

---

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ  
БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ**


---

УДК 577.217.52

## НЕЗНАЧИТЕЛЬНЫЕ ВАРИАЦИИ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ 5'-НЕТРАНСЛИРУЕМОЙ ОБЛАСТИ мРНК β-ГЛОБИНА ИЗМЕНЯЮТ ТРЕБОВАНИЯ К КОНЦЕНТРАЦИИ ФАКТОРА ИНИЦИАЦИИ eIF2

© 2003 г. С. Е. Дмитриев, И. М. Теренин, М. П. Рубцова, И. Н. Шатский\*

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119899

Поступила в редакцию 24.09.2002 г.

Изменения в нуклеотидной последовательности 5'-нетранслируемой области мРНК β-глобина, увеличивающие число спаренных оснований без появления стабильных вторичных структур, слабо влияют на эффективность трансляции этой мРНК в лизате ретикулоцитов кролика при ее низкой концентрации, но резко снижают эффективность трансляции при высоких концентрациях. Удаление спаренных участков восстанавливает характер трансляции. Добавление в лизат очищенного эукариотического фактора инициации eIF2 приводит к ликвидации различий в трансляции матриц с разной вторичной структурой 5'-нетранслируемой области. Аналогичный эффект обеспечивает р50, главный белок мРНК. Добавление других мРНК-связывающих инициаторных факторов – eIF4F и eIF4B – не сказывается на зависимости эффективности трансляции от концентрации мРНК. При помощи системы сборки 48S инициаторного комплекса из очищенных компонентов показано, что для максимальной эффективности инициации трансляции исходной мРНК β-глобина необходимо меньше eIF2, чем для ее производной, содержащей в 5'-нетранслируемой области слабые вторичные структуры. Предложена модель, согласно которой eIF2, помимо доставки Met-тРНК, выполняет функцию фактора, стабилизирующего взаимодействие 40S субчастицы рибосомы с 5'-нетранслируемой областью мРНК, что особенно важно при инициации трансляции на матрицах со структурированными 5'-нетранслируемыми областями.

*Ключевые слова:* инициация трансляции, мРНК β-глобина, вторичная структура мРНК, 5'-нетранслируемая область, фактор инициации eIF2, реконструкция 48S инициаторного комплекса, млекопитающие.

Два ключевых этапа в инициации трансляции – это связывание малой рибосомной 40S субчастицы с инициаторной Met-тРНК и “посадка” субчастицы на мРНК. Первый этап у эукариот осуществляется с помощью трехсубъединичного фактора инициации eIF2, образующего тройной комплекс eIF2 · GTP · Met-тРНК. Второй этап катализируется мРНК-связывающими факторами eIF4F, eIF4A и eIF4B, которые расплетают вторичные структуры в лидере (5'-НТО) мРНК и, возможно, обеспечивают движение 40S субчастицы от 5'-конца мРНК к AUG-кодону. Несмотря на то, что строение и функции каждого из этих белков хорошо изучены, модель, описывающая процесс инициации трансляции в целом (см., например, обзоры [1, 2]), оставляет много открытых вопро-

сов. В частности, очень мало известно о том, как соотносятся друг с другом два этапа инициации: независимы ли они, какова их последовательность и насколько жестко она детерминирована. Некоторые данные [3, 4] позволяют предположить, что взаимодействие тройного комплекса с 40S субчастицей носит характер ассоциации-диссоциации, и связывание становится стабильным лишь при достижении сканирующей рибосомой AUG-кодона благодаря спариванию оснований с антикодоном тРНК. Взаимодействие 40S субчастицы с мРНК также, скорее всего, не является необратимым процессом, причем стабильность ассоциации находится в обратной зависимости от стабильности вторичных структур в 5'-НТО [5]. Исходя из такой модели динамических взаимодействий компонентов инициации, можно высказать предположение, что матрицы с более структурированными 5'-НТО должны иметь повышенные требования к количеству факторов инициации и быть чувствительными к уменьшению их концентрации. Поскольку многие факторы обладают очень сильными мРНК-связывающими свойствами [6–8], при увеличении количества мРНК в сис-

Принятые сокращения: 5'-НТО – 5'-нетранслируемая область, ТЧЛ – трехчастный лидер, ПЦР – полимеразная цепная реакция, ОТ-ПЦР – обратная транскрипция-полимеразная цепная реакция, DMS – диметилсульфат, СМСТ – 1-циклогексил-3-(2-морфолино-этил)-карбодимид мето-*p*-толуолсульфонат, GMPNP – гуанозин-5'-[β,γ-имидо]трифосфат, ДТТ – дитиотреитол, GFP – зеленый флуоресцентный белок.

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

теме эффективная концентрация этих факторов падает, и вероятность инициации на таких структурированных матрицах уменьшается – иными словами, мРНК начинает ингибировать собственную трансляцию. Феномен ингибирования матрицей собственной трансляции известен достаточно давно [9, 10], и его объяснение “вытитровыванием” фактора (факторов) инициации было предложено практически сразу [10, 11]. Однако во всех этих работах исследователи имели дело с суммарными препаратами мРНК, поэтому не могли выявить индивидуальные различия матриц. Также не был однозначно установлен компонент аппарата трансляции, снижение концентрации которого приводило к описанному эффекту, и не был предложен механизм, описывающий данный феномен.

В настоящей работе показано, что производные β-глобиновой мРНК с незначительными вариациями во вторичной структуре 5'-НТО обладают принципиально разной способностью подавлять собственную трансляцию, однако эти различия можно устранить, увеличив количество eIF2 в системе. С помощью метода реконструкции 48S инициаторных трансляционных комплексов из очищенных компонентов показано, что у матриц, содержащих вторичные структуры в 5'-НТО, повышены требования к концентрации eIF2.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

**При конструировании плазмид** использовали штамм *Escherichia coli* JM109 и векторы серии pUC18. Работы с плазмидами и генно-инженерные манипуляции проводили согласно [12]. κДНК β-глобина получали с помощью обратной транскрипции–полимеразной цепной реакции (ОТ–ПЦР) на суммарной поли(А)<sup>+</sup> мРНК, выделенной из ретикулоцитов кролика [13] с использованием праймеров АСАСТТГСТТТТГАСАСААС и ТТАС-ГАГСТСААГГГГСТТКАТГ, ревертазы AMV (“Promega”) и ДНК-полимеразы *Taq* (“Fermentas”). С помощью ПЦР перед участком, соответствующим 5'-НТО β-глобиновой мРНК, вводили промотор РНК-полимеразы фага Т7. ПЦР-продукт лигировали в плазмиду pUC18 по участкам *KpnI–Ecl136II*, затем фрагмент *BalI–Ecl136II* κДНК β-глобина заменяли участком, кодирующим полноразмерный белок GFP, полученным с помощью ПЦР на плазмиде pGFP-C2 (“CLONTECH”) с праймерами ССАТГГГТАААГГАГ и СТСТ-ТАСТТГТАТАГТТКАТССА. Конечную конструкцию bG использовали для получения соответствующей мРНК. Таким образом, мРНК bG длиной 1192 н. состояла из 5'-НТО и первых 415 н. кодирующей части мРНК β-глобина с присоединенным к ним фрагментом, кодирующим белок GFP. Продукт трансляции мРНК bG имел массу около 42 кДа, что удобно для проведения электрофоретического анализа. Конструкции

TbG и bTbG получали из bG олигонуклеотид-направленным мутагенезом (набор GeneEditor, “Promega”). Использовали олигонуклеотиды GTAATACGACTCACTATAGGACTCTCT-TCGCATCGCTGTCTGCGAGGGCCAGAGCT-TACTTGCAATCCC и GCTTTTGACACAACCTGTGTACTCTCTTTCG-CATCGCTGTCTGCGAGGGCCAGAGCT-TACTTGCAATCC соответственно. Аналогично из TbG с использованием праймеров СТТСГ-САТСГСТААГСТТАСТТГСААТССС и GTCT-GCGAGGGCCAGAATGGTGCATCTGTCC получали Td1bG и Td2bG соответственно.

**РНК получали** с помощью Т7-транскрипции с котранскрипционным кешированием. Реакцию проводили в 20 мкл смеси, содержащей 80 мМ Hepes-KOH, pH 7.4, 12 мМ Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 2 мМ спермидина, 10 мМ DTT, по 10 мМ АТФ, УТР и СТР, 5 мМ m<sup>7</sup>GpppGTP (“Pharmacia”), 5 мкг ДНК, линеаризованной по участку *Ecl136II*, 20 ед. акт. рибонуклеазного ингибитора HPRI (“Fermentas”) и 20 ед. акт. РНК-полимеразы фага Т7 (“Fermentas”). После предынкубации при 37°C в течение 5 мин добавляли GTP до концентрации 0.5 мМ и инкубировали еще 1 ч. ДНК разрушали обработкой 3 мкл RQ DNase (“Promega”) в течение 5 мин. После фенольной депротенинизации реакционную смесь очищали от солей и нуклеотидов гель-фильтрацией на сефадексе G50, РНК осаждали этанолом и растворяли в воде.

**Для трансляции** использовали обработанный нуклеазой лизат ретикулоцитов кролика фирмы “Promega”. Реакционная смесь содержала 4.3 мкл лизата, дополненного смесью аминокислот и [<sup>35</sup>S]метионином (“Amersham”) согласно рекомендации изготовителя, и 1.7 мкл водного раствора мРНК разной концентрации. Электрофорез продуктов трансляции проводили по Лэммли в 12%-ном полиакриламидном геле [12].

**Реконструкцию 48S инициаторных комплексов** проводили согласно [14] с небольшими модификациями. Вместо суммарной нативной тРНК для получения Met-тРНК использовали искусственную инициаторную тРНК<sup>Met</sup>, синтезированную Т7-транскрипцией плазмиды pTRM1 (см. [15]). Концентрация 40S субчастиц рибосом составляла 250 нМ. Реконбинантные белки eIF1 и eIF1A выделяли из *E. coli* на агарозе Ni-NTA (“Qiagen”) по методике изготовителя. eIF2, eIF3, eIF4A и eIF4B выделяли из лизата ретикулоцитов кролика согласно [16], а eIF4F – из лизата клеток HeLa [17]. eIF4F после хроматографии на m<sup>7</sup>G-сефарозе для полного удаления m<sup>7</sup>GTP диализовали против буфера, содержащего 1 М КСl. Все препараты факторов были активны, поскольку в отсутствие любого из них сборки комплекса не происходило (данные не приведены). Препарат белка p50 любезно предоставлен Л.П. Овчинниковым. Обрат-

ную транскрипцию проводили с праймера Shin18, TCACCACCAACTTCTTCCAC, комплементарного участку 61–80 н. кодирующей части мРНК  $\beta$ -глобина. Использовали обратную транскриптазу AMV (“Promega”). Интенсивность сигналов на радиоавтографах гелей оценивали с помощью программы ImageQuant 5.0.

**Зондирование вторичной структуры мРНК** проводили в условиях, аналогичных условиям сборки 48S инициаторных комплексов, в буфере, содержащем 20 мМ Трис-НСl, рН 7.4, 80 мМ  $\text{KCH}_3\text{COO}$ , 2.5 мМ  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , 0.1 мМ EDTA, 1 мМ DTT, 0.25 мМ спермидина, 1 мМ АТР и 0.4 мМ GTP. 1 пмоль мРНК инкубировали 10 мин при 30°C в 20 мкл буфера, после чего добавляли либо 1 мкл свежеприготовленного 10%-ного спиртового раствора DMS, либо 10 мкл свежеприготовленного раствора СМСТ в буфере, либо 0.1 ед. акт. РНКазы T1 или 0.3 ед. акт. РНКазы T2 (“Pharmacia”). При использовании DMS смесь инкубировали 5 мин, в остальных случаях – 20 мин. По окончании реакции к смеси добавляли 1/4 объема раствора SP (1.5 мМ  $\text{CH}_3\text{COONa}$  рН 5.0, 1 М  $\beta$ -меркаптоэтанол, 0.1 мМ EDTA) и 5 мкг 18S рРНК в качестве соосаждителя. РНК экстрагировали фенол-хлороформной смесью и осаждали тремя объемами этанола. Осадок растворяли в 10 мкл смеси, содержащей 5 пмоль меченного  $^{32}\text{P}$  праймера Shin18, 5 мМ каждого из dNTP, 5 ед. акт. NPRI, 40 ед. акт. ревертазы M-MLV (“Helicon”) и 2 мкл 5x буфера для M-MLV. Инкубировали 30 мин при 30°C. РНК экстрагировали фенол-хлороформной смесью, осаждали этанолом и растворяли в 4 мкл Stop Solution из набора фирмы “USB” для секвенирования.

**ДНК секвенировали** по Сэнгеру [12] с помощью набора фирмы “USB”. Электрофорез ДНК в денатурирующих условиях проводили в 6%-ном полиакриламидном геле с 7 М мочевиной.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

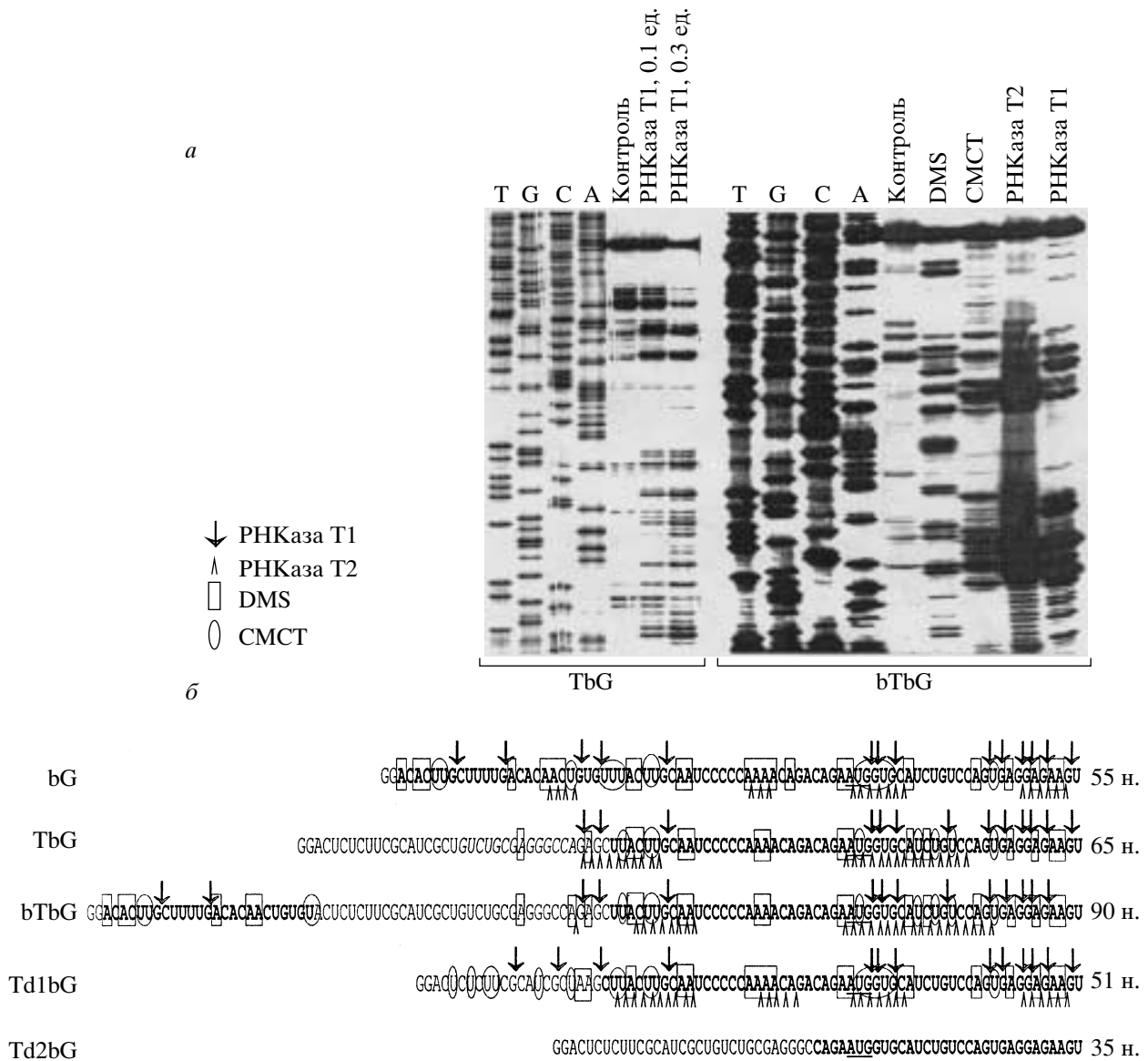
Различия в ингибировании матрицами собственной трансляции изучали на пяти мРНК, которые отличались только 5'-проксимальными участками 5'-НТО, причем различия затрагивали не более 3% длины мРНК. Кодирующая часть, а также 28 н. лидера, примыкающие к AUG-кодону, были одинаковыми у всех мРНК (за исключением Td2bG, см. ниже). Таким образом, все различия в трансляции этих мРНК могли объясняться только различной эффективностью инициации, причем идентичность контекстов стартовых кодонов позволила изучать раннюю стадию инициации, а именно, первичное связывание 40S субчастицы рибосомы с 5'-концом мРНК и все, что происходит до достижения субчастицей области AUG-кодона. Стабильность же финального 48S комплекса, а также кинетика присоединения большой

субчастицы, элонгация и терминация на всех матрицах должны быть одинаковыми.

Нуклеотидные последовательности мРНК приведены на рис. 1б. bG содержала 5'-НТО мРНК  $\beta$ -глобина. мРНК TbG отличалась от нее заменой первых 25 н. на 35 5'-концевых нуклеотидов лидера поздних аденовирусных мРНК (трехчастного лидера, ТЧЛ, в котором эти 35 н. находятся в одноцепочечной конформации [18]). мРНК bTbG содержала  $\beta$ -глобиновую 5'-НТО со вставкой того же участка ТЧЛ в положение 25. Таким образом, от TbG она отличалась 5'-концом, а от bG – серединой 5'-НТО. В Td1bG первые 25 н. мРНК  $\beta$ -глобина заменены 17 5'-концевыми нуклеотидами ТЧЛ, а в Td2bG вместо  $\beta$ -глобинового лидера находятся 35 5'-концевых нуклеотидов ТЧЛ. Таким образом, 5'-НТО пяти мРНК различались структурой и – в меньшей степени – длиной.

Все мРНК транслировали в обработанном нуклеазой лизате ретикулоцитов кролика с добавлением [ $^{35}\text{S}$ ]метионина, причем использовали возрастающие концентрации мРНК. По окончании трансляции реакционные смеси разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, гели радиоавтографировали и оценивали эффективность трансляции с помощью фосфоримиджера. Как можно видеть из рис. 2, матрицы, несмотря на незначительность различий в первичной структуре, при трансляции ведут себя по-разному. мРНК bG и Td1bG хорошо транслируются даже в самых высоких из проверенных концентраций (вплоть до 170 мкг/мл), в то время как остальные мРНК имеют ярко выраженный оптимум в районе 25 мкг/мл, при превышении которого эффективность трансляции падает.

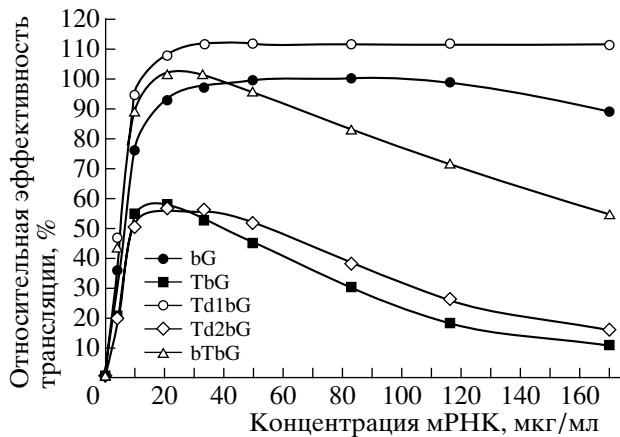
Из сравнения первичных структур мРНК ясно, что обнаруженный эффект не связан ни с длиной 5'-НТО (в мРНК Td1bG и Td2bG одинаково короткие лидеры, а у остальных мРНК длины 5'-НТО различаются незначительно), ни с нуклеотидной последовательностью, находящейся непосредственно на 5'-конце (эти последовательности одинаковы у bG и bTbG и у Td1bG, TbG и Td2bG). Выяснено предположение, что различия в трансляции связаны со вторичными структурами 5'-НТО мРНК. Для проверки этой гипотезы проведено химическое и ферментативное зондирование вторичных структур 5'-проксимальных участков транскриптов bG, TbG, bTbG и Td1bG. На рис. 1 представлены результаты, полученные с помощью рибонуклеазы T1 (разрывает одноцепочечные участки после гуанина) и рибонуклеазы T2 (вносит нуклеотид-неспецифичные разрывы в одноцепочечные участки), а также с помощью модифицирующих агентов DMS и СМСТ, реагирующих с неспаренными основаниями адениловых и урациловых остатков соответственно. После ре-



**Рис. 1.** Результаты химического и ферментативного зондирования 5'-НТО транскриптов bG, TbG, bTbG и Td1bG с помощью модифицирующих реагентов DMS (по остаткам аденина) и CMCT (по уридину), а также гуанозин-специфичной РНКазы T1 и неспецифичной РНКазы T2, гидролизующих одноцепочечные участки РНК. Зондирование остатков цитозина не проводили. *а* – Радиоавтографы с результатами зондирования 5'-НТО транскриптов TbG и bTbG. *б* – Нуклеотидные последовательности 5'-проксимальных участков β-глобиновой мРНК (bG) и ее производных. Участки, относящиеся к мРНК β-глобина, показаны жирным. Инициаторные AUG-кодоны подчеркнуты. Участок TbG длиной 15 н., отличающий ее от Td1bG, отмечен курсивом. Справа указаны длины 5'-НТО мРНК.

акции меченный <sup>32</sup>P праймер отжигали с мРНК, проводили обратную транскрипцию и анализировали ее продукты с использованием секвенирующего геля (примеры зондирования мРНК TbG и bTbG представлены на рис. 1*а*). Данные о доступности оснований для модификации приведены на рис. 1*б*. Видно, что мРНК bG и Td1bG имеют одноцепочечные лидеры (блок UUUU в 5'-НТО мРНК bG, скорее всего, также находится в одноцепочечной конформации, но его атака по непонятным причинам затруднена, а анализ доступности

первых 2 н. (GG) во всех мРНК сложен из-за невозможности различить на радиоавтографе сигналы от GG и от полноразмерной РНК). В то же время у остальных мРНК некоторые основания в 5'-НТО спарены, причем в мРНК bTbG 5'-проксимальная часть лидера находится в одноцепочечной конформации, а вторичные структуры локализованы только в центральной части. Метод компьютерного моделирования, однако, показал, что 5'-НТО TbG, bTbG и Td2bG не содержат длинных двухцепочечных участков, и недо-



**Рис. 2.** Трансляция мРНК bG, TbG, bTbG, Td1bG и Td2bG в обработанном нуклеазой лизате ретикулоцитов кролика в присутствии [<sup>35</sup>S]метионина. Интенсивность полос продуктов трансляции на радиоавтографах гелей количественно оценивали с помощью фосфоримиджера. Максимальная интенсивность сигнала, полученного на матрице мРНК bG, принята за 100%.

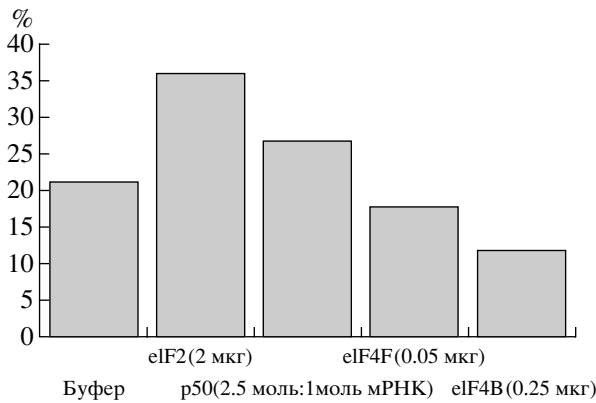
ступность некоторых оснований, по-видимому, обусловлена короткими нестабильными шпильками длиной не более 7 н. с общей свободной энергией никак не ниже  $-10$  ккал/моль. Такие шпильки не должны служить серьезным препятствием для сканирующего аппарата, по крайней мере, когда находятся в середине 5'-НТО, как в случае bTbG [19, 20]. И действительно, в точках максимума эффективность трансляции всех пяти матриц различается не более чем в 2 раза (рис. 2). Однако даже такие незначительные вторичные структуры приводят к драматическому снижению уровня трансляции при более высоких концентрациях мРНК.

Наблюдаемый эффект может быть объяснен тем, что избыток мРНК приводит к связыванию некоего компонента лизата, необходимого для инициации трансляции, потребность в котором невелика или отсутствует у bG и Td1bG, но значительна у TbG, bTbG и Td2bG. Очевидно, что это должен быть компонент (скорее всего, белок) с мРНК-связывающими свойствами, причем для участия в инициации он должен взаимодействовать с мРНК в области 5'-НТО, но при избытке РНК связывание становится неспецифичным. При этом либо неспецифическое связывание с РНК приводит к его инактивации, либо мы имеем дело с более чем одним компонентом, и в условиях избытка мРНК происходит их распределение (“растаскивание”) по разным матрицам, в результате чего число матриц, на которых одновременно оказываются все необходимые компоненты, резко уменьшается.

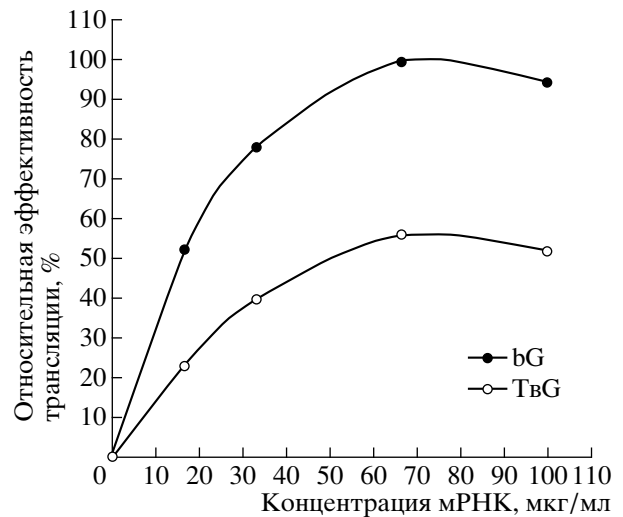
Различная потребность в этом неизвестном компоненте у различных мРНК может объяс-

няться двояко. Во-первых, не исключено, что в инициации трансляции мРНК TbG, bTbG и Td2bG участвует некий специфический мРНК-связывающий белок. Однако, учитывая незначительность различий между этими мРНК и мРНК первой группы (bG и Td1bG), это маловероятно. Действительно, сравнение белковых компонентов мРНК этих мРНК с помощью УФ-сшивки и аффинной хроматографии белков на РНК-сефарозе показало полную их идентичность (данные не приведены). Второе объяснение заключается в том, что наличие вторичных структур в 5'-НТО повышает необходимость в одном или нескольких канонических факторах инициации, количество которых в лизате ограничено. Наиболее вероятные кандидаты на эту роль – мРНК-связывающие факторы eIF4F и eIF4B, а также фактор eIF2, у которого это свойство наиболее выражено. Было интересно проверить влияние главного белка мРНК, р50, поскольку, согласно [21, 22], этот белок, неспецифически связываясь с сахарофосфатным остовом мРНК, препятствует неспецифическому связыванию факторов инициации и, таким образом, должен способствовать снижению эффекта “вытитровывания” искомого фактора. Белок eIF4F выделен из клеток HeLa, eIF2, eIF4B и р50 – из ретикулоцитов кролика. Очищенные до гомогенного состояния белки добавляли в обработанный нуклеазой лизат ретикулоцитов и транслировали 25 и 150 мкг/мл мРНК TbG. Количество добавленных факторов примерно в 3–4 раза превышало количество этих же факторов в лизате (согласно оценке содержания факторов в клетке [23–25]). Использовали молярное соотношение белок р50 : мРНК 2.5 : 1 согласно [21]. Эффективность трансляции определяли, как описано выше. На рис. 3 приведено отношение эффективности трансляции при большей концентрации мРНК к эффективности при меньшей концентрации. Видно, что из всех проверенных факторов инициации только eIF2 способен увеличивать данное соотношение (т.е. нивелировать снижение уровня трансляции при увеличении концентрации мРНК). Белок р50, как и ожидалось, оказывал положительный эффект, однако более слабый, чем eIF2. Но факторы eIF4F и eIF4B, хотя и стимулировали трансляцию мРНК TbG при ее концентрации 25 мкг/мл, не обладали такой способностью при более высоких концентрациях мРНК и даже немного ингибировали трансляцию (данные не представлены), что снижало соотношение эффективностей трансляции при большей и меньшей концентрациях мРНК (рис. 3). В случае 25 и 75 мкг/мл мРНК положительный эффект eIF2 еще более выражен при сохранении отрицательного влияния других факторов (данные не представлены).

Влияние повышенного содержания eIF2 на трансляцию изучили более подробно. С этой целью



**Рис. 3.** Влияние факторов инициации трансляции и белка p50 на аутоингибирование трансляции транскриптом TbG. Трансляцию 25 и 150 мкг/мл мРНК проводили в лизате ретикулоцитов с добавлением [<sup>35</sup>S]метионина. По оси ординат отложено отношение интенсивности сигналов продуктов, полученных при трансляции 150 и 25 мкг/мл мРНК (%). Внизу указаны количества факторов, добавленных в систему.



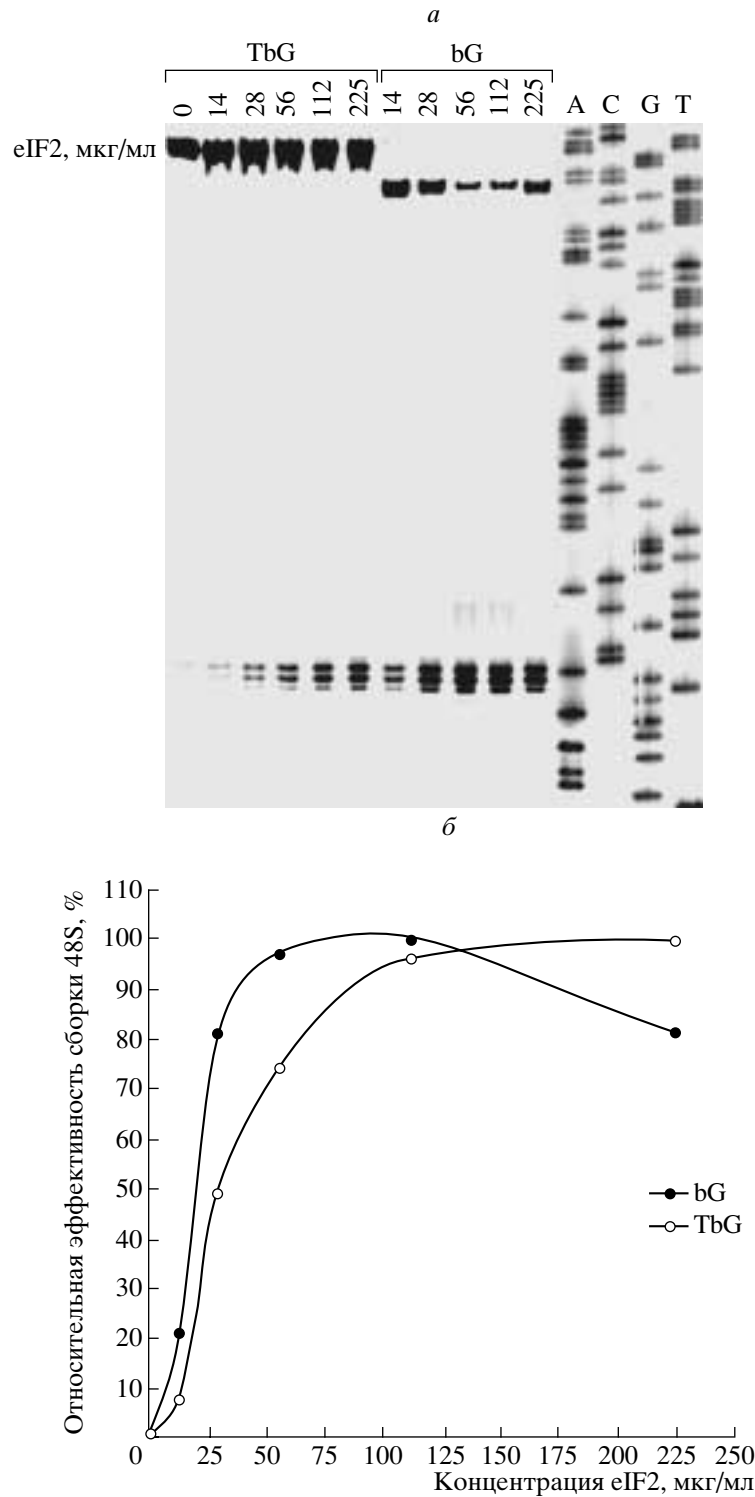
**Рис. 4.** Трансляция мРНК bG и TbG в лизате ретикулоцитов кролика с добавлением фактора eIF2 (2 мкг/пробу). См. подпись к рис. 2.

разные количества мРНК bG и TbG транслировали в лизате ретикулоцитов кролика, в который добавляли очищенный eIF2 (2 мкг белка на 6 мкл реакционной смеси). Картина трансляции в этих условиях (рис. 4) сильно отличалась от картины в исходном лизате (рис. 2): эффективность трансляции мРНК TbG возрастала вплоть до концентрации мРНК 70 мкг/мл, и кривые зависимости уровня трансляции от концентрации мРНК для bG и TbG имели одинаковый вид (хотя по абсолютной величине TbG, как и прежде, транслировалась почти в 2 раза хуже). Таким образом, нам удалось показать, что недостаток именно eIF2 ответствен за резкое снижение уровня трансляции при увеличении концентрации мРНК TbG. Скорее всего, это справедливо и для других матриц со слабыми вторичными структурами в 5'-НТО.

Полученные данные указывают на то, что у мРНК с одноцепочечным лидером требования к концентрации eIF2 понижены. Чтобы получить прямые доказательства этого, 48S инициаторные комплексы реконструировали из очищенных компонентов на мРНК bG и TbG, варьируя концентрацию eIF2. мРНК, 40S субчастицы рибосом, Met-тРНК, GMPPNP, АТФ и факторы инициации eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3, eIF4A, eIF4B и eIF4F смешивали (см. "УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА") и инкубировали 5 мин при 30°C. 48S комплексы визуализировали с помощью тоу-принтинга: к кодирующей части мРНК отжигали праймер и проводили реакцию обратной транскрипции. Реакционную смесь после депротенизации наносили на секвенирующий гель рядом с продуктами секвенирующих реакций, проведенных с того же праймера. Радиоавтограмма геля представлена на

рис. 5a. Интенсивности сигналов тоу-принтов оценивали с помощью фосфоримиджера ("Molecular Dynamics Phosphor Imager SI"). На рис. 5b показана интенсивность тоу-принтов (за 100% принимали максимальную величину интенсивности каждой из двух мРНК). Хорошо видно, что с увеличением количества eIF2 в системе эффективность сборки 48S на bG растет намного быстрее, чем на TbG, практически достигая своего максимального значения в присутствии 50 мкг/мл eIF2, в то время как в случае TbG выход на плато максимальных значений наблюдается значительно позже – примерно при 125 мкг/мл eIF2. Таким образом, нам удалось однозначно показать, что по потребности в eIF2 две мРНК различаются почти в 2 раза, что, скорее всего, обусловлено содержанием в 5'-НТО TbG незначительных вторичных структур и отсутствием таких структур в bG. Интересно, что при превышении оптимального количества eIF2 наблюдается некоторое ингибирование образования 48S на мРНК bG (рис. 5b). По-видимому, это связано с тем, что eIF2, при его повышенном содержании, мешает посадке 40S субчастицы и/или факторов группы eIF4, успешно конкурируя с ними за связывание с неструктурированной 5'-НТО. На мРНК TbG при тех же концентрациях eIF2 этого не происходит, хотя дальнейшее увеличение концентрации eIF2 (до 500 мкг/мл) приводит к незначительному ингибированию сборки (данные не приведены).

Представленные нами результаты позволяют говорить о новом механизме регуляции трансляции эукариотических мРНК. Как известно, количество активного eIF2 в клетке может сильно меняться. Хорошо изучены механизмы регуляции



**Рис. 5.** Реконструкция 48S инициаторных комплексов из очищенных компонентов на мРНК bG и TbG при разных концентрациях eIF2, выявляемая с помощью тоу-принта. *a* – Радиоавтограф геля с тоу-принтами комплексов. *b* – Результаты обчета интенсивностей тоу-принтов на фосфоримиджере (за 100% принимали максимальную интенсивность для каждой из двух матриц).

активности eIF2 путем фосфорилирования  $\alpha$ -субъединицы при вирусных инфекциях, апоптозе, аминокислотном голодании, недостатке гема, на-

коплении в клетке неправильно свернутых белков и других стрессовых ситуациях (см., например, обзор [26]). Возникающий в этих условиях

дефицит активного eIF2 приводит к дифференциации уровня трансляции различных матриц: мРНК с повышенными требованиями к фактору практически перестают транслироваться, и преимущество получают мРНК, способные иницировать при низких концентрациях тройного комплекса. Различная потребность в eIF2 у разных мРНК была известна и ранее [27]. До открытия кеп-связывающих факторов четвертой группы это свойство мРНК даже считалось определяющим при конкуренции между матрицами [28]. Однако эти различия объяснялись специфическим сродством 5'-НТО мРНК к eIF2, и эффективность инициации трансляции ставилась в прямую зависимость от эффективности связывания мРНК с eIF2. С другой стороны, показано, что связывание eIF2 с мРНК приводит к потере им тРНК-связывающей активности и невозможности образования тройного комплекса [29]. Наши результаты лучше согласуются с этими данными. Действительно, резкое уменьшение эффективности трансляции мРНК ТбГ и ей подобных матриц проще всего объяснить именно инактивацией молекул eIF2, связавшихся с избытком мРНК. В моделях, предложенных ранее [27, 30], предполагается, что связавшийся с мРНК eIF2 все-таки обладает активностью, если находится “на своем месте” (т.е. в области лидера или AUG-кодона). Более того, это связывание необходимо для инициации, не зависит от связывания мРНК с малой субъединицей рибосомы и даже предвывает его. Связывание же с кодирующей частью действительно инактивирует eIF2. С этих позиций наши данные об ингибировании трансляции мРНК со структурированными 5'-НТО следовало бы объяснить пониженным сродством таких лидеров (по сравнению с одноцепочечными) к eIF2: на таких мРНК eIF2 связывается преимущественно с кодирующей частью и утрачивает активность, в то время как на матрицах с неструктурированными 5'-НТО фактор с большей вероятностью садится “на свое место”, и увеличение концентрации мРНК сказывается в меньшей степени. Предпочтения eIF2 в связывании РНК различной структуры изучены плохо. Сообщалось [31], что к некоторым мРНК сродство фактора даже меньше, чем к двухцепочечным РНК, однако на основании этих скудных данных едва ли можно сказать, является ли причиной различий в трансляции матриц с одноцепочечными и структурированными лидерами разное сродство к eIF2. Кроме того, такая гипотеза плохо согласуется с обнаруженным нами снижением уровня образования 48S в очищенной системе трансляции на мРНК bG при повышенной концентрации eIF2 (рис. 5б). Вместо нее мы предлагаем следующую модель.

Связывание тройного комплекса eIF2 · Met-тРНК · GTP с 40S субчастицей рибосомы может происходить как до ее посадки на мРНК, так и по-

сле, причем при недостатке eIF2 обычно имеет место вторая ситуация [3]. При этом eIF2 стабилизирует взаимодействие 40S с мРНК благодаря контакту с обоими компонентами. мРНК с неструктурированным лидером образуют с рибосомной субчастицей достаточно прочный комплекс даже в отсутствие тройного комплекса, в то время как любые вторичные структуры в 5'-НТО сильно ослабляют взаимодействие 40S с мРНК [5]. Иными словами, при инициации на матрицах первого типа eIF2 выполняет только одну функцию – доставку Met-тРНК к 40S субчастице, стабильно ассоциированной с мРНК и “ожидающей” ее прихода. Очевидно, что время жизни такого комплекса достаточно велико для того, чтобы связывание тройного комплекса произошло даже при пониженных концентрациях eIF2 в системе. Матрицы же со структурированными лидерами используют eIF2 не только как средство доставки Met-тРНК, но и как фактор, стабилизирующий взаимодействие 40S с мРНК. В его отсутствие этот комплекс нестабилен и быстро разрушается, “не дожидаясь” прихода Met-тРНК. При этом вероятность того, что 40S окажется на AUG-кодоне, прямо зависит от концентрации eIF2, и при низких ее значениях скорость инициации на таких матрицах понижена. Вполне возможно, что тройной комплекс eIF2 · Met-тРНК · GTP важен еще и как помощник непротессивной хеликазы eIF4A, поскольку его связывание с мРНК не дает расплетенным дуплексам “схлопываться”, что еще больше стабилизирует контакт мРНК с 40S субчастицей. Эта роль обычно отводится фактору eIF4B [32], однако нельзя исключить, что и eIF2 участвует в этом процессе.

Таким образом, невысокая скорость инициации на мРНК со структурированными 5'-НТО объясняется не только и, может быть, не столько необходимостью временных затрат на расплетание вторичных структур, сколько повышенными требованиями к содержанию eIF2, стабилизирующему взаимодействие малой рибосомной субчастицы с мРНК. В рамках данной работы не планировалось изучение кинетики образования 48S комплексов на мРНК с различной структурой при различных концентрациях eIF2, но в дальнейшем оно обязательно должно быть проведено.

Авторы выражают благодарность Я.Е. Дунаевскому за помощь в выделении факторов инициации, Л.П. Овчинникову за предоставление препарата белка p50 и А.В. Писареву за обсуждение результатов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (96-04-55009 и 01-04-06503 “МАС”) и Федеральной целевой программы “Интеграция” (2000-1.5-88).



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dever T.E. 2002. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell*. **108**, 545–556.
2. Pestova T.V., Kolupaeva V.G., Lomakin I.B., Pilipenko E.V., Shatsky I.N., Agol V.I., Hellen C.U. 2001. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 7029–7036.
3. Dasso M.C., Milburn S.C., Hershey J.W., Jackson R.J. 1990. Selection of the 5'-proximal translation initiation site is influenced by mRNA and eIF-2 concentrations. *Eur. J. Biochem.* **187**, 361–371.
4. Hinnebusch A.G. 1993. Gene-specific translational control of the yeast GCN4 gene by phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2. *Mol. Microbiol.* **10**, 215–223.
5. Seal S.N., Schmidt A., Marcus A. 1989. Ribosome binding to inosine-substituted mRNAs in the absence of ATP and mRNA factors. *J. Biol. Chem.* **264**, 7363–7368.
6. Barrieux A., Rosenfeld M.G. 1977. Characterization of GTP-dependent Met-tRNA<sup>f</sup> binding protein. *J. Biol. Chem.* **252**, 3843–3847.
7. Abramson R.D., Dever T.E., Lawson T.G., Ray B.K., Thach R.E., Merrick W.C. 1987. The ATP-dependent interaction of eukaryotic initiation factors with mRNA. *J. Biol. Chem.* **262**, 3826–3832.
8. Hughes D.L., Dever T.E., Merrick W.C. 1993. Further biochemical characterization of rabbit reticulocyte eIF-4B. *Arch. Biochem. Biophys.* **301**, 311–319.
9. Gozes I., Schmitt H., Littauer U.Z. 1975. Translation *in vitro* of rat brain messenger RNA coding for tubulin and actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **72**, 701–705.
10. Wettenhall R.E., Slobbe A. 1976. Inhibitory action of different RNA fractions on the translation of globin mRNA *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta*. **432**, 323–328.
11. Minich W.B., Korneyeva N.L., Ovchinnikov L.P. 1989. Translational active mRNPs from rabbit reticulocytes are qualitatively different from free mRNA in their translatability in cell-free system. *FEBS Lett.* **257**, 257–259.
12. Sambrook J., Russell D. Molecular cloning: a laboratory manual. 3d Ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001.
13. Gielen J., Aviv H., Leder P. 1974. Characteristics of rabbit globin mRNA purification by oligo(dT) cellulose chromatography. *Arch. Biochem. Biophys.* **163**, 146–154.
14. Шатский И.Н. 2001. Реконструкция иницирующих комплексов *in vitro* для исследования молекулярных механизмов инициации трансляции у млекопитающих. *Молекуляр. биология*. **35**, 628–637.
15. Pestova T.V., Hellen C.U. 2001. Preparation and activity of synthetic unmodified mammalian tRNA<sup>i</sup>(Met) in initiation of translation *in vitro*. *RNA*. **7**, 1496–1505.
16. Merrick W.C. 1979. Purification of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *Methods Enzymol.* **60**, 101–108.
17. Grifo J.A., Tahara S.M., Morgan M.A., Shatkin A.J., Merrick W.C. 1983. New initiation factor activity required for globin mRNA translation. *J. Biol. Chem.* **258**, 5804–5810.
18. Zhang Y., Dolph P.J., Schneider R.J. 1989. Secondary structure analysis of adenovirus tripartite leader. *J. Biol. Chem.* **264**, 10679–10684.
19. Kozak M. 1989. Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Mol. Cell Biol.* **9**, 5134–5142.
20. Vega Laso M.R., Zhu D., Sagliocco F., Brown A.J., Tuite M.F., McCarthy J.E. 1993. Inhibition of translational initiation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a function of the stability and position of hairpin structures in the mRNA leader. *J. Biol. Chem.* **268**, 6453–6462.
21. Minich W.B., Ovchinnikov L.P. 1992. Role of cytoplasmic mRNP proteins in translation. *Biochimie*. **74**, 477–483.
22. Pisarev A.V., Skabkin M.A., Thomas A.A., Merrick W.C., Ovchinnikov L.P., Shatsky I.N. 2002. Positive and negative effects of the major mammalian messenger ribonucleoprotein p50 on binding of 40S ribosomal subunits to the initiation codon of beta-globin mRNA. *J. Biol. Chem.* **277**, 15445–15451.
23. Safer B., Kemper W., Jagus R. 1979. The use of [<sup>14</sup>C]eukaryotic initiation factor 2 to measure the endogenous pool size of eukaryotic initiation factor 2 in rabbit reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.* **254**, 8091–8094.
24. Duncan R., Hershey J.W. 1983. Identification and quantitation of levels of protein synthesis initiation factors in crude HeLa cell lysates by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **258**, 7228–7235.
25. Rau M., Ohlmann T., Morley S.J., Pain V.M. 1996. A reevaluation of the cap-binding protein, eIF4E, as a rate-limiting factor for initiation of translation in reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.* **271**, 8983–8990.
26. Clemens M.J. 2001. Initiation factor eIF2 alpha phosphorylation in stress responses and apoptosis. *Progress Mol. Subcell. Biol.* **27**, 57–89.
27. Rosen H., Di Segni G., Kaempfer R. 1982. Translational control by messenger RNA competition for eukaryotic initiation factor 2. *J. Biol. Chem.* **257**, 946–952.
28. Di Segni G., Rosen H., Kaempfer R. 1979. Competition between alpha- and beta-globin messenger ribonucleic acids for eukaryotic initiation factor 2. *Biochemistry*. **18**, 2847–2854.
29. Barrieux A., Rosenfeld M.G. 1978. mRNA-induced dissociation of initiation factor 2. *J. Biol. Chem.* **253**, 6311–6314.
30. Thomas A.A., Scheper G.C., Voorma H.O. 1992. Hypothesis: is eukaryotic initiation factor 2 the scanning factor? *New Biol.* **4**, 404–407.
31. Rosen H., Knoller S., Kaempfer R. 1981. Messenger ribonucleic acid specificity in the inhibition of eukaryotic translation by double-stranded ribonucleic acid. *Biochemistry*. **20**, 3011–3020.
32. Jaramillo M., Dever T.E., Merrick W.C., Sonenberg N. 1991. RNA unwinding in translation: assembly of helicase complex intermediates comprising eukaryotic initiation factors eIF-4F and eIF-4B. *Mol. Cell Biol.* **11**, 5992–5997.

## Minor Secondary-Structure Variation in the 5'-Untranslated Region of the $\beta$ -Globin mRNA Changes the Concentration Requirements for eIF2

S. E. Dmitriev, I. M. Terenin, M. P. Rubtsova, and I. N. Shatsky

*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, 119899 Russia;  
E-mail: shatsky@libro.genebee.msu.su*

Nucleotide sequence changes increasing the number of paired bases without producing stable secondary structure elements in the 5'-untranslated region (5'-UTR) of the  $\beta$ -globin mRNA had a slight effect on its translation in rabbit reticulocyte lysate at its low concentration and dramatically decreased translation efficiency at a high concentration. The removal of paired regions restored translation. Addition of purified eIF2 to the lysate resulted in equal translation efficiencies of templates differing in structure of 5'-UTR. A similar effect was observed for p50, a major mRNP protein. Other mRNA-binding initiation factors, eIF4F and eIF3B, had no effect on the dependence of translation efficiency on mRNA concentration. Analysis of the assembly of the 48S initiation complex from its purified components showed that less eIF2 is required for translation initiation on the  $\beta$ -globin mRNA than on its derivative containing minor secondary structure elements in 5'-UTR. According to a model proposed, eIF2 not only delivers Met-tRNA, but it also stabilizes the complex of the 40S ribosome subunit with 5'-UTR, which is of particular importance for translation initiation on templates with structured 5'-UTR.