

УДК 577.21

МОДИФИКАЦИИ РИБОСОМНОГО ПРОФАЙЛИНГА, ПОЗВОЛЯЮЩИЕ ПОЛУЧИТЬ НОВЫЕ ДАННЫЕ О РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ

Обзор

© 2021 Д.Е. Андреев^{1,2}, В.В. Смирнова¹, И.Н. Шатский^{1*}

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия; электронная почта: shatsky@genebee.msu.su

² ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 30.04.2021

После доработки 18.06.2021

Принята к публикации 18.06.2021

Рибосомный профайлинг (ribosome profiling, riboseq) положил начало изучению трансляции на полном уровне у всех живых организмов. Данный метод основан на глубоком секвенировании фрагментов мРНК, защищаемых рибосомами от разрезания рибонуклеазами, так называемых рибосомных футпринтов. В классическом варианте рибосомный профайлинг вместе с секвенированием РНК позволяет не только довольно точно детектировать транскрибируемые рамки считывания в транскриптом, но и отслеживать изменения в экспрессии генов в ответ на различные воздействия. Основной особенностью данного подхода является то, что в этом варианте рибосомного профайлинга обычно проводится селекция фрагментов мРНК по размеру 25–35 нуклеотидов и при этом не анализируется информация о рибосомных футпринтах других размеров. Кроме того, оригинальный рибосомный профайлинг «усредняет» данные от всех рибосом и не позволяет изучать специфические рибосомные комплексы, ассоциированные с различными трансляционными факторами. Тем не менее разработанные недавно модификации рибосомного профайлинга позволяют ответить на ряд вопросов. В частности, стало возможно наблюдать не только за элонгирующими, но и за сканирующими и реиницирующими рибосомами; наблюдать события, связанные со столкновением рибосом при трансляции мРНК; обнаруживать новые способы котрансляционной сборки мультисубъединичных белковых комплексов, происходящие в процессе трансляции; а также использовать селективное выделение специфических рибосомных комплексов, связанных с определенными белковыми факторами. Новые данные, полученные с помощью этих модифицированных подходов, позволяют лучше понять механизмы регуляции трансляции и функциональную роль компонентов трансляционного аппарата.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рибосомный профайлинг, рибосома, трансляция, белковый синтез, сканирование, мРНК, секвенирование нового поколения.

DOI: 10.31857/S0320972521090050

ВВЕДЕНИЕ

Технологии массового параллельного секвенирования, которые также называются секвенированием нового (следующего) поколения, находят все больше применений в науках о жизни. Различные варианты методик отличаются не только получением информации о конкретных последовательностях ДНК и РНК в клетке, но и тем, с какими компонентами в клетке они ассо-

циированы. Один из вариантов развития данных технологий основан на том, что рибосомные субчастицы, вовлеченные в трансляцию, защищают фрагменты мРНК от разрезания рибонуклеазами [1, 2]. Тот факт, что фрагменты мРНК, защищаемые рибосомой (рибосомные футпринты, РФП), имеют достаточно большую длину ~ 25–35 нуклеотидов (нт) и остаются стабильно связанными с рибосомой после разрезания, позволил исследователям из лаборатории Jonathan Weissman разработать способ выделения и секвенирования РФП, который получил название рибосомный профайлинг [3].

Исходный экспериментальный протокол рибосомного профайлинга может быть описан следующей последовательностью действий [4]. Клетки перед выделением обрабатывают инги-

Принятые сокращения: НТО – нетранскрибируемая область; ОРС – открытая рамка считывания; ПИК – прединициаторный комплекс; РСК – рибосомный сканирующий комплекс; РФП – рибосомный футпринт; eIF – эукариотический инициаторный фактор; RQC – контроль качества при помощи транскрибирующих рибосом.

* Адресат для корреспонденции.

битором трансляции циклогексимидам, который «останавливает» рибосомы там, где они транслируют мРНК. После разрушения клеток лизат обрабатывают рибонуклеазой I, которая эффективно разрезает не только незащищенную мРНК, но также вносит многочисленные разрывы в рРНК. Тем не менее 80S рибосомные субчастицы с фрагментами РНК остаются достаточно стабильными для того, чтобы их можно было выделить (например, в градиенте сахарозы при ультрацентрифугировании через сахарозную «подушку» или с помощью гель-фильтрации). После выделения РНК из таких 80S рибосом и разделения фрагментов в денатурирующем акриламидном геле проводят выделение фрагментов РНК требуемого размера. Далее фрагменты РНК с помощью стандартных подходов превращают в библиотеки кДНК для последующего массового параллельного секвенирования. Одновременно порция того же самого лизата, отобранная до обработки рибонуклеазой, используется для выделения мРНК и ее последующего фрагментирования с помощью щелочного гидролиза. Фрагменты мРНК той же длины, что и РФП, используются для приготовления библиотек и последующего секвенирования мРНК. После прочтения всех РФП и фрагментов мРНК проводится их картирование на геном или транскриптом, в результате чего создается моментальный снимок всей трансляции и транскрипции в клетках при заданных условиях.

При разработке любого нового метода требуется приложить большие усилия, чтобы заставить научное сообщество поверить в реальность и ценность получаемых результатов. Результаты самой первой работы по рибосомному профайлингу сразу же убедили нас в том, что данный подход действительно работает. Как и стоило ожидать, РФП преимущественно обнаруживались в кодирующих открытых рамках считывания (ОРС) мРНК. Но самым убедительным аргументом стал тот факт, что сигнал от транслирующей рибосом демонстрировал четкую триплетную периодичность. Такие данные однозначно свидетельствовали о том, что секвенирование РФП действительно дает информацию о расположении транслирующей рибосом на мРНК в клетке.

Начиная с даты первой публикации в 2009 г. метод рибосомного профайлинга получил активнейшее развитие и сейчас используется для изучения регуляции экспрессии генов и картирования кодирующих участков генома для любых живых организмов, начиная от бактерий и архей и заканчивая органами и тканями животных и человека. Метод активно развивается и эволюционирует как со стороны эксперимен-

тального подхода, так и со стороны биоинформатических инструментов для обработки, интерпретации и визуализации получаемых результатов. В частности, одна из первых и самых очевидных модификаций метода заключалась в использовании различных ингибиторов трансляции, действующих на рибосому. Так, некоторые ингибиторы приводят к обогащению рибосомами стартовых кодонов мРНК — у эукариот для этих целей используются антибиотики лактиномицин и харрингтонин. Другие антибиотики, такие как анизомицин и тигециклин, способны останавливать рибосомы в различных конформациях, что позволяет анализировать конформационные распределения состояний рибосом в различных условиях [5–8]. В данном обзоре мы не будем подробно останавливаться на этих аспектах, поскольку они детально обсуждаются в недавних обзорах от лидеров в области использования рибосомного профайлинга, включая разработчиков метода [9–15].

Важно отметить, что подавляющее большинство работ основано на исследовании «стандартного» РФП, фрагмента мРНК длиной 25–35 нт, защищаемого элонгирующей рибосомой от разрезания рибонуклеазой и остающегося ассоциированным с рибосомой после такой обработки. Те же рибосомные комплексы, которые являются нестабильными после разрезания нуклеазами или защищают фрагменты мРНК большего размера, не анализируются при использовании классического подхода (рис. 1). Более того, стандартный способ получения РФП не позволяет установить состав рибосомных комплексов, защищающих мРНК — теряется информация о комплексах, ассоциированных с трансляционными факторами на разных стадиях белкового синтеза. Мы подробно остановимся на новых модификациях рибосомного профайлинга, которые выходят за рамки анализа «стандартных» РФП и позволяют глубже взглянуть на те аспекты белкового синтеза, которые не видны при использовании стандартного подхода. В основном эти новые модификации касаются клеток эукариот, аппарат трансляции которых значительно сложнее, чем у бактерий, и требует большего числа регулирующих белковых факторов.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ТЕХНИКИ РИБОСОМНОГО ПРОФАЙЛИНГА НА СТАДИЮ СКАНИРОВАНИЯ ПРИ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ У ЭУКАРИОТ

В основе инициации трансляции у большинства клеточных мРНК эукариот лежит сканиру-

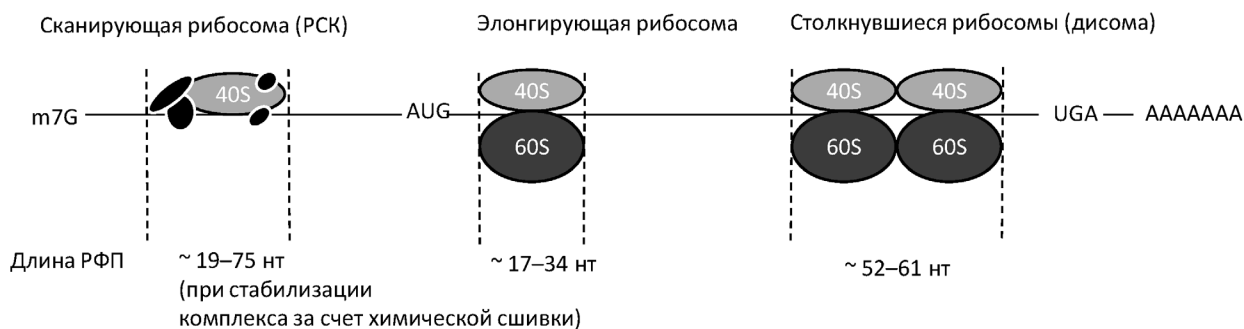


Рис. 1. Варианты рибосомных футпринтов от различных рибосомных комплексов. При использовании стандартного подхода выделяются рибосомные футпринты, соответствующие только элонгирующей рибосоме (комплекс посередине). Указанный диапазон длин футпринтов является приблизительным, поскольку варьирует в разных работах

ющий механизм, принцип которого был предложен Marilyn Kozak 40 лет назад [16, 17]. Согласно этому механизму, m7G-кэп на 5'-конце мРНК связывает тримерный белковый комплекс eIF4F, состоящий из eIF4G1 (каркасный белок) и связанных с ним eIF4E (кэп-связывающая субъединица) и хеликазы eIF4A. Комплекс eIF4F через взаимодействие eIF4G1 с иницирующим фактором eIF3 привлекает на 5'-конец мРНК 43S преиницирующий комплекс (43S ПИК). Комплекс 43S представляет собой 40S рибосомную субчастицу, нагруженную факторами инициации eIF3, eIF1, eIF1A, eIF5 и тройным комплексом (ТК) eIF2xGTPxMet-tRNA_i. После связывания с 5'-концом мРНК 40S рибосома и факторы инициации образуют сканирующий комплекс (48S РСК), который начинает двигаться в сторону 3'-конца мРНК, продевая последовательно нуклеотидную цепь мРНК через мРНК-связывающий канал 40S рибосомной субчастицы, в то время как ТК сканирует нуклеотидную последовательность на присутствие стартового кодона в подходящем нуклеотидном контексте. Предполагается, что в удержании мРНК 40S субчастицей в процессе сканирования принимают участие как структурные компоненты мРНК-связывающего канала 40S субчастицы, так и иницирующий фактор eIF4G1 и, возможно, РНК-связывающие мотивы некоторых субъединиц фактора eIF3. После узнавания стартового кодона происходит высвобождение факторов инициации и GDP, присоединение 60S субчастицы, и начинается синтез полипептида [18–22].

Хотя данная модель инициации, основанная на множестве кропотливых биохимических экспериментов, является на данный момент общепринятой, остается ряд важных вопросов, требующих дополнительных исследований. Главным препятствием в изучении стадии сканирования является то, что 43S ПИК и сканирующие комплексы являются по своей природе

нестабильными и разрушаются в процессе выделения из клеток. Так, стандартный подход для выделения рибосомных комплексов, центрифугирование в градиенте сахарозы, приводит к потере ассоциации инициаторных факторов с 40S рибосомой, что конечно же не отражает реальной ситуации. Для решения данной проблемы был разработан метод фиксации трансляционных комплексов в клетках за счет химического сшивания с помощью формальдегида [23].

Данный подход был использован в модификации рибосомного профайлинга, позволяющей детектировать положение РСК на мРНК [24]. Работа была сделана на клетках дрожжей *S. cerevisiae*. После обработки клеток формальдегидом их разрушали, лизат обрабатывали рибонуклеазой и затем разделяли в градиенте сахарозы. За счет использования химической сшивки оказалось возможным выделить небольшую фракцию рибосомных комплексов, обладающих коэффициентом седиментации меньше, чем 80S (80S также стабилизируются формальдегидом и видны на градиенте). Затем выделяли защищенные РСК фрагменты мРНК и подвергали их массовому параллельному секвенированию. На стадии селекции по размеру проводился выбор широкого спектра фрагментов до 250 нт, поскольку ожидалось, что сканирующие рибосомы за счет дополнительных взаимодействий мРНК с инициаторными факторами могут защищать фрагменты мРНК большей длины, чем элонгирующие рибосомы [25–27] (рис. 1).

Оказалось, что фрагменты мРНК, защищаемые сканирующими рибосомами, действительно имеют очень разнообразное распределение по длине – от 19 до 75 нт. Большая часть РСК-футпринтов обнаруживалась в 5'-НТО, со значительным обогащением на стартовых кодонах. Соответствующие рибосомные футпринты, как и ожидалось, редко обнаруживаются в кодирующих участках мРНК и 3'-НТО, однако обогаще-

ние наблюдается на терминирующих кодонах ОРС (по всей видимости, за счет образования интермедиатов в процессе терминации трансляции). Общая картина и характеристики футпринтов РСК полностью согласуются с моделью сканирования.

Интересно отметить несколько важных деталей, проясняющих ряд аспектов сканирования и узнавания стартового кодона. Во-первых, при выравнивании футпринтов относительно стартовых кодонов удалось обнаружить несколько паттернов длин фрагментов, имеющих фиксированный 5'-конец в положении – 12, соответствующих мРНК, выходящей из рибосомы. При этом 3'-концы соответствующих футпринтов располагаются в положении + 6, + 16 и + 24 соответственно. Авторы предполагают, что три популяции футпринтов соответствуют трем различным функциональным состояниям рибосомного комплекса на AUG кодоне. Так, самый короткий футпринт, по всей видимости, соответствует только что прибывшей рибосоме в «открытой» конформации, необходимой для сканирования. Во-вторых, более детальное изучение рибосомных футпринтов на стартовом кодоне позволяет идентифицировать минорные популяции фрагментов большей длины. Авторы предполагают, что эти футпринты образуются по двум причинам – за счет дополнительных контактов с инициаторными факторами в районе выхода мРНК из канала рибосомы, а также за счет образования очереди из сканирующих рибосом.

Анализ тех футпринтов от РСК, которые расположены до стартового кодона в 5'-НТО, также оказался очень полезен и интересен. Для многих мРНК распределение сканирующих рибосом по 5'-НТО было однородным, что соответствует представлениям об эффективном процессе сканирования. Тем не менее на некоторых мРНК обнаруживается локальное накопление сканирующих рибосом в определенных участках 5'-НТО, что говорит о возможном существовании блокирующих участков, которые с трудом проходятся рибосомой при сканировании. В ряде случаев такие паузы в 5'-НТО не могут быть объяснены присутствием коротких рамок считывания или локальных структурных элементов. По предположениям авторов, такие паузы могут либо быть связаны с последовательностью нуклеотидов, которая «плоха» для сканирования, либо со связыванием белков, препятствующих движению сканирующих рибосом. Приведенные авторами рибосомные профили с паузами сканирующих рибосом для мРНК *PAB1* и *SEC4* являются очень яркими и интересными примерами существования регуляторных *cis*-действи-

ющих элементов в 5'-НТО, которые, вероятно, замедляют сканирующие рибосомы [28].

Метод рибосомного профайлинга сканирующих комплексов вскоре был адаптирован и успешно использован для изучения сканирования у высших эукариот – на примере клеточных культур млекопитающих [28, 29] и для рыбки даanio-рерио (*zebrafish*, *Danio rerio*) [30]. В целом основные результаты, полученные для дрожжей, наблюдаются и в этих работах. Мы подчеркнем несколько важных, на наш взгляд, выводов, которые проясняют аспекты регуляции инициации трансляции и сканирования. Так, изучение футпринтов РСК, приходящихся на самый 5'-конец мРНК, поддерживает модель постепенного продвижения 5'-конца последовательности в мРНК-связывающий канал рибосомы. В экспериментах с *D. rerio* было показано, что рибосомные футпринты на 5'-концах мРНК имеют широкий набор длин от 15 до 80 нт, в то время как остальные сканирующие рибосомы, начавшие движение от 5'-конца, в основном защищают фрагменты большой длины (60–70 нт). Постепенное увеличение длины футпринтов с 5'-конца мРНК свидетельствует против модели, согласно которой мРНК-связывающий канал рибосомы сразу же загружается 5'-проксимальным сегментом мРНК. Эти результаты соотносятся с данными, полученными путем биохимических экспериментов [31, 32]. Кроме того, в работе [30] было установлено, что эффективность посадки сканирующих рибосом на мРНК, которые начинаются с С или Т, снижена по сравнению с транскриптами, у которых первый нуклеотид является А или G, вероятно, из-за более низкой аффинности кэпа к eIF4E [33, 34]. Также стоит отметить интересное наблюдение, связанное с регуляторными функциями коротких рамок считывания в 5'-НТО. Было показано, что ингибирующий эффект таких рамок считывания связан с природой терминирующего кодона этой рамки – присутствие наименее эффективного из трех стоп-кодонов, UGA, сильнее всего снижает количество сканирующих рибосом после рамки [30].

Мы считаем, что данная модификация рибосомного профайлинга является чрезвычайно важной для понимания принципов регуляции сканирования в 5'-НТО мРНК. В частности, данный метод будет крайне полезен для того, чтобы выяснить механизмы кэп-независимой трансляции у млекопитающих. Так, если определенная мРНК может иницировать трансляцию за счет внутренней посадки рибосомы с использованием IRES-элемента (internal ribosome entry site), то стоит ожидать отсутствия РФП от сканирующих рибосом в значительной части ее

5'-НТО. В противном случае механизм кэп-независимой инициации, по всей видимости, должен быть основан на сканировании [35]. Другими словами, мы считаем, что данный метод позволит выяснить реальный механизм инициации трансляции для тех мРНК, в последовательности которых ранее было предположено наличие IRES-элементов.

СЕЛЕКТИВНЫЙ РИБОСОМНЫЙ ПРОФАЙЛИНГ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФУНКЦИИ ИНИЦИАТОРНЫХ ФАКТОРОВ

Эволюция технологии рибосомного профайлинга привела к появлению его особой модификации, названной селективным рибосомным профайлингом. Суть модификации заключается в выделении после обработки рибонуклеазой части рибосом, ассоциированных с определенным белком (рис. 2). Это достигается путем выделения рибосомных комплексов либо с помощью антител к интересующему белку, либо с помощью тэга, введенного в этот белок, после чего из отобранных комплексов выделяют фрагменты мРНК и подвергают их массовому параллельному секвенированию. Таким образом осуществляют позиционное картирование – т.е. наличие того или иного фактора в рибосомном комплексе соотносится с положением рибосомы на нуклеотидной последовательности какой-либо мРНК.

Данный подход был впервые применен в 2011 г. для изучения взаимодействия насцентного полипептида с шапероном Trigger factor (TF) в процессе трансляции у бактерий *E. coli* [36]. Ав-

торы данной работы ввели аффинный тэг AviTag в TF, после чего фиксировали рибосомные комплексы с помощью сшивающего агента DSP (дитиобиссукцинимидилпропионат), обрабатывали лизат микрококковой нуклеазой и выделяли 70S рибосомы, ассоциированные с TF через насцентный полипептид. С помощью данного подхода было показано, что TF начинает взаимодействовать с насцентным полипептидом на стадии ~ 100 аминокислотных остатков (а.о.). Этот вывод был получен при сравнении метагеномного рибосомного профиля от всех рибосом и от рибосом, отобранных с помощью AviTag – в последнем случае наблюдалось резкое увеличение количества РФП после ~ 100-го кодона мРНК.

Селективный рибосомный профайлинг был применен сразу тремя группами исследователей для изучения функции трансляционных факторов (соответствующие статьи опубликованы в одном номере высокорейтингового журнала *Molecular Cell* [28, 29, 37]). Во всех трех работах продемонстрирован любопытный факт, что иницирующий фактор eIF3 сохраняет свои контакты с рибосомой и на начальной фазе элонгации. Этот результат соответствует данным о структуре рибосомных комплексов с eIF3 – на многих предложенных крио-ЭМ моделях 40S рибосомных комплексов eIF3 имеет контакты с обращенной в раствор (solvent side) поверхностью 40S рибосомы [38–41]. Кроме того, согласно результатам ряда работ, eIF3 играет важную роль в реинициации после трансляции коротких ОРС в 5'-НТО, что подразумевает сохранение взаимодействия eIF3 с 80S рибосомой при трансляции короткой рамки считывания [42, 43].

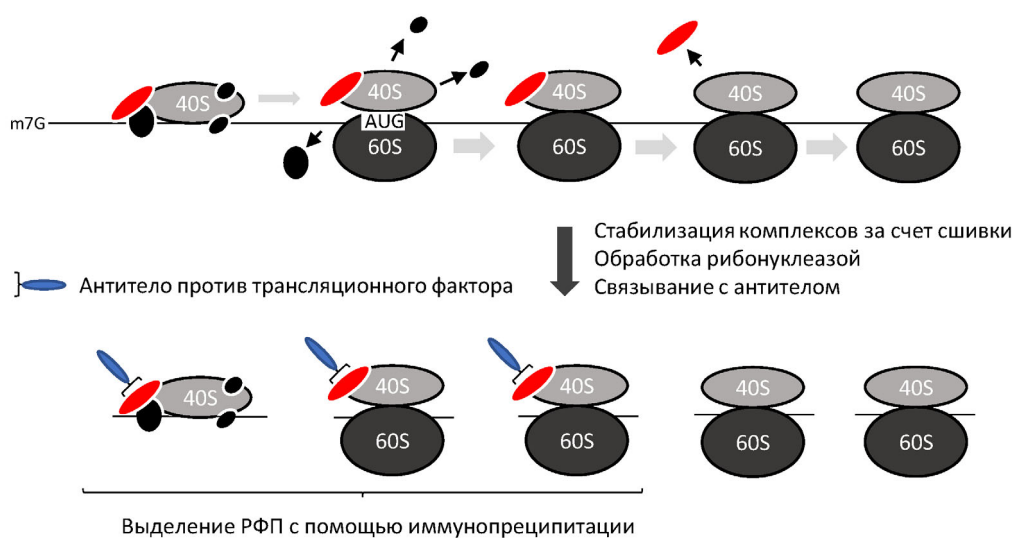


Рис. 2. Схематическое изображение селективного рибосомного профайлинга

В двух исследованиях с использованием сшивающего реагента для фиксации инициаторных комплексов [28, 29] было показано, что контакты eIF3 с рибосомой формируются на самом начальном этапе сканирования и драматически падают при достижении стартового кодона, но следовые количества eIF3 сохраняются и после прохождения стартового кодона: согласно первой из этих публикаций — до 20–25-го кодона, согласно второй — примерно до 12-го кодона. Хотя эти результаты, как уже упоминалось, не противоречат структурным и биохимическим данным, есть две причины считать данную оценку завышенной. Первая причина заключается в том, что далеко не каждый стартовый кодон ОРС расположен в оптимальном для инициации контексте, и во многих случаях существует возможность проскальзывающего сканирования инициаторных комплексов, что не учитывается при интерпретации результатов данных работ. Недавнее исследование, посвященное изучению проскальзывающего сканирования через стартовые кодоны основной ОРС, показывает, что этот механизм активно используется в клетках млекопитающих и может быть детектирован методом рибосомного профайлинга [44]. Мы предполагаем, что какая-то часть сканирующих рибосом, не узнавших стартовый кодон, может принести вклад в обогащение сигнала от связанных с eIF3 рибосомных комплексов. Вторая причина связана с результатами недавней работы, показывающей специфическое взаимодействие eIF3 с 80S рибосомой, транслирующей определенный набор мРНК [37]. Вклад этих специфических мРНК, таким образом, может исказить общую картину для всех транслируемых мРНК.

Остановимся на упомянутой работе более подробно. Lin et al. с помощью рибосомного профайлинга изучали эффект подавления одной из субъединиц eIF3, eIF3e, на экспрессию генов в клеточной линии MCF-10A [37]. Оказалось, что нокдаун eIF3e приводил к статистически значимым изменениям «трансляционной эффективности» для нескольких сотен мРНК. Важно отметить, что «трансляционная эффективность» в опубликованных работах часто оценивается по соотношению РФП к фрагментам мРНК для каждой конкретной мРНК. Этот термин не совсем точный, поскольку отражает нагрузку мРНК рибосомами, а не реальную эффективность трансляции мРНК. Так, группа мРНК с повышенной «трансляционной эффективностью» была обогащена мРНК, кодирующими митохондриальные и трансмембранные белки. В то же время результаты альтернативного метода измерения эффективности белкового синте-

за, основанного на пульс-мечении синтезируемых белков (pulse SILAC, pSILAC) и масс-спектрометрии, оказались прямо противоположными — нокдаун eIF3e, наоборот, приводил к пониженному синтезу сходного набора митохондриальных и трансмембранных белков.

Чтобы разрешить данное противоречие, авторы работы [37] более детально проанализировали данные рибосомного профайлинга и обнаружили, что мРНК с кажущейся повышенной «трансляционной эффективностью» покрыты рибосомами неравномерно: в клетках с нокдауном eIF3e наблюдается значительное повышение плотности рибосом между 25-м и 75-м триплетами кодирующей последовательности. Для изучения природы данного эффекта был использован селективный рибосомный профайлинг — после обработки лизата клеток рибонуклеазой из фракции 80S моносом с помощью антител выделялись те рибосомы, которые ассоциированы с eIF3 (важно отметить, что в данном случае не проводилась фиксация комплексов с помощью сшивающих агентов). Действительно, оказалось, что eIF3 ассоциирован с 80S рибосомами, вовлеченными в элонгацию специфических мРНК. Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что eIF3 стабильно ассоциирован (поскольку детектируется без сшивки) с некоторыми мРНК в процессе элонгации и, по всей видимости, каким-то образом стимулирует элонгацию на протяжении первых 75 кодонов.

Суммируя основные выводы результатов трех указанных выше работ по функциональной роли eIF3, можно сделать следующие выводы: eIF3, как и другие факторы инициации, в основном высвобождается на стадии образования 80S, однако покидает рибосому в последнюю очередь и может некоторое непродолжительное время оставаться связанным с элонгирующей рибосомой. При этом на некоторых мРНК взаимодействие с eIF3 может сохраняться на протяжении длительного времени, и это взаимодействие необходимо для эффективной трансляции нескольких десятков триплетов. Крайне интересно и важно понять, что именно заставляет eIF3 задерживаться на определенных мРНК в процессе элонгации и где именно находится eIF3 на 80S — изменяются ли контакты eIF3 с рибосомой по сравнению с прединициаторным, например, сканирующим, комплексом.

eIF3 — не единственный фактор инициации, который изучали с помощью селективного рибосомного профайлинга. Так, авторы двух работ также использовали eIF2 при обогащении РСК [28, 29]. Как и ожидалось, eIF2 оказывается связан с РСК с самого начала процесса сканирования, а при достижении стартового кодона он

«исчезает». Интересно отметить тот факт, что при сравнении селективного профайлинга против eIF2 и eIF3 с данными от неотобранных футпринтов от РСК удалось подтвердить тот факт, что факторы инициации диссоциируют при узнавании стартового кодона, однако eIF3 уходит позже eIF2.

Интересно, что схожие результаты были получены и для eIF4G с eIF4E [28]. Оказалось, что эти факторы остаются связанными с рибосомой в процессе сканирования всей 5'-НТО. Если для eIF4G этот результат был вполне ожидаем, то для кэп-связывающего белка eIF4E он был неочевиден. Действительно, можно было предположить, что eIF4E остается связанным с кэпом и в какой-то момент диссоциирует от eIF4G, продолжая движение со сканирующей рибосомой, однако эта гипотеза не нашла подтверждения по результатам селективного рибосомного профайлинга – согласно полученным результатам, все РСК содержат eIF4E. Затем на основании результатов дополнительных экспериментов авторами была предложена модель, согласно которой eIF4E сохраняет взаимодействие с кэпом на протяжении всего сканирования, а следовательно, 5'-НТО может одновременно сканировать только одна рибосома [28]. Эта крайне нетривиальная и провокационная модель заслуживает отдельного обсуждения.

Описанная выше модель основана на результатах двух ключевых экспериментов. В первом авторы блокировали иницировавшие 80S рибосомы с помощью ингибитора трансляции харрингтоина [6, 45] и не обнаружили накопления РСК перед 80S, «застрявшей» на стартовом кодоне. Второй эксперимент заключался в использовании набора репортерных конструкций, содержащих 5'-НТО из повторяющихся блоков [28]. С увеличением количества блоков и, соответственно, длины 5'-НТО было обнаружено падение активности репортера в зависимости от увеличения длины 5'-НТО. Результаты этих экспериментов, по мнению авторов, подтверждают гипотезу работы одной сканирующей рибосомы на 5'-НТО. Мы предполагаем, что этим результатам есть альтернативное объяснение. Вероятно, РСК может диссоциировать от мРНК в процессе сканирования, особенно если он натывается на препятствие. Тогда отсутствие накопления сканирующих рибосом перед 80S может объясняться диссоциацией за счет столкновения РСК с «замороженной» 80S. В том же ключе можно объяснить и зависимость трансляции от длины лидирующей последовательности – при увеличении общего времени сканирования увеличивается вероятность потери сканирующего комплекса. Можно предпо-

ложить, что вероятность диссоциации сканирующей рибосом критически зависит от лидирующей последовательности – ослабление взаимодействия компонентов сканирующего комплекса с неоптимальными последовательностями повышает вероятность диссоциации рибосомы от мРНК. Стоит отметить обсуждавшиеся ранее данные по профайлингу сканирующих комплексов в дрожжах, когда на индивидуальных мРНК наблюдались значительные паузы от сканирующих рибосом в определенных положениях на 5'-НТО. Таким образом, на наш взгляд, полученные в работе данные не опровергают модель, согласно которой 5'-НТО может одновременно транслировать несколько РСК. Здесь также уместно привести результаты прямого эксперимента [46], когда авторы осуществили бесклеточную трансляцию кэпированной мРНК с достаточно длинной 5'-НТО и использовали циклогексимид для остановки 80S элонгирующей рибосомы на стартовом кодоне. «Замораживая» сканирование через данную 5'-НТО путем повышения содержания магния и негидролизуемого аналога АТР, АМР-РNP (аденилилимидодифосфат), с помощью электронной микроскопии авторы наблюдали в этой системе структуры, состоящие из нескольких 40S рибосом вместе с одной полной 80S рибосомой. Эти данные предоставляют дополнительные доказательства в поддержку сканирующей модели инициации трансляции у эукариот с разрывом взаимодействия между кэпом и фактором eIF4E на определенной стадии сканирования.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЕЛЕКТИВНОГО РИБОСОМНОГО ПРОФАЙЛИНГА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КОТРАНСЛЯЦИОННОЙ СБОРКИ МУЛЬТИСУБЪЕДИНИЧНЫХ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ

Сворачивание вновь синтезированных белков является серьезной проблемой в «переполненной» клеточной среде, поскольку непродуктивные взаимодействия могут привести к неправильной укладке белковых цепей, агрегации и деградации. Эта проблема, как известно, преодолевается в клетках сочетанием одновременного синтеза белковых цепей с промотированием их правильного сворачивания. Клетки используют для этой цели молекулярные шапероны для стимуляции котрансляционного сворачивания белков. Использование рибосомного профайлинга для изучения котрансляционного сворачивания было впервые предложено и при-

менено в упоминавшейся ранее работе по изучению функции шаперона Trigger factor у бактерий [36]. Позднее такой же подход был использован для изучения функции других котрансляционных шаперонов и последовательности сворачивания белков, например, была исследована функция Ssb, шаперона дрожжей из семейства Hsp70, в котрансляционном взаимодействии с насцентным полипептидом [47].

Наиболее интересные и интригующие результаты были получены при изучении сборки мультисубъединичных белковых комплексов. Известно, что сборка некоторых комплексов требует участия специализированных шаперонов. Например, сборка 20S протеасомы у дрожжей осуществляется пятью специализированными шаперонами: Roc1–Roc4 и Ump1 [48, 49]. Однако верно ли это для большинства комплексов, или для них используется какой-то другой способ сборки, оставалось неясным.

Чтобы исследовать процесс сборки сложных мультисубъединичных комплексов в клетках дрожжей *S. cerevisiae*, авторы работы [50] использовали селективный рибосомный профайлинг, при котором проводилось аффинное выделение рибосомных комплексов за отдельные субъединицы исследуемого комплекса, слитые с тэгом – в данном случае использовался GFP. В качестве первого примера авторы исследовали сборку синтетазы жирных кислот (FAS), состоящей из двух субъединиц, которые собираются в додекамерный комплекс $\alpha\beta_6$. Селективный рибосомный профайлинг показал, что сборка FAS инициируется котрансляционно асимметричным образом. Тэгируемая α -субъединица не взаимодействовала с рибосомами, транслируемыми α - или β -цепью. Напротив, тэгируемая β -субъединица взаимодействовала с рибосомами, транслируемыми мРНК α -субъединицы: наблюдалось примерно 40-кратное обогащение РФП по сравнению с неселектированными РФП, начиная со 125-го триплета α -субъединицы, и обогащение сохранялось до завершения синтеза всей субъединицы. На основании этого результата была предложена модель, по которой сначала полностью синтезируется β -субъединица FAS, которая может стабильно свернуться в отсутствие α . Затем происходит трансляция α -субъединицы, в процессе которой из рибосомы появляется структурный домен, который начинает взаимодействовать с уже синтезированной β -субъединицей. Проанализировав еще 11 мультисубъединичных комплексов, авторы работы показали, что 9 комплексов собираются котрансляционно и всего лишь 3 собираются после синтеза всех субъединиц. Таким образом, котрансляционная сборка мультисубъединич-

ных комплексов – это, по всей видимости, очень распространенный, если не основной, механизм их формирования. Авторы предполагают, что такой вариант сборки может реализовываться для гораздо большего количества белковых комплексов, например, для гомо- или гетеродимеров [50].

В последующих работах было получено доказательство того, что котрансляционная сборка белковых комплексов также широко применяется в клетках млекопитающих. В работе [51] было показано, что мультисубъединичные транскрипционные комплексы TFIID, TREX-2 и SAGA также собираются котрансляционно. Кроме того, авторы упомянутой ранее работы по изучению сканирующих комплексов [29], по всей видимости, случайно обнаружили факт котрансляционной сборки уже обсуждавшегося нами 800 кДа трансляционного фактора eIF3: используя тэгируемые субъединицы eIF3 для выделения сканирующих рибосомных комплексов, авторы обнаружили обогащение РФП от мРНК, кодирующих другие субъединицы eIF3.

Интересно рассмотреть два возможных механизма котрансляционной сборки субъединиц комплексов. Согласно первой модели, полностью синтезированная субъединица взаимодействует с синтезируемой насцентной цепью второй субъединицы, направляя ее сборку и защищая от агрегации. Такая модель, получившая название последовательной, по всей видимости, является основной. Вторая модель предусматривает то, что насцентные пептиды двух субъединиц могут начать взаимодействовать между собой прямо в процессе трансляции. Для этого необходимо, чтобы взаимодействующие участки находились в *N*-концевых частях обеих субъединиц. Такая модель получила название одновременной сборки (рис. 3). Авторы работы [51] показали, что одна пара субъединиц комплекса TFIID, TAF6-TAF9, собирается по принципу одновременной сборки. Такая модель подразумевает, что две различные полирибосомы взаимодействуют друг с другом через насцентные цепи белков, образуя, можно сказать, «суперполисому». Крайне интересно понять, как в таком случае координируются процессы трансляции двух мРНК, ведь для скоординированной сборки комплексов необходима идеальная синхронизация инициации, элонгации и терминации трансляции на двух мРНК одновременно. Мы полагаем, что исследование такого гипотетического механизма трансляции «суперполисом» может привести к открытию принципиально новых механизмов регуляции трансляции.

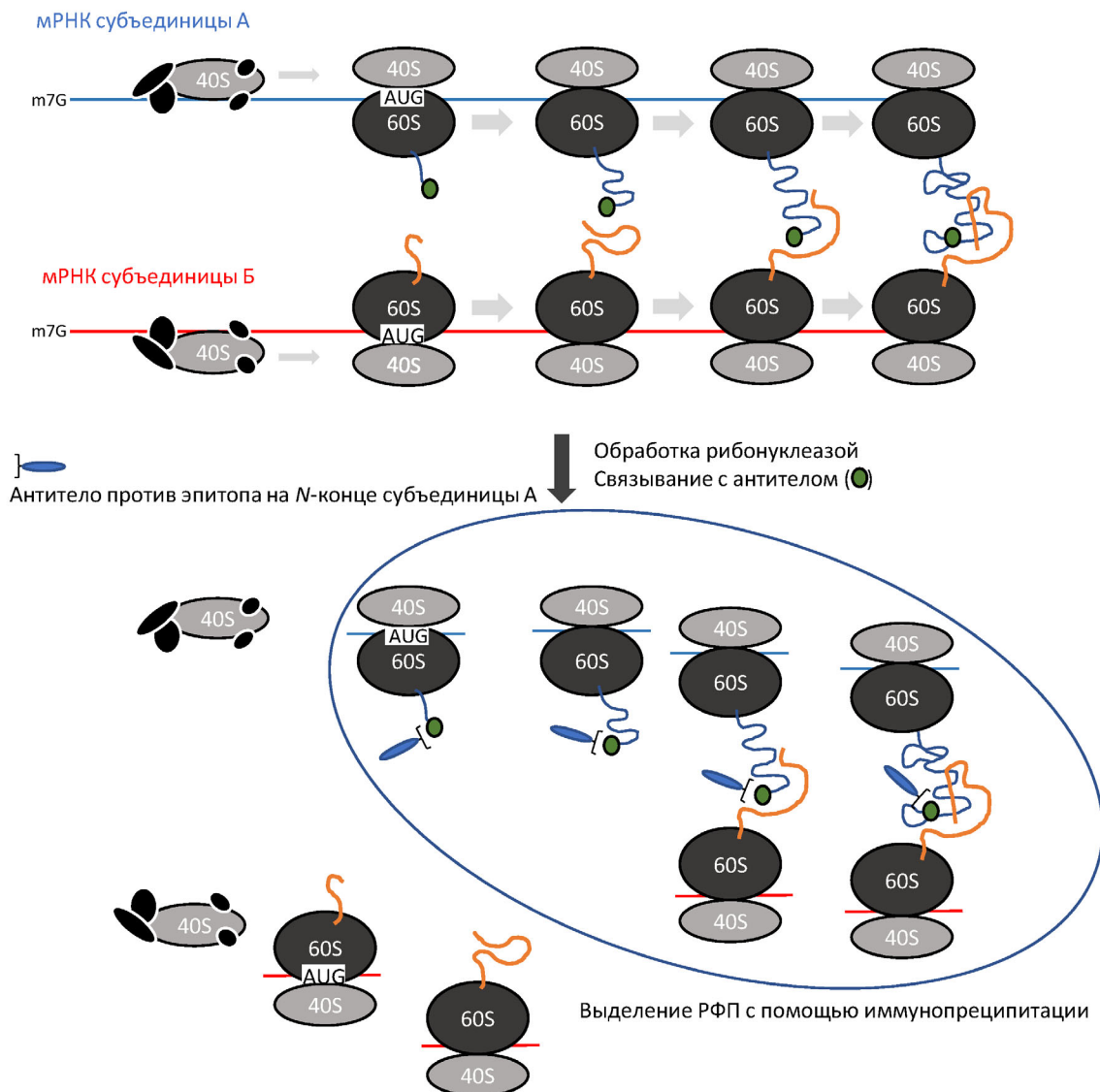


Рис. 3. Котрансляционная ассоциация двух субъединиц комплекса, основанная на модели одновременной сборки, и использование рибосомного профайлинга для изучения сборки комплексов. Согласно данной модели, две субъединицы комплекса начинают взаимодействовать в процессе трансляции по мере появления насцентных цепей из рибосомы. Стоит отметить, что, по всей видимости, более распространенной является сборка по последовательной модели, когда одна из субъединиц уже синтезирована целиком (не показано)

ПРОФАЙЛИНГ ДИСОМ

Доказательства того, что рибосома может транслировать мРНК неравномерно и претерпевать паузы, были получены еще в 1988 г. в классической работе Wolin et al. [2]. Используя подход, который затем лег в основу рибосомного профайлинга, анализ РФП от радиоактивно меченой мРНК препролактина, авторы обнаружили не только стандартные футпринты от элонгирующих рибосом, но также набор футпринтов, соответствующих накоплению 2–9 рибосом на мРНК, своеобразную лестницу от удлиненных

фрагментов мРНК, защищаемых рибосомами от разрезания микрококковой нуклеазой. Этот факт очень важен, поскольку показывает, что при сближении двух рибосом участок мРНК между ними остается защищен, и такой сигнал теряется при применении стандартного рибосомного профайлинга со стадией выбора размера футпринтов 25–35 нт.

Очевидно, что сближение двух элонгирующих рибосом может происходить *in vivo*. В 2014 г. в работе [52] был применен модифицированный метод рибосомного профайлинга в дрожжах, когда кроме стандартных футпринтов также вы-

делялась фракция фрагментов РНК с длиной 40–80 нт, которая теоретически могла содержать фрагменты мРНК, защищаемые двумя «столкнувшимися» рибосомами. Действительно, были обнаружены футпринты от «дисом», которые, как и ожидалось, в основном картируются в транслируемых ОРС мРНК и которыми обогащены некоторые мРНК, в чьих последовательностях ранее были обнаружены специфические рибосомные паузы (например, на мРНК *HAS1*). Интересно наблюдение, что «дисомы» крайне редко обнаруживаются в начале рамки считывания вплоть до 25 нт. По всей видимости, это говорит о том, что иницилирующая рибосома не начинает трансляцию до тех пор, пока элонгирующая 80S рибосома не освободит 25 нт мРНК.

Модификация рибосомного профайлинга, позволяющая изучать «дисомы» и столкновения более двух рибосом, в дальнейшем была использована в нескольких исследованиях. Авторы работы [53] применили данный подход для изучения столкновений рибосом в клетках линии НЕК293 и клетках *D. rerio*. Согласно оценке авторов, столкновение рибосом – очень распространенное явление даже в нормальных, не стрессовых условиях: около 11% мРНК имеют хотя бы один сайт столкновения рибосом. Такие паузы наблюдаются в дискретных положениях в кодирующих частях мРНК и на неоптимальных терминирующих кодонах. С помощью модифицированного рибосомного профайлинга авторы не только подтвердили случаи известных рибосомных пауз для индивидуальных генов и последовательностей триплетов, но и обнаружили новый мотив, приводящий к паузе рибосом. Так, при картировании паузы от «дисом» по отношению к Е-Р-А сайту лидирующей рибосомы был выявлен не только известный мотив Pro-Pro-Lys, но и новый мотив Arg-X-Lys. Также было обнаружено, что формирование дисом на стоп-кодонах усиливается, если в положении +4 находится С – это наблюдение соответствует данным об эффекте контекста стоп-кодона на эффективность терминации [54, 55]. Интересно отметить тот факт, что в ряде случаев на особенно «сильных» местах паузы могут образовываться очереди из множества рибосом – так, накопление до 6 рибосом в ряд было обнаружено перед сайтом паузы на мРНК *XBP1u*. Полученные данные однозначно говорят о том, что столкновения рибосом – это вполне обычное явление, происходящее в клетках в нормальных условиях.

Нужно отметить интересную гипотезу, которая была предложена при изучении «столкнувшихся» рибосом в клетках дрожжей [56] и в пе-

чени мыши [57]. В обоих случаях РФП из «дисом» составляют существенную фракцию всех РФП. В обоих случаях авторы предполагают, что столкновения рибосом (по крайней мере, части из них) не случайны, а ассоциированы с котрансляционным сворачиванием белков. Так, у дрожжей паузами обогащены участки последовательности, расположенные в кодирующей части мРНК, соответствующей промежутку между альфа-спиралями. При этом в процессе трансляции с насцентными полипептидами «дисом» ассоциируются специфические шапероны [56].

В то же время известно, что две столкнувшиеся рибосомы могут служить сигналом для активации специфического пути контроля качества на уровне трансляции, который называется RQC. Этот путь довольно хорошо изучен и детально описан в последних работах, и мы не будем подробно описывать последовательность событий, которые происходят после активации RQC [58–61], однако отметим самый первый этап – узнавание уникального интерфейса между столкнувшимися рибосомами специфической Е3 убиквитинлигазой Hel2 (Rqt1) у дрожжей и ZNF598 – у млекопитающих. Более того, столкнувшиеся рибосомы могут также активировать риботоксический стрессовый ответ. Так, «дисомы» привлекают специализированную киназу ZAK α , которая при этом аутофосфорилируется и затем активирует SAPK (p38/JNK) сигнальный каскад [62]. Кроме того, столкнувшиеся рибосомы могут также рекрутировать белок GCN1 [63], который способен приводить к активации GCN2, фосфорилированию eIF2 и, как результат, к глобальному подавлению трансляции.

Учитывая данные модифицированного рибосомного профайлинга о том, что столкновения рибосом – это обычное явление, которое происходит в нормальных условиях, можно предложить следующую модель. В нормальных условиях столкновения рибосом часто происходят на нормальных, неповрежденных мРНК, однако они успевают разрешиться до того, как активируется RQC или другие стрессовые пути. Тем не менее даже в нормальных условиях некоторые мРНК индуцируют настолько сильные паузы, что активируется RQC (в качестве примера изучался случай с мРНК *XBP1u* [53]). При возникновении стресса, приводящего к более длительным паузам «дисом» или к накоплению значительного количества поврежденных мРНК, активно запускается RQC. Если же паузы встречаются слишком часто и не успевают разрешиться даже с помощью RQC, происходит активация интегрированного стрессового ответа (ISR) и подавление трансляции, а также актива-

ция риботоксического стресса через SAPK (p38/JNK) с последующей активацией апоптоза. Многие детали регуляции трансляции за счет столкновения рибосом еще предстоит изучить. Стоит отметить, что рибосомный профайлинг «дисом» оказывается очень ценным инструментом для изучения функции факторов, вовлеченных в котрансляционный контроль качества мРНК и рибосомы [42, 64, 65].

ОБСУЖДЕНИЕ

За чуть более чем 10 лет своего существования рибосомный профайлинг завоевал заслуженную популярность. Теперь оказывается довольно сложно отследить все статьи, где используется этот метод, поскольку часто рибосомный профайлинг рутинно применяется вместе с десятками других подходов и не упоминается в аннотации к статье. Большинство применений рибосомного профайлинга основано на классическом подходе с анализом РФП от 80S или 70S рибосом. Особенно привлекательно использовать данный метод для изучения функции транскрипционных факторов как основных, так и тех, которые работают на специфических мРНК. С помощью «обычного» рибосомного профайлинга можно обнаружить мРНК, зависящие от исследуемого фактора инициации, а в некоторых случаях можно даже предположить механизм работы этого фактора. Мы не можем обойти вниманием ряд недавних работ, в которых изучалась роль некоторых неканонических факторов трансляции, и вкратце перечислим некоторые из них. Так, с помощью рибосомного профайлинга была исследована роль инициа-

торных факторов eIF2D, MCT и DENR [66–68], eIF5A [69], eEF3 [70], eIF1 [71, 72], eIF4A, eIF4B и Ded1 [73], Rli1/ABCE1 [74], Dom34 [52], eIF5 [75] и eIF4G2 [76]. Мы предполагаем, что модификации рибосомного профайлинга, описанные в данной статье, окажутся еще более ценными при изучении функциональной роли малоизученных транскрипционных факторов и регуляторов.

Рибосомный профайлинг и его новые модификации, описанные в данном обзоре, уже стали важнейшим методом для изучения принципов регуляции синтеза белка в живых клетках, и его вклад в наше понимание трансляции сложно переоценить. Вместе с тем мы до сих пор не до конца понимаем возможные артефакты рибосомного профайлинга и их вклад в интерпретацию результатов. Яркий пример, рассмотренный в данном обзоре — мнимое увеличение «транскрипционной эффективности» некоторых мРНК, регулируемых eIF3, которое на самом деле оказалось связанным с подавлением трансляции [37]. Следовательно, для независимого подтверждения результатов рибосомного профайлинга необходимо использовать альтернативные экспериментальные подходы.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00152).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов, выполненных авторами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Castles, J. J., and Singer, M. F. (1969) Degradation of polyuridylic acid by ribonuclease II: protection by ribosomes, *J. Mol. Biol.*, **40**, 1-17, doi: 10.1016/0022-2836(69)90292-7.
2. Wolin, S. L., and Walter, P. (1988) Ribosome pausing and stacking during translation of a eukaryotic mRNA, *EMBO J.*, **7**, 3559-3569.
3. Ingolia, N. T., Ghaemmhami, S., Newman, J. R., and Weissman, J. S. (2009) Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling, *Science*, **324**, 218-223, doi: 10.1126/science.1168978.
4. Ingolia, N. T., Brar, G. A., Rouskin, S., McGeachy, A. M., and Weissman, J. S. (2012) The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments, *Nat. Prot.*, **7**, 1534-1550, doi: 10.1038/nprot.2012.086.
5. Lee, S., Liu, B., Lee, S., Huang, S. X., Shen, B., and Qian, S. B. (2012) Global mapping of translation initiation sites in mammalian cells at single-nucleotide resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, E2424-2432, doi: 10.1073/pnas.1207846109.
6. Ingolia, N. T., Lareau, L. F., and Weissman, J. S. (2011) Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes, *Cell*, **147**, 789-802, doi: 10.1016/j.cell.2011.10.002.
7. Wu, C. C., Zinshteyn, B., Wehner, K. A., and Green, R. (2019) High-resolution ribosome profiling defines discrete ribosome elongation states and translational regulation during cellular stress, *Mol. Cell*, **73**, 959-970.e955, doi: 10.1016/j.molcel.2018.12.009.
8. Lareau, L. F., Hite, D. H., Hogan, G. J., and Brown, P. O. (2014) Distinct stages of the translation elongation cycle revealed by sequencing ribosome-protected mRNA fragments, *eLife*, **3**, e01257, doi: 10.7554/eLife.01257.
9. Ingolia, N. T., Hussmann, J. A., and Weissman, J. S. (2019) Ribosome profiling: global views of translation, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **11**, doi: 10.1101/cshperspect.a032698.
10. Brar, G. A., and Weissman, J. S. (2015) Ribosome profiling reveals the what, when, where and how of protein synthesis,

- Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **16**, 651-664, doi: 10.1038/nrm4069.
11. Kiniry, S. J., Michel, A. M., and Baranov, P. V. (2020) Computational methods for ribosome profiling data analysis, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **11**, e1577, doi: 10.1002/wrna.1577.
 12. Ingolia, N. T. (2014) Ribosome profiling: new views of translation, from single codons to genome scale, *Nat. Rev. Genet.*, **15**, 205-213, doi: 10.1038/nrg3645.
 13. Andreev, D. E., O'Connor, P. B., Loughran, G., Dmitriev, S. E., Baranov, P. V., and Shatsky, I. N. (2017) Insights into the mechanisms of eukaryotic translation gained with ribosome profiling, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 513-526, doi: 10.1093/nar/gkw1190.
 14. Calviello, L., and Ohler, U. (2017) Beyond read-counts: Ribo-seq data analysis to understand the functions of the transcriptome, *Trends Genet.*, **33**, 728-744, doi: 10.1016/j.tig.2017.08.003.
 15. Michel, A. M., and Baranov, P. V. (2013) Ribosome profiling: a Hi-Def monitor for protein synthesis at the genome-wide scale, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **4**, 473-490, doi: 10.1002/wrna.1172.
 16. Kozak, M. (1978) How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell*, **15**, 1109-1123, doi: 10.1016/0092-8674(78)90039-9.
 17. Kozak, M. (1980) Evaluation of the "scanning model" for initiation of protein synthesis in eucaryotes, *Cell*, **22**, 7-8, doi: 10.1016/0092-8674(80)90148-8.
 18. Hinnebusch, A. G. (2014) The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation, *Annu. Rev. Biochem.*, **83**, 779-812, doi: 10.1146/annurev-biochem-060713-035802.
 19. Hinnebusch, A. G. (2017) Structural insights into the mechanism of scanning and start codon recognition in eukaryotic translation initiation, *Trends Biochem. Sci.*, **42**, 589-611, doi: 10.1016/j.tibs.2017.03.004.
 20. Tahmasebi, S., Sonenberg, N., Hershey, J. W. B., and Mathews, M. B. (2019) Protein synthesis and translational control: a historical perspective, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **11**, doi: 10.1101/cshperspect.a035584.
 21. Hershey, J. W. B., Sonenberg, N., and Mathews, M. B. (2019) Principles of translational control, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **11**, doi: 10.1101/cshperspect.a032607.
 22. Hinnebusch, A. G., Ivanov, I. P., and Sonenberg, N. (2016) Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs, *Science*, **352**, 1413-1416, doi: 10.1126/science.aad9868.
 23. Valasek, L., Szamecz, B., Hinnebusch, A. G., and Nielsen, K. H. (2007) In vivo stabilization of preinitiation complexes by formaldehyde cross-linking, *Methods Enzymol.*, **429**, 163-183, doi: 10.1016/S0076-6879(07)29008-1.
 24. Archer, S. K., Shirokikh, N. E., Beilharz, T. H., and Preiss, T. (2016) Dynamics of ribosome scanning and recycling revealed by translation complex profiling, *Nature*, **535**, 570-574, doi: 10.1038/nature18647.
 25. Pisarev, A. V., Kolupaeva, V. G., Yusupov, M. M., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. (2008) Ribosomal position and contacts of mRNA in eukaryotic translation initiation complexes, *EMBO J.*, **27**, 1609-1621, doi: 10.1038/emboj.2008.90.
 26. Kozak, M. (1977) Nucleotide sequences of 5'-terminal ribosome-protected initiation regions from two reovirus messages, *Nature*, **269**, 391-394, doi: 10.1038/269390a0.
 27. Lazarowitz, S. G., and Robertson, H. D. (1977) Initiator regions from the small size class of reovirus messenger RNA protected by rabbit reticulocyte ribosomes, *J. Biol. Chem.*, **252**, 7842-7849, doi: 10.1016/S0021-9258(17)41043-X.
 28. Bohlen, J., Fenzl, K., Kramer, G., Bukau, B., and Teleman, A. A. (2020) Selective 40S footprinting reveals cap-tethered ribosome scanning in human cells, *Mol. Cell*, **79**, 561-574.e565, doi: 10.1016/j.molcel.2020.06.005.
 29. Wagner, S., Herrmannova, A., Hronova, V., Gunisova, S., Sen, N. D., et al. (2020) Selective translation complex profiling reveals staged initiation and co-translational assembly of initiation factor complexes, *Mol. Cell*, **79**, 546-560.e547, doi: 10.1016/j.molcel.2020.06.004.
 30. Giess, A., Torres Cleuren, Y. N., Tjeldnes, H., Krause, M., Bizuayehu, T. T., et al. (2020) Profiling of small ribosomal subunits reveals modes and regulation of translation initiation, *Cell Rep.*, **31**, 107534, doi: 10.1016/j.celrep.2020.107534.
 31. Elfakess, R., Sinvani, H., Haimov, O., Svitkin, Y., Sonenberg, N., and Dikstein, R. (2011) Unique translation initiation of mRNAs-containing TISU element, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 7598-7609, doi: 10.1093/nar/gkr484.
 32. Kumar, P., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. (2016) Toward the mechanism of eIF4F-mediated ribosomal attachment to mammalian capped mRNAs, *Genes Dev.*, **30**, 1573-1588, doi: 10.1101/gad.282418.116.
 33. Meyuhas, O., and Kahan, T. (2015) The race to decipher the top secrets of TOP mRNAs, *Biochim. Biophys. Acta*, **1849**, 801-811, doi: 10.1016/j.bbagr.2014.08.015.
 34. Tamarkin-Ben-Harush, A., Vasseur, J. J., Debart, F., Ulitsky, I., and Dikstein, R. (2017) Cap-proximal nucleotides via differential eIF4E binding and alternative promoter usage mediate translational response to energy stress, *eLife*, **6**, doi: 10.7554/eLife.21907.
 35. Shatsky, I. N., Terenin, I. M., Smirnova, V. V., and Andreev, D. E. (2018) Cap-independent translation: what's in a name? *Trends Biochem. Sci.*, **43**, 882-895, doi: 10.1016/j.tibs.2018.04.011.
 36. Oh, E., Becker, A. H., Sandikci, A., Huber, D., Chaba, R., et al. (2011) Selective ribosome profiling reveals the cotranslational chaperone action of trigger factor *in vivo*, *Cell*, **147**, 1295-1308, doi: 10.1016/j.cell.2011.10.044.
 37. Lin, Y., Li, F., Huang, L., Polte, C., Duan, H., Fang, J., et al. (2020) eIF3 associates with 80S ribosomes to promote translation elongation, mitochondrial homeostasis, and muscle health, *Mol. Cell*, **79**, 575-587.e577, doi: 10.1016/j.molcel.2020.06.003.
 38. Hashem, Y., des Georges, A., Dhote, V., Langlois, R., Liao, H. Y., et al. (2013) Structure of the mammalian ribosomal 43S preinitiation complex bound to the scanning factor DHX29, *Cell*, **153**, 1108-1119, doi: 10.1016/j.cell.2013.04.036.
 39. Des Georges, A., Dhote, V., Kuhn, L., Hellen, C. U., Pestova, T. V., et al. (2015) Structure of mammalian eIF3 in the context of the 43S preinitiation complex, *Nature*, **525**, 491-495, doi: 10.1038/nature14891.
 40. Eliseev, B., Yeramala, L., Leitner, A., Karuppusamy, M., Raimondeau, E., et al. (2018) Structure of a human cap-dependent 48S translation pre-initiation complex, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 2678-2689, doi: 10.1093/nar/gky054.
 41. Brito Querido, J., Sokabe, M., Kraatz, S., Gordiyenko, Y., Skehel, J. M., et al. (2020) Structure of a human 48S translational initiation complex, *Science*, **369**, 1220-1227, doi: 10.1126/science.aba4904.
 42. Valasek, L. S., Zeman, J., Wagner, S., Beznoskova, P., Pavlikova, Z., et al. (2017) Embraced by eIF3: structural and functional insights into the roles of eIF3 across the translation cycle, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 10948-10968, doi: 10.1093/nar/gkx805.
 43. Mohammad, M. P., Munzarova Pondelickova, V., Zeman, J., Gunisova, S., and Valasek, L. S. (2017) In vivo evidence that eIF3 stays bound to ribosomes elongating and terminating on short upstream ORFs to promote reinitiation, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 2658-2674, doi: 10.1093/nar/gkx049.
 44. Benitez-Cantos, M. S., Yordanova, M. M., O'Connor, P. B. F., Zhdanov, A. V., Kovalchuk, S. I., et al. (2020) Translation initiation downstream from annotated start codons in human mRNAs coevolves with the Kozak context, *Genome Res.*, **30**, 974-984, doi: 10.1101/gr.257352.119.

45. Fresno, M., Jimenez, A., and Vazquez, D. (1977) Inhibition of translation in eukaryotic systems by harringtonine, *Eur. J. Biochem.*, **72**, 323-330, doi: 10.1111/j.1432-1033.1977.tb11256.x.
46. Shirokikh, N. E., Dutikova, Y. S., Staroverova, M. A., Hannan, R. D., and Preiss, T. (2019) Migration of small ribosomal subunits on the 5'-untranslated regions of capped messenger RNA, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, doi: 10.3390/ijms20184464.
47. Doring, K., Ahmed, N., Riemer, T., Suresh, H. G., Vainshtein, Y., et al. (2017) Profiling Ssb-nascent chain interactions reveals principles of Hsp70-assisted folding, *Cell*, **170**, 298-311.e220, doi: 10.1016/j.cell.2017.06.038.
48. Le Tallec, B., Barrault, M. B., Courbeyrette, R., Guerois, R., Marsolier-Kergoat, M. C., and Peyroche, A. (2007) 20S proteasome assembly is orchestrated by two distinct pairs of chaperones in yeast and in mammals, *Mol. Cell*, **27**, 660-674, doi: 10.1016/j.molcel.2007.06.025.
49. Rosenzweig, R., and Glickman, M. H. (2008) Chaperone-driven proteasome assembly, *Biochem. Soc. Trans.*, **36**, 807-812, doi: 10.1042/BST0360807.
50. Shiber, A., Doring, K., Friedrich, U., Klann, K., Merker, D., et al. (2018) Cotranslational assembly of protein complexes in eukaryotes revealed by ribosome profiling, *Nature*, **561**, 268-272, doi: 10.1038/s41586-018-0462-y.
51. Kamenova, I., Mukherjee, P., Conic, S., Mueller, F., El-Saafin, F., et al. (2019) Co-translational assembly of mammalian nuclear multisubunit complexes, *Nat. Commun.*, **10**, 1740, doi: 10.1038/s41467-019-09749-y.
52. Guydosh, N. R., and Green, R. (2014) Dom34 rescues ribosomes in 3'-untranslated regions, *Cell*, **156**, 950-962, doi: 10.1016/j.cell.2014.02.006.
53. Han, P., Shichino, Y., Schneider-Poetsch, T., Mito, M., Hashimoto, S., et al. (2020) Genome-wide survey of ribosome collision, *Cell Rep.*, **31**, 107610, doi: 10.1016/j.celrep.2020.107610.
54. Brown, A., Shao, S., Murray, J., Hegde, R. S., and Ramakrishnan, V. (2015) Structural basis for stop codon recognition in eukaryotes, *Nature*, **524**, 493-496, doi: 10.1038/nature14896.
55. McCaughan, K. K., Brown, C. M., Dalphin, M. E., Berry, M. J., and Tate, W. P. (1995) Translational termination efficiency in mammals is influenced by the base following the stop codon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 5431-5435, doi: 10.1073/pnas.92.12.5431.
56. Zhao, T., Chen, Y. M., Li, Y., Wang, J., Chen, S., et al. (2021) Disome-seq reveals widespread ribosome collisions that promote cotranslational protein folding, *Genome Biol.*, **22**, 16, doi: 10.1186/s13059-020-02256-0.
57. Arpat, A. B., Liechti, A., De Matos, M., Dreos, R., Janich, P., and Gatfield, D. (2020) Transcriptome-wide sites of collided ribosomes reveal principles of translational pausing, *Genome Res.*, **30**, 985-999, doi: 10.1101/gr.257741.119.
58. Joazeiro, C. A. P. (2019) Mechanisms and functions of ribosome-associated protein quality control, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**, 368-383, doi: 10.1038/s41580-019-0118-2.
59. Ikeuchi, K., Izawa, T., and Inada, T. (2018) Recent progress on the molecular mechanism of quality controls induced by ribosome stalling, *Front. Genet.*, **9**, 743, doi: 10.3389/fgene.2018.00743.
60. Joazeiro, C. A. P. (2017) Ribosomal stalling during translation: providing substrates for ribosome-associated protein quality control, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **33**, 343-368, doi: 10.1146/annurev-cellbio-111315-125249.
61. Defenouillere, Q., and Fromont-Racine, M. (2017) The ribosome-bound quality control complex: from aberrant peptide clearance to proteostasis maintenance, *Curr. Genet.*, **63**, 997-1005, doi: 10.1007/s00294-017-0708-5.
62. Wu, C. C., Peterson, A., Zinshteyn, B., Regot, S., and Green, R. (2020) Ribosome collisions trigger general stress responses to regulate cell fate, *Cell*, **182**, 404-416.e414, doi: 10.1016/j.cell.2020.06.006.
63. Pochopien, A. A., Beckert, B., Kasvandik, S., Berninghausen, O., Beckmann, R., et al. (2021) Structure of Gcn1 bound to stalled and colliding 80S ribosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, doi: 10.1073/pnas.2022756118.
64. Meydan, S., and Guydosh, N. R. (2020) Disome and Trisome profiling reveal genome-wide targets of ribosome quality control, *Mol. Cell*, **79**, 588-602.e586, doi: 10.1016/j.molcel.2020.06.010.
65. Tuck, A. C., Rankova, A., Arpat, A. B., Liechti, L. A., Hess, D., et al. (2020) Mammalian RNA decay pathways are highly specialized and widely linked to translation, *Mol. Cell*, **77**, 1222-1236.e1213, doi: 10.1016/j.molcel.2020.01.007.
66. Young, D. J., Makeeva, D. S., Zhang, F., Anisimova, A. S., Stolboushkina, E. A., et al. (2018) Tma64/eIF2D, Tma20/MCT-1, and Tma22/DENR recycle post-termination 40S subunits *in vivo*, *Mol. Cell*, **71**, 761-774.e765, doi: 10.1016/j.molcel.2018.07.028.
67. Gaikwad, S., Ghobakhlu, F., Young, D. J., Visweswaraiyah, J., Zhang, H., and Hinnebusch, A. G. (2021) Reprogramming of translation in yeast cells impaired for ribosome recycling favors short, efficiently translated mRNAs, *eLife*, **10**, doi: 10.7554/eLife.64283.
68. Castelo-Szekely, V., De Matos, M., Tusup, M., Pascolo, S., Ule, J., and Gatfield, D. (2019) Charting DENR-dependent translation reinitiation uncovers predictive uORF features and links to circadian timekeeping via clock, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 5193-5209, doi: 10.1093/nar/gkz261.
69. Schuller, A. P., Wu, C. C., Dever, T. E., Buskirk, A. R., and Green, R. (2017) eIF5A functions globally in translation elongation and termination, *Mol. Cell*, **66**, 194-205.e195, doi: 10.1016/j.molcel.2017.03.003.
70. Kasari, V., Margus, T., Atkinson, G. C., Johansson, M. J. O., and Hauryliuk, V. (2019) Ribosome profiling analysis of eEF3-depleted *Saccharomyces cerevisiae*, *Sci. Rep.*, **9**, 3037, doi: 10.1038/s41598-019-39403-y.
71. Zhou, F., Zhang, H., Kulkarni, S. D., Lorsch, J. R., and Hinnebusch, A. G. (2020) eIF1 discriminates against suboptimal initiation sites to prevent excessive uORF translation genome-wide, *RNA*, **26**, 419-438, doi: 10.1261/rna.073536.119.
72. Fijalkowska, D., Verbruggen, S., Ndah, E., Jonckheere, V., Menschaert, G., and Van Damme, P. (2017) eIF1 modulates the recognition of suboptimal translation initiation sites and steers gene expression via uORFs, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 7997-8013, doi: 10.1093/nar/gkx469.
73. Sen, N. D., Zhou, F., Harris, M. S., Ingolia, N. T., and Hinnebusch, A. G. (2016) eIF4B stimulates translation of long mRNAs with structured 5'-UTRs and low closed-loop potential but weak dependence on eIF4G, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 10464-10472, doi: 10.1073/pnas.1612398113.
74. Young, D. J., Guydosh, N. R., Zhang, F., Hinnebusch, A. G., and Green, R. (2015) Rli1/ABCE1 recycles terminating ribosomes and controls translation reinitiation in 3'-UTRs *in vivo*, *Cell*, **162**, 872-884, doi: 10.1016/j.cell.2015.07.041.
75. Tang, L., Morris, J., Wan, J., Moore, C., Fujita, Y., et al. (2017) Competition between translation initiation factor eIF5 and its mimic protein 5MP determines non-AUG initiation rate genome-wide, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 11941-11953, doi: 10.1093/nar/gkx808.
76. Sugiyama, H., Takahashi, K., Yamamoto, T., Iwasaki, M., Narita, M., et al. (2017) Nat1 promotes translation of specific proteins that induce differentiation of mouse embryonic stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 340-345, doi: 10.1073/pnas.1617234114.

**MODIFICATIONS OF THE RIBOSOME PROFILING THAT PROVIDE
NEW DATA ON THE REGULATION OF TRANSLATION****Review****D. E. Andreev^{1,2}, V. V. Smirnova¹, and I. N. Shatsky^{1*}**¹ *Lomonosov Moscow State University, A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,
119992 Moscow, Russia; e-mail: shatsky@genebee.msu.su*² *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry
of the Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia*

Ribosome profiling (riboseq) has opened the possibilities for the genome-wide studies of translation in all living organisms. This method is based on deep sequencing of mRNA fragments protected by the ribosomes from hydrolysis by ribonucleases, the so-called ribosomal footprints (RFPs). Ribosomal profiling together with RNA sequencing allows not only to identify with a reasonable accuracy translated reading frames in the transcriptome, but also to track changes in gene expression in response to various stimuli. Notably, ribosomal profiling in its classical version has certain limitations. The size of the selected mRNA fragments is 25-35 nts, while RFPs of other sizes are usually omitted from analysis. Also, ribosomal profiling "averages" the data from all ribosomes and does not allow to study specific ribosomal complexes associated with particular translation factors. However, recently developed modifications of ribosomal profiling provide answers to a number of questions. Thus, it has become possible to analyze not only elongating, but also scanning and reinitiating ribosomes, to study events associated with the collision of ribosomes during mRNA translation, to discover new ways of cotranslational assembly of multisubunit protein complexes during translation, and to selectively isolate ribosomal complexes associated with certain protein factors. New data obtained using these modified approaches provide a better understanding of the mechanisms of translation regulation and the functional roles of translational apparatus components.

Keywords: ribosome profiling, ribosome, translation, protein synthesis, scanning, mRNA, Next-Generation Sequencing