

*На правах рукописи*

ОЧКАСОВА АНАСТАСИЯ СЕРГЕЕВНА

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РИБОСОМНОГО БЕЛКА  $\mu$ S3 ЧЕЛОВЕКА С  
АПУРИН-АПИРИМИДИНОВЫМИ САЙТАМИ В ДНК И мРНК**

1.4.9 – биоорганическая химия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Новосибирск 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

**Научный руководитель:** **Грайфер Дмитрий Маратович**, д.х.н., доцент

**Официальные оппоненты:** **Речкунова Надежда Ивановна**, д.х.н., доцент, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук», в.н.с.

**Алкаласва Елена Зиновьевна**, к.б.н., доцент, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук», в.н.с., зав. лаб.

**Волчо Константин Петрович**, д.х.н., профессор РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук», г.н.с.

Защита состоится 26 апреля 2023 г. в 10:00 часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ.02.01 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

С авторефератом можно ознакомиться на сайте [www.niboch.nsc.ru](http://www.niboch.nsc.ru)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,  
к.х.н.

Пестряков П.Е.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** В настоящее время известно, что многие рибосомные белки не только участвуют в трансляции в качестве компонентов рибосомы, но также вовлечены в различные клеточные процессы, не связанные с биогенезом рибосом и трансляцией. Такие функции, называемые «внерибосомными» или «нетрансляционными», в подавляющем большинстве случаев свойственны для изолированных (находящихся вне рибосомы) рибосомных белков. Известны только два эукариотических рибосомных белка, RACK1 и L13a, которые проявляют нетрансляционные функции, находясь в составе рибосом.

Эволюционно консервативный рибосомный белок uS3 у эукариот является одним из ключевых участников процесса трансляции, поскольку он принимает непосредственное участие в формировании мРНК-связывающего центра рибосомы и во взаимодействиях с факторами инициации трансляции. Одновременно белки семейства uS3 имеют наиболее разнообразные внерибосомные функции, большинство из которых связано с их взаимодействием с ДНК (для обзора см., например, Graifer and Karpova, 2020). К наиболее известным и хорошо изученным неканоническим функциям эукариотических рибосомных белков семейства uS3 относится их участие в регуляции транскрипции генов, находящихся под контролем транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B, а также способность участвовать в эксцизионной репарации повреждений в ДНК (см., например, Graifer et al., 2014). Последнее проявляется, в частности, в наличии у них так называемой АП-лиазной активности – способности расщеплять ДНК по апурин-апиримидиновым (АП) сайтам, образующимся в результате действия активных форм кислорода при окислительном стрессе, а также спонтанно в отсутствие стресса. В этом плане наиболее изучен белок uS3 человека; однако на момент начала настоящей работы многие аспекты участия этого белка в репарации ДНК оставались неясными. Так, было неизвестно, какие последовательности или структурные мотивы ДНК предпочтительно взаимодействуют с изолированным uS3 и обладает ли uS3 активностью ферментов репарации, будучи в составе 40S рибосомной субчастицы. Кроме того, было не ясно, где и когда этот белок реально участвует в репарации в клетке и какой участок в нем отвечает за АП-лиазную активность. Наконец, было неизвестно, может ли uS3 в составе 40S субчастиц взаимодействовать с АП-сайтами в мРНК и таким образом принимать участие в контроле качества мРНК в процессе трансляции. Понимание молекулярных механизмов функционирования систем, обеспечивающих стабильность генома, – репарации повреждений в ДНК и контроля качества мРНК имеет фундаментальное значение, поскольку известно, что нарушения в этих системах являются причинами развития многих серьезных патологий. Так, нарушения в системе репарации ДНК приводят к таким патологиям, как рак и нейродегенеративные заболевания. Накопление поврежденных мРНК в клетках также связывают с развитием таких нейродегенеративных заболеваний, как болезни Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона.

**Цель и задачи исследования.** Целью данной работы являлось исследование функций рибосомного белка uS3 человека в составе зрелых

цитоплазматических 40S субчастиц рибосом или ядерных пре-40S частиц и в свободном состоянии, связанных с его взаимодействиями с АП-сайтами в ДНК и мРНК, ассоциированными соответственно с процессами репарации ДНК и контроля качества мРНК.

Для достижения поставленной цели предполагалось решить следующие задачи:

- выяснить, способен ли белок uS3 в составе зрелых цитоплазматических 40S субчастиц или ядерных пре-40S субчастиц рибосом человека проявлять активность ферментов репарации ДНК, в частности взаимодействовать с АП-сайтами;
- идентифицировать участки связывания рибосомного белка uS3 на геномной ДНК человека в составе хроматина с использованием метода ChIP-Seq на клетках HEK293;
- определить аминокислотные остатки свободного uS3, непосредственно участвующие в формировании АП-лиазного каталитического центра;
- установить, способен ли белок uS3 в составе 40S субчастицы взаимодействовать с АП-сайтом в мРНК, связанной в рибосомном канале;
- выяснить, может ли взаимодействие рибосомного белка uS3 с АП-сайтом в мРНК происходить непосредственно в процессе трансляции.

#### **Научная новизна полученных результатов и практическая ценность.**

В настоящей работе впервые проведен сравнительный анализ АП-лиазной активности рибосомного белка uS3 человека в свободном состоянии и в составе 40S рибосомных субчастиц по отношению к двуцепочечной (дц) и одноцепочечной (оц) ДНК. С использованием метода, основанного на иммунопреципитации хроматина (ChIP) и высокопроизводительном секвенировании ДНК (Seq), определены участки геномной ДНК человека, взаимодействующие с uS3; установлено, что критерием выбора белком uS3 места для связывания является не повышенное сродство к определенной последовательности ДНК, а физическая доступность участка хроматина. Определен район изолированного белка uS3, содержащий остаток, образующий ковалентную связь с АП-сайтом в оц-ДНК на стадии ее расщепления по этому сайту. Тем самым впервые получены данные об аминокислотных остатках uS3, непосредственно участвующих в формировании его АП-лиазного центра.

Обнаружено, что мРНК, содержащая АП-сайт, может посредством него сшиваться с пептидом 55-64 белка uS3, находящимся на внешней поверхности 40S субчастицы недалеко от участка входа мРНК в рибосомный канал. Показано, что такая сшивка может происходить в процессе трансляции поврежденной мРНК в бесклеточной белоксинтезирующей системе, что приводит к образованию трансляционного комплекса с ковалентно фиксированной на рибосоме мРНК. Известно, что в клетке комплексы с мРНК, «застывшей» на рибосоме, являются мишенями для пути No-Go Decay, предназначенного для их разборки и деградации поврежденных мРНК и «недосинтезированных» пептидов (сопряженный с ним путь Ribosome-based Quality Control) (для обзора см. Inada, 2020). Следовательно, полученные результаты указывают на существование неизвестного ранее молекулярного

механизма, посредством которого рибосомы участвуют в контроле качества мРНК, основанном на образовании ковалентной связи между АП-сайтом мРНК и белком uS3 40S субчастицы.

Таким образом, результаты настоящего исследования значительно расширили знания о неканонических функциях рибосомного белка uS3 человека как в составе рибосомы, так и вне ее. Полученные в ходе исследования результаты могут иметь принципиальное значение для понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе развития многих опасных патологий, связанных с нарушениями в процессах репарации повреждений в ДНК и с накоплением поврежденных мРНК.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Белок uS3 в составе зрелых цитоплазматических 40S субчастиц рибосом человека не обладает АП-лиазной активностью, но может сшиваться посредством своего пептида 55-64 с АП-сайтом в оц-ДНК; такой сшивки не происходит, когда uS3 находится в составе ядерных пре-40S частиц.
2. АП-лиазная активность изолированного белка uS3 по отношению к оц-ДНК существенно выше, чем к дц-ДНК. При расщеплении АП-сайта uS3 образует ковалентные аддукты как с продуктом расщепления ДНК, так и, в меньшей степени, с нерасщепленной ДНК; это расщепление происходит с участием района 155-192 белка uS3.
3. В клеточном ядре изолированный белок uS3 взаимодействует преимущественно с прицентромерными районами хромосом и его доменами, ассоциированными с ядрышком.
4. Синтетические аналоги мРНК, фиксированные в канале рибосомы кодон-антикодоновым взаимодействием с тРНК в Р-участке, способны сшиваться с пептидом 55-64 белка uS3 с помощью АП-сайта, находящегося вне рибосомы вблизи участка входа мРНК в канал.
5. Синтетические аналоги мРНК, содержащие АП-сайт, могут сшиваться через этот сайт с пептидом 55-64 белка uS3 в процессе трансляции. Сшивка происходит, когда в ходе движения мРНК относительно рибосомы АП-сайт оказывается в наиболее благоприятном положении относительно этого пептида.

**Апробация работы и публикации результатов.** По результатам работы опубликовано 5 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Основные результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: VII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (12-17 июля 2015 г., Новосибирск, Россия); международная конференция «Химическая биология-2016», посвященная 90-летию юбилею академика Д.Г.Кнорре (24-29 июля 2016 г., Новосибирск, Россия); II Всероссийская конференция с международным участием «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (18-23 июня 2017 г., Новосибирск, Россия); международная научная конференция «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» и VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (18-22 сентября 2017 г., Москва, Россия); XVIII Всероссийский симпозиум «Структура и функции клеточного ядра» (16-18 октября 2018 г., Санкт-Петербург, Россия), 44th FEBS Congress (6-11 July, 2019,

Krakow, Poland); X Российский симпозиум «Белки и пептиды» (3-7 октября 2022 г., Сочи, Россия).

**Личный вклад автора.** Представленные в диссертационной работе результаты в основном получены лично автором. Выделение пре-40S субчастиц рибосом из ядер клеток HEK293T проведено в ЛСФР ИХБФМ СО РАН А.В. Ивановым. Пробоподготовка ChIP-Seq-образцов для получения библиотек ДНК выполнена в ЛСФР А.В. Гопаненко. Приготовление библиотек ДНК с их последующим высокопроизводительным секвенированием и первичной обработкой данных проведено в ЦПК «Геномика» ИХБФМ СО РАН А.Е. Тупикиным и М.Р. Кабиловым; биоинформатический анализ данных выполнен М.Р. Кабиловым. Аналоги мРНК с защитной группой были синтезированы в ЛХРНК ИХБФМ СО РАН М.И. Мещаниновой.

**Структура и объем диссертации.** Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 123 страницах, содержит 36 рисунков, 3 таблицы. Библиография включает 281 литературный источник.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

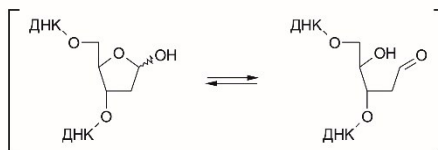
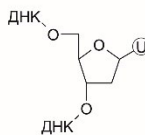
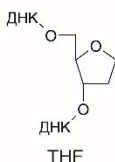
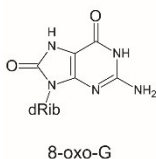
### 1. Способность белка uS3 в составе 40S субчастиц рибосом сшиваться с АП-сайтом в оц-ДНК

На первом этапе работы было исследовано, способен ли uS3 человека в составе рибосомы сшиваться с АП-сайтом в ДНК и расщеплять ДНК по этому сайту подобно тому, как это делает изолированный uS3 (Балуева и др., 2008). Для этой цели была использована модельная 23-звенная одноцепочечная (оц) ДНК, несущая звенья, имитирующие различные окислительные повреждения (рис. 1) и 40S субчастицы рибосом из плаценты человека.

оц-ДНК: 5'-СТСТСССТТСТХСТССТТТСТСТ-3'

«ДНК: 5'-AGAGGAAAGGAGCGAAGGGAGAG-3'

Х=G, 8-охо-G, dU или THF

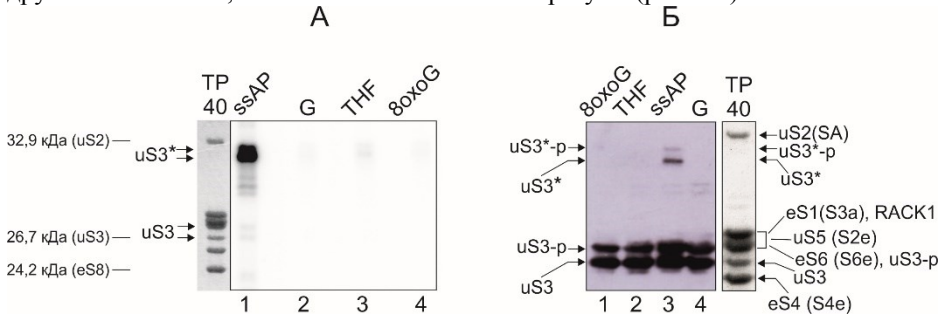


АП-сайт

**Рисунок 1.** Модельные ДНК, использованные в данной части работы. Оц-ДНК,

одноцепочечная 23-звенная модельная ДНК; кДНК, комплементарный ей 23-мер; THF, тетрагидрофуран; 8-охо-G, 8-оксогуанин. Остаток dU в соответствующем 23-мере превращали в АП-сайт перед использованием с помощью урацил-ДНК-гликозилазы. Он представлен в равновесии между гидроксильной и альдегидной формами (в природе равновесие преимущественно сдвинуто в сторону гидроксильной формы (Wilde et al., 1988).

Радиоавтограф геля, представленный на рис. 2А, отображает результаты сшивки 40S субчастиц с меченными 23-мерными оц-ДНК, несущими вставки, моделирующие различные окислительные повреждения. Видно, что рибосомный белок сшивается только с оц-ДНК, содержащей АП-сайт (рис. 2А, дорожка 1). Иммуноблоттинг с использованием антител против белка uS3 (рис. 2Б) выявил интенсивный дублет, соответствующий немодифицированному uS3, а также более слабую двойную полосу на дорожке 3, чье положение соответствует положению дублета на радиоавтографе (рис. 2А). Следовательно, сшивка оц-ДНК происходит именно с белком uS3 через АП-сайт. Модельные ДНК с другими вставками, сшивки с белком uS3 не образуют (рис. 2А).

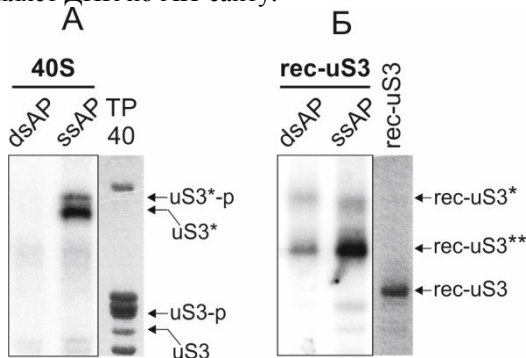


**Рисунок 2.** Идентификация сшивок модельных оц-ДНК с рибосомным белком uS3 в составе 40S субчастицы. (А) Анализ рибосомных белков 40S субчастиц, инкубированных с 5'-<sup>32</sup>P-мечеными модельными ДНК, с помощью SDS-ПААГ. Радиоавтограф геля. (Б) Анализ рибосомных белков 40S субчастиц, инкубированных с модельными ДНК, с помощью иммуноблоттинга с использованием специфических антител против uS3 кролика. Дорожки «ТР40» соответствуют суммарному белку 40S субчастицы после разделения в SDS-ПААГ и окрашивания геля Coomassie R250. Полосы, соответствующие рибосомным белкам, подписаны на рисунке (uS3-p – белок uS3 в фосфорилированной форме); полосы, соответствующие сшитому белку uS3, обозначены звездочками. Обозначения 8охоG, THF, ssAP и G соответствуют опытам с 40S субчастицами, инкубированными с оц-ДНК, содержащими соответственно остатки 8-оксогуанина, тетрагидрофурана, АП-сайт или немодифицированный G.

## 2. Различия во взаимодействиях с АП-сайтами ДНК белка uS3 в составе 40S субчастиц рибосом и изолированного uS3

Сравнительный анализ способностей рекомбинантного рибосомного белка uS3 человека (rec-uS3) и белка uS3 в составе 40S субчастиц рибосом человека сшиваться с АП-сайтом в оц-ДНК и дц-ДНК был проведен с использованием описанных выше 23-мерных 5'-<sup>32</sup>P-меченых модельных ДНК и последующего разделения сшитых белков с помощью SDS-ПААГ. Оказалось, что uS3 в составе 40S субчастицы образует сшивки только с оц-АП-ДНК (рис.

3А), а гес-uS3 – как с оц-АП-ДНК, так и с дц-АП-ДНК, хотя с последней намного менее эффективно (рис. 3Б). В результате сшивки гес-uS3 с АП-ДНК образуются два продукта: минорный соответствует белку, сшитому с полноразмерной АП-ДНК, а мажорный – белку, сшитому с 5'-концевым 10-звенным фрагментом АП-ДНК, образующимся после ее расщепления по АП-сайту (рис. 3Б). Белок uS3 в составе 40S субчастиц сшивается только с полноразмерной ДНК, что указывает на то, что гес-uS3 и uS3 в составе 40S субчастиц сшиваются с АП-ДНК по-разному и что uS3 в составе рибосомы, по-видимому, не расщепляет ДНК по АП-сайту.



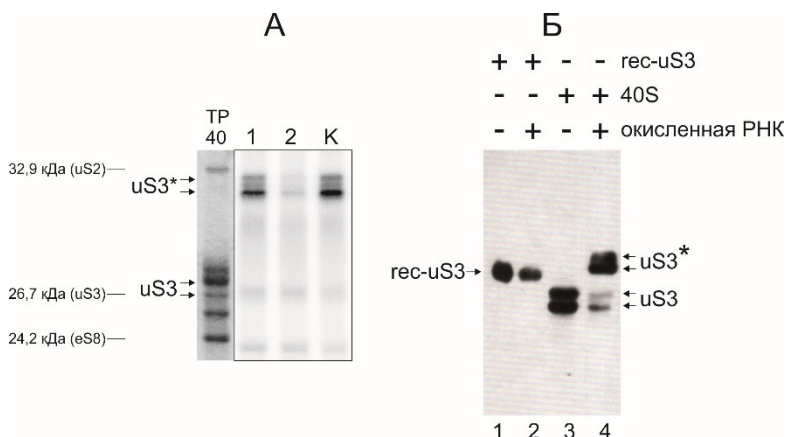
**Рисунок 3.** Анализ сшивки 5'-<sup>32</sup>P-меченых дц-АП-ДНК и оц-АП-ДНК (dsAP и ssAP соответственно), с белком uS3 в составе 40S субчастицы рибосом человека (А) и с гес-uS3 (Б) с помощью SDS-ПААГ. Радиоавтограф геля. Rec-uS3\*\* – гес-uS3, сшитый с фрагментом ДНК, оставшимся после ее расщепления по АП-сайту, гес-uS3\* – гес-uS3, сшитый с полноразмерной 23-звенной ДНК. Полосы, соответствующие фосфорилированному белку uS3, обозначены uS3-p; полосы, соответствующие сшитому белку uS3, обозначены звездочками.

### 3. Участок сшивки белка uS3 в составе 40S субчастиц рибосом с АП-сайтом оц-ДНК

Ранее было показано, что uS3 в составе 40S субчастиц с высокой эффективностью сшивается с диальдегидными производными любых коротких РНК посредством участка 55-64 в КН-домене (от англ. K homology domain), экспонированного на поверхности субчастицы (Sharifulin et al., 2015). Для того, чтобы проверить, не с этим ли участком сшивается АП-сайт в оц-ДНК, его предварительно блокировали сшивкой с производным олигорибонуклеотида с 3'-концевой рибозой, окисленной до диальдегида. Результаты, представленные на рис. 4А (дорожка 2) показывают, что блокирование пептида 55-64 uS3 с помощью сшивки с окисленным производным нонарибонуклеотида лишает 40S субчастицу способности сшиваться с оц-АП-ДНК, следовательно, участок сшивки оц-АП-ДНК находится во фрагменте 55-64 или прилегает к нему.

Наконец, с помощью иммуноблотинга с использованием антител против белка uS3 установлено, что гес-uS3, в отличие от uS3 в составе 40S субчастицы, не взаимодействует с диальдегидным производным нонарибонуклеотида, что говорит о структурном различии белка в составе рибосомы и вне ее (рис. 4Б, дорожка 2).



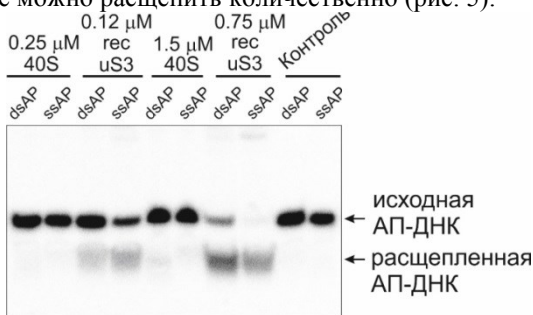


**Рисунок 4.** Сшивка 3'-диальдегидного производного нонарибонуклеотида AAUAAAUC («окисленная РНК») с белком uS3 в составе 40S субчастицы (А) и с гес-uS3 (Б), и влияние производного, сшитого с белком uS3 в составе 40S субчастицы, на способность uS3 сшиваться с оц-АП-ДНК. Панель А, радиоавтограф геля после разделения в SDS-ПААГ белков, выделенных из 40S субчастиц, инкубированных с 5'-<sup>32</sup>P-меченой оц-АП-ДНК в отсутствие производного нонарибонуклеотида (1), из 40S субчастиц, предварительно инкубированных с этим производным (2), и из 40S субчастиц, предварительно инкубированных с немодифицированным нонарибонуклеотидом (3). Панель Б, иммуноблот после инкубации гес-uS3 (дорожка 2) и 40S субчастиц (дорожка 4) с производным AAUAAAUC. Дорожки 1 и 3 соответствуют контрольным гес-uS3 (1) и 40S субчастицам (3), инкубированным в отсутствие производного нонарибонуклеотида. Звездочкой обозначены полосы, соответствующие сшитому uS3.

#### 4. Анализ АП-лиазной активности изолированного рибосомного белка uS3

Для анализа способности гес-uS3 расщеплять ДНК, содержащие АП-сайт, использовали описанную выше модельную 23-мерную оц-АП-ДНК и ее дуплекс с комплементарным 23-мером в качестве дц-АП-ДНК. Оказалось, что гес-uS3 расщепляет оц-АП-ДНК намного эффективнее, чем дц-АП-ДНК, и при достаточной концентрации белка ее можно расщепить количественно (рис. 5).

**Рисунок 5.** Анализ расщепления 0.5 мкМ 5'-<sup>32</sup>P-меченых оц-АП-ДНК (ssAP) и дц-АП-ДНК (dsAP), инкубированных с гес-uS3 или 40S субчастицами, взятыми в разных концентрациях (обозначены сверху). Радиоавтограф геля после разделения в ПААГ в присутствии 8 М мочевины. Дорожки «Контроль» соответствуют экспериментам с модельными ДНК, инкубированными в отсутствие гес-uS3 и 40S субчастиц.

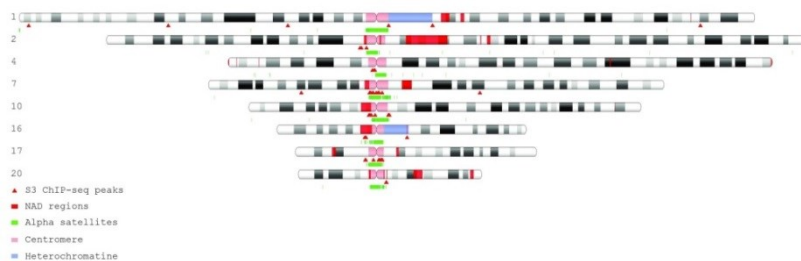


Результаты по расщеплению АП-ДНК белком гес-uS3 хорошо коррелируют с приведенными выше данными по сшивкам этого белка с АП-ДНК (раздел 2), показывающими преимущественное сшивание гес-uS3 с продуктом расщепления модельной ДНК, то есть с 10-мером (рис. 3Б). Что касается белка uS3 в составе 40S субчастицы рибосомы, он, как оказалось, вообще неспособен расщеплять АП-ДНК (см. рис. 5; соответствующее предположение уже было сделано в разделе 2), причем расщепления не удавалось наблюдать даже при максимально достижимых концентрациях (5 мкМ) 40S субчастиц (соответствующий радиоавтограф не приведен).

## 5. Участки связывания рибосомного белка uS3 на геномной ДНК в составе хроматина и проверка способности белка uS3 в составе ядерных пре-40S частиц взаимодействовать с АП-сайтами в оц-ДНК

Для получения информации о функциональной роли белка uS3 в клетке была проведена идентификация участков связывания этого белка на геномной ДНК человека с использованием метода ChIP-Seq на клетках HEK293. Глубокое секвенирование и обработка результатов ChIP-Seq с помощью коммерческого программного обеспечения CLC GW позволило получить около 15 миллионов уникальных последовательностей ДНК (ридов). В результате картирования этих ридов на геномной ДНК (версия генома человека hg38) получили 229 пиков, локализованных преимущественно в прицентромерных районах хромосом (в частности, хромосом 1, 2, 4, 7, 10, 16, 17 и 20, см. рис. 6). В хромосомах 7, 10, 16 и 20 пики совпадали с регионами хроматина, называемыми NAD (от англ. nucleolus-associated chromatin regions), или примыкали к ним (рис. 6).

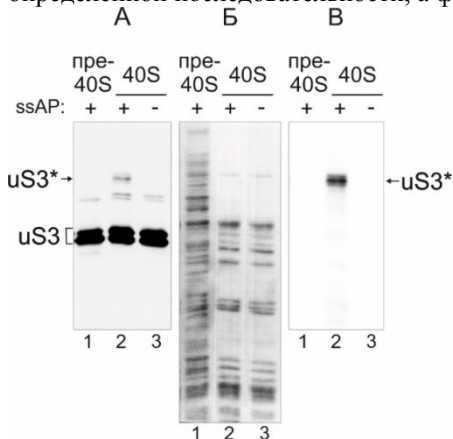
Дальнейший анализ участков связывания рибосомного белка uS3 показал, что большинство из них находится в районах, гиперчувствительных к ДНКазе I, где хроматин находится в менее конденсированном состоянии и доступен как для расщепления ДНКазой, так и для связывания ДНК-связывающих белков. Кроме того, центромерные и прицентромерные районы хромосом, в которых uS3 связывается преимущественно, содержат много альфа-сателлитных повторов, склонных к формированию петель с одноцепочечными участками ДНК, где содержание АП-сайтов резко повышено (Fernández et al., 2001; Cortés et al., 2003; Aze et al., 2016).



**Рисунок 6.** Распределение пиков ChIP-Seq для рибосомного белка uS3 на идеограммах хромосом версии генома hg38. Приведены только те хромосомы, в которых найдено более 5 пиков. Положения пиков показаны красными стрелками. Районы хромосом отмечены разными цветами в соответствии с обозначениями, приведенными внизу слева.

Однако метод ChIP-Seq не позволяет узнать, в каком состоянии (изолированном или в составе ядерных пре-40S частиц) рибосомный белок uS3 взаимодействует с тем или иным участком ДНК. Для решения этого вопроса был проведен эксперимент для проверки способности белка uS3 в составе пре-40S частиц сшиваться с АП-сайтом в оц-ДНК. Для этого использовали ту же модельную 23-х мерную оц-АП-ДНК (рис. 1), что и для изучения сшивок с uS3 в составе зрелых 40S субчастиц, и пре-40S частицы, выделенные из ядер клеток НЕК293 человека. Результаты радиоавтографа (рис. 7В) и иммуноблоттинга с использованием антител против рибосомного белка uS3 (рис.7А) показали, что белок uS3 в составе пре-40S частиц не способен сшиваться с АП-сайтами в оц-ДНК. Таким образом, в ядре хроматин может взаимодействовать только со свободным белком uS3.

Анализ последовательностей ДНК хроматина в участках связывания рибосомного белка uS3 человека, идентифицированных методом ChIP-Seq, выявил консенсусные последовательности, выравнивание которых показало наличие в их структуре повторов TGGAA. Для оценки влияния наличия этого повтора в ДНК на величину ее сродства к белку uS3 и эффективность расщепления белком uS3 по АП-сайту проводили эксперименты *in vitro* с использованием гес-uS3 и 25-звенными модельными оц-ДНК, содержащими и не содержащими пентамеры TGGAA. Оказалось, что все они имеют сродство к белку и эффективность расщепления по АП-сайту в пределах одного порядка (соответствующие данные не приведены). Очевидно, основным критерием выбора белком uS3 участков на хроматине является не узнавание какой-либо определенной последовательности, а физическая доступность для связывания.

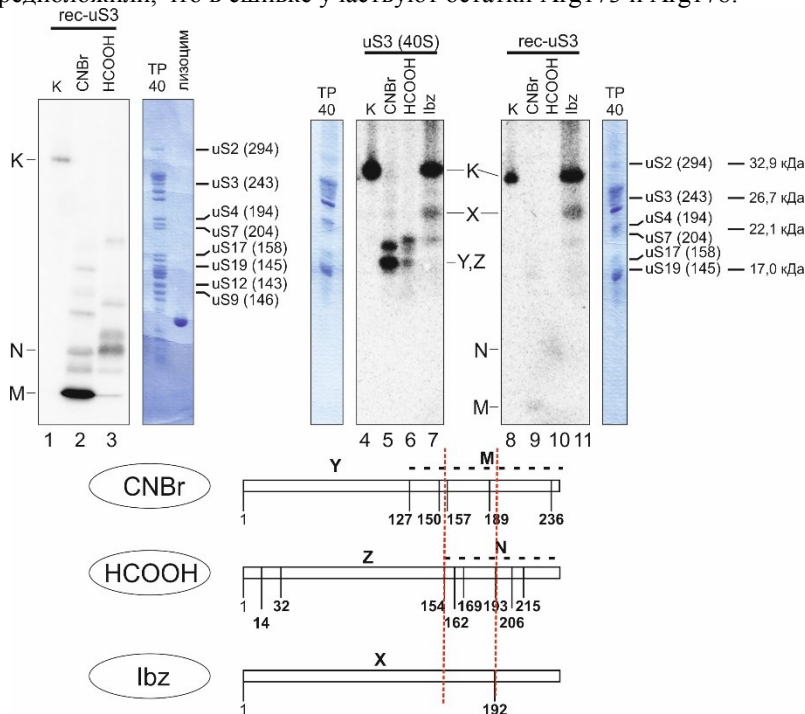


**Рисунок 7.** Анализ сшивок 5'-<sup>32</sup>P-меченой оц-АП-ДНК (ssAP) с белком uS3 в составе 40S субчастиц рибосом из плацент человека (40S) или пре-40S частиц из ядерного экстракта клеток НЕК293 (пре-40S). Иммуноблоттинг рибосомных белков, разделенных в SDS-ПААГ, с использованием антител против рибосомного белка uS3 (А); нитроцеллюлозная мембрана, окрашенная Ponseau C, перед ее использованием в иммуноблоттинге (Б); радиоавтограф мембраны (В). Стрелками показаны полосы, соответствующие белку uS3, сшитому (uS3\*) и не сшитому (uS3) с модельной ДНК.

## 6. Аминокислотные остатки белка uS3, взаимодействующие с АП-сайтом в составе модельной ДНК

Чтобы идентифицировать район гес-uS3, участвующий в расщеплении ДНК по АП-сайту, белок со сшитой через АП-сайт радиоактивно меченой 23-звенной модельной ДНК, обозначенной в разделе 1 как ssAP, обрабатывали в параллельных экспериментах специфическими протеолитическими агентами –

бромцианом, муравьиной кислотой и йодозобензойной кислотой. Продукты, полученные в результате расщепления (см. рис. 8) сравнивали с контролем, в котором белок uS3, был сшит с АП-ДНК посредством установленного ранее района 55-64 в составе 40S субчастицы (рис. 8, дорожки 4-7). Интересно, что сшивка гес-uS3 с АП-ДНК стабильна в условиях анализа даже без восстановления. Комбинация результатов расщепления гес-uS3, сшитого с модельной ДНК тремя использованными протеолитическими агентами позволяет заключить, что участок сшивки расположен в области 155-192 С-концевого домена белка uS3 (см. схему на рис. 8). Следует отметить, что ни с одним из трех использованных здесь протеолитических агентов не удалось достичь исчерпывающего расщепления белка uS3, и мы наблюдали полосы, соответствующие как продуктам его как полного, так и неполного расщепления. Принимая во внимание аномальную для оснований Шиффа стабильность сшивки гес-uS3 в районе 155-192 с АП-сайтом в ДНК, и известные данные о том, что такая стабильность характерна для сшивок с участием остатков аргинина, мы предположили, что в сшивке участвуют остатки Arg173 и Arg178.



**Рисунок 8.** Идентификация участка сшивки модельной АП-сайт-содержащей ДНК в белке гес-uS3. Анализ с помощью SDS-ПААГ меченых пептидов, полученных в результате расщепления с помощью CNBr, муравьиной кислоты (HCOOH) или Ibz сшитого с модельной ДНК гес-uS3 или uS3 в составе 40S субчастицы (референсная сшивка). Контрольные дорожки К (1), (4), (8) соответствуют сшитому uS3 (рекомбинантному или из 40S субчастиц), необработанному протеолитическими агентами. Дорожка «TP40» - окрашенные Coomassie R250 полосы, полученные при

разделении суммарного белка 40S субчастиц; некоторые из рибосомных белков указаны с длинами их пептидных цепей, обозначенными в количестве аминокислотных остатков (в скобках). Окрашенная дорожка с лизоцимом (длиной 129 аа) представлена в качестве дополнительного маркера. Радиоактивные полосы, соответствующие продуктам полного расщепления белка uS3, сшитого с модельной ДНК, обозначены как X, Y, Z, M и N. Ниже электрофореграмм приведены схематические изображения (карты) расщепления белка uS3 человека CNBr, HCOOH и Ibz, на которых отмечены сшитые пептиды uS3, образующиеся при расщеплении uS3 каждым из агентов. Пунктирные линии черного цвета над схемами соответствуют коротким сшитым пептидам M и N. Вертикальными пунктирными линиями красного цвета показаны границы области 155-192, в пределах которой расположен сайт сшивки белка uS3 с модельной ДНК. Результаты расщепления гес-uS3 CNBr и HCOOH дублированы на правой и левой панелях.

## 7. Способность мРНК, фиксированной в мРНК-связывающем канале рибосомы, сшиваться посредством АП-сайта с пептидом 55-64 белка uS3

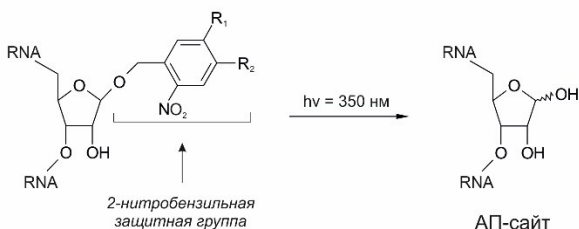
Обнаруженная нами (см. выше) биологически незначимая способность зрелых 40S субчастиц сшиваться с АП-сайтами в оц-ДНК могла бы отражать функцию uS3 в составе рибосомы, связанную с его взаимодействием с такими сайтами в цитоплазматических мРНК. Известно, что 40S субчастица рибосомы человека способна эффективно сшиваться с диальдегидными производными неструктурированных РНК посредством пептида 55-64 белка uS3, расположенного на ее поверхности вблизи входа в мРНК-связывающий канал (Sharifulin et al., 2015; Sharifulin et al., 2016). Поэтому можно было полагать, что этот пептид способен взаимодействовать с АП-сайтами в мРНК, поскольку они могут существовать в открытой альдегидной форме (см. рис. 1). Принимая во внимание вышесказанное, мы проверили, может ли АП-сайт в мРНК, связанной с 40S субчастицами, взаимодействовать с пептидом 55-64 белка uS3. Для этой цели были использованы два аналога мРНК (длиной 23 и 30 нуклеотидов), содержащие на 5'-конце триплет UUC, позволяющий фиксировать мРНК в рибосомном канале с помощью взаимодействия с тРНК<sup>Phe</sup> в Р-участке, и АП-сайт на 3'-конце, защищенный фотолabileйной 2-нитробензильной группой, которую можно деблокировать мягким УФ-светом в нужный момент (рис. 9, верхняя и средняя части).

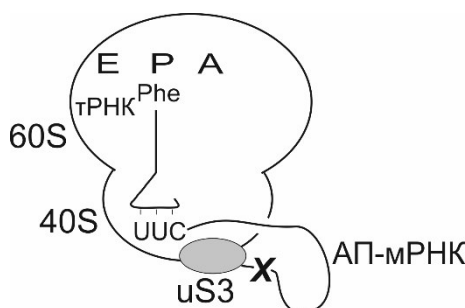
АП-мРНК<sub>23</sub>: UUC GAC AAC AAA CAC AAC AAA C-**X**     **X**, АП-сайт

мРНК<sub>23</sub>: UUC GAC AAC AAA CAC AAC AAA CA

АП-мРНК<sub>30</sub>: UUC GAC AAC AAA CAC AAC AAA GGA AUA AC-**X**

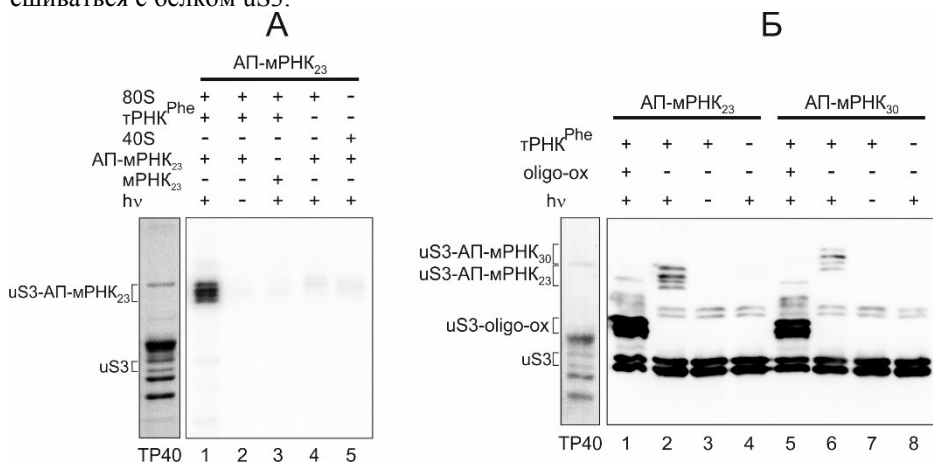
мРНК<sub>30</sub>: UUC GAC AAC AAA CAC AAC AAA GGA AUA ACA





**Рисунок 9.** Аналоги мРНК, содержащие защищенный АП-сайт, соответствующие немодифицированные аналоги, схема снятия защитной группы с АП-сайта и схематическое изображение рибосомного комплекса, где 5'-концевой триплет UUC аналога мРНК связан с тРНК<sup>Phe</sup> в Р-участке рибосомы, а 3'-конец шит с экспонированным фрагментом белка uS3 через АП-сайт, который обозначен как «X». А, Р и Е – участки связывания тРНК на рибосоме (соответственно, аминокислотный, пептидный и участок выхода).

Была проанализирована способность аналога мРНК, фиксированного в мРНК-связывающем канале посредством кодон-антикодонного взаимодействия с тРНК в Р-участке, сшиваться с экспонированным пептидом белка uS3 через АП-сайт на 3'-конце мРНК, расположенный вне рибосомы (рис. 9). Результаты анализа рибосомных белков, выделенных из комплексов рибосом с 5'-<sup>32</sup>Р-меченной АП-мРНК<sub>23</sub>, на радиоавтографе на рис. 10А показывают, что сшивка происходила именно с деблокированным АП-сайтом и только тогда, когда мРНК была фиксирована в мРНК-связывающем канале кодон-антикодонным взаимодействием между тРНК<sup>Phe</sup> и триплетом UUC в Р-участке. Результаты иммуноблоттинга, представленные на рис. 10Б (дорожки 2-4, 6-8), показывают те же самые закономерности, что наблюдали на радиоавтографе, для обоих аналогов АП-мРНК<sub>23</sub> и АП-мРНК<sub>30</sub>. Следовательно, АП-сайт на 3'-конце мРНК, закрепленной в мРНК-связывающем канале рибосомы, действительно может сшиваться с белком uS3.



**Рисунок 10.** Сшивка аналогов мРНК, содержащих АП-сайт, с белком uS3 в рибосомных комплексах, в которых эти аналоги были фиксированы в мРНК-связывающем канале с помощью тРНК<sup>Phe</sup>. Радиоавтограф геля после разделения в SDS-ПААГ белков, выделенных из соответствующих комплексов, инкубированных с 5'-<sup>32</sup>P-меченым аналогом АП-мРНК<sub>23</sub> (А). Иммуноблотинг рибосомных белков, выделенных из комплексов, инкубированных с немечеными аналогами АП-мРНК<sub>23</sub> или АП-мРНК<sub>30</sub>, где АП-сайт оставался заблокированным («hv-») или был деблокирован («hv+») с помощью УФ-облучения (Б). Иммуноблотинг проведен с использованием антител против рибосомного белка uS3. В отдельных экспериментах 40S субчастицы перед добавлением мРНК и тРНК сшивали с 3'-диальдегидным производным нонамера AAUAAAUAU (обозначенным как «oligo-ox»), взятым в 25-кратном молярном избытке относительно рибосом. TP40 – суммарный белок рибосомных 40S субчастиц, разделенных в SDS-ПААГ и окрашенных Coomassie R250 (А) или Ponceau C (Б).

## 8. Сшивки мРНК, содержащей АП-сайт, с рибосомным белком uS3 могут происходить прямо в процессе трансляции

MPHK K: GCCGCCACC**AUG**UUUCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU  
MPHK24: GCCGCCACC**AUG**UUUCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU**X**  
MPHK30: GCCGCCACC**AUG**UUUCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU**X**  
MPHK35: GCCGCCACC**AUG**UUUCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU**X**

**X**, АП-сайт

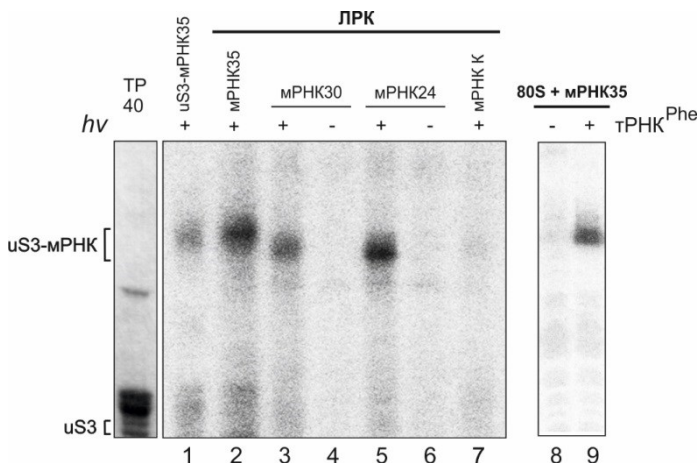
**Рисунок 11.** Последовательности использованных аналогов мРНК, в которых выделены старт-кодон AUG и АП-сайт (X).

мРНК (по крайней мере, до стадии образования пост-инициаторного комплекса), служило накопление [ $^{35}\text{S}$ ]-Met в 80S рибосомных фракциях, которое практически полностью зависело от присутствия аналогов мРНК. Для получения дополнительной информации о природе 80S рибосомных комплексов, образующихся при трансляции модельных мРНК, была проанализирована природа содержащихся в них молекул тРНК (в этом случае трансляцию модельных мРНК в ЛРК останавливали антибиотиком анизомицином, блокирующем образование пептидной связи). Оказалось, что в опытах со всеми использованными аналогами мРНК комплексы 80S рибосом, содержат тРНК<sup>Phe</sup> в сопоставимых количествах. Это указывает на то, что мРНК, содержащие АП-сайт, участвуют в процессе элонгации, по крайней мере, на стадии связывания Phe-тРНК<sup>Phe</sup> с фенилаланиновым кодоном мРНК, следующим за кодоном AUG в рибосомном Р-участке.

Чтобы узнать, может ли мРНК посредством АП-сайта сшиваться с uS3 в 40S субчастице в процессе трансляции, мы проанализировали с помощью SDS-ПААГ суммарный белок из фракций 80S рибосом, выделенных из смесей, полученных в результате инкубации ЛРК, лишённого эндогенной мРНК, с 5'- $^{32}\text{P}$ -мечеными мРНК24, мРНК30 или мРНК35. Для идентификации радиоактивных полос, соответствующих сшитому с ними uS3, мы использовали образец, полученный в результате инкубации 40S субчастиц рибосом человека с мРНК35, взятой в высокой концентрации, в условиях генерирования неспецифической сшивки альдегидных производных олигорибонуклеотидов с пептидом 55-64 белка uS3 (рис. 12, дорожка 1). Этот тип сшивки происходит гораздо менее эффективно, чем при фиксации немодифицированной части альдегид-содержащей РНК в рибосомном канале путем взаимодействия с тРНК (см. раздел 7), поэтому его можно выявить только при использовании очень высоких концентраций рибосом и производного РНК (Sharifulin et al., 2016; Sharifulin et al., 2015).

Результаты, представленные на рис. 12, показывают, что инкубация АП-сайт-содержащих аналогов мРНК в ЛРК в условиях трансляции приводит к появлению радиоактивных полос (дорожки 2, 3 и 5), соответствующих uS3, сшитому с мРНК посредством ее АП-сайта. Следует заметить, что инкубация модельных мРНК с 80S рибосомами в отсутствие тРНК в концентрациях, близких к таковым в опытах с ЛРК, не привела к появлению интенсивных радиоактивных полос, соответствующих их сшивкам с uS3 (рис. 12, дорожка 8). Это свидетельствует о том, что радиоактивные полосы, наблюдаемые с АП-сайт-содержащими аналогами мРНК (рис. 12) в опытах с ЛРК, не являются результатом неспецифической сшивки рибосом с аналогами мРНК, а произошли в составе трансляционных комплексов. В этих комплексах немодифицированная 5'-концевая часть мРНК, очевидно, находилась в рибосомном канале, а 3'-концевая часть с АП-сайтом – вне его, что и позволяло АП-сайту сшиваться с пептидом 55-64 uS3.



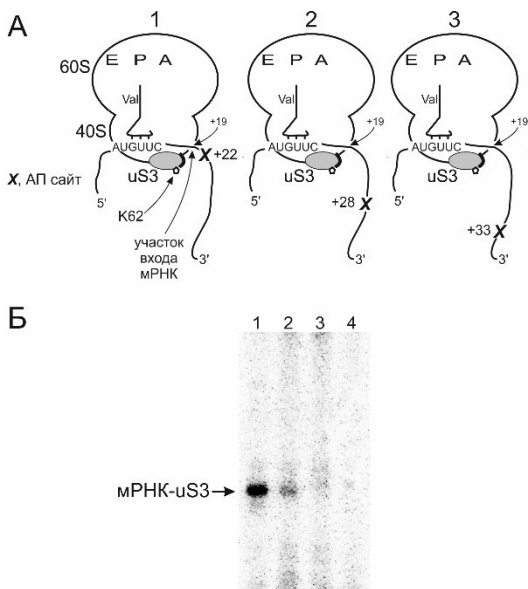


**Рисунок 12.** Анализ рибосомных белков, сшитых с 5'-<sup>32</sup>P-мечеными модельными мРНК (примерно с одинаковой удельной радиоактивностью) при их трансляции в ЛРК, обработанном МНазой, с помощью электрофореза в SDS-ПААГ (дорожки 2-7). Концентрация эндогенных рибосом в трансляционных смесях составляла  $\approx 0,05$  мкМ. Слева представлена дорожка, показывающая разделение суммарного белка 40S субчастицы с последующим окрашиванием геля Coomassie R250 (TP40). Полосы, соответствующие uS3, сшитому с модельными мРНК, обозначены как uS3-мРНК. Обозначение *hν* соответствует облучению мягким УФ-светом для снятия защиты с АП-сайтов мРНК перед их загрузкой в трансляционную систему. Дорожка 1 (uS3-мРНК35) соответствует эталонной сшивке белка через пептид 55-64 с мРНК35, полученной инкубацией меченой мРНК с 40S субчастицами человека, взятыми в концентрации 2.5 мкМ. Дорожки 8 и 9 относятся к uS3, сшитому с мРНК35 в 80S рибосомных комплексах, полученных без ЛРК при концентрациях 80S рибосом и мРНК, таких же, как и в экспериментах с ЛРК.

Как видно из результатов, представленных на рис. 12, при трансляции в ЛРК выход сшивки примерно одинаков для всех модельных мРНК (дорожки 2, 3 и 5). Это указывает на то, что они происходили, когда АП-сайт в мРНК в ходе трансляции попадал в общее для всех аналогов благоприятное для сшивания положение относительно пептида 55-64 белка uS3. Если бы это было не так, то выходы сшивок uS3 с этими мРНК различались бы, так как расстояния от АП-сайта, расположенного в 3'-концевой части мРНК вне рибосомного канала, до участка входа мРНК в рибосому и, соответственно, до пептида 55-64 uS3, были бы различны для мРНК24, мРНК30 и мРНК35. Для доказательства данного утверждения были проведены модельные эксперименты по сшиванию одних и тех же аналогов мРНК с uS3 в составе 80S рибосомных комплексов человека, в которых мРНК были фиксированы в канале рибосомы путем взаимодействия триплета GUU с тРНК<sup>Val</sup> в Р-участке рибосомы аналогично тому, как это было сделано выше (см. раздел 7). В этих комплексах рамка считывания была смещена на два нуклеотида относительно той, в которой AUG является стартовым кодоном (рис. 13А), поэтому АП-сайт мРНК находился в положениях +22, +28 или +33. Результаты анализа сшивок аналогов мРНК с uS3 в составе

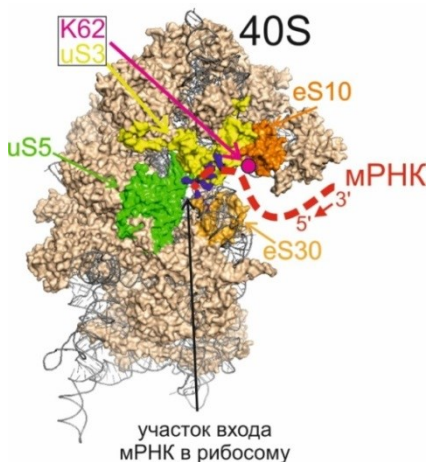
этих комплексов (рис. 13Б) показали, что выход сшивок мРНК с uS3 резко снижается при удалении АП-сайта от положения +22, которое, по-видимому, является наиболее благоприятным из трех выбранных положений для сшивания АП-сайта с пептидом 55-64 uS3. Таким образом, эти результаты подтверждают вышеупомянутое утверждение об общем для всех аналогов мРНК положении АП-сайта относительно указанного выше пептида белка uS3, благоприятном для сшивки, при трансляции этих аналогов.

Анализ структуры 40S субчастиц, проведенный в (Malugin et al., 2019), выявил кластер положительно заряженных аминокислотных остатков между пептидом 55-64 uS3 и участком входа мРНК в рибосомный канал, который, как предполагают авторы, и отвечает за лабильное связывание с мРНК в процессе трансляции. Этот кластер мог бы притягивать к себе район мРНК, находящийся между пептидом 55-64 и участком входа мРНК в канал во время трансляции, и тем самым заставлять мРНК (и, соответственно, АП-сайт при его наличии в ней) проходить мимо данного пептида перед тем, как войти в рибосому (рис. 14).



**Рисунок 13.** Сшивка мРНК, содержащих АП-сайт, с районом 55-64 uS3 в 80S рибосомных комплексах, в которых мРНК фиксирована в канале с помощью кодон-антикодонного взаимодействия с тРНК<sup>Val</sup> в Р-участке. (А) Схематическое изображение комплексов, где молекулы тРНК изображены как L-подобные объекты, а их антикодоны обозначены тремя вертикальными чертами. (Б) Анализ рибосомных белков, сшитых с 5'-<sup>32</sup>P-мечеными модельными мРНК в вышеуказанных комплексах, с помощью электрофореза в SDS-ПААГ. Радиоавтограф геля, на котором дорожки 1-4 соответствуют комплексам с мРНК24, мРНК30, мРНК35 и мРНК К, соответственно. Отмечена основная полоса, соответствующая uS3, сшитому с аналогами мРНК (мРНК-uS3).

Можно предположить, что пептид 55-64 uS3 в процессе трансляции сканирует мРНК на наличие АП-сайта, и когда находит его, то сшивается с ним, что должно неизбежно привести к остановке трансляции. Такой рибосомный комплекс с «застывшей» мРНК, как уже было сказано выше, является мишенью для клеточного пути No-Go Decay.



**Рисунок 14.** Карман для лабильного связывания неструктурированных РНК между порой входа мРНК в рибосому и пептидом 55-64 uS3, предложенный в работе (Malygin et al., 2019). Темно-синим цветом обозначены положительно заряженные аминокислотные остатки uS3 и соседних рибосомных белков вблизи участка входа мРНК в рибосому; красной пунктирной линией обозначена входящая в рибосому мРНК.

Таким образом, впервые получены данные, указывающие на то, что 40S субчастица может быть прямым участником процесса контроля качества мРНК в процессе трансляции посредством белка uS3, способного сшиваться АП-сайтом в мРНК.

### Заключение

Результаты настоящей работы позволили получить неизвестную ранее информацию о взаимодействии рибосомного белка uS3 человека с ДНК. Анализ наших данных об участках связывания uS3 на геномной ДНК привел к заключению, что находящийся вне рибосом uS3 предпочитает взаимодействовать с одноцепочечными районами ДНК в районах, физически доступных для связывания белка. Результаты работы указывают на то, что находящийся вне рибосом uS3 может быть участником процесса репарации ДНК в ядрышке и связанном с ядрышком хроматине. Впервые получены данные о пептидном фрагменте 155-192 в С-концевом домене uS3, непосредственно участвующем в АП-лиазной активности белка на стадии образования его ковалентного интермедиата с АП-сайтом. Эта активность отсутствует у белка uS3 в составе зрелых цитоплазматических 40S субчастиц, однако который, тем не менее, способен сшиваться с АП-сайтами в одноцепочечных ДНК.

Обнаруженная в настоящей работе способность uS3 в составе рибосомы сшиваться с АП-сайтом в оц-ДНК не может иметь биологического значения, поскольку зрелые субчастицы находятся в цитоплазме, а ДНК – в ядре. Поэтому было сделано предположение, что данное свойство отражает способность белка взаимодействовать с АП-сайтами в мРНК. Это предположение удалось полностью подтвердить экспериментально, продемонстрировав сшивку АП-сайта в составе мРНК с пептидом 55-64 в N-концевом домене uS3, удаленным от каталитического центра, обеспечивающего АП-лиазную активность. Он находится на внешней поверхности 40S субчастицы вблизи участка входа мРНК и, согласно нашим данным, может сшиваться с АП-сайтами в мРНК в процессе трансляции. Полученные результаты указывают на существование неизвестного

ранее механизма вовлечения рибосом в контроль качества мРНК, основанного на ковалентной фиксации поврежденной мРНК, превращающей соответствующий рибосомный комплекс в мишень для клеточного пути, предназначенного для удаления «застрявших» на рибосоме мРНК. Таким образом, неканонические функции uS3, основанные на его способности взаимодействовать с АП-сайтами, включают в себя его участие в контроле качества как ДНК, так и мРНК, причем в репарации ДНК участвует только белок, находящийся вне рибосомы, а в контроле качества мРНК – белок в составе 40S субчастицы. Эти функции осуществляются двумя отдельными активными центрами, один из которых, предназначенный для взаимодействия с АП-сайтами в ДНК, расположен в С-концевом домене, а второй, для взаимодействия с АП-сайтами в мРНК – в КН (N-концевом) домене.

## Выводы

1. Белок uS3 в составе зрелых цитоплазматических 40S субчастиц рибосом человека, в отличие от изолированного рекомбинантного uS3, не проявляет АП-лиазной активности, однако способен сшиваться с АП-сайтом в одноцепочечной (но не двуцепочечной) ДНК посредством пептида 55-64, экспонированного на поверхности субчастицы вблизи участка входа мРНК, что отражает способность этого пептида к взаимодействию с АП-сайтами в мРНК.

2. Изолированный рекомбинантный рибосомный белок uS3 расщепляет по АП-сайту более эффективно одноцепочечную ДНК по сравнению с двуцепочечной ДНК, сшиваясь при этом с продуктом расщепления ДНК и, в меньшей степени, с нерасщепленной ДНК. Участок сшивки ДНК в изолированном uS3 находится в районе 155-192, расположенном вдали от пептида 55-64, взаимодействующего с АП-сайтами в одноцепочечных нуклеиновых кислотах в составе 40S субчастиц. Это свидетельствует о существовании в рибосомном белке uS3 двух различных центров взаимодействия с АП-сайтами.

3. В клеточном ядре белок uS3, находящийся вне рибосомных частиц, взаимодействует преимущественно с прицентромерными областями хромосом и доменами хроматина, ассоциированными с ядрышком. Основным критерием выбора белком uS3 участков на хроматине является их физическая доступность для связывания, которая, вероятно, обеспечивается отсутствием их экранирования гистонами и/или высоким содержанием одноцепочечных участков.

4. Синтетические аналоги мРНК, содержащие АП-сайт, способны сшиваться с пептидом 55-64 белка uS3, экспонированным на поверхности 40S субчастицы вблизи участка входа мРНК в рибосомный канал, когда неповрежденная 5'-концевая часть мРНК фиксирована в канале кодон-антикодоновым взаимодействием с тРНК, а АП-сайт находится в мРНК на расстоянии нескольких нуклеотидных остатков с 3'-стороны от последнего остатка, находящегося внутри рибосомы.

5. Пептид 55-64 белка uS3 может сшиваться с синтетическими мРНК через АП-сайт в процессе трансляции. Сшивка происходит, когда в ходе движения мРНК относительно рибосомы АП-сайт оказывается в наиболее благоприятном положении относительно этого пептида. Комплекс с ковалентно фиксированной на рибосоме мРНК имеет все свойства мишени для клеточного пути No-Go Десау, предназначенного для удаления поврежденных мРНК, что указывает на существование неизвестного ранее механизма, вовлекающего рибосомы в процесс контроля качества мРНК посредством сшивки АП-сайта с пептидом 55-64 белка uS3.

## Публикации по теме диссертации

1. Grosheva A.S., Zharkov D.O., Stahl J., Gopanenko A.V., Tupikin A.E., Kabilov M.R., Graifer D.M., Karpova G.G. Recognition but no repair of abasic site in single-stranded DNA by human ribosomal uS3 protein residing within intact 40S subunit // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – V. 45. – P. 3833-3843.
2. Ochkasova A.S., Meschaninova M.I., Venyaminova A.G., Ivanov A.V., Graifer D.M., Karpova G.G. The human ribosome can interact with the abasic site in mRNA via a specific peptide of the uS3 protein located near the mRNA entry channel // *Biochimie.* – 2019. – V. 158. – P. 117-125.
3. Ochkasova A.S., Kabilov M.R., Karpova G.G., Graifer D.M. Exploring the Interaction of Human Ribosomal Protein uS3 with Single-Stranded DNAs Having Different Sequences // *Russ. J. Bioorganic Chem.* – 2019. – V. 45. – P. 619-624.
4. Ochkasova A.S., Meschaninova M.I., Venyaminova A.G., Graifer D.M., Karpova G.G. AP sites in various mRNA positions cross-link to the protein uS3 in the translating mammalian ribosome // *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* – 2021. – V. 1869. – e140698.
5. Ochkasova A.S., Arbuzov G.D., Kabilov M.R., Tupikin A.E., Karpova G.G., Graifer D.M. AP lyase activity of the human ribosomal protein uS3: The DNA cleavage sequence specificity and the location of the enzyme active center // *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteom.* – 2022. – V. 1871. – e140880.