

УДК 577.213:577.217

СХОДНЫЕ ЧЕРТЫ В МЕХАНИЗМАХ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ мРНК В ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ И ПРОКАРИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

© 2006 г. Д. Е. Андреев, И. М. Теренин, С. Е. Дмитриев, И. Н. Шатский

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992

Поступила в редакцию 20.02.2006 г.

На примере мРНК с нестандартными 5'-нетранслируемыми областями (5'-НТО) или мРНК без 5'-НТО (безлидерные мРНК) авторы обзора обсуждают сходные черты в механизмах инициации трансляции на прокариотических и эукариотических рибосомах.

Ключевые слова: инициация трансляции, механизмы, IRES-элементы, безлидерные мРНК.

SIMILAR FEATURES IN MECHANISMS OF TRANSLATION INITIATION OF MRNAS IN EUKARYOTIC AND PROKARYOTIC SYSTEMS, by D.E. Andreev, I.M. Terenin, S.E. Dmitriev, I.N. Shatsky* (A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow 119992, Russia; *e-mail: shatsky@libro.genebee.msu.su). Using as examples non-canonical features of translation initiation for some bacterial and mammalian mRNAs with unusual 5'- untranslated regions (5'-UTR) or lacking these regions (leaderless mRNAs), the authors of this review discuss similarities in mechanisms of translation initiation on prokaryotic and eukaryotic ribosomes.

До недавнего времени существовало устойчивое мнение, что механизмы инициации трансляции у прокариот и эукариот кардинально различны. Для такой точки зрения имеется достаточно оснований. У бактерий известны всего три фактора инициации – IF1, IF2 и IF3, в то время как 9 канонических и целый ряд вспомогательных мРНК-связывающих белков обслуживают процесс инициации трансляции у эукариот [1]. Бактериальные и эукариотические мРНК имеют разные сигналы первичного связывания мРНК. Большинство прокариотических мРНК полицистронны и способны связывать малые субчастицы рибосом во внутренних участках своих полинуклеотидных последовательностей, тогда как мРНК эукариот моноцистронны и в подавляющем большинстве случаев первичное связывание 40S субчастицы рибосом происходит только на 5'-конце этих мРНК. Исключение из этого правила представляют так называемые участки внутреннего связывания рибосом, или IRES-элементы (Internal Ribosome Entry Site), которые найдены в РНК ряда вирусов и в некоторых мРНК эукариот [2, 3]. Однако в отличие от сигнала Шайна-Далгарно (SD) и A,U-богатых последовательностей, узнаваемых белком S1 бактерий [4], изученные к настоящему времени IRES-элементы – это весьма протяженные (300–400 н.) и сложно устроенные структуры с высокоспецифичными участками связывания отдель-

ных компонентов эукариотического аппарата трансляции [2, 3].

В последнее десятилетие, однако, появились данные, которые похоже начали “перекидывать мостик” между механизмами инициации трансляции у эукариот и прокариот. Обнаружено, что несмотря на отсутствие гомологии в первичной структуре и разницу в размере, эукариотические факторы инициации eIF1, eIF1A и eIF5B являются структурными и функциональными аналогами бактериальных IF3, IF1 и IF2 [5–8]. Тем не менее, даже учитывая указанное сходство некоторых иницирующих факторов, трудно было предположить, что существуют очевидные параллели между бактериальным и эукариотическим механизмами инициации трансляции, поскольку процесс связывания мРНК и поиска иницирующего AUG-кодона на эукариотических 80S рибосомах выглядит очень сложным. Однако за последние годы описаны интересные случаи, которые говорят в пользу гораздо большего, чем думали ранее, сходства в механизмах поиска иницирующего кодона на мРНК между 70S и 80S рибосомами. Эти работы выполнены в основном в лаборатории Пестовой и Хеллена, в нашей лаборатории и в группе Бони. В данном обзоре обсуждаются молекулярные механизмы связывания мРНК, имеющих неканонические инициаторные участки, с рибосомами млекопитающих и бактерий. Эти механизмы обнаруживают новые параллели между системами инициации трансляции у про- и эука-

*Эл. почта: shatsky@libro.genebee.msu.su

риот. Однако прежде чем переходить к описанию этих необычных наблюдений, необходимо напомнить о сегодняшних представлениях о механизмах связывания мРНК у бактерий (прежде всего у *Escherichia coli*) и эукариот.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМАХ СВЯЗЫВАНИЯ И ПОИСКА ИНИЦИИРУЮЩЕГО КОДОНА У ПРО- И ЭУКАРИОТ

Знакомство с работами, опубликованными за последнее время, приводит к мысли, что далеко не все молекулярные биологи имеют четкое представление о том, какие сигналы в прокариотической мРНК определяют специфичность и эффективность поиска ее инициаторного кодона. По мнению многих, SD-антиSD-взаимодействие играет определяющую роль в первичном связывании рибосомы и в выборе конкретного иницирующего триплета на мРНК. Другими словами, считается, что РНК-РНК-взаимодействия являются характерной чертой прокариотической инициации трансляции, в отличие от эукариотической, которая, как полагают, основана на мРНК-белковых взаимодействиях. На самом деле совершенно упускается из виду, что на 30S субчастице рибосомы расположен мРНК-связывающий белковый компонент – рибосомный белок S1, без которого невозможна инициация трансляции в клетках *E. coli* и других грамотрицательных бактерий [9]. Участок мРНК, связывающий белок S1, расположен непосредственно перед последовательностью SD. Он не имеет какого-либо очевидного консенсуса. Ясно только, что когда такая последовательность обогащена U или A, то такой сигнал оказывается мощным энхансером инициации трансляции [4]. Скорее всего, белок S1, а не SD-последовательность осуществляет первичное связывание мРНК. Для эффективной инициации длина SD не должна превышать 5–6 н. В противном случае образуется слишком стабильный и долгоживущий комплекс, что резко снижает эффективность трансляции. Интересно, что белок S1 противодействует образованию очень длинного SD-антиSD-дуплекса [10].

Концепции о роли бактериальных иницирующих факторов за последнее время серьезно не изменились [1]. Фактор 3 у бактерий (IF3) способствует образованию правильного кодон-антикодонного взаимодействия между инициаторным триплетом мРНК и инициаторной тРНК, разрушая все другие кодон-антикодонные взаимодействия. Функциональным аналогом IF3 у эукариот является сканирующий фактор eIF1 (см. ниже). IF2 в присутствии GTP связывает на поверхности 30S субчастицы инициаторную тРНК и, по-видимому, затем стимулирует ассоциацию получаю-

щегося инициаторного 30S комплекса с 50S рибосомной субчастицей с образованием 70S инициаторного комплекса. Функциональным аналогом этого фактора у эукариот является 40S–60S-соединяющий фактор eIF5B. Фактор IF1 (eIF1A у эукариот) препятствует связыванию инициаторной тРНК в А-участке, тем самым стимулируя ее “посадку” строго в Р-сайт [11]. Важно отметить, что у бактерий в отличие от эукариот для укладки инициаторного района мРНК в мРНК-связывающий канал 30S субчастицы не требуется хеликаза и гидролиз АТФ. Такое отличие можно объяснить следующим образом. Во-первых, прокариотические рибосомы связываются с иницирующими районами мРНК сразу же после их синтеза РНК-полимеразой, поэтому блокирование инициаторных последовательностей за счет комплементарного спаривания с дистальными участками мРНК исключается. (У эукариот инициация трансляции происходит на уже полностью синтезированных молекулах мРНК). Во-вторых, на прокариотических мРНК инициаторные сигналы расположены, как правило, непосредственно перед иницирующим кодоном. Наконец, как недавно показано в лаборатории Ноллера [12], мРНК-связывающий канал 30S субчастицы в 3'-направлении от А-участка рибосомы обладает хеликазной активностью. Тем не менее, известно, что стабильные вторичные структуры, вовлекающие SD-последовательность и инициаторный триплет, сильно подавляют трансляцию у бактерий.

В отличие от прокариотических мРНК главный инициаторный сигнал в мРНК эукариот – это кеп-структура на их 5'-конце. Именно здесь начинаются все события процесса инициации трансляции в подавляющем большинстве эукариотических мРНК (рис. 1). С кепом связывается иницирующий фактор eIF4E, который входит в состав мультимерного комплекса eIF4F. Главный структурный компонент этого комплекса – его большая субъединица eIF4G (170 кДа), которая имеет участки связывания уже упомянутой кеп-связывающей субъединицы eIF4E, двух молекул хеликазы eIF4A и поли(А)-связывающего белка PABP (Poly(A)-Binding Protein). В результате взаимодействия PABP, который связан с поли(А) на 3'-конце мРНК, с eIF4G ассоциация всего комплекса факторов с 5'-концом мРНК заметно стабилизируется, и, как следствие этого взаимодействия, мРНК замыкается в кольцо [13]. Комплекс мРНК с этими факторами присоединяется к 40S рибосомной субчастице, которая уже несет на себе тройной комплекс eIF2-GTP-Мет-тРНК_и, eIF3, eIF1A, eIF1 и eIF5. В результате такого взаимодействия образуется так называемый 48S комплекс. Фактор eIF3 это огромный мультисубъединичный комплекс, который в настоящее время интенсивно изучается. Он служит площадкой, на которой собирается большинство других факторов, вклю-

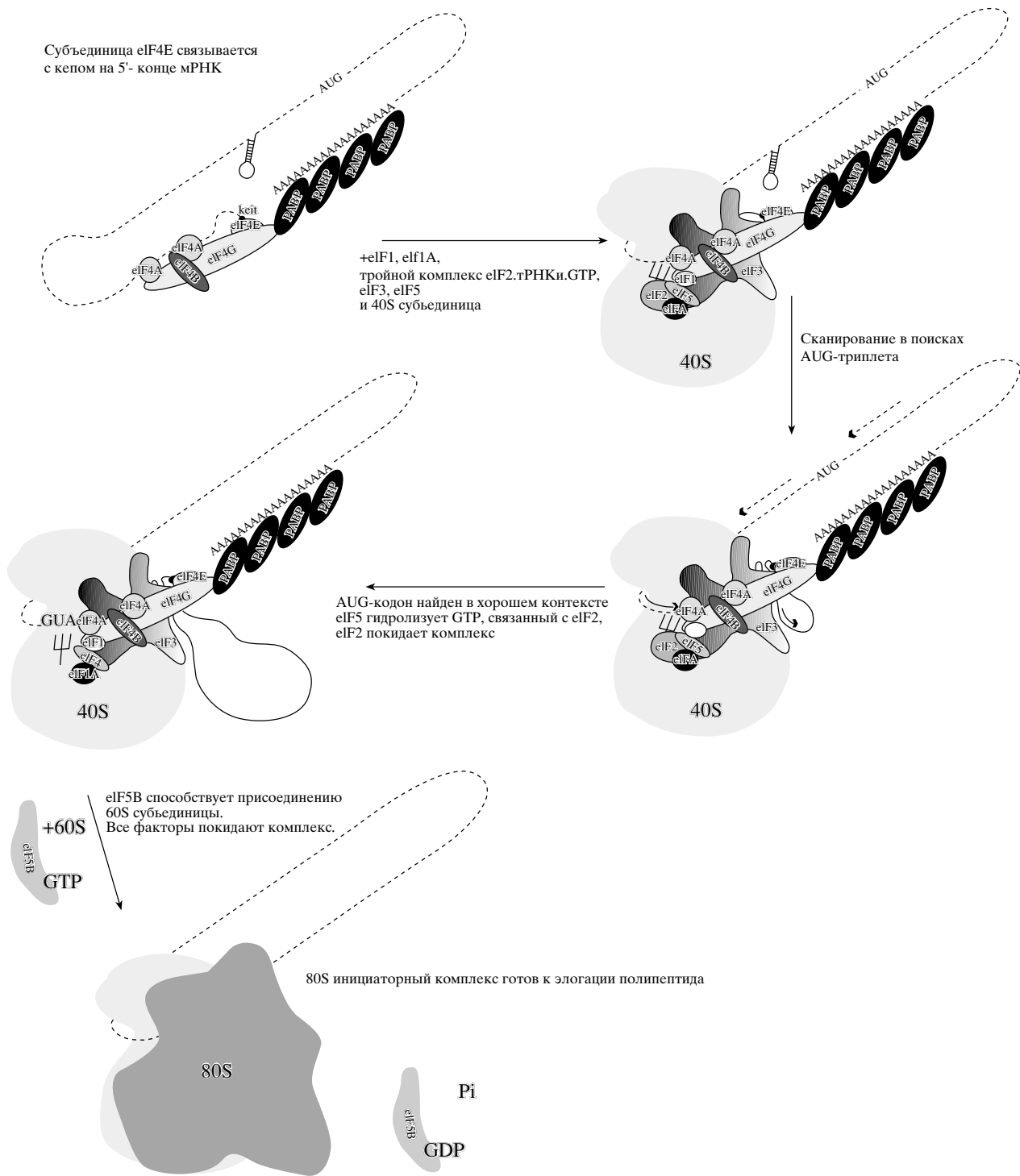


Рис. 1. Схема инициации трансляции у эукариот по кеп-зависимому пути. Пояснения в тексте.

чая eIF4G – субъединицу кеп-связывающего комплекса eIF4F. eIF3 также стимулирует связывание тройного комплекса eIF2-GTP-Мет-тРНК_{Met} [1]. После связывания 43S комплекса с комплексом мРНК-eIF4F-РАВР начинается процесс сканирования 5'-НТО мРНК в 3'-направлении в поисках бли-

жайшего инициаторного кодона, который должен находиться в оптимальном нуклеотидном контексте ...ANNAUGG/A... [14]. Процесс сканирования сопровождается разворачиванием вторичной структуры 5'-НТО хеликазой eIF4A, что требует гидролиза АТФ. Для плавления особенно стабиль-

ных шпилек хеликазе eIF4A требуется помощь еще одного фактора – eIF4B (см. [15] и ссылки там). В поиске инициаторного кодона обязательно участвует сканирующий фактор eIF1 (также связанный с eIF3), полный аналог прокариотического IF3 [8]. Когда инициаторный кодон найден, и установилось кодон-антикодонное взаимодействие между ним и Met-тРНК_i (48S комплекс), под действием eIF5 происходит гидролиз GTP в составе тройного комплекса eIF2-GTP-Met-тРНК_i, и фактор eIF2 высвобождается из 40S субчастицы. Дальнейшие события изучены не так подробно. Известно, что после освобождения eIF2-GDP фактор eIF5B, используя гидролиз второй молекулы GTP, присоединяет 60S рибосомную субчастицу к 48S комплексу, все факторы покидают рибосому и сформировавшийся 80S иницирующий комплекс оказывается готовым к элонгации полипептидной цепи. Аналогом eIF5B у прокариот является фактор IF2 [5]. Аналога “сканирующего” эукариотического фактора eIF2 у бактерий нет, он есть у архей, но его функция у них не установлена.

Таким образом, у эукариот связывание мРНК и выбор на ней иницирующего триплета целиком основаны на РНК-белковых взаимодействиях. АнтиSD-последовательность в эукариотической 18S рРНК отсутствует. Периодически появляются работы, в которых предполагается участие взаимодействия типа SD-антиSD между 5'-НТО отдельных мРНК эукариот и 18S рРНК 40S субчастицы. Однако серьезные экспериментальные доказательства вовлечения взаимодействий такого типа в инициаторный процесс у эукариот авторы, как правило, не предоставляют. Исключение составляют, пожалуй, только работы группы Мауро ([16] и ссылки там). Эти авторы представили достаточно серьезные экспериментальные данные, которые говорят в пользу существования взаимодействия типа SD-антиSD между и нонануклеотидным элементом из 5'-НТО мРНК мыши, кодирующей гомеодомен *Gtx*, и комплементарной последовательностью из шпильки 26 в 18S рРНК мыши [16]. Однако и здесь есть еще очень много вопросов, на которые необходимо ответить, прежде чем отпадут все сомнения в существовании SD-антиSD-взаимодействий хотя бы у отдельных представителей эукариотических мРНК. В любом случае самым строгим экспериментальным доказательством таких взаимодействий у эукариот может быть только прямая регистрация дуплекса между мРНК и 18S рРНК в составе 48S иницирующего комплекса.

Описанный выше процесс инициации трансляции справедлив для подавляющего большинства эукариотических мРНК, но не для всех. Целый ряд геномных РНК у РНК-содержащих вирусов животных не содержат кеп-структуру на 5'-конце, а их 5'-НТО длиной до 1000 н. имеют очень силь-

но развитую вторичную структуру. Такие РНК используют уже упомянутый выше механизм внутренней инициации трансляции [2, 3], типичный для бактерий. Согласно этому механизму, 40S субчастица связывается не с 5'-концом мРНК, а со специфической структурой внутри 5'-НТО этой мРНК, или IRES-элементом. Предполагается IRES-элементы присутствуют в некоторых клеточных мРНК, хотя этот вопрос в настоящее время активно обсуждается [17]. Даже у родственных вирусов IRES-элементы могут иметь совершенно разную структуру и предъявлять разные требования к набору канонических иницирующих факторов, описанных выше [2, 3]. Существенный вклад в изучение структуры ряда вирусных IRES-элементов и их требований как к каноническим, так и к вспомогательным белковым факторам, внесли работы нашей лаборатории и лаборатории Пестовой-Хеллена [2, 3]. Подход, использованный в этих работах, основан на реконструкции иницирующих комплексов *in vitro* из полностью очищенных компонентов с последующим анализом этих комплексов методом тоупринтинга [18].

МЕХАНИЗМ ОБРАЗОВАНИЯ 48S ИНИЦИИРУЮЩЕГО КОМПЛЕКСА НА РНК ВИРУСА *Rhopalosiphum padi* (RhPV)

Геномная мРНК вируса RhPV, инфицирующего черемуховую тлю, имеет 5'-НТО длиной 579 н. Эта РНК не кепирована, ее 5'-конец, по-видимому, ковалентно связан с вирусным белком, что исключает использование для инициации трансляции классического кеп-зависимого механизма. Действительно, показано [19], что 5'-НТО РНК RhPV содержит IRES-элемент. Удивительно, однако, что этот элемент способен с одинаковой эффективностью направлять трансляцию в бесклеточных системах из клеток насекомых, пшеницы и млекопитающих. Известные в настоящий момент IRES-элементы, как правило, высокоспецифичны и не узнаются компонентами трансляции из гетерологичных систем. IRES-элемент РНК RhPV изучали в нашей системе сборки 48S предынициаторных комплексов из очищенных компонентов с последующим анализом методом тоупринтинга [18]. Как и ожидалось, в присутствии всех канонических факторов инициации млекопитающих данный IRES-элемент эффективно образует 48S иницирующий комплекс. Однако исключение фактора eIF4B из инкубационной смеси никак не влияло на выход этого комплекса. (Фактор eIF4B помогает хеликазе eIF4A “плавить” шпильки в 5'-НТО мРНК в процессе сканирования). Более того, образование 48S комплекса, хотя и с довольно низким выходом, наблюдалось при полном отсутствии всех факторов четвертой группы – eIF4A, eIF4B, и eIF4F. Приме-

1 gataaaagaa cctataatcc cttcgcacac cgcgtcacac cgcgctatat gctgctcatt
 61 aggaattacg gctccttttt tgtggataca atctcttgta tacgatatac ttattgttaa
 121 tttcattgac ctttacgcaa tcctgcgtaa atgctgggtat aggggtgtact tcggatttcc
 181 gagcctatat tggttttgaa *aggaccttta agtccctact atactacatt gtactagcgt*
 241 *aggccacgta ggcccgtaag atattataac tttttatta tttttattc accccccaca*
 301 *ttaatccag ttaaagcttt ataactataa gtaagccgtg ccgaaacggt aatcggtcgc*
 361 *tagttgcgta acaactgtta gtttaatttt ccaaatttta tttttcaca tttttagtta*
 421 ***agattttagc ttgccttaag cagtctttat atcttctgta tattatttta aagtttatag***
 481 ***gagcaaagtt cgctttactc gcaatagcta ttttatttat ttaggaata ttatcacctc***
 541 ***gtaattattt aattataaca ttagctttat ctatttata AUG***tctacgat gtcttgacc

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность 5'-НТО РНК вируса *Rhopalosiphum padi*. Нуклеотидные остатки, составляющие IRES-элемент этой РНК, представлены курсивом. Полностью неструктурированная часть IRES-элемента RhPV выделена жирным.

чательно, что замена АТФ на его негидролизуемый аналог не приводила к дальнейшему снижению выхода 48S комплекса [20].

Способность IRES-элемента мРНК RhPV к сборке 48S иницирующего комплекса в отсутствие иницирующих факторов четвертой группы и гидролиза АТФ совершенно не характерна для эукариот, за исключением IRES-элементов РНК вируса гепатита С, некоторых флавивирусов и вируса паралича свертка (CrPV), механизм инициации трансляции которых, как установлено ранее, гораздо ближе к прокариотическому, чем к эукариотическому [2].

Для локализации IRES-элемента внутри 5'-НТО РНК RhPV получили большие делеции (~100 н. каждая), перекрывающие всю эту 5'-НТО. Способность этих мутантных форм РНК RhPV образовывать 48S комплексы проверена в системе сборки. Обнаружено, что ни одна из делеций не уничтожает активность IRES-элемента РНК RhPV. Только делеция двух третей AUG-проксимальной последовательности 5'-НТО (нуклеотиды 199–599) приводила к резкому подавлению активности IRES-элемента. Результаты химического и ферментативного зондирования выявили высокую структурированность 5'-концевой трети 5'-НТО, слабую структурированность средней части и фактически полное отсутствие спаривания оснований в U-богатой AUG-проксимальной области 5'-НТО РНК RhPV (рис. 2) [20]. Таким образом, в отличие от других IRES-элементов, изученных к настоящему времени, IRES-элемент РНК RhPV не имеет специфических участков связывания компонентов инициации трансляции, что

и объясняет его способность работать в любых эукариотических бесклеточных системах. Внутреннее связывание 40S рибосомной субчастицы с этой РНК неспецифически направляется длинным U-богатым однотяжевым районом.

Хотя соответствующие опыты в бактериальной системе еще не проведены, есть серьезные основания ожидать, что такой IRES-элемент будет работать и в системе *E. coli*, тем более, что рибосомный белок S1 *E. coli* имеет ярко выраженное сродство к U-богатым последовательностям. В работе группы Бони установлено, что если 5'-НТО эукариотической мРНК содержит подходящую нуклеотидную последовательность (сигнал) для белка S1, то наличие в ней SD-последовательности не обязательно для связывания с 30S рибосомными субчастицами *E. coli* [21].

Необходимо отметить, что для образования 48S комплекса как RhPV IRES-элементу дикого типа, так и всем его активным делеционным вариантам абсолютно необходим сканирующий фактор eIF1 [20]. Почти полную аналогию с этим наблюдением можно найти в упомянутой работе группы Бони [21], в которой показано, что образование бактериального 30S иницирующего комплекса на мРНК, лишенной последовательности SD, но способной связываться с 30S субчастицей через белок S1, полностью зависит от фактора IF3, функционального аналога эукариотического eIF1. Таким образом, сканирование не является исключительной принадлежностью эукариотического механизма инициации трансляции. Сканирование происходит и в процессе локализации иницирующего кодона 30S субчастицей, хотя в

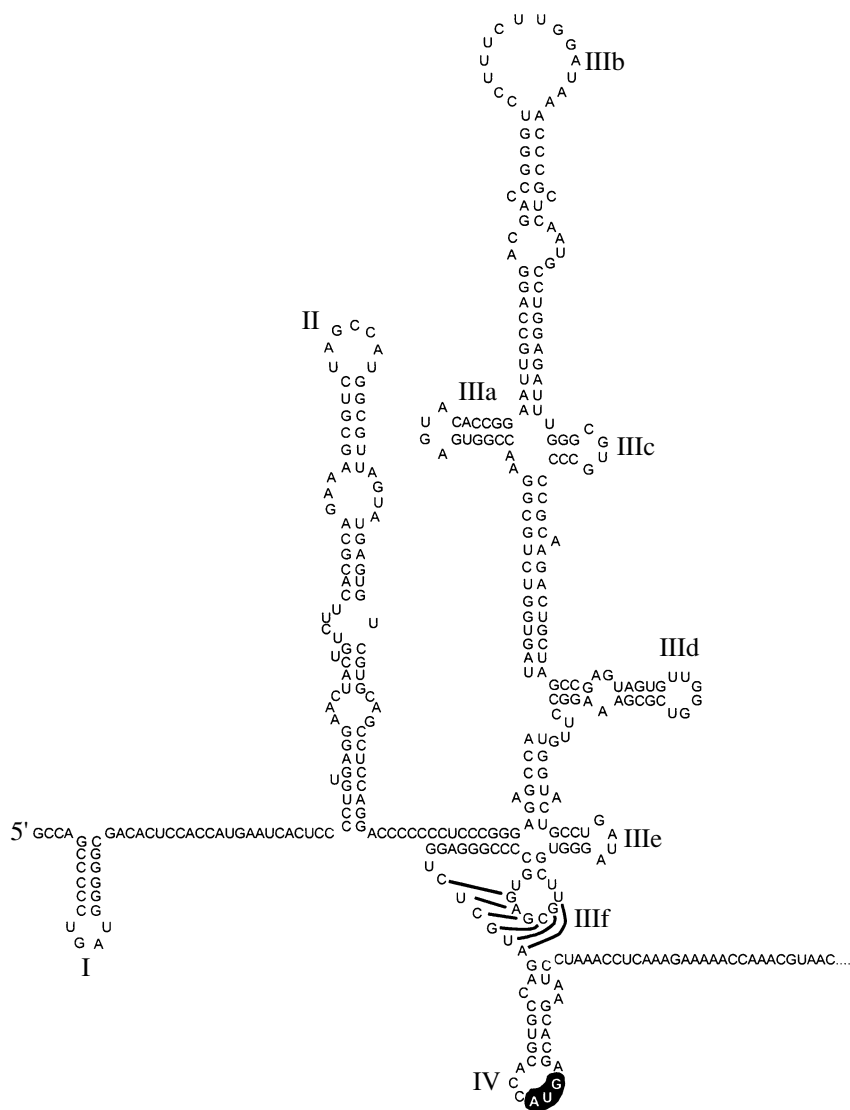


Рис. 3. Структура 5'-НТО РНК вируса гепатита С человека. Домены обозначены римскими цифрами. В состав IRES-элемента РНК HCV входят домены II, III, IV и начальная часть кодирующей последовательности, показанная на рисунке. Субдомены IIIa, IIId, IIIe и домен IV играют основную роль в бесфакторном образовании бинарного комплекса IRES-элемента РНК HCV с 40S рибосомной субчастицей. Фактор eIF3 связывается в участке соединения шпилек IIIa, IIIb и IIIc. Точная функция домена II пока не ясна.

бактериальных мРНК сканирование вероятно происходит в пределах достаточно короткой последовательности нуклеотидов иницирующего района.

ОСОБЕННОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ IRES-ЭЛЕМЕНТА РНК ВИРУСА ГЕПАТИТА С С 40S СУБЧАСТИЦАМИ РИБОСОМ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Обнаружены удивительные особенности связывания IRES-элемента РНК вируса гепатита С (HCV), родственных элементов некоторых пести-вирусов (и даже отдельных представителей пи-

корнавирусов) с 40S субчастицей. Для подобных IRES-элементов характерен особый способ выбора иницирующего кодона в соответствующих мРНК аппаратом инициации трансляции млекопитающих. Этой теме посвящено несколько обзоров [2, 3], поэтому мы просто коротко напомним о необычных свойствах IRES-подобных структур HCV. Нуклеотидная последовательность этих элементов (порядка 300 н.) складывается в уникальную структуру (рис. 3), подобной которой не найдено ни в одной клеточной мРНК млекопитающих. Для образования 48S иницирующего комплекса такие IRES-элементы нуждаются только в двух иницирующих факторах – eIF2 и eIF3.

Это означает, что не требуется никакого сканирования. Уникальные особенности IRES-элементов типа IRES HCV в значительной мере объясняются тем, что они способны формировать на первой стадии инициации прочные и специфические бинарные комплексы с 40S субчастицей из клеток млекопитающих в отсутствие каких-либо факторов инициации и инициаторной тРНК. В связывание вовлечены рибосомные белки, но не рРНК. Какой или какие из рибосомных белков 40S субчастиц участвуют в этом первичном связывании до сих пор не ясно, хотя кандидатов на эту роль уже больше десяти. Важно упомянуть, что 40S субчастицы из растений или дрожжей эти IRES-элементы не связывают. Предложена модель [22], согласно которой IRES-элемент HCV связывается непосредственно с 40S субчастицей рибосомы таким образом, что иницирующий AUG-кодон сразу направляется в Р-участок субчастицы. Поэтому и не требуются ни сканирующий фактор eIF1, ни eIF1A (аналог IF1 у бактерий), ни факторы четвертой группы. Чтобы образовать иницирующий 48S комплекс остается только присоединить тройной комплекс eIF2-GTP-Met-тРНК_{Met}, что и наблюдается в эксперименте [22]. Зачем нужен еще и eIF3 не очень ясно. Известно только, что этот фактор стимулирует связывание eIF2-GTP-Met-тРНК_{Met} с 40S субчастицей. Возможно, он нужен на следующей стадии, когда eIF5 и eIF5B присоединяют 48S иницирующий комплекс, сформированный на IRES-элементе HCV, к большой субчастице рибосомы.

Таким образом, IRES HCV как бы выполняет роль и прокариотического белка S1 рибосом, и последовательности SD, помещая иницирующий кодон РНК HCV в непосредственной близости от Р-участка рибосомы, хотя и имеет гораздо больший размер, чем стандартный участок инициации трансляции прокариотической мРНК. В любом случае, механизм инициации трансляции на IRES-элементе HCV совершенно нетипичен для эукариотических мРНК.

IRES-ПОДОБНЫЙ ЭЛЕМЕНТ В мРНК, КОДИРУЮЩИХ РИБОСОМНЫЙ БЕЛОК S1 ИЗ *E. coli* И ДРУГИХ ГАММА-ПРОТЕОБАКТЕРИЙ

В предыдущих разделах приведены примеры эукариотических мРНК, которые используют механизмы инициации трансляции, не типичные для эукариот и несущие черты сходства с механизмами инициации у бактерий. мРНК, кодирующая рибосомный белок S1 из *E. coli* и других гамма-протеобактерий (мРНК *rpsA*), представляет собой яркий пример нетипичной бактериальной инициации трансляции, которая напоминает IRES-зависимую инициацию у эукариот. Иницирующий район (TIR) мРНК *rpsA* является одним из самых эф-

фективных в *E. coli*, несмотря на отсутствие в нем канонической последовательности SD. TIR мРНК *rpsA* занимает район ~ в 100 н. и содержит три шпилечных структуры. Предполагается, что эти шпилечные структуры образуют специфическую пространственную структуру, в которой отдельные участки ориентированы строго определенным образом, необходимым для эффективного взаимодействия с компонентами трансляционного аппарата. Нарушение этой специфической IRES-подобной структуры при посадке дополнительных молекул рибосомного белка S1 значительно снижает эффективность инициации трансляции на мРНК *rpsA*, обеспечивая аутогенный контроль синтеза белка S1 [23].

НЕЗАВИСИМОЕ ОТ ИНИЦИИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ СВЯЗЫВАНИЕ БЕЗЛИДЕРНЫХ мРНК С 70S И 80S РИБОСОМАМИ

Безлидерные мРНК, т.е. мРНК, которые начинаются непосредственно с иницирующего AUG-кодона, обнаружены во всех трех царствах живых организмов, хотя пока еще не найдены в клетках млекопитающих. В 1992 г. в нашей лаборатории обнаружили, что безлидерная мРНК, кодирующая репрессор cI фага λ , способна связываться в отсутствие иницирующих факторов непосредственно с 70S рибосомами [24]. Более того, оказалось, что иницирующий фактор IF3 препятствует связыванию такой мРНК с 30S субчастицами. В дальнейшем эти выводы подтвердили на разных безлидерных мРНК в других лабораториях и показали, что для таких мРНК путь инициации через прямое связывание с 70S рибосомами является, скорее всего, основным [25]. Было решено проверить, способны ли к такому способу инициации трансляции 80S рибосомы млекопитающих. Для опытов выбрали модельную мРНК, которая начинается с последовательности той же мРНК *cI*, переходящей затем в последовательность *lacZ*. Очевидно, что такая модельная мРНК не имеет никаких специфических эукариотических черт. Связывание этой мРНК с 40S рибосомными субчастицами или с 80S рибосомами также проверяли в очищенной системе с помощью метода тоупринта. Оказалось, что мРНК *cllacZ* в присутствии Met-тРНК_{Met} способна связывать 80S, но не 40S, рибосомы без каких-либо эукариотических факторов инициации трансляции [26]. Мутация 5'-концевого AUG-кодона в GUG полностью подавляет такое связывание. Как и в случае 70S рибосом *E. coli*, даже незначительное удлинение 5'-конца сильно ингибировало связывание, а более длинный, даже неструктурированный лидер (CAA)₁₉ предотвращал его полностью. Объяснение этому факту дано в нашей работе 1992 г. [24]. Хотя мРНК *cllacZ* в присутствии всех факто-

ров могла образовывать комплексы и с 40S рибосомной субчастицей, эффективность этого связывания была почти такой же, как при бесфакторном связывании с целыми 80S рибосомами. Важно отметить, что 80S комплексы, образованные с мРНК *cIlacZ* в отсутствие факторов инициации, оказались полностью компетентными к дальнейшей элонгации полипептида при добавлении обоих факторов элонгации EF1H и EF2 [26]. Таким образом, показано, что для безлидерных мРНК канонический способ инициации через 40S рибосомные субчастицы по крайней мере не имеет преимуществ перед 80S инициаторным путем. Можно предположить, что в условиях естественной конкуренции со стандартными лидер-содержащими мРНК этот путь, как и в случае бактериальных систем, окажется основным, если не единственным.

Сходство в механизмах инициации трансляции на безлидерных мРНК с 70S и 80S рибосомами должно быть в дальнейшем подкреплено результатами сравнения структурной организации соответствующих мРНК-связывающих каналов, особенно тех частей этих каналов, которые взаимодействуют с 5'-концевой кодирующей областью мРНК. Такие исследования интенсивно ведутся в лаборатории Г.Г. Карповой в Новосибирске, но окончательные выводы еще впереди.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Свойства некоторых неканонических мРНК при программировании рибосом млекопитающих и бактерий дают основания заключить, что основные принципы связывания мРНК у эукариотических и прокариотических рибосом имеют гораздо больше сходства, чем это можно было предположить еще 5–10 лет назад. В случае же безлидерных мРНК мы видим практически полное совпадение механизмов их связывания с прокариотическими и эукариотическими рибосомами. Не исключено, что такие мРНК представляют собой реликт эволюции трансляционного аппарата. Эти данные должны укрепить нас во мнении, что кажущийся громоздким аппарат инициации трансляции у эукариот существует главным образом для работы со сложными 5'-НТО эукариотических мРНК, обеспечивая одновременно регуляцию их активности. Огромное разнообразие структур 5'- и 3'-НТО эукариотических мРНК, в особенности мРНК млекопитающих, потребовало участия в трансляционном контроле множества белковых факторов как общих для всех мРНК, так и специфических, т.е. работающих с индивидуальными мРНК эукариот. Некоторые из них, вероятно, осуществляют связь трансляции с другими процессами передачи и реализации генетической информации в эукариоти-

ческой клетке (транскрипция, сплайсинг, транспорт мРНК, биогенез рибосомных субчастиц).

Логично предположить, что эти специфические белковые факторы могут иметь контакты не только с мРНК, но и с рибосомными структурными белками или с дополнительными доменами эукариотических рРНК. Многие из структурных белков рибосомных субчастиц и дополнительные домены рРНК эукариот могут не иметь прямого отношения к основным функциям рибосомы как белоксинтезирующей машины. Открытие способности белка RACK1, интегрального компонента 40S субчастицы рибосом млекопитающих, связывать протеинкиназу С хорошо иллюстрирует разнообразие функций компонентов эукариотической рибосомы [27]. В данном случае рибосомный белок оказывается связующим звеном между сигнальным и трансляционным аппаратами клетки. Другой яркий пример – это белок L13a из 60S субчастицы. В нефосфорилированном состоянии он прочно интегрирован в структуру субчастицы, а в фосфорилированном состоянии связывается с 3'-НТО мРНК церулоплазмينا и принимает участие в подавлении инициации трансляции этой мРНК [28]. Пока таких примеров, где четко выявляются функции рибосомных белков, не связанные непосредственно с процессом синтеза полипептида, немного, но их число со временем должно возрасти, если принять во внимание, что даже в дрожжевой малой субчастице (40S субчастица из клеток млекопитающих еще сложнее) из 32 структурных белков только 15 гомологичны бактериальным, а 17 не имеют аналогов. С другой стороны, из 22 белков 30S субчастицы только шесть–семь не имеют аналогов в рибосомах эукариот. Опубликовано множество сообщений об изменении экспрессии генов отдельных рибосомных белков в раковых линиях клеток млекопитающих, но функциональное значение таких изменений пока не известно.

Авторы, задумывая эту статью, исходили из предположения, что постоянное сравнение не только структур рибосом или отдельных факторов трансляции (что делается постоянно), но и самих механизмов трансляции у бактерий и эукариот может быть весьма полезным для более глубокого понимания этого фундаментального процесса. Подробный анализ этих механизмов позволяет более четко вычленивать, что же в них является сходным, а что кардинально различным и тем самым сфокусировать внимание исследователей на еще совсем не исследованных проблемах.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (05-04-49704).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hershey J.W.B., Merrick W.C. 2000. Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. In: *Trans-*

- lational control*. Eds Sonenberg N., Hershey J.W.B., Mathews M.B. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 33–88.
2. Hellen C.U.T., Sarnow P. 2001. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev.* **15**, 1593–1612.
 3. Сизова Д.В., Шатский И.Н. 2000. Участки внутреннего связывания рибосом у вирусных и клеточных мРНК. *Молекуляр. биология.* **34**, 181–192.
 4. Boni I.V., Issaeva D.M., Musychenko M.L., Tzareva N.V. 1991. Ribosome-messenger recognition: mRNA target sites for ribosomal protein S1. *Nucleic Acids Res.* **19**, 155–162.
 5. Pestova T.V., Lomakin I.B., Lee J.H., Choi S.K., Dever T.E., Hellen C.U. 2000. The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature.* **403**, 332–335.
 6. Battiste J.L., Pestova T.V., Hellen C.U., Wagner G. 2000. The eIF1A solution structure reveals a large RNA-binding surface important for scanning function. *Mol. Cell.* **5**, 109–119.
 7. Pestova T.V., Kolupaeva V.G. 2002. The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev.* **16**, 2906–2922.
 8. Lomakin I.B., Shirokikh N.E., Yusupov M.M., Hellen C.U., Pestova T.V. 2006. The fidelity of translation initiation: reciprocal activities of eIF1, IF3 and YciH. *EMBO J.* **25**, 196–210.
 9. Sorensen M.A., Fricke J., Pedersen S. 1998. Ribosomal protein S1 is required for translation of most, if not all, natural mRNAs in *Escherichia coli in vivo*. *J. Mol. Biol.* **280**, 561–569.
 10. Komarova A.V., Tchufistova L.S., Supina E.V., Boni I.V. 2002. Protein S1 counteracts the inhibitory effect of the extended Shine-Dalgarno sequence on translation. *RNA.* **8**, 1137–1147.
 11. Dahlquist K.D., Puglisi J.D. 2000. Interaction of translation initiation factor IF1 with the E.coli ribosomal A site. *J. Mol. Biol.* **299**, 1–15.
 12. Takyar S., Hickerson R.P., Noller H.F. 2005. mRNA helicase activity of the ribosome. *Cell.* **120**, 49–58.
 13. Wells S.E., Hillner P.E., Vale R.D., Sachs A.B. 1998. Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol. Cell.* **2**, 135–140.
 14. Kozak M. 1989. The scanning model for translation: an update. *J. Cell. Biol.* **108**, 229–241.
 15. Dmitriev S.E., Terenin I.M., Dunaevsky Y.E., Merrick W.C., Shatsky I.N. 2003. Assembly of 48S translation initiation complexes from purified components with mRNAs that have some base pairing within their 5' untranslated regions. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 8925–8933.
 16. Dresios J., Chappell S.A., Zhou W., Mauro V.P. 2006. An mRNA-rRNA base-pairing mechanism for translation initiation in eukaryotes. *Nature Struct. Mol. Biol.* **13**, 30–34.
 17. Kozak M. 2005. A second look at cellular mRNA sequences said to function as internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Res.* **33**, 6593–6602.
 18. Шатский И.Н. 2001. Реконструкция иницирующих комплексов *in vitro* для исследования молекулярных механизмов инициации трансляции у млекопитающих. *Молекуляр. биология.* **35**, 628–637.
 19. Woolaway K.E., Lazardis K., Belsham G.J., Carter M.J., Roberts L. 2001. The 5' untranslated region of *Rhopalosiphum padi* virus contains an internal ribosome entry site which functions efficiently in mammalian, plant, and insect translation systems. *J. Virol.* **75**, 10244–10249.
 20. Terenin I.M., Dmitriev S.E., Andreev D.E., Royall E., Belsham G. J., Roberts L.O., Shatsky I.N. 2005. A cross-kingdom internal ribosome entry site reveals a simplified mode of internal ribosome entry. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 7879–7888.
 21. Tzareva N.V., Makhno V.I., Boni I.V. 1994. Ribosome-messenger recognition in the absence of the Shine-Dalgarno interactions. *FEBS Lett.* **337**, 189–194.
 22. Pestova T.V., Shatsky I.N., Fletcher S.P., Jackson R.J., Hellen C.U.T. 1998. A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev.* **12**, 67–83.
 23. Boni I.V., Artamonova V.S., Tzareva N.V., Dreyfus M. 2001. Non-canonical mechanism for translational control in bacteria: synthesis of ribosomal protein S1. *EMBO J.* **20**, 4222–4232.
 24. Balakin A.G., Skripkin E.A., Shatsky I.N., Bogdanov A.A. 1992. Unusual ribosome binding properties of mRNA encoding bacteriophage lambda repressor. *Nucleic Acids Res.* **20**, 563–571.
 25. Moll I., Grill S., Gualerzi C.O., Blasi U. 2002. Leaderless mRNAs in bacteria: surprises in ribosomal recruitment and translational control. *Mol. Microbiol.* **43**, 239–246.
 26. Andreev D.E., Terenin I.M., Dunaevsky Y.E., Dmitriev S.E., Shatsky I.N. 2006. A leaderless mRNA can bind to mammalian 80S ribosomes and direct polypeptide synthesis in the absence of translation initiation factors. *Mol. Cell. Biol.* (in press)
 27. Nilsson J., Sengupta J., Frank J., Nissen P. 2004. Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO Rep.* **5**, 1137–1141.
 28. Mazumder P., Sampath P., Seshadri V., Maitra R.K., DiCorleto P.E., Fox P.L. 2003. Regulated release of L13a from the 60S ribosomal subunit as a mechanism of transcript-specific translational control. *Cell.* **115**, 187–198.