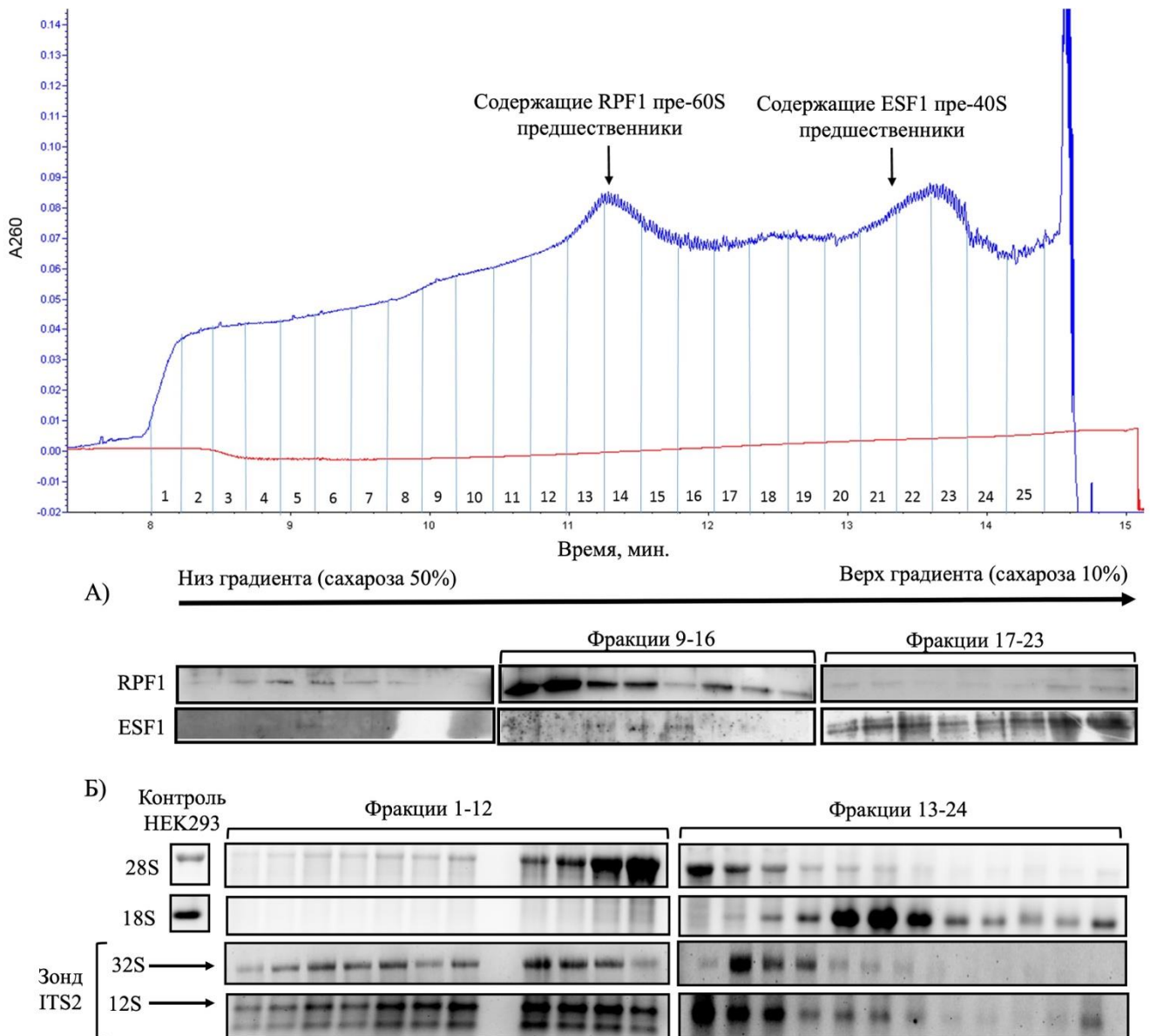
Помимо вышеописанных изменений процессинга пре-рРНК при нокдауне фактора ERF1 RAMP анализ выявил уникальные эффекты, не описанные на моделях биогенеза рибосом у низших эукариот. Согласно полученным результатам, наблюдается увеличение соотношений 32S/47S, 32S/41S и 21S/41S, а также уменьшение соотношения 41S/47S (Рисунок 23). Подобные изменения указывают на ускорение пути процессинга 2, который, вероятно, включает альтернативные стадии, необходимые либо для расщепления в сайте A0, либо для его пропуска для поддержания уровня зрелой 18S рРНК (Рисунок 7).

### **3.5. Факторы биогенеза рибосом RPF1 и ERF1 ко-седиментируют с предшественниками 60S и 40S субъединиц, соответственно**

Теоретически, нокдаун белков RPF1 и ERF1 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 ERF1 непосредственно участвуют в биогенезе рибосом, необходимо продемонстрировать их прямое связывание с прерибосомами 60S и 40S.

В качестве такого эксперимента, подтверждающего нахождение белков RPF1 и ERF1 в составе ранних прерибосомных частиц, мы использовали центрифугирование ядрышковой фракции клеток HEK293 дикого типа в градиенте сахарозы. Для получения ядрышковой фракции сначала выделяли ядра клеток путем гипоосмотического лизиса с последующим центрифугированием лизатов через сахарозную подушку. Выделенные ядра обрабатывали соответствующим буфером (подробности см. раздел 2.2.10 «Материалов и методов»), содержащим

0,1% неионного детергента и ДНКазу I для разрушения ядерной мембраны и отделения геномной ДНК. Полученные образцы, содержащие преимущественно фракцию растворимых и нерастворимых компонентов ядрышка, наносили на линейный градиент сахарозы с последующим ультрацентрифугированием (результатирующий профиль представлен на рисунке 24). С целью характеристики профиля пре-РНК и подтверждения содержания белков RPF1 и ESF1 в конкретных фракциях тотальную 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 24). 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 24). 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 24).



**Рисунок 24.** 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 прерибосом.

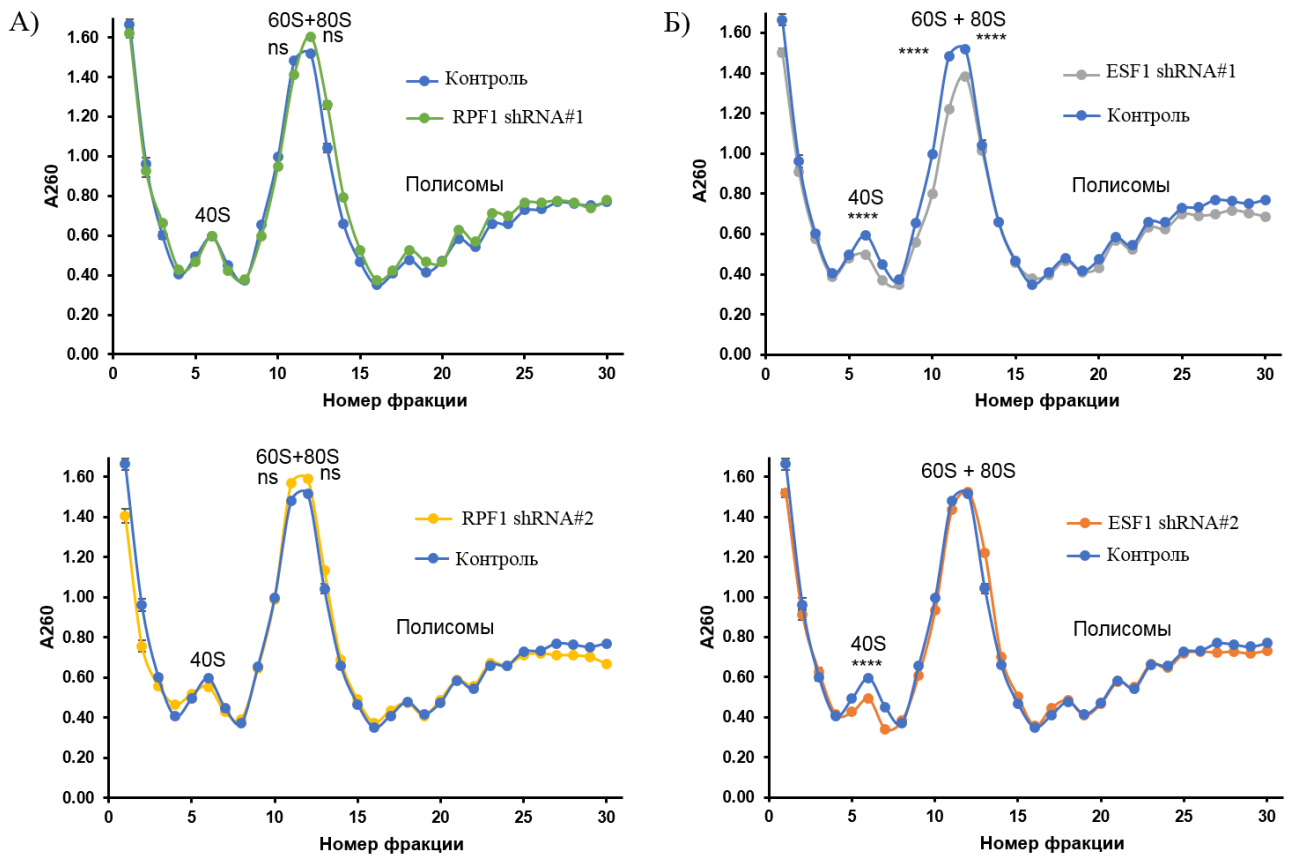
### 3.6. Нокдаун факторов биогенеза рибосом RPF1 и ESF1 не приводит к заметному изменению профиля полисом в клетках

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

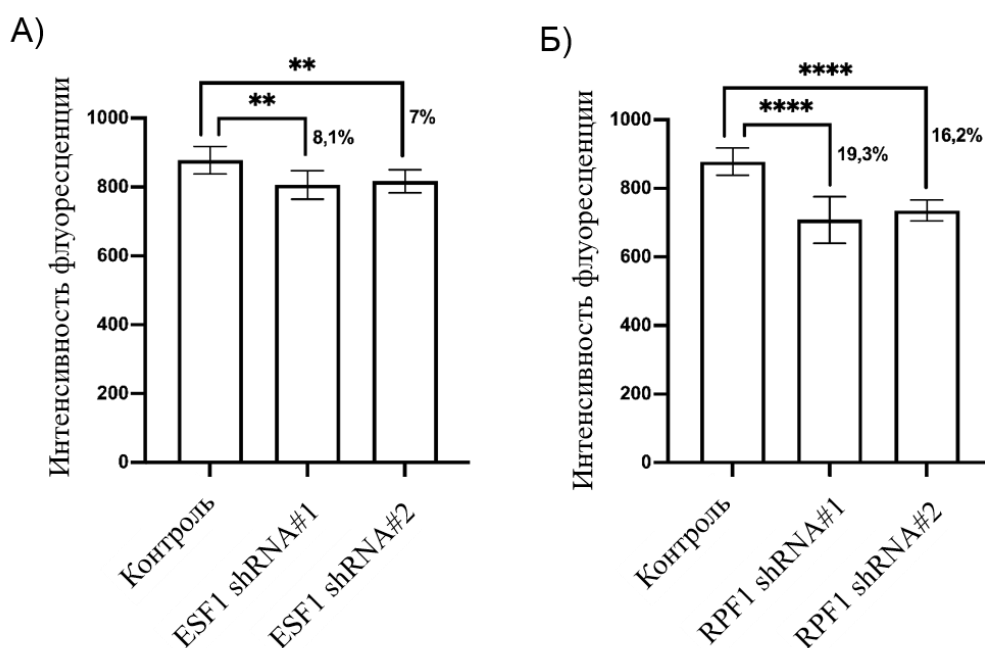
оценки влияния нокдауна факторов биогенеза рибосом RPF1 и ERF1 на профиль полисом с помощью сахарозных градиентов были проанализированы лизаты клеток HEK293, обработанных циклогексимидом (ингибитор стадии элонгации в процессе синтеза белка). Сравнивали профили, получаемые при разделении лизатов контрольных клеток и HEK293 с нокдаунами RPF1 или ERF1.

Согласно полученным результатам, нокдаун RPF1 не приводит к значимому снижению общего содержания 60S-80S рибосомных частиц (Рисунок 25). В свою очередь, в результате нокдауна ERF1 наблюдается заметное снижение содержания 40S рибосомных субъединиц, а активность shRNA#1 приводит к небольшому уменьшению содержания 80S частиц (Рисунок 25). При этом, как в случае нокдауна RPF1, так и в случае нокдауна ERF1 не отмечено глобальных изменений в профиле полисом. Таким образом, полученные данные демонстрируют, что клетки с истощением RPF1 или ERF1, в целом, сохранили трансляционную активность, необходимую для поддержания синтеза белка. Данный вывод подкрепляется результатами оценки метаболической активности клеток с помощью теста AlamarBlue (Рисунок 26). 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 ERF1. 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 25.** Профили полисом из цитоплазматической фракции контрольных клеток НЕК293 и клеток НЕК293 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 26.** 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 нокаутом ESF1 и контрольных клетках, представленные в виде гистограмм. б) Результаты теста AlamarBlue, полученные на клетках с нокаутом 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 нокаутом RPF1/ESF1 (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

### 3.7. Обсуждение результатов

Биогенез рибосом представляет собой высокоорганизованный процесс, требующий участия множества факторов сборки и некодирующих РНК, которые модулируют процессинг пре-рРНК. Переходы между стадиями биогенеза рибосом жестко регулируется вне- и внутриклеточными сигналами для поддержания оптимального режима синтеза белка.

Формирование зрелой 28S рибосомной РНК в процессе биогенеза рибосом у высших эукариот требует двух основных событий. Во-первых, РНКазы MRP

опосредует расщепление 41S или 45S пре-pPHK в сайте 2 (соответствует сайту A3 у *S. cerevisiae*), что приводит к образованию 21S и 32S пре-pPHK в пути 1 и 2, соответственно (Рисунок 7) [205]. Во-вторых, эндонуклеаза LAS1 в составе комплекса риксосомы (NOL9, WDR18, LAS1L, MDN1, PELP1, TEX10 и SENP3) осуществляет расщепление по сайту 4 (соответствует сайту C2 у *S. cerevisiae* [206]). Расщепление по сайту 4 способствует образованию промежуточных продуктов пре-pPHK 12S и 28S в обоих путях биогенеза, что приводит к диссоциации маркеров раннего биогенеза NOG2-NSA2 и созреванию туннеля выхода полипептида [119, 207]. Разрезанию по сайту 4 предшествует формирование благоприятного структурного окружения домена I в формирующейся 28S пре-pPHK [122]. Основные структурные преобразования, необходимые для созревания большой 60S субъединицы начинаются с ранней ядрышковоо частицы, содержащей в своем составе белок SSF1, взаимодействующий с так называемым WDR74-модулем (WDR74-NOP52-RPF1-MAK16; соответствует Nsa1-модулю у *S. cerevisiae*) [120]. Этот комплекс способствует структурному объединению доменов I и II, формирующих будущий туннель выхода полипептида, и образованию стабильного промежуточного ядрышкового «предшественника NSA1». На последующих этапах созревания рекрутируется AAA-АТФаза NLV2 (соответствующая Rix7 у *S. cerevisiae*) и способствует высвобождению модуля WDR74, а также комплекса SSF1-RRP15-SURF6.

За вышеописанными событиями следует ассоциация предшественника 60S субъединицы с факторами формирования домена III и последующим привлечением AAA-АТФазы MDN1 (соответствующей Rea1 у *S. cerevisiae*), которая стимулирует диссоциацию комплекса BOP1-WDR12-DDX18 (соответствует Erb1, Ytm1 и Has1 у *S. cerevisiae* соответственно) и связанных с ним факторов. Эти процессы сопровождаются встраиванием комплекса NOG2 и 5S РНП и образованием позднего ядрышкового предшественника 60S [31, 35, 143]. Частица NOG2 взаимодействует с комплексом риксосомы, обладающим нуклеазной активностью; его диссоциация способствует расщеплению ITS2, ПЭТ и образованию центрального выступа [31, 122, 207].

Как полученные нами функциональные и биохимические данные о изменениях, вызванных нокдауном RPF1, вписываются в эту сложную картину? Несмотря на то, что истощение RPF1 снижает расщепление по сайту 4, этот эффект стоит рассматривать как косвенный. В пользу этой идеи говорит тот факт, что комплекс риксосомы не содержит RPF1. Данные Крио-ЭМ позволяют предположить, что во время расщепления сайта 4 RPF1 уже не связан с предшественником 60S [31]. Вероятно, что дефицит RPF1 приводит к ослаблению взаимодействий доменов I и II, поддерживаемых модулем WRD74, или повышает подвижность промежуточных прерибосомных комплексов. Можно также предположить, что отсутствие RPF1, в итоге, негативно влияет на формирование сайтов связывания риксосомы или эндонуклеазы LAS1 и приводит к снижению эффективности расщепления 32S пре-рРНК в сайте 4 в регионе ITS2. Тем не менее, видимо, степени наблюдаемых нарушений недостаточно для значительного замедления биогенеза рибосом и выраженного снижения пролиферации клеток (что подтверждается результатами анализа AlamarBlue). Похожие эффекты наблюдали и в более ранних работах, выполненных на клетках дрожжей *S. cerevisiae*. Было показано, что пре-60S частицы могут обходить промежуточный механизм контроля качества в ядре, продолжая дальнейшее созревание в цитоплазме, и взаимодействовать с зрелой субъединицей 40S. В результате aberrantные 80S рибосомы обнаруживали во фракции полисом. Эти наблюдения подтверждают наши данные профилирования полисом, которые демонстрируют отсутствие значимых отличий в фракциях 60S/80S и полисом в клетках с дефицитом RPF1, по сравнению с контрольными HEK293. Однако механизмы обхода контроля качества частицами, содержащими ITS2, а также трансляционные характеристики этих аномальных рибосом все еще не изучены [208].

Необходимо отметить, что увеличение 5'ETS в клетках с нокдауном RPF1 под действием shRNA предполагает либо увеличение скорости транскрипции РНК полимеразы I, либо ингибирование расщепления 5'ETS. Согласно литературным данным, выход NPM1 из ядрышка в клетках с нокдауном RPF1, может приводить к снижению метилирования H3K9 на промоторах генов рДНК, что в конечном счете

может привести к увеличению транскрипции рибосомной РНК [209]. Повышенный уровень предшественника 5'ETS в клетках с нокдауном RPF1 может также указывать на участие данного фактора биогенеза в ранних этапах сборки рибосом, а его отсутствие приводит к нарушению регуляции процессинга A0. Это предположение согласуется с данными, полученными на дрожжах, которые показали ко-иммунопреципитацию RPF1 с ранним, содержащим 35S рРНК, предшественником. В конечном итоге, повышенный уровень 5'ETS может быть вызван деметилированием промотора рДНК, снижением процессинга 5'ETS, либо комбинацией этих факторов.

Созревание рРНК 18S в клетках человека характеризуется усложнением стадий ремоделирования и процессинга в нуклеоплазме по сравнению с образованием 18S у дрожжей [122, 210]. Первичный транскрипт 47S человека содержит в 6 раз более длинный участок 5'ETS [32]. Ранние стадии процессинга пре-рРНК человека, по-видимому, начинаются с ассоциации растущего транскрипта с содержащими мякРНК комплексами UTP-A, UTP-B и U3 (аналогичны дрожжевым), необходимыми для стабилизации сегмента 5'ETS, формирования 5'ETS частицы и обеспечивающими благоприятные структурные условия для присоединения других факторов сборки [104]. Модульная сборка 5', центрального, 3'-мажорного и 3'-минорного доменов сегмента рРНК содержащего 18S рРНК начинается только тогда, когда он становится полностью доступным в процессе транскрипции. Правильная организация доменов и ассоциация с собранным комплексом 5'ETS приводит к расщеплению в сайте A0 эндонуклеазой UTP24 как у дрожжей, так и у человека. Следующие стадии ремоделирования происходят за счет связывания новых факторов сборки и формирования процессомы малой субъединицы (SSU процессомы) [102]. Простота организации ядрышка дрожжей по сравнению с ядрышком высших эукариот позволила выделить и описать формирование оптимальной структуры доменов поэтапно с помощью Крио-ЭМ. Эти исследования позволили выявить ряд содержащих 5'ETS структур в разных состояниях [100, 108, 112, 211]. Процесс формирования 5'ETS частицы в клетках человека при этом еще предстоит описать ввиду недостатка

структурных данных [111]. Белок ESF1 и его дрожжевой гомолог Esf1 являются одними из самых ранних факторов процессинга пре-рРНК. Согласно имеющимся данным, они взаимодействуют с 5'-доменом сегмента 18S рРНК при формировании процессомы малой субъединицы [100, 102]. Несмотря на значительный прогресс в структурной характеристике SSU процессомы, 3D-модели дрожжевых частиц не дают никакой информации о 5'-домине 18S с присоединенным белком Esf1 и его партнерами. Ранее было показано, что каждый домен 18S сегмента рРНК формируется как самостоятельная единица, но только присутствие всех доменов в благоприятной пространственной организации приводит к расщеплению сайта A0. Это сопровождается практически немедленной диссоциацией самых ранних факторов и уплотнением предшественника с образованием SSU процессомы [102]. По нашим данным, нокдаун ESF1 приводит к снижению соотношения 41S/47S и 26S/30S, что наглядно демонстрирует снижение эффективности расщепления сайта A0. Снижение эффективности процессинга участка A0 приводит к увеличению соотношений 32S/47S и 30S/47S. Это наблюдение позволяет утверждать, что происходит активация пути 2 биогенеза рибосом, который начинается с расщепления сайта 2 вместо A0. В клетках с нокдауном ESF1 также выявлено снижение соотношения 26S/30S, однако уровень зрелой 18S рРНК значимо не изменяется. Это означает, что при дефиците ESF1 расщепление сайта A0, скорее всего, либо не происходит при процессинге рРНК по пути 2, либо происходит независимо от ESF1.

В совокупности с данными, полученными ранее нашей исследовательской группой [203], эти результаты показывают, что клетки человека чрезвычайно эффективно используют пути биогенеза рибосом для поддержания общего уровня синтеза белка. Нокдаун факторов сборки рибосом, особенно тех, которые выполняют вспомогательные/структурные функции и не участвуют непосредственно в актах расщепления, не приводит к резкому падению эффективности созревания рибосомных субъединиц, а скорее подстраивает процесс биогенеза под новые условия. Эти предположения косвенно подтверждаются нашими данными профилирования полисом. Наконец, следует

отметить, что для нашего исследования мы использовали трансформированные клетки, которые, вероятно, обладают измененными механизмами контроля, что может привести к увеличению пластичности и ослаблению контроля биогенеза рибосом на стадии ядрышка.

## Выводы

1. Клетки HEK293 с нокдауном факторов биогенеза рибосом человека RPF1 и ERF1 обладают пониженной жизнеспособностью по сравнению с контрольными клетками.
2. Морфология клеток и архитектура ядрышка при нокдауне белков RPF1 и ERF1 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 прерибосомной РНК, 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.



## Список литературы

1. Weisser M., Ban N. Extensions, Extra Factors, and Extreme Complexity: Ribosomal Structures Provide Insights into Eukaryotic Translation // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. — 2019. — Vol. 11. — Extensions, Extra Factors, and Extreme Complexity. — No. 9. — P. a032367.
2. Melnikov S., Ben-Shem A., Garreau De Loubresse N., Jenner L., Yusupova G., Yusupov M. One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes // Nature Structural & Molecular Biology. — 2012. — Vol. 19. — One core, two shells. — No. 6. — P. 560-567.
3. Genuth N.R., Barna M. The Discovery of Ribosome Heterogeneity and Its Implications for Gene Regulation and Organismal Life // Molecular Cell. — 2018. — Vol. 71. — No. 3. — P. 364-374.
4. Ban N., Nissen P., Hansen J., Moore P.B., Steitz T.A. The Complete Atomic Structure of the Large Ribosomal Subunit at 2.4 Å Resolution // Science. — 2000. — Vol. 289. — No. 5481. — P. 905-920.
5. Jenner L., Melnikov S., De Loubresse N.G., Ben-Shem A., Iskakova M., Urzhumtsev A., Meskauskas A., Dinman J., Yusupova G., Yusupov M. Crystal structure of the 80S yeast ribosome // Current Opinion in Structural Biology. — 2012. — Vol. 22. — No. 6. — P. 759-767.
6. Klinge S., Voigts-Hoffmann F., Leibundgut M., Arpagaus S., Ban N. Crystal Structure of the Eukaryotic 60 S Ribosomal Subunit in Complex with Initiation Factor 6 // Science. — 2011. — Vol. 334. — No. 6058. — P. 941-948.
7. Laptev I., Shvetsova E., Levitskii S., Serebryakova M., Rubtsova M., Zgoda V., Bogdanov A., Kamenski P., Sergiev P., Dontsova O. METTL15 interacts with the assembly intermediate of murine mitochondrial small ribosomal subunit to form m4C840 12S rRNA residue // Nucleic Acids Research. — 2020. — Vol. 48. — No. 14. — P. 8022-8034.
8. Hernandez-Verdun D. Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle // Nucleus. — 2011. — Vol. 2. — No. 3. — P. 189-194.
9. Weeks S.E., Metge B.J., Samant R.S. The nucleolus: a central response hub for the stressors that drive cancer progression // Cellular and Molecular Life Sciences. — 2019. — Vol. 76. — The nucleolus. — No. 22. — P. 4511-4524.
10. Lindström M.S., Jurada D., Bursac S., Orsolich I., Bartek J., Volarevic S. Nucleolus as an emerging hub in maintenance of genome stability and cancer pathogenesis // Oncogene. — 2018. — Vol. 37. — No. 18. — P. 2351-2366.

11. Hernandez-Verdun D., Roussel P., Thiry M., Sirri V., Lafontaine D.L.J. The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism // *WIREs RNA*. — 2010. — Vol. 1. — No. 3. — P. 415-431.
12. Olson M.O.J., ed. *The Nucleolus*. — New York, NY: Springer New York, 2011.
13. Dörner K., Ruggeri C., Zemp I., Kutay U. Ribosome biogenesis factors—from names to functions // *The EMBO Journal*. — 2023. — Vol. 42. — No. 7. — P. e112699.
14. Daiß J.L., Griesenbeck J., Tschochner H., Engel C. Synthesis of the ribosomal RNA precursor in human cells: mechanisms, factors and regulation // *Biological Chemistry*. — 2023. — Vol. 404. — No. 11-12. — P. 1003-1023.
15. Salim D., Gerton J.L. Ribosomal DNA instability and genome adaptability // *Chromosome Research*. — 2019. — Vol. 27. — No. 1-2. — P. 73-87.
16. Stults D.M., Killen M.W., Pierce H.H., Pierce A.J. Genomic architecture and inheritance of human ribosomal RNA gene clusters // *Genome Research*. — 2008. — Vol. 18. — No. 1. — P. 13-18.
17. Gibbons J.G., Branco A.T., Godinho S.A., Yu S., Lemos B. Concerted copy number variation balances ribosomal DNA dosage in human and mouse genomes // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2015. — Vol. 112. — No. 8. — P. 2485-2490.
18. Smirnov E., Chmúrčiaková N., Liška F., Bažantová P., Cmarko D. Variability of Human rDNA // *Cells*. — 2021. — Vol. 10. — No. 2. — P. 196.
19. Mullineux S.-T., Lafontaine D.L.J. Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: Where do we stand? // *Biochimie*. — 2012. — Vol. 94. — No. 7. — P. 1521-1532.
20. Potapova T.A., Gerton J.L. Ribosomal DNA and the nucleolus in the context of genome organization // *Chromosome Research*. — 2019. — Vol. 27. — No. 1-2. — P. 109-127.
21. Mayer C., Schmitz K.-M., Li J., Grummt I., Santoro R. Intergenic Transcripts Regulate the Epigenetic State of rRNA Genes // *Molecular Cell*. — 2006. — Vol. 22. — No. 3. — P. 351-361.
22. McKeown P. Mechanisms of rDNA silencing and the Nucleolar Remodelling Complex (NoRC) // *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. — 2014. — № 10.
23. Herdman C., Mars J.-C., Stefanovsky V.Y., Tremblay M.G., Sabourin-Felix M., Lindsay H., Robinson M.D., Moss T. A unique enhancer boundary complex on the mouse ribosomal RNA genes persists after loss of Rrn3 or UBF and the inactivation of RNA

- polymerase I transcription // PLOS Genetics. — 2017. — Vol. 13. — No. 7. — P. e1006899.
24. Sørensen P.D., Frederiksen S. Characterization of human 5S rRNA genes // Nucleic Acids Research. — 1991. — Vol. 19. — No. 15. — P. 4147-4151.
25. Andersen J.S., Lyon C.E., Fox A.H., Leung A.K.L., Lam Y.W., Steen H., Mann M., Lamond A.I. Directed Proteomic Analysis of the Human Nucleolus // Current Biology. — 2002. — Vol. 12. — No. 1. — P. 1-11.
26. Scherl A., Couté Y., Déon C., Callé A., Kindbeiter K., Sanchez J.-C., Greco A., Hochstrasser D., Diaz J.-J. Functional Proteomic Analysis of Human Nucleolus // Molecular Biology of the Cell. — 2002. — Vol. 13. — No. 11. — P. 4100-4109.
27. Wild T., Horvath P., Wyler E., Widmann B., Badertscher L., Zemp I., Kozak K., Csucs G., Lund E., Kutay U. A Protein Inventory of Human Ribosome Biogenesis Reveals an Essential Function of Exportin 5 in 60S Subunit Export // PLoS Biology. — 2010. — Vol. 8. — No. 10. — P. e1000522.
28. Tafforeau L., Zorbas C., Langhendries J.-L., Mullineux S.-T., Stamatopoulou V., Mullier R., Wacheul L., Lafontaine D.L.J. The Complexity of Human Ribosome Biogenesis Revealed by Systematic Nucleolar Screening of Pre-rRNA Processing Factors // Molecular Cell. — 2013. — Vol. 51. — No. 4. — P. 539-551.
29. Badertscher L., Wild T., Montellese C., Alexander L.T., Bammert L., Sarazova M., Stebler M., Csucs G., Mayer T.U., Zamboni N., Zemp I., Horvath P., Kutay U. Genome-wide RNAi Screening Identifies Protein Modules Required for 40S Subunit Synthesis in Human Cells // Cell Reports. — 2015. — Vol. 13. — No. 12. — P. 2879-2891.
30. Farley-Barnes K.I., McCann K.L., Ogawa L.M., Merkel J., Surovtseva Y.V., Baserga S.J. Diverse Regulators of Human Ribosome Biogenesis Discovered by Changes in Nucleolar Number // Cell Reports. — 2018. — Vol. 22. — No. 7. — P. 1923-1934.
31. Vanden Broeck A., Klinge S. Principles of human pre-60 S biogenesis // Science. — 2023. — Vol. 381. — No. 6653. — P. eadh3892.
32. Singh S., Vanden Broeck A., Miller L., Chaker-Margot M., Klinge S. Nucleolar maturation of the human small subunit processome // Science. — 2021. — Vol. 373. — No. 6560. — P. eabj5338.
33. Vanden Broeck A., Klinge S. Eukaryotic Ribosome Assembly // Annual Review of Biochemistry. — 2024.
34. Bohnsack K.E., Bohnsack M.T. Uncovering the assembly pathway of human ribosomes and its emerging links to disease // The EMBO Journal. — 2019. — Vol. 38. — No. 13. — P. e100278.

35. Kressler D., Hurt E., Bergler H., Baßler J. The power of AAA-ATPases on the road of pre-60S ribosome maturation — Molecular machines that strip pre-ribosomal particles // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. — 2012. — Vol. 1823. — No. 1. — P. 92-100.
36. Her J., Chung I.K. The AAA-ATPase NVL2 is a telomerase component essential for holoenzyme assembly // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 2012. — Vol. 417. — No. 3. — P. 1086-1092.
37. Yoshikatsu Y., Ishida Y., Sudo H., Yuasa K., Tsuji A., Nagahama M. NVL2, a nucleolar AAA-ATPase, is associated with the nuclear exosome and is involved in pre-rRNA processing // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 2015. — Vol. 464. — No. 3. — P. 780-786.
38. Martin R., Straub A.U., Doebele C., Bohnsack M.T. DExD/H-box RNA helicases in ribosome biogenesis // *RNA Biology*. — 2013. — Vol. 10. — No. 1. — P. 4-18.
39. Choudhury P., Hackert P., Memet I., Sloan K.E., Bohnsack M.T. The human RNA helicase DHX37 is required for release of the U3 snoRNP from pre-ribosomal particles // *RNA Biology*. — 2019. — Vol. 16. — No. 1. — P. 54-68.
40. Srivastava L., Lapik Y.R., Wang M., Pestov D.G. Mammalian DEAD Box Protein Ddx51 Acts in 3' End Maturation of 28S rRNA by Promoting the Release of U8 snoRNA // *Molecular and Cellular Biology*. — 2010. — Vol. 30. — No. 12. — P. 2947-2956.
41. Sloan K.E., Leisegang M.S., Doebele C., Ramírez A.S., Simm S., Saffertal C., Kretschmer J., Schorge T., Markoutsas S., Haag S., Karas M., Ebersberger I., Schleiff E., Watkins N.J., Bohnsack M.T. The association of late-acting snoRNPs with human pre-ribosomal complexes requires the RNA helicase DDX21 // *Nucleic Acids Research*. — 2015. — Vol. 43. — No. 1. — P. 553-564.
42. Kellner M., Rohrmoser M., Forné I., Voss K., Burger K., Mühl B., Gruber-Eber A., Kremmer E., Imhof A., Eick D. DEAD-box helicase DDX27 regulates 3' end formation of ribosomal 47S RNA and stably associates with the PeBoW-complex // *Experimental Cell Research*. — 2015. — Vol. 334. — No. 1. — P. 146-159.
43. Bohnsack M.T., Martin R., Granneman S., Ruprecht M., Schleiff E., Tollervey D. Prp43 Bound at Different Sites on the Pre-rRNA Performs Distinct Functions in Ribosome Synthesis // *Molecular Cell*. — 2009. — Vol. 36. — No. 4. — P. 583-592.
44. Pertschy B., Schneider C., Gnädig M., Schäfer T., Tollervey D., Hurt E. RNA Helicase Prp43 and Its Co-factor Pfa1 Promote 20 to 18 S rRNA Processing Catalyzed by the Endonuclease Nob1 // *Journal of Biological Chemistry*. — 2009. — Vol. 284. — No. 50. — P. 35079-35091.
45. Memet I., Doebele C., Sloan K.E., Bohnsack M.T. The G-patch protein NF- $\kappa$ B-repressing factor mediates the recruitment of the exonuclease XRN2 and activation of the

RNA helicase DHX15 in human ribosome biogenesis // *Nucleic Acids Research*. — 2017. — P. gkx013.

46. Wandrey F., Montellese C., Koos K., Badertscher L., Bammert L., Cook A.G., Zemp I., Horvath P., Kutay U. The NF45/NF90 Heterodimer Contributes to the Biogenesis of 60S Ribosomal Subunits and Influences Nucleolar Morphology // *Molecular and Cellular Biology*. — 2015. — Vol. 35. — No. 20. — P. 3491-3503.

47. Miller O.L., Beatty B.R. Visualization of Nucleolar Genes // *Science*. — 1969. — Vol. 164. — No. 3882. — P. 955-957.

48. Miller O.L., Bakken A.H. MORPHOLOGICAL STUDIES OF TRANSCRIPTION // *Acta Endocrinologica*. — 1972. — T. 71. — № 2\_Suppla. — C. S155-S177.

49. Jantzen H.-M., Admon A., Bell S.P., Tjian R. Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins // *Nature*. — 1990. — Vol. 344. — No. 6269. — P. 830-836.

50. McStay B., Frazier M.W., Reeder R.H. xUBF contains a novel dimerization domain essential for RNA polymerase I transcription. // *Genes & Development*. — 1991. — Vol. 5. — No. 11. — P. 1957-1968.

51. Hamdane N., Stefanovsky V.Y., Tremblay M.G., Németh A., Paquet E., Lessard F., Sanij E., Hannan R., Moss T. Conditional Inactivation of Upstream Binding Factor Reveals Its Epigenetic Functions and the Existence of a Somatic Nucleolar Precursor Body // *PLoS Genetics*. — 2014. — Vol. 10. — No. 8. — P. e1004505.

52. Tremblay M.G., Sibai D.S., Valère M., Mars J.-C., Lessard F., Hori R.T., Khan M.M., Stefanovsky V.Y., LeDoux M.S., Moss T. Ribosomal DNA promoter recognition is determined in vivo by cooperation between UBTF1 and SL1 and is compromised in the UBTF-E210K neuroregression syndrome // *PLOS Genetics*. — 2022. — Vol. 18. — No. 2. — P. e1009644.

53. Grob A., Colleran C., McStay B. Construction of synthetic nucleoli in human cells reveals how a major functional nuclear domain is formed and propagated through cell division // *Genes & Development*. — 2014. — Vol. 28. — No. 3. — P. 220-230.

54. Grob A., McStay B. Construction of synthetic nucleoli and what it tells us about propagation of sub-nuclear domains through cell division // *Cell Cycle*. — 2014. — Vol. 13. — No. 16. — P. 2501-2508.

55. Mars J.-C., Sabourin-Felix M., Tremblay M.G., Moss T. A Deconvolution Protocol for ChIP-Seq Reveals Analogous Enhancer Structures on the Mouse and Human Ribosomal RNA Genes // *G3 Genes|Genomes|Genetics*. — 2018. — Vol. 8. — No. 1. — P. 303-314.

56. Uusküla-Reimand L., Hou H., Samavarchi-Tehrani P., Rudan M.V., Liang M., Medina-Rivera A., Mohammed H., Schmidt D., Schwalie P., Young E.J., Reimand J., Hadjur S., Gingras A.-C., Wilson M.D. Topoisomerase II beta interacts with cohesin and CTCF at topological domain borders // *Genome Biology*. — 2016. — Vol. 17. — No. 1. — P. 182.
57. Phillips J.E., Corces V.G. CTCF: Master Weaver of the Genome // *Cell*. — 2009. — Vol. 137. — CTCF. — No. 7. — P. 1194-1211.
58. Huang K., Jia J., Wu C., Yao M., Li M., Jin J., Jiang C., Cai Y., Pei D., Pan G., Yao H. Ribosomal RNA Gene Transcription Mediated by the Master Genome Regulator Protein CCCTC-binding Factor (CTCF) Is Negatively Regulated by the Condensin Complex // *Journal of Biological Chemistry*. — 2013. — Vol. 288. — No. 36. — P. 26067-26077.
59. Van De Nobelen S., Rosa-Garrido M., Leers J., Heath H., Soochit W., Joosen L., Jonkers I., Demmers J., Van Der Reijden M., Torrano V., Grosveld F., Delgado M.D., Renkawitz R., Galjart N., Sleutels F. CTCF regulates the local epigenetic state of ribosomal DNA repeats // *Epigenetics & Chromatin*. — 2010. — Vol. 3. — No. 1. — P. 19.
60. Garg L.C., DiAngelo S., Jacob S.T. Role of DNA topoisomerase I in the transcription of supercoiled rRNA gene. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1987. — Vol. 84. — No. 10. — P. 3185-3188.
61. Rose K.M., Szopa J., Han F.-S., Cheng Y.-C., Richter A., Scheer U. Association of DNA topoisomerase I and RNA polymerase I: a possible role for topoisomerase I in ribosomal gene transcription // *Chromosoma*. — 1988. — Vol. 96. — No. 6. — P. 411-416.
62. Zhang H., Wang J.C., Liu L.F. Involvement of DNA topoisomerase I in transcription of human ribosomal RNA genes. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1988. — Vol. 85. — No. 4. — P. 1060-1064.
63. Ray S., Panova T., Miller G., Volkov A., Porter A.C.G., Russell J., Panov K.I., Zomerdijk J.C.B.M. Topoisomerase II $\alpha$  promotes activation of RNA polymerase I transcription by facilitating pre-initiation complex formation // *Nature Communications*. — 2013. — Vol. 4. — No. 1. — P. 1598.
64. French S.L., Sikes M.L., Hontz R.D., Osheim Y.N., Lambert T.E., El Hage A., Smith M.M., Tollerverey D., Smith J.S., Beyer A.L. Distinguishing the Roles of Topoisomerases I and II in Relief of Transcription-Induced Torsional Stress in Yeast rRNA Genes // *Molecular and Cellular Biology*. — 2011. — Vol. 31. — No. 3. — P. 482-494.
65. Sloan K.E., Warda A.S., Sharma S., Entian K.-D., Lafontaine D.L.J., Bohnsack M.T. Tuning the ribosome: The influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome

biogenesis and function // RNA Biology. — 2017. — Vol. 14. — Tuning the ribosome. — No. 9. — P. 1138-1152.

66. Birkedal U., Christensen-Dalsgaard M., Krogh N., Sabarinathan R., Gorodkin J., Nielsen H. Profiling of Ribose Methylations in RNA by High-Throughput Sequencing // *Angewandte Chemie International Edition*. — 2015. — Vol. 54. — No. 2. — P. 451-455.

67. Lestrade L. snoRNA-LBME-db, a comprehensive database of human H/ACA and C/D box snoRNAs // *Nucleic Acids Research*. — 2006. — Vol. 34. — No. 90001. — P. D158-D162.

68. Piekna-Przybylska D., Decatur W.A., Fournier M.J. The 3D rRNA modification maps database: with interactive tools for ribosome analysis // *Nucleic Acids Research*. — 2007. — Vol. 36. — P. D178-D183.

69. Taoka M., Nobe Y., Yamaki Y., Yamauchi Y., Ishikawa H., Takahashi N., Nakayama H., Isobe T. The complete chemical structure of *Saccharomyces cerevisiae* rRNA: partial pseudouridylation of U2345 in 25S rRNA by snoRNA snR9 // *Nucleic Acids Research*. — 2016. — Vol. 44. — No. 18. — P. 8951-8961.

70. Watkins N.J., Bohnsack M.T. The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA // *WIREs RNA*. — 2012. — Vol. 3. — No. 3. — P. 397-414.

71. Ganot P., Bortolin M.-L., Kiss T. Site-Specific Pseudouridine Formation in Preribosomal RNA Is Guided by Small Nucleolar RNAs // *Cell*. — 1997. — Vol. 89. — No. 5. — P. 799-809.

72. Kiss-László Z., Henry Y., Bachellerie J.-P., Caizergues-Ferrer M., Kiss T. Site-Specific Ribose Methylation of Preribosomal RNA: A Novel Function for Small Nucleolar RNAs // *Cell*. — 1996. — Vol. 85. — No. 7. — P. 1077-1088.

73. Ni J., Tien A.L., Fournier M.J. Small Nucleolar RNAs Direct Site-Specific Synthesis of Pseudouridine in Ribosomal RNA // *Cell*. — 1997. — Vol. 89. — No. 4. — P. 565-573.

74. Lafontaine D.L.J., Bousquet-Antonelli C., Henry Y., Caizergues-Ferrer M., Tollervy D. The box H+ACA snoRNAs carry Cbf5p, the putative rRNA pseudouridine synthase // *Genes & Development*. — 1998. — Vol. 12. — No. 4. — P. 527-537.

75. Lowe T.M., Eddy S.R. A Computational Screen for Methylation Guide snoRNAs in Yeast // *Science*. — 1999. — Vol. 283. — No. 5405. — P. 1168-1171.

76. Petrov A.S., Bernier C.R., Hsiao C., Norris A.M., Kovacs N.A., Waterbury C.C., Stepanov V.G., Harvey S.C., Fox G.E., Wartell R.M., Hud N.V., Williams L.D. Evolution

of the ribosome at atomic resolution // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2014. — Vol. 111. — No. 28. — P. 10251-10256.

77. King T.H., Liu B., McCully R.R., Fournier M.J. Ribosome Structure and Activity Are Altered in Cells Lacking snoRNPs that Form Pseudouridines in the Peptidyl Transferase Center // *Molecular Cell*. — 2003. — Vol. 11. — No. 2. — P. 425-435.

78. Martin R., Hackert P., Ruprecht M., Simm S., Brüning L., Mirus O., Sloan K.E., Kudla G., Schleiff E., Bohnsack M.T. A pre-ribosomal RNA interaction network involving snoRNAs and the Rok1 helicase // *RNA*. — 2014. — Vol. 20. — No. 8. — P. 1173-1182.

79. Sharma S., Lafontaine D.L.J. ‘View From A Bridge’: A New Perspective on Eukaryotic rRNA Base Modification // *Trends in Biochemical Sciences*. — 2015. — Vol. 40. — No. 10. — P. 560-575.

80. Jorjani H., Kehr S., Jedlinski D.J., Gumienny R., Hertel J., Stadler P.F., Zavolan M., Gruber A.R. An updated human snoRNAome // *Nucleic Acids Research*. — 2016. — Vol. 44. — No. 11. — P. 5068-5082.

81. Falaleeva M., Pages A., Matuszek Z., Hidmi S., Agranat-Tamir L., Korotkov K., Nevo Y., Eyraş E., Sperling R., Stamm S. Dual function of C/D box small nucleolar RNAs in rRNA modification and alternative pre-mRNA splicing // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2016. — Vol. 113. — No. 12.

82. Martens-Uzunova E.S., Olvedy M., Jenster G. Beyond microRNA – Novel RNAs derived from small non-coding RNA and their implication in cancer // *Cancer Letters*. — 2013. — Vol. 340. — No. 2. — P. 201-211.

83. Schubert T., Pusch M.C., Diermeier S., Benes V., Kremmer E., Imhof A., Längst G. Df31 Protein and snoRNAs Maintain Accessible Higher-Order Structures of Chromatin // *Molecular Cell*. — 2012. — Vol. 48. — No. 3. — P. 434-444.

84. Ebersberger I., Simm S., Leisegang M.S., Schmitzberger P., Mirus O., Von Haeseler A., Bohnsack M.T., Schleiff E. The evolution of the ribosome biogenesis pathway from a yeast perspective // *Nucleic Acids Research*. — 2014. — Vol. 42. — No. 3. — P. 1509-1523.

85. Haag S., Kretschmer J., Bohnsack M.T. WBSCR22/Merm1 is required for late nuclear pre-ribosomal RNA processing and mediates N<sup>7</sup>-methylation of G1639 in human 18S rRNA // *RNA*. — 2015. — Vol. 21. — No. 2. — P. 180-187.

86. White J., Li Z., Sardana R., Bujnicki J.M., Marcotte E.M., Johnson A.W. Bud23 Methylates G1575 of 18S rRNA and Is Required for Efficient Nuclear Export of Pre-40S Subunits // *Molecular and Cellular Biology*. — 2008. — Vol. 28. — No. 10. — P. 3151-3161.



87. Lafontaine D., Vandenhautte J., Tollervey D. The 18S rRNA dimethylase Dim1p is required for pre-ribosomal RNA processing in yeast. // *Genes & Development*. — 1995. — Vol. 9. — No. 20. — P. 2470-2481.
88. Zorbas C., Nicolas E., Wacheul L., Huvelle E., Heurgué-Hamard V., Lafontaine D.L.J. The human 18S rRNA base methyltransferases DIMT1L and WBSCR22-TRMT112 but not rRNA modification are required for ribosome biogenesis // *Molecular Biology of the Cell*. — 2015. — Vol. 26. — No. 11. — P. 2080-2095.
89. Leulliot N., Bohnsack M.T., Graille M., Tollervey D., Van Tilbeurgh H. The yeast ribosome synthesis factor Emg1 is a novel member of the superfamily of alpha/beta knot fold methyltransferases // *Nucleic Acids Research*. — 2007. — Vol. 36. — No. 2. — P. 629-639.
90. Meyer B., Wurm J.P., Kötter P., Leisegang M.S., Schilling V., Buchhaupt M., Held M., Bahr U., Karas M., Heckel A., Bohnsack M.T., Wöhnert J., Entian K.-D. The Bowen–Conradi syndrome protein Nep1 (Emg1) has a dual role in eukaryotic ribosome biogenesis, as an essential assembly factor and in the methylation of  $\Psi$ 1191 in yeast 18S rRNA // *Nucleic Acids Research*. — 2011. — Vol. 39. — No. 4. — P. 1526-1537.
91. Correll C.C., Bartek J., Dundr M. The Nucleolus: A Multiphase Condensate Balancing Ribosome Synthesis and Translational Capacity in Health, Aging and Ribosomopathies // *Cells*. — 2019. — Vol. 8. — The Nucleolus. — No. 8. — P. 869.
92. Coleman A.W. Analysis of Mammalian rDNA Internal Transcribed Spacers // *PLoS ONE*. — 2013. — Vol. 8. — No. 11. — P. e79122.
93. Wang M., Anikin L., Pestov D.G. Two orthogonal cleavages separate subunit RNAs in mouse ribosome biogenesis // *Nucleic Acids Research*. — 2014. — Vol. 42. — No. 17. — P. 11180-11191.
94. Grisendi S., Mecucci C., Falini B., Pandolfi P.P. Nucleophosmin and cancer // *Nature Reviews Cancer*. — 2006. — Vol. 6. — No. 7. — P. 493-505.
95. Tomecki R., Sikorski P.J., Zakrzewska-Placzek M. Comparison of preribosomal RNA processing pathways in yeast, plant and human cells – focus on coordinated action of endo- and exoribonucleases // *FEBS Letters*. — 2017. — Vol. 591. — No. 13. — P. 1801-1850.
96. Baßler J., Hurt E. Eukaryotic Ribosome Assembly // *Annual Review of Biochemistry*. — 2019. — Vol. 88. — No. 1. — P. 281-306.
97. Langhendries J.-L., Nicolas E., Doumont G., Goldman S., Lafontaine D.L.J. The human box C/D snoRNAs U3 and U8 are required for pre-rRNA processing and tumorigenesis // *Oncotarget*. — 2016. — Vol. 7. — No. 37. — P. 59519-59534.

98. Belin S., Beghin A., Solano-González E., Bezin L., Brunet-Manquat S., Textoris J., Prats A.-C., Mertani H.C., Dumontet C., Diaz J.-J. Dysregulation of Ribosome Biogenesis and Translational Capacity Is Associated with Tumor Progression of Human Breast Cancer Cells // *PLoS ONE*. — 2009. — Vol. 4. — No. 9. — P. e7147.
99. Coleman A.W. Nuclear rRNA transcript processing versus internal transcribed spacer secondary structure // *Trends in Genetics*. — 2015. — Vol. 31. — No. 3. — P. 157-163.
100. Chaker-Margot M., Barandun J., Hunziker M., Klinge S. Architecture of the yeast small subunit processome // *Science*. — 2017. — Vol. 355. — No. 6321. — P. eaal1880.
101. Pérez-Fernández J., Román Á., De Las Rivas J., Bustelo X.R., Dosil M. The 90S Preribosome Is a Multimodular Structure That Is Assembled through a Hierarchical Mechanism // *Molecular and Cellular Biology*. — 2007. — Vol. 27. — No. 15. — P. 5414-5429.
102. Hunziker M., Barandun J., Buzovetsky O., Steckler C., Molina H., Klinge S. Conformational switches control early maturation of the eukaryotic small ribosomal subunit // *eLife*. — 2019. — Vol. 8. — P. e45185.
103. Chaker-Margot M., Hunziker M., Barandun J., Dill B.D., Klinge S. Stage-specific assembly events of the 6-MDa small-subunit processome initiate eukaryotic ribosome biogenesis // *Nature Structural & Molecular Biology*. — 2015. — Vol. 22. — No. 11. — P. 920-923.
104. Hunziker M., Barandun J., Petfalski E., Tan D., Delan-Forino C., Molloy K.R., Kim K.H., Dunn-Davies H., Shi Y., Chaker-Margot M., Chait B.T., Walz T., Tollervey D., Klinge S. UtpA and UtpB chaperone nascent pre-ribosomal RNA and U3 snoRNA to initiate eukaryotic ribosome assembly // *Nature Communications*. — 2016. — Vol. 7. — No. 1. — P. 12090.
105. Kornprobst M., Turk M., Kellner N., Cheng J., Flemming D., Koš-Braun I., Koš M., Thoms M., Berninghausen O., Beckmann R., Hurt E. Architecture of the 90S Pre-ribosome: A Structural View on the Birth of the Eukaryotic Ribosome // *Cell*. — 2016. — Vol. 166. — No. 2. — P. 380-393.
106. Granneman S. The human Imp3 and Imp4 proteins form a ternary complex with hMpp10, which only interacts with the U3 snoRNA in 60-80S ribonucleoprotein complexes // *Nucleic Acids Research*. — 2003. — T. 31. — № 7. — C. 1877-1887.
107. Bammert L., Jonas S., Ungricht R., Kutay U. Human AATF/Che-1 forms a nucleolar protein complex with NGDN and NOL10 required for 40S ribosomal subunit synthesis // *Nucleic Acids Research*. — 2016. — Vol. 44. — No. 20. — P. 9803-9820.

108. Barandun J., Hunziker M., Klinge S. Assembly and structure of the SSU processome — a nucleolar precursor of the small ribosomal subunit // *Current Opinion in Structural Biology*. — 2018. — Vol. 49. — P. 85-93.
109. Granneman S., Kudla G., Petfalski E., Tollervey D. Identification of protein binding sites on U3 snoRNA and pre-rRNA by UV cross-linking and high-throughput analysis of cDNAs // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2009. — Vol. 106. — No. 24. — P. 9613-9618.
110. Dutca L.M., Gallagher J.E.G., Baserga S.J. The initial U3 snoRNA:pre-rRNA base pairing interaction required for pre-18S rRNA folding revealed by in vivo chemical probing // *Nucleic Acids Research*. — 2011. — Vol. 39. — No. 12. — P. 5164-5180.
111. Vanden Broeck A., Klinge S. An emerging mechanism for the maturation of the Small Subunit Processome // *Current Opinion in Structural Biology*. — 2022. — Vol. 73. — P. 102331.
112. Barandun J., Chaker-Margot M., Hunziker M., Molloy K.R., Chait B.T., Klinge S. The complete structure of the small-subunit processome // *Nature Structural & Molecular Biology*. — 2017. — Vol. 24. — No. 11. — P. 944-953.
113. Cheng J., Lau B., La Venuta G., Ameismeier M., Berninghausen O., Hurt E., Beckmann R. 90 S pre-ribosome transformation into the primordial 40 S subunit // *Science*. — 2020. — Vol. 369. — No. 6510. — P. 1470-1476.
114. Du Y., An W., Zhu X., Sun Q., Qi J., Ye K. Cryo-EM structure of 90 S small ribosomal subunit precursors in transition states // *Science*. — 2020. — Vol. 369. — No. 6510. — P. 1477-1481.
115. Lau B., Cheng J., Flemming D., La Venuta G., Berninghausen O., Beckmann R., Hurt E. Structure of the Maturing 90S Pre-ribosome in Association with the RNA Exosome // *Molecular Cell*. — 2021. — Vol. 81. — No. 2. — P. 293-303.e4.
116. Sardana R., Liu X., Granneman S., Zhu J., Gill M., Papoulas O., Marcotte E.M., Tollervey D., Correll C.C., Johnson A.W. The DEAH-box Helicase Dhr1 Dissociates U3 from the Pre-rRNA to Promote Formation of the Central Pseudoknot // *PLOS Biology*. — 2015. — Vol. 13. — No. 2. — P. e1002083.
117. Boneberg F.M., Brandmann T., Kobel L., Van Den Heuvel J., Bargsten K., Bammert L., Kutay U., Jinek M. Molecular mechanism of the RNA helicase DHX37 and its activation by UTP14A in ribosome biogenesis // *RNA*. — 2019. — Vol. 25. — No. 6. — P. 685-701.
118. Allmang C. Degradation of ribosomal RNA precursors by the exosome // *Nucleic Acids Research*. — 2000. — Vol. 28. — No. 8. — P. 1684-1691.

119. Sloan K.E., Mattijssen S., Lebaron S., Tollervey D., Pruijn G.J.M., Watkins N.J. Both endonucleolytic and exonucleolytic cleavage mediate ITS1 removal during human ribosomal RNA processing // *Journal of Cell Biology*. — 2013. — Vol. 200. — No. 5. — P. 577-588.
120. Kater L., Thoms M., Barrio-Garcia C., Cheng J., Ismail S., Ahmed Y.L., Bange G., Kressler D., Berninghausen O., Sinning I., Hurt E., Beckmann R. Visualizing the Assembly Pathway of Nucleolar Pre-60S Ribosomes // *Cell*. — 2017. — Vol. 171. — No. 7. — P. 1599-1610.e14.
121. Gamalinda M., Ohmayer U., Jakovljevic J., Kumcuoglu B., Woolford J., Mbom B., Lin L., Woolford J.L. A hierarchical model for assembly of eukaryotic 60S ribosomal subunit domains // *Genes & Development*. — 2014. — Vol. 28. — No. 2. — P. 198-210.
122. Klinge S., Woolford J.L. Ribosome assembly coming into focus // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. — 2019. — Vol. 20. — No. 2. — P. 116-131.
123. Burlacu E., Lackmann F., Aguilar L.-C., Belikov S., Nues R.V., Trahan C., Hector R.D., Dominelli-Whiteley N., Cockroft S.L., Wieslander L., Oeffinger M., Granneman S. High-throughput RNA structure probing reveals critical folding events during early 60S ribosome assembly in yeast // *Nature Communications*. — 2017. — Vol. 8. — No. 1. — P. 714.
124. Pöll G., Müller C., Bodden M., Teubl F., Eichner N., Lehmann G., Griesenbeck J., Tschochner H., Milkereit P. Structural transitions during large ribosomal subunit maturation analyzed by tethered nuclease structure probing in *S. cerevisiae* // *PLOS ONE*. — 2017. — Vol. 12. — No. 7. — P. e0179405.
125. Zhou D., Zhu X., Zheng S., Tan D., Dong M.-Q., Ye K. Cryo-EM structure of an early precursor of large ribosomal subunit reveals a half-assembled intermediate // *Protein & Cell*. — 2019. — Vol. 10. — No. 2. — P. 120-130.
126. Barrio-Garcia C., Thoms M., Flemming D., Kater L., Berninghausen O., Baßler J., Beckmann R., Hurt E. Architecture of the Rix1–Rea1 checkpoint machinery during pre-60S-ribosome remodeling // *Nature Structural & Molecular Biology*. — 2016. — Vol. 23. — No. 1. — P. 37-44.
127. Zhou Y., Musalgaonkar S., Johnson A.W., Taylor D.W. Tightly-orchestrated rearrangements govern catalytic center assembly of the ribosome // *Nature Communications*. — 2019. — Vol. 10. — No. 1. — P. 958.
128. Nissan T.A. 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm // *The EMBO Journal*. — 2002. — T. 21. — № 20. — C. 5539-5547.

129. Hiraishi N., Ishida Y., Sudo H., Nagahama M. WDR74 participates in an early cleavage of the pre-rRNA processing pathway in cooperation with the nucleolar AAA-ATPase NVL2 // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 2018. — Vol. 495. — No. 1. — P. 116-123.
130. Lygerou Z., Allmang C., Tollervey D., Séraphin B. Accurate Processing of a Eukaryotic Precursor Ribosomal RNA by Ribonuclease MRP in Vitro // *Science*. — 1996. — Vol. 272. — No. 5259. — P. 268-270.
131. Pillon M.C., Sobhany M., Borgnia M.J., Williams J.G., Stanley R.E. Grc3 programs the essential endoribonuclease Las1 for specific RNA cleavage // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2017. — Vol. 114. — No. 28.
132. Dembowski J.A., Kuo B., Woolford J.L. Has1 regulates consecutive maturation and processing steps for assembly of 60S ribosomal subunits // *Nucleic Acids Research*. — 2013. — Vol. 41. — No. 16. — P. 7889-7904.
133. Merl J., Jakob S., Ridinger K., Hierlmeier T., Deutzmann R., Milkereit P., Tschochner H. Analysis of ribosome biogenesis factor-modules in yeast cells depleted from pre-ribosomes // *Nucleic Acids Research*. — 2010. — Vol. 38. — No. 9. — P. 3068-3080.
134. Talkish J., Campbell I.W., Sahasranaman A., Jakovljevic J., Woolford J.L. Ribosome Assembly Factors Pwp1 and Nop12 Are Important for Folding of 5.8S rRNA during Ribosome Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* // *Molecular and Cellular Biology*. — 2014. — Vol. 34. — No. 10. — P. 1863-1877.
135. Sahasranaman A., Dembowski J., Strahler J., Andrews P., Maddock J., Woolford J.L. Assembly of *Saccharomyces cerevisiae* 60S ribosomal subunits: role of factors required for 27S pre-rRNA processing: Analysing ribosome assembly one step at a time // *The EMBO Journal*. — 2011. — Vol. 30. — No. 19. — P. 4020-4032.
136. Woolford J.L., Baserga S.J. Ribosome Biogenesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics*. — 2013. — Vol. 195. — No. 3. — P. 643-681.
137. Konikkat S., Woolford, J.L. Principles of 60S ribosomal subunit assembly emerging from recent studies in yeast // *Biochemical Journal*. — 2017. — Vol. 474. — No. 2. — P. 195-214.
138. Sanghai Z.A., Miller L., Molloy K.R., Barandun J., Hunziker M., Chaker-Margot M., Wang J., Chait B.T., Klinge S. Modular assembly of the nucleolar pre-60S ribosomal subunit // *Nature*. — 2018. — Vol. 556. — No. 7699. — P. 126-129.
139. Allmang C., Tollervey D. The role of the 3' external transcribed spacer in yeast pre-rRNA processing // *Journal of Molecular Biology*. — 1998. — Vol. 278. — No. 1. — P. 67-78.

140. Chen W., Xie Z., Yang F., Ye K. Stepwise assembly of the earliest precursors of large ribosomal subunits in yeast // *Nucleic Acids Research*. — 2017. — Vol. 45. — No. 11. — P. 6837-6847.
141. Saveanu C., Namane A., Gleizes P.-E., Lebreton A., Rousselle J.-C., Noaillac-Depeyre J., Gas N., Jacquier A., Fromont-Racine M. Sequential Protein Association with Nascent 60S Ribosomal Particles // *Molecular and Cellular Biology*. — 2003. — Vol. 23. — No. 13. — P. 4449-4460.
142. Lo Y.-H., Sobhany M., Hsu A.L., Ford B.L., Krahn J.M., Borgnia M.J., Stanley R.E. Cryo-EM structure of the essential ribosome assembly AAA-ATPase Rix7 // *Nature Communications*. — 2019. — Vol. 10. — No. 1. — P. 513.
143. Prattes M., Lo Y.-H., Bergler H., Stanley R.E. Shaping the Nascent Ribosome: AAA-ATPases in Eukaryotic Ribosome Biogenesis // *Biomolecules*. — 2019. — Vol. 9. — No. 11. — P. 715.
144. Talkish J., Zhang J., Jakovljevic J., Horsey E.W., Woolford J.L. Hierarchical recruitment into nascent ribosomes of assembly factors required for 27SB pre-rRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae* // *Nucleic Acids Research*. — 2012. — Vol. 40. — No. 17. — P. 8646-8661.
145. Fromm L., Falk S., Flemming D., Schuller J.M., Thoms M., Conti E., Hurt E. Reconstitution of the complete pathway of ITS2 processing at the pre-ribosome // *Nature Communications*. — 2017. — Vol. 8. — No. 1. — P. 1787.
146. Biedka S., Micic J., Wilson D., Brown H., Diorio-Toth L., Woolford J.L. Hierarchical recruitment of ribosomal proteins and assembly factors remodels nucleolar pre-60S ribosomes // *Journal of Cell Biology*. — 2018. — Vol. 217. — No. 7. — P. 2503-2518.
147. Schillewaert S., Wacheul L., Lhomme F., Lafontaine D.L.J. The Evolutionarily Conserved Protein LAS1 Is Required for Pre-rRNA Processing at Both Ends of ITS2 // *Molecular and Cellular Biology*. — 2012. — Vol. 32. — No. 2. — P. 430-444.
148. Frazier M.N., Pillon M.C., Kocaman S., Gordon J., Stanley R.E. Structural overview of macromolecular machines involved in ribosome biogenesis // *Current Opinion in Structural Biology*. — 2021. — Vol. 67. — P. 51-60.
149. Wu S., Tutuncuoglu B., Yan K., Brown H., Zhang Y., Tan D., Gamalinda M., Yuan Y., Li Z., Jakovljevic J., Ma C., Lei J., Dong M.-Q., Woolford J.L., Gao N. Diverse roles of assembly factors revealed by structures of late nuclear pre-60S ribosomes // *Nature*. — 2016. — Vol. 534. — No. 7605. — P. 133-137.
150. Chakraborty A., Uechi T., Kenmochi N. Guarding the ‘translation apparatus’: defective ribosome biogenesis and the p53 signaling pathway // *WIREs RNA*. — 2011. — Vol. 2. — No. 4. — P. 507-522.

151. Kater L., Mitterer V., Thoms M., Cheng J., Berninghausen O., Beckmann R., Hurt E. Construction of the Central Protuberance and L1 Stalk during 60S Subunit Biogenesis // *Molecular Cell*. — 2020. — Vol. 79. — No. 4. — P. 615-628.e5.
152. Baßler J., Kallas M., Pertschy B., Ulbrich C., Thoms M., Hurt E. The AAA-ATPase Real Drives Removal of Biogenesis Factors during Multiple Stages of 60S Ribosome Assembly // *Molecular Cell*. — 2010. — Vol. 38. — No. 5. — P. 712-721.
153. Matsuo Y., Granneman S., Thoms M., Manikas R.-G., Tollervey D., Hurt E. Coupled GTPase and remodelling ATPase activities form a checkpoint for ribosome export // *Nature*. — 2014. — Vol. 505. — No. 7481. — P. 112-116.
154. Micic J., Li Y., Wu S., Wilson D., Tutuncuoglu B., Gao N., Woolford J.L. Coupling of 5S RNP rotation with maturation of functional centers during large ribosomal subunit assembly // *Nature Communications*. — 2020. — Vol. 11. — No. 1. — P. 3751.
155. Malyutin A.G., Musalgaonkar S., Patchett S., Frank J., Johnson A.W. Nmd3 is a structural mimic of EIF 5A, and activates the cp GTPase Lsg1 during 60S ribosome biogenesis // *The EMBO Journal*. — 2017. — Vol. 36. — No. 7. — P. 854-868.
156. Sengupta J., Bussiere C., Pallesen J., West M., Johnson A.W., Frank J. Characterization of the nuclear export adaptor protein Nmd3 in association with the 60S ribosomal subunit // *Journal of Cell Biology*. — 2010. — Vol. 189. — No. 7. — P. 1079-1086.
157. Liang X., Zuo M.-Q., Zhang Y., Li N., Ma C., Dong M.-Q., Gao N. Structural snapshots of human pre-60S ribosomal particles before and after nuclear export // *Nature Communications*. — 2020. — Vol. 11. — No. 1. — P. 3542.
158. Cheng J., Lau B., Thoms M., Ameismeier M., Berninghausen O., Hurt E., Beckmann R. The nucleoplasmic phase of pre-40S formation prior to nuclear export // *Nucleic Acids Research*. — 2022. — Vol. 50. — No. 20. — P. 11924-11937.
159. Preti M., O'Donohue M.-F., Montel-Lehry N., Bortolin-Cavaillé M.-L., Choismel V., Gleizes P.-E. Gradual processing of the ITS1 from the nucleolus to the cytoplasm during synthesis of the human 18S rRNA // *Nucleic Acids Research*. — 2013. — Vol. 41. — No. 8. — P. 4709-4723.
160. Montellese C., Montel-Lehry N., Henras A.K., Kutay U., Gleizes P.-E., O'Donohue M.-F. Poly(A)-specific ribonuclease is a nuclear ribosome biogenesis factor involved in human 18S rRNA maturation // *Nucleic Acids Research*. — 2017. — Vol. 45. — No. 11. — P. 6822-6836.
161. Ferreira-Cerca S., Pöll G., Gleizes P.-E., Tschochner H., Milkereit P. Roles of Eukaryotic Ribosomal Proteins in Maturation and Transport of Pre-18S rRNA and Ribosome Function // *Molecular Cell*. — 2005. — Vol. 20. — No. 2. — P. 263-275.

162. Ameisemeier M., Cheng J., Berninghausen O., Beckmann R. Visualizing late states of human 40S ribosomal subunit maturation // *Nature*. — 2018. — Vol. 558. — No. 7709. — P. 249-253.
163. Johnson A.W., Lund E., Dahlberg J. Nuclear export of ribosomal subunits // *Trends in Biochemical Sciences*. — 2002. — Vol. 27. — No. 11. — P. 580-585.
164. Hurt E., Hannus S., Schmelzl B., Lau D., Tollervey D., Simos G. A Novel In Vivo Assay Reveals Inhibition of Ribosomal Nuclear Export in Ran-Cycle and Nucleoporin Mutants // *The Journal of Cell Biology*. — 1999. — Vol. 144. — No. 3. — P. 389-401.
165. Thomas F., Kutay U. Biogenesis and nuclear export of ribosomal subunits in higher eukaryotes depend on the CRM1 export pathway // *Journal of Cell Science*. — 2003. — Vol. 116. — No. 12. — P. 2409-2419.
166. Schafer T. The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes // *The EMBO Journal*. — 2003. — T. 22. — № 6. — C. 1370-1380.
167. Merwin J.R., Bogar L.B., Poggi S.B., Fitch R.M., Johnson A.W., Lycan D.E. Genetic Analysis of the Ribosome Biogenesis Factor *Ltv1* of *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics*. — 2014. — Vol. 198. — No. 3. — P. 1071-1085.
168. Faza M.B., Chang Y., Occhipinti L., Kemmler S., Panse V.G. Role of Mex67-Mtr2 in the Nuclear Export of 40S Pre-Ribosomes // *PLoS Genetics*. — 2012. — Vol. 8. — No. 8. — P. e1002915.
169. Oeffinger M., Dlakić M., Tollervey D. A pre-ribosome-associated HEAT-repeat protein is required for export of both ribosomal subunits // *Genes & Development*. — 2004. — Vol. 18. — No. 2. — P. 196-209.
170. Wyler E., Zimmermann M., Widmann B., Gstaiger M., Pfannstiel J., Kutay U., Zemp I. Tandem affinity purification combined with inducible shRNA expression as a tool to study the maturation of macromolecular assemblies // *RNA*. — 2011. — Vol. 17. — No. 1. — P. 189-200.
171. Zemp I., Wild T., O'Donohue M.-F., Wandrey F., Widmann B., Gleizes P.-E., Kutay U. Distinct cytoplasmic maturation steps of 40S ribosomal subunit precursors require hRio2 // *Journal of Cell Biology*. — 2009. — Vol. 185. — No. 7. — P. 1167-1180.
172. Landry-Voyer A.-M., Bilodeau S., Bergeron D., Dionne K.L., Port S.A., Rouleau C., Boisvert F.-M., Kehlenbach R.H., Bachand F. Human PDCD2L Is an Export Substrate of CRM1 That Associates with 40S Ribosomal Subunit Precursors // *Molecular and Cellular Biology*. — 2016. — Vol. 36. — No. 24. — P. 3019-3032.



173. Lo K.-Y., Li Z., Bussiere C., Bresson S., Marcotte E.M., Johnson A.W. Defining the Pathway of Cytoplasmic Maturation of the 60S Ribosomal Subunit // *Molecular Cell*. — 2010. — Vol. 39. — No. 2. — P. 196-208.
174. Ma C., Wu S., Li N., Chen Y., Yan K., Li Z., Zheng L., Lei J., Woolford J.L., Gao N. Structural snapshot of cytoplasmic pre-60S ribosomal particles bound by Nmd3, Lsg1, Tif6 and Reh1 // *Nature Structural & Molecular Biology*. — 2017. — Vol. 24. — No. 3. — P. 214-220.
175. Gartmann M., Blau M., Armache J.-P., Mielke T., Topf M., Beckmann R. Mechanism of eIF6-mediated Inhibition of Ribosomal Subunit Joining // *Journal of Biological Chemistry*. — 2010. — Vol. 285. — No. 20. — P. 14848-14851.
176. Weis F., Giudice E., Churcher M., Jin L., Hilcenko C., Wong C.C., Traynor D., Kay R.R., Warren A.J. Mechanism of eIF6 release from the nascent 60S ribosomal subunit // *Nature Structural & Molecular Biology*. — 2015. — Vol. 22. — No. 11. — P. 914-919.
177. Kargas V., Castro-Hartmann P., Escudero-Urquijo N., Dent K., Hilcenko C., Sailer C., Zisser G., Marques-Carvalho M.J., Pellegrino S., Wawiórka L., Freund S.M., Wagstaff J.L., Andreeva A., Faille A., Chen E., Stengel F., Bergler H., Warren A.J. Mechanism of completion of peptidyltransferase centre assembly in eukaryotes // *eLife*. — 2019. — Vol. 8. — P. e44904.
178. Bécam A.-M., Nasr F., Racki W., Zagulski M., Herbert C. Ria1p (Ynl163c), a protein similar to elongation factors 2, is involved in the biogenesis of the 60S subunit of the ribosome in *Saccharomyces cerevisiae* // *Molecular Genetics and Genomics*. — 2001. — Vol. 266. — No. 3. — P. 454-462.
179. Senger B., Lafontaine D.L.J., Graindorge J.-S., Gadal O., Camasses A., Sanni A., Garnier J.-M., Breitenbach M., Hurt E., Fasiolo F. The Nucle(ol)ar Tif6p and Efl1p Are Required for a Late Cytoplasmic Step of Ribosome Synthesis // *Molecular Cell*. — 2001. — Vol. 8. — No. 6. — P. 1363-1373.
180. Menne T.F., Goyenechea B., Sánchez-Puig N., Wong C.C., Tonkin L.M., Ancliff P.J., Brost R.L., Costanzo M., Boone C., Warren A.J. The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein mediates translational activation of ribosomes in yeast // *Nature Genetics*. — 2007. — Vol. 39. — No. 4. — P. 486-495.
181. Bhaskar V., Desogus J., Graff-Meyer A., Schenk A.D., Cavadini S., Chao J.A. Dynamic association of human Ebp1 with the ribosome // *RNA*. — 2021. — Vol. 27. — No. 4. — P. 411-419.
182. Kraushar M.L., Krupp F., Harnett D., Turko P., Ambrozkiewicz M.C., Sprink T., Imami K., Günningmann M., Zinnall U., Vieira-Vieira C.H., Schaub T., Münster-Wandowski A., Bürger J., Borisova E., Yamamoto H., Rasin M.-R., Ohler U., Beule D., Mielke T., Tarabykin V., Landthaler M., Kramer G., Vida I., Selbach M., Spahn C.M.T.

Protein Synthesis in the Developing Neocortex at Near-Atomic Resolution Reveals Ebp1-Mediated Neuronal Proteostasis at the 60S Tunnel Exit // *Molecular Cell*. — 2021. — Vol. 81. — No. 2. — P. 304-322.e16.

183. Schäfer T., Maco B., Petfalski E., Tollervy D., Böttcher B., Aebi U., Hurt E. Hrr25-dependent phosphorylation state regulates organization of the pre-40S subunit // *Nature*. — 2006. — Vol. 441. — No. 7093. — P. 651-655.

184. Heuer A., Thomson E., Schmidt C., Berninghausen O., Becker T., Hurt E., Beckmann R. Cryo-EM structure of a late pre-40S ribosomal subunit from *Saccharomyces cerevisiae* // *eLife*. — 2017. — Vol. 6. — P. e30189.

185. Fatica A., Oeffinger M., Dlakić M., Tollervy D. Nob1p Is Required for Cleavage of the 3' End of 18S rRNA // *Molecular and Cellular Biology*. — 2003. — Vol. 23. — No. 5. — P. 1798-1807.

186. Lamanna A.C., Karbstein K. An RNA Conformational Switch Regulates Pre-18S rRNA Cleavage // *Journal of Molecular Biology*. — 2011. — Vol. 405. — No. 1. — P. 3-17.

187. Larburu N., Montellese C., O'Donohue M.-F., Kutay U., Gleizes P.-E., Plisson-Chastang C. Structure of a human pre-40S particle points to a role for RACK1 in the final steps of 18S rRNA processing // *Nucleic Acids Research*. — 2016. — Vol. 44. — No. 17. — P. 8465-8478.

188. Scaiola A., Peña C., Weisser M., Böhringer D., Leibundgut M., Klingauf-Nerurkar P., Gerhardy S., Panse V.G., Ban N. Structure of a eukaryotic cytoplasmic pre-40S ribosomal subunit // *The EMBO Journal*. — 2018. — Vol. 37. — No. 7. — P. e98499.

189. Ameismeier M., Zemp I., Van Den Heuvel J., Thoms M., Berninghausen O., Kutay U., Beckmann R. Structural basis for the final steps of human 40S ribosome maturation // *Nature*. — 2020. — Vol. 587. — No. 7835. — P. 683-687.

190. Rouquette J., Choismel V., Gleizes P.-E. Nuclear export and cytoplasmic processing of precursors to the 40S ribosomal subunits in mammalian cells // *The EMBO Journal*. — 2005. — T. 24. — № 16. — C. 2862-2872.

191. Vanrobays E., Gelugne J.-P., Gleizes P.-E., Caizergues-Ferrer M. Late Cytoplasmic Maturation of the Small Ribosomal Subunit Requires RIO Proteins in *Saccharomyces cerevisiae* // *Molecular and Cellular Biology*. — 2003. — Vol. 23. — No. 6. — P. 2083-2095.

192. Vanrobays E. Processing of 20S pre-rRNA to 18S ribosomal RNA in yeast requires Rrp10p, an essential non-ribosomal cytoplasmic protein // *The EMBO Journal*. — 2001. — Vol. 20. — № 15. — P. 4204-4213.

193. Widmann B., Wandrey F., Badertscher L., Wyler E., Pfannstiel J., Zemp I., Kutay U. The kinase activity of human Rio1 is required for final steps of cytoplasmic maturation of 40S subunits // *Molecular Biology of the Cell*. — 2012. — Vol. 23. — No. 1. — P. 22-35.
194. Ferreira-Cerca S., Kiburu I., Thomson E., LaRonde N., Hurt E. Dominant Rio1 kinase/ATPase catalytic mutant induces trapping of late pre-40S biogenesis factors in 80S-like ribosomes // *Nucleic Acids Research*. — 2014. — Vol. 42. — No. 13. — P. 8635-8647.
195. Ferreira-Cerca S., Sagar V., Schäfer T., Diop M., Wesseling A.-M., Lu H., Chai E., Hurt E., LaRonde-LeBlanc N. ATPase-dependent role of the atypical kinase Rio2 on the evolving pre-40S ribosomal subunit // *Nature Structural & Molecular Biology*. — 2012. — Vol. 19. — No. 12. — P. 1316-1323.
196. Mitterer V., Shayan R., Ferreira-Cerca S., Murat G., Enne T., Rinaldi D., Weigl S., Omanic H., Gleizes P.-E., Kressler D., Plisson-Chastang C., Pertschy B. Conformational proofreading of distant 40S ribosomal subunit maturation events by a long-range communication mechanism // *Nature Communications*. — 2019. — Vol. 10. — No. 1. — P. 2754.
197. Plassart L., Shayan R., Montellese C., Rinaldi D., Larburu N., Pichereaux C., Froment C., Lebaron S., O'Donohue M.-F., Kutay U., Marcoux J., Gleizes P.-E., Plisson-Chastang C. The final step of 40S ribosomal subunit maturation is controlled by a dual key lock // *eLife*. — 2021. — Vol. 10. — P. e61254.
198. Baumas K., Soudet J., Caizergues-Ferrer M., Faubladiet M., Henry Y., Mougin A. Human RioK3 is a novel component of cytoplasmic pre-40S pre-ribosomal particles // *RNA Biology*. — 2012. — Vol. 9. — No. 2. — P. 162-174.
199. Wehner K.A., Baserga S.J. The  $\sigma 70$ -like Motif // *Molecular Cell*. — 2002. — Vol. 9. — No. 2. — P. 329-339.
200. Peng W.-T. ESF1 is required for 18S rRNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* // *Nucleic Acids Research*. — 2004. — Vol. 32. — No. 6. — P. 1993-1999.
201. Chen J., Tan X., Wang Z., Liu Y., Zhou J., Rong X., Lu L., Li Y. The ribosome biogenesis protein Esf1 is essential for pharyngeal cartilage formation in zebrafish // *The FEBS Journal*. — 2018. — Vol. 285. — No. 18. — P. 3464-3484.
202. Hacot S., Coute Y., Belin S., Albaret M.A., Mertani H.C., Sanchez J., Rosa-Calatrava M., Diaz J. Isolation of Nucleoli // *Current Protocols in Cell Biology*. — 2010. — Vol. 47. — No. 1.
203. Moraleva A., Deryabin A., Kordyukova M., Polzikov 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. — P. e0285833.

204. Abraham K.J., Khosraviani N., Chan J.N.Y., Gorthi A., Samman A., Zhao D.Y., Wang M., Bokros M., Vidya E., Ostrowski L.A., Oshidari R., Pietrobon V., Patel P.S., Algouneh A., Singhanian R., Liu Y., Yerlici V.T., De Carvalho D.D., Ohh M., Dickson B.C., Hakem R., Greenblatt J.F., Lee S., Bishop A.J.R., Mekhail K. Nucleolar RNA polymerase II drives ribosome biogenesis // Nature. — 2020. — Vol. 585. — No. 7824. — P. 298-302.

205. Robertson N., Shchepachev V., Wright D., Turowski T.W., Spanos C., Helwak A., Zamoyska R., Tollervey D. A disease-linked lncRNA mutation in RNase MRP inhibits ribosome synthesis // Nature Communications. — 2022. — Vol. 13. — No. 1. — P. 649.

206. Ferrolino M.C., Mitrea D.M., Michael J.R., Kriwacki R.W. Compositional adaptability in NPM1-SURF6 scaffolding networks enabled by dynamic switching of phase separation mechanisms // Nature Communications. — 2018. — Vol. 9. — No. 1. — P. 5064.

207. Castle C.D., Cassimere E.K., Denicourt C. LAS1L interacts with the mammalian Rix1 complex to regulate ribosome biogenesis // Molecular Biology of the Cell. — 2012. — Vol. 23. — No. 4. — P. 716-728.

208. Sarkar A., Thoms M., Barrio-Garcia C., Thomson E., Flemming D., Beckmann R., Hurt E. Preribosomes escaping from the nucleus are caught during translation by cytoplasmic quality control // Nature Structural & Molecular Biology. — 2017. — Vol. 24. — No. 12. — P. 1107-1115.

209. Holmberg Olausson K., Nistér M., Lindström M.S. Loss of Nucleolar Histone Chaperone NPM1 Triggers Rearrangement of Heterochromatin and Synergizes with a Deficiency in DNA Methyltransferase DNMT3A to Drive Ribosomal DNA Transcription // Journal of Biological Chemistry. — 2014. — Vol. 289. — No. 50. — P. 34601-34619.

210. Moraleva A.A., Deryabin A.S., Rubtsov Y.P., Rubtsova M.P., Dontsova O.A. Eukaryotic Ribosome Biogenesis: The 40S Subunit // Acta Naturae. — 2022. — T. 14. — Eukaryotic Ribosome Biogenesis. — № 1. — C. 14-30.

211. Zhang L., Wu C., Cai G., Chen S., Ye K. Stepwise and dynamic assembly of the earliest precursors of small ribosomal subunits in yeast // Genes & Development. — 2016. — Vol. 30. — No. 6. — P. 718-732.