

**ЭФФЕКТИВНАЯ КЕП-ЗАВИСИМАЯ ТРАНСЛЯЦИЯ МРНК
МЛЕКОПИТАЮЩИХ С ДЛИННЫМИ И СИЛЬНО
СТРУКТУРИРОВАННЫМИ 5'-НЕТРАНСЛИРУЕМЫМИ ОБЛАСТЯМИ
in vitro И *in vivo***

© 2009 г. С. Е. Дмитриев, Д. Е. Андреев, З. В. Адьянова, И. М. Теренин, 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 24.07.2008 г.

Представлена к публикации О.А. Донцовой

В соответствии с общепринятой сканирующей моделью Козак вторичная структура 5'-нетранслируемых областей (5'-НТО) эукариотических мРНК может оказывать только ингибирующий эффект на инициацию трансляции, поскольку должна тормозить движение 40S субчастицы вдоль нуклеотидной цепи. Таким образом, существование эффективно транслирующихся мРНК с длинными и сильно структурированными 5'-НТО несовместимо с кеп-зависимым сканирующим механизмом. Предполагается, что для эффективной трансляции такие мРНК должны использовать альтернативные пути – прежде всего, механизм внутренней инициации. Он подразумевает присутствие в 5'-НТО специальных структур – IRES-элементов (Internal Ribosome Entry Site). Нами показано, что это мнение ошибочно и, скорее всего, основано на опытах по трансляции мРНК в лизате ретикулоцитов кролика. Эта бесклеточная система неправильно отражает соотношение эффективностей трансляции разных мРНК, которое наблюдается *in vivo*. На примере пяти мРНК сходного строения, имеющих либо относительно короткие лидерные области (взяты из мРНК β -глобина и β -актина), либо длинные и сильно структурированные 5'-НТО (из мРНК c-myc, LINE-1 и Apaf-1) мы показываем, что в трансфицированных клетках или в полных цитоплазматических экстрактах культивируемых клеток трансляционная активность всех этих мРНК сравнима и сильно зависит от присутствия кеп-а на их 5'-конце.

Ключевые слова: инициация трансляции, сканирующий механизм, клеточные IRES-элементы, 5'-нетранслируемые области, вторичная структура РНК, бесклеточные системы трансляции, эукариоты.

EFFICIENT CAP-DEPENDENT *in vitro* AND *in vivo* TRANSLATION OF MAMMALIAN mRNAs WITH LONG AND HIGHLY STRUCTURED 5'-UNTRANSLATED REGIONS, by S. E. Dmitriev*, D. E. Andreev, Z. V. Adyanova, I. M. Terenin, I. N. Shatsky (Belozersky Institute of Physical and Chemical Biology, Moscow State University, Moscow 119992, *e-mail: dmitriev_sergey@genebee.msu.su). According to generally accepted scanning model proposed by M. Kozak, the secondary structure of 5'-untranslated regions (5'-UTR) of eukaryotic mRNAs can only cause an inhibitory effect on the translation initiation since it would counteract migration of the 40S ribosomal subunit along the mRNA polynucleotide chain. Thus, the existence of efficiently translatable mRNAs with long and highly structured 5'-UTRs is not compatible with the cap-dependent scanning mechanism. It is expected that such mRNAs should use alternative ways of translation initiation to be efficiently translated, first of all the mechanism of the internal ribosome entry mediated by special RNA structures called IRESes (for Internal Ribosome Entry Sites), which have been proposed to reside within their 5'-UTRs. In this paper, it is shown that this point of view is not correct and most probably based on experiments of mRNA translation in rabbit reticulocyte lysate. This cell free system does not reflect correctly the ratio of translation efficiencies of various mRNAs which is observed in the living cell. Using five different mRNAs of similar design which possess either relatively short leaders of cellular mRNAs (β -globin and β -actin mRNAs) or long and highly structured 5'-UTRs (c-myc, LINE-1, Apaf-1 mRNAs), we show that the translation activities of all tested 5'-UTRs are comparable, both in transfected cells and in a whole cytoplasmic extract of cultivated cells. This activity is strongly dependent on the presence of the cap at their 5'-ends.

Key words: translation initiation, scanning mechanism, cellular IRES-elements, 5'-untranslated regions, RNA secondary structure, cell-free translation systems, eukaryotes.

Принятые сокращения: 5'-НТО – 5'-нетранслируемая область; ВЭМК – вирус энцефаломиокардита; ЛПК – лизат ретикулоцитов кролика; IRES (Internal Ribosome Entry Site) – участок внутренней посадки рибосомы.

* Эл. почта: dmitriev_sergey@genebee.msu.su

Согласно модели М. Козак [1], предложенной около 30 лет назад, инициация трансляции у эукариотических организмов является 5'-конец зависимой и происходит по механизму, названному ею "сканированием". Малая субчастица эукариотической рибосомы с помощью специальных белковых факторов связывается с кепированным 5'-концом эукариотической мРНК и начинает поступательное движение в направлении 5' → 3'. При этом она сканирует 5'-нетранслируемую область (5'-НТО) мРНК в поисках иницирующего кодона в оптимальном контексте (A/GNNAUGG/A), просматривая всю ее нуклеотид за нуклеотидом. При обнаружении такого кодона 40S субчастица останавливается, к ней присоединяется большая субчастица, после чего может начаться стадия элонгации полипептидной цепи. Из сканирующей модели непременно следует, что 1) стартовым кодоном служит ближайший к 5'-концу AUG-триплет, если он находится в оптимальном нуклеотидном окружении; 2) вторичная структура 5'-НТО может оказывать только ингибирующий эффект на инициацию, поскольку должна тормозить движение 40S субчастицы вдоль нуклеотидной цепи; другими словами, чем больше "шпилек" в 5'-НТО, тем больше энергии и времени нужно для их расплетания; 3) при одном и том же содержании спаренных оснований мРНК с длинными 5'-НТО должны быть менее эффективными в трансляции, чем с короткими, поскольку чем длиннее 5'-НТО, тем больше препятствий встречает 40S субчастица на своем пути. Экспериментальные данные в поддержку сканирующей модели, приведенные М. Козак [1], оказались весьма убедительными. Сканирующая модель была принята большинством исследователей и вошла во все учебники по молекулярной биологии.

Вскоре после выдвигания постулатов линейного сканирования появились данные о том, что некоторые вирусные мРНК (пикорна- и пестивирусные), у которых нет кеп-структуры на 5'-конце, используют особый механизм инициации трансляции. Эти мРНК содержат специальные сложные структуры, названные IRES-элементами (Internal Ribosome Entry Site), которые обеспечивают посадку нагруженных факторами 40S субчастиц не на 5'-конец, а непосредственно во внутренний участок их 5'-НТО (см. [2]). Вирусные IRES-элементы – это сильно структурированные сегменты РНК длиной не менее 200 н., имеющие высокоспецифичные участки для связывания ключевых факторов инициации трансляции либо самой 40S субчастицы. Следует отметить, что концепция внутренней инициации никак не подрывала основ сканирующей модели, поскольку касалась изначально только некоторых РНК-содержащих вирусов, реплицирующихся исключительно в цитоплазме и не способных кепировать свои геномные РНК.

Как это часто бывает, вскоре после открытия у вирусных РНК феномена внутренней инициации начали появляться публикации, в которых утверждалось, что и трансляция некоторых клеточных мРНК (всегда кепированных) может происходить по IRES-зависимому пути. Сначала это были осторожные публикации [3–5], однако затем открытие новых клеточных IRES-элементов приобрело лавинообразный характер [6], так что стало создаваться впечатление, что практически в любой мРНК, имеющей длинную GC-богатую 5'-НТО, наверняка содержится IRES. Последовавшие затем бурные дебаты между М. Козак и остальными членами "трансляционного" сообщества [7, 8], а также ряд других критических публикаций [9–11] привели к осознанию того, что при идентификации клеточных IRES-элементов отсутствовал целый ряд важных контрольных тестов. В результате применения этих тестов многие клеточные IRES-элементы не выдержали проверку, т.е. скорее всего они являются артефактами [9–12]. Тем не менее, концепция клеточных IRES-элементов остается чрезвычайно популярной. Она подогревается двумя обстоятельствами: 1) из работ по анализу профиля экспрессии клеточных мРНК в условиях различных стрессов (при которых в клетках снижается концентрация активного кеп-связывающего фактора eIF4F) следует, что до 10% клеточных мРНК продолжают транслироваться в условиях, когда кеп-зависимая инициация невозможна или сильно подавлена [13]; среди таких условий можно назвать аминокислотное голодание, вирусные инфекции, апоптоз, митоз, окислительный стресс и т.д.; 2) очень трудно представить, как мРНК с длинными структурированными 5'-НТО могут эффективно транслироваться по сканирующему механизму: согласно теории Козак, уровень их кеп-зависимой трансляции должен быть крайне низким – однако порой это оказывается совсем не так.

Недавно мы исследовали механизмы инициации трансляции мРНК ретротранспозона L1 [14]. Из опубликованных данных следовало, что 5'-НТО этой мРНК содержит IRES, что весьма логично, учитывая ее большую длину (>900 н.) и экстремально высокое содержание остатков G и C. Тем не менее, нам удалось показать, что никакого IRES-элемента в 5'-НТО мРНК L1 нет и первый цистрон этой мРНК транслируется по кеп-зависимому пути, причем с неожиданно высокой эффективностью. Более того, оказалось, что делеция ~80% 5'-НТО мРНК L1, удаляющая большую часть ее шпилек, практически не сказывается на эффективности трансляции ни *in vivo*, ни *in vitro* [14]. Оставалось неясным, имеем ли мы дело с уникальной особенностью мРНК L1 или существующие представления о неэффективности кеп-зависимой трансляции длинных структурированных 5'-НТО являются заблуждением.

В представленной работе мы сравнили эффективность инициации трансляции модельных кефированных и полиаденилированных мРНК, различающихся только своими 5'-НТО, в системах *in vitro* и *in vivo*. Мы использовали как относительно короткие 5'-НТО, заведомо не содержащие IRES-элементов, так и длинные структурированные 5'-НТО, которые, как полагают, их содержат. Нами показано, что эффективность трансляции, направляемая этими 5'-НТО, сравнима и сильно зависит от наличия кепа на 5'-конце. В работе объяснено, почему мнение о низкой эффективности длинных и сильно структурированных 5'-НТО в кеф-зависимой трансляции получило столь широкое распространение.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Молекулярно-генетические конструкции получали на основе вектора pGL3R [15]. Работы с плазмидами и генно-инженерные манипуляции проводили согласно общепринятым методикам, использовали ферменты фирм “СибЭнзим” (Россия) и “Fermentas” (Литва). Плазмида, содержащая 5'-НТО ретротранспозона L1, описана в [14]. Для получения остальных конструкций в вектор pGL3R по сайтам PvuII и NcoI встраивали фрагменты соответствующих кДНК, полученные с помощью ОТ-ПЦР на суммарной мРНК из клеток НЕК293Т (β-актин, Araf-1 и с-мус), либо из ЛРК (β-глобин). В качестве затравки для синтеза первой цепи использовали праймер dT₁₆, а для проведения ПЦР – пары специфических праймеров: CCGGCACTAGTGTAATACGACTCACTATAGGACCGCCGAGACCGCGTCC и CGCGCCATGGTGAGCTGGCGGGCGGGTGTGGAC для β-актина; AAGAAGAGGTAGCGAGTGGACG и CGCGCCATGGTCCCTCAGATCTTTCTCTCTCTG для Araf-1; CTGCGCGCAACTCGCTGTAGTAATTCAGC и CGCGCCATGGAGATATCTCGCTGGGCGC для с-мус; ACTTGCTTTTGACACAAGT и CGCGCCATGGTCTGTCTGTTTTGGGGGATTGC для β-глобина кролика. Аналогичным образом в pGL3R встраивали фрагмент ВЭМК (315–846 н.), вырезанный из плазмиды pTE1 [16] эндонуклеазами рестрикции SmaI и NcoI.

m7G- и A-кепированные полиаденилированные РНК получали и очищали согласно [14, 17]. В качестве матрицы использовали ПЦР-продукты, полученные с соответствующих плазмид. Обратный праймер, FLA50 [17], соответствовал дистальному участку 3'-НТО SV40 из вектора и содержал поли(Т)-участок, а в качестве прямых праймеров брали 5'-НТО-специфические олигонуклеотиды, которые содержали на 5'-конце последовательность промотора РНК-полимеразы T7 (T7UTR [17] в случае L1; CGCCGTAATACGACTCACTATAGGGACACTTGCTTTTGACACAAGTGTG в случае β-глобина; CCGGCACTAGTGTAATACGACTCACTATAGG в случае β-актина; CGCCGTAATACGACTCACTATAGGGCGCGCAACTCGCG

TAGTAATTCAGC в случае с-мус; CGCCGTAATACGACTCACTATAGGGGAAGAAGAGGTAGCGAGTGGACG в случае Araf-1; CGCCGTAATACGACTCACTATAGGGGAGCTTATCGATACCGTCG в случае ВЭМК).

S30-экстракт клеток мышинного асцита готовили по следующей методике. Клетки асцитной карциномы Кребс-2, росшие в брюшной полости лабораторных мышей в течение 1 нед, извлекали с помощью шприца и собирали в пробирку с изотоническим раствором (150 мМ NaCl, 35 мМ Трис-НCl pH 7.5). После центрифугирования (Beckman JA-20, 1200 об/мин, 10 мин) клетки ресуспендировали в равном объеме изотонического раствора и осаждали еще раз, после чего процедуру промывки повторяли еще дважды, тщательно отбирая супернатант. Затем осадок клеток суспендировали в 1.5 объемах гипотонического буфера (10 мМ Трис-НCl pH 7.5, 10 мМ KCH₃COO, 1.5 мМ Mg(CH₃COO)₂, 2.5 мМ дитиотреитол) и инкубировали во льду в течение 20 мин, после чего клетки разрушали гомогенизатором Даунса (тип В, 15–20 ходов) и центрифугировали в течение 20 мин при 15000 об/мин. Супернатант аккуратно отбирали, разделяли на аликвоты и хранили при –75°C.

Трансляцию в системе S30 из клеток асцитной карциномы Кребс-2 проводили в конечном объеме 10 мкл, содержащем 5 мкл экстракта, трансляционный буфер (20 мМ Neres-KOH pH 7.6, 1 мМ дитиотреитол, 0.5 мМ спермидин-НCl, 0.6 мМ Mg(CH₃COO)₂, 8 мМ креатинфосфат, 1 мМ АТФ, 0.2 мМ GTP, 100 мМ KCH₃COO и по 25 мкМ каждой из 20 аминокислот), 2 ед. ингибитора рибонуклеаз HPRI (“Fermentas”) и 0.25 пмоль мРНК. Трансляцию в ЛРК, обработанном нуклеазой микрококков, проводили в соответствии с протоколом изготовителя (“Promega”), как описано в [17], однако вместо радиоактивно меченного использовали 25 мкМ “холодного” L-метионина.

Клетки культивировали на среде DMEM с 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (“ПанЭко”), как описано в [14]. Накануне трансфекции клетки рассеивали в 24-луночные планшеты. Трансфекцию РНК проводили с помощью реактива Lipofectamine 2000 (“Invitrogen”) при плотности клеток 60–80% от монослоя. На одну лунку брали 0.5 мкг указанной мРНК, кодирующей люциферазу светлячка, 1 нг нормировочной кефированной полиаденилированной мРНК capRluc [14], кодирующей люциферазу *Renilla*, и 1.3 мкл трансфицирующего реагента. Через 2.5 ч клетки лизировали и измеряли активность люцифераз Fluc и Rluc с помощью набора DLA (“Promega”).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе мы использовали несколько модельных мРНК, которые кодировали люциферазу

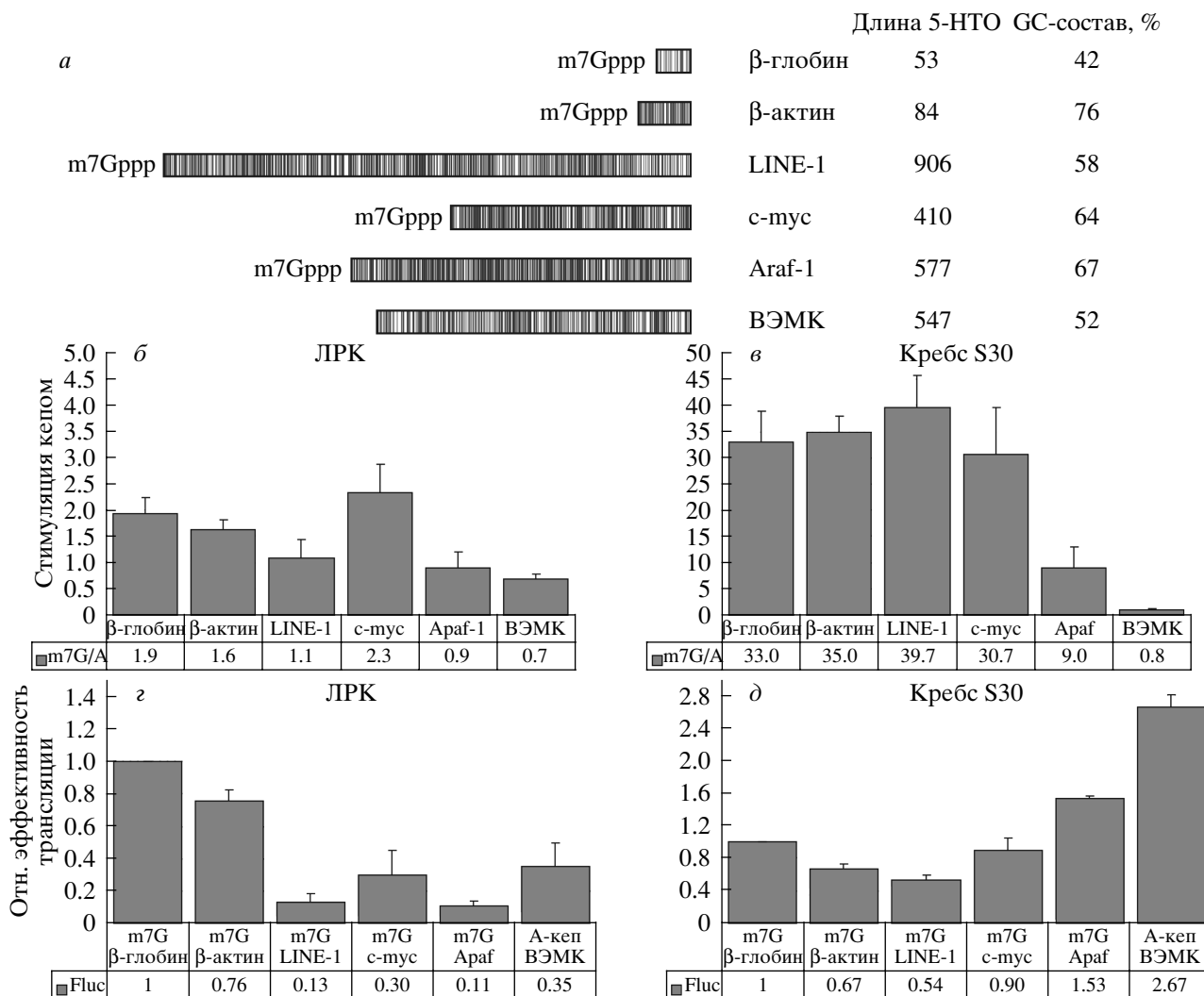


Рис. 1. Стимуляция кепом и относительная эффективность трансляции модельных мРНК, различающихся 5'-НТО, в лизате ретикулоцитов кролика (ЛРК) и экстракте S30 из клеток асцитной карциномы Кребс-2. **а** – Схематическое изображение 5'-НТО использованных мРНК. Белые и черные вертикальные линии указывают положение АТ- и GC-оснований соответственно. Справа приведены длины и GC-состав этих 5'-НТО. **б** и **в** – Кратность стимуляции трансляции m7G-кепом шести различных 5'-НТО по отношению к А-кепированным мРНК в ЛРК и S30 соответственно. Значения кратностей стимуляции приведены под соответствующими столбиками. **г** и **д** – Эффективность трансляции мРНК с разными 5'-НТО по отношению к 5'-НТО мРНК β-глобина, эффективность которой принята за единицу, в ЛРК и экстракте S30 соответственно.

светлячка (Fluc), но отличались своими 5'-НТО (см. рис. 1а). 5'-НТО с-мус взята из мРНК, кодирующей фактор транскрипции человека, ответственный за пролиферацию клеток, а 5'-НТО Araf-1 – из мРНК, кодирующей ключевой фактор апоптоза, который организует на своей поверхности каспазы. Эти довольно протяженные 5'-НТО сильно структурированы и, как считают многие исследователи, содержат в своем составе IRES-элементы [15, 18–21]. Трансляционные свойства этих 5'-НТО сравнивали со свойствами 5'-НТО из мРНК β-актина, β-глобина, ретротранспозона L1 и IRES-элемента из РНК ВЭМК в разных системах трансляции. мРНК β-актина человека и β-глобина

кролика имеют относительно короткие лидерные области (84 и 53 н. соответственно) и заведомо не содержат IRES-элементов. Они часто используются как стандартные клеточные мРНК, которые работают исключительно по кепп-зависимому сканирующему механизму. Следует особо подчеркнуть, что мРНК β-глобина кролика считается одной из самых активных в инициации трансляции среди природных мРНК млекопитающих. мРНК L1, транскрибируемая с ретротранспозона LINE-1 человека, напротив, имеет сильно структурированную 5'-НТО очень большой длины, однако, как мы недавно показали [14], использует только кепп-зависимый способ инициации трансляции, т.е. не со-

держит IRES-элемента. Наконец, IRES ВЭМК взят в качестве контроля, как классический пример вирусного IRES-элемента, активность которого совершенно не должна зависеть от наличия кеп-а на 5'-конце соответствующей РНК. РНК получали путем Т7-транскрипции с соответствующих ПЦР-продуктов. За последовательностью, кодирующей люциферазу, в них следовала 3'-НТО вируса SV40 длиной 162 н., взятая из вектора pGL3R, и поли(А)-последовательность длиной 50 н., которую вводили с помощью ПЦР. мРНК содержали на 5'-конце либо кеп (m7Gppp), либо его нефункциональный аналог (Appp), которые вводили во время Т7-транскрипции путем добавления в реакционную смесь m7GpppG или ApppG соответственно. ApppG не способен взаимодействовать с кеп-связывающими белками, eIF4E или eIF4F, однако защищает мРНК от возможной 5' → 3'-экзонуклеазной деградации. В силу сходства всех частей использованных мРНК, за исключением 5'-НТО, их трансляционная активность должна прямо зависеть от активности 5'-НТО в инициации трансляции.

Трансляционную активность описанных РНК-конструкций анализировали в двух бесклеточных системах: обработанном нуклеазой ЛРК и в необработанной нуклеазами фракции S30 из клеток асцитной карциномы Кребс-2. Первая система всем хорошо известна и широко применяется, поскольку коммерчески доступна. Она характерна тем, что в ней нет эндогенных матриц, т.е. тестируемая в этой системе экзогенная мРНК работает в неконкурентных условиях. Кроме того, ретикулоциты – это весьма специфические специализированные клетки. В них отсутствуют многие мРНК-связывающие белки или их концентрации сильно снижены. Вторая система, напротив, используется весьма эпизодически. Как правило, систему S30 готовят сами исследователи. От ЛРК ее отличает то, что тестируемые мРНК транслируются в условиях конкуренции с эндогенными клеточными матрицами. Кроме того, система S30 из клеток асцитной карциномы Кребс-2 (и аналогичные ей системы из других культивируемых клеток млекопитающих) содержит все мРНК-связывающие белки, входящие в состав транслируемых мРНК. Фактически, системы S30 – это полные цитоплазматические фракции клеток. Логично предположить, что трансляция мРНК в таких экстрактах лучше отражает ситуацию *in vivo*.

Ниже представлены результаты трансляции кепированных (m7G-кепированных) и некепированных (А-кепированных) мРНК в ЛРК и цитоплазматическом экстракте клеток асцитной карциномы Кребс-2. На рис. 1б, 1в в виде отношения уровня трансляции m7G-кепированной мРНК и ее А-кепированного варианта в ЛРК и в экстракте S30 представлены данные для каждой мРНК. Таким образом, эти диаграммы отражают влияние кеп-а на трансляционную активность тестируемых

мРНК в каждой из систем. С другой стороны, из рис. 1г, 1д можно сделать заключение о соотношении абсолютных уровней эффективности трансляции использованных мРНК в двух системах. Анализ этих данных позволяет прийти к однозначному выводу, что присутствие или отсутствие кеп-а очень слабо влияет на инициацию трансляции в ЛРК. Кепирование либо вовсе не влияет на трансляцию (мРНК L1, Araf-1), либо эффект не превышает 2.5 раз (мРНК β-актина, β-глобина, с-тус). Напротив, в системе S30 из клеток Кребс-2 этот эффект достигает десятков раз для большинства клеточных мРНК. Следует особо отметить, что во всех опытах кепирование оказывало наименьшее влияние на 5'-НТО Araf-1, хотя все равно оно было весьма значительным.

На самом деле в экспериментах в ЛРК мы не сделали никакого открытия: незначительное влияние кеп-а при трансляции в этой системе вскользь отмечали многие. Важно другое: из этого не было сделано практического вывода. А такой вывод однозначен. Систему ЛРК нельзя использовать для исследования механизмов инициации трансляции мРНК со сложно организованными 5'-НТО. Нельзя изучать в ней и регуляцию трансляции таких мРНК, в частности, эффекты, связанные с модификациями кеп-связывающих факторов (eIF4E, eIF4F) и их репрессоров (4E-BP). Именно эти модификации (в первую очередь, фосфорилирование 4E-BP1) отвечают за изменение профиля экспрессии мРНК во время клеточных стрессов, в том числе, за дифференциальный эффект стресса на трансляцию разных клеточных мРНК. Все эти процессы нельзя изучать в системах, которые “не чувствуют” кеп.

Кроме того, мы выяснили, что иерархия эффективностей инициации трансляции одного и того же набора мРНК сильно различается в двух использованных нами системах трансляции *in vitro* (рис. 1г, 1д). В то время как в ЛРК иницирующая активность простых лидерных участков (5'-НТО мРНК β-актина и β-глобина) заметно выше по сравнению с активностью длинных и сильно структурированных 5'-НТО, эти различия в значительной степени выравниваются при трансляции тех же мРНК в экстракте S30. Объяснений данному расхождению может быть несколько. Помимо отмеченной выше нечувствительности к кепу, в ЛРК замечен также высокий уровень aberrантной инициации трансляции на внутренних AUG [17], который может сказываться на эффективности трансляции основного продукта. Вероятно, некоторые из описанных эффектов связаны также с отсутствием в ЛРК многих мРНК-связывающих белков.

Данные, полученные в системе S30, гораздо лучше согласуются с результатами опытов по трансфекции животных клеток теми же мРНК, чем данные, полученные в ЛРК. Хотя значения

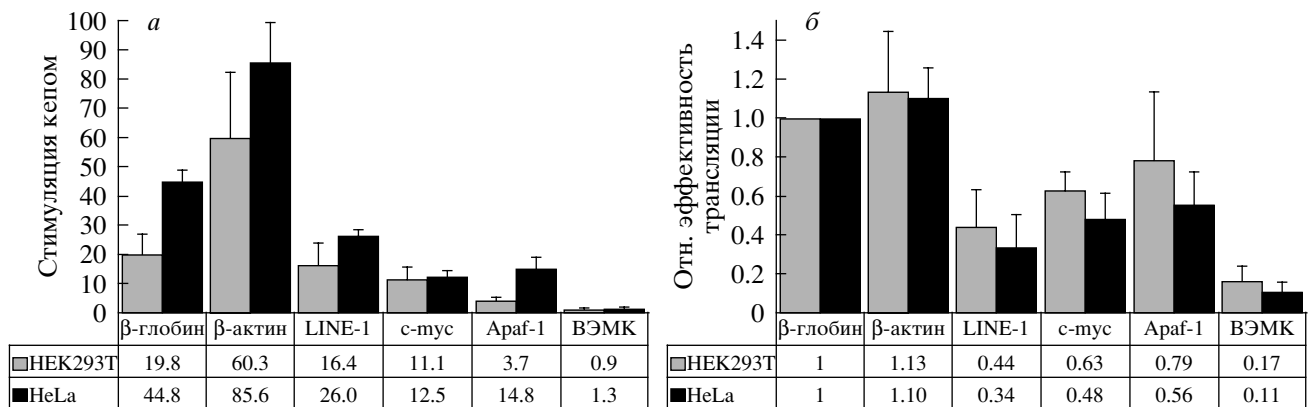


Рис. 2. Кратность стимуляции m7G-кепом (*а*) и относительная эффективность трансляции (*б*) тех же мРНК, что и на рис. 1, в трансфицированных клетках линий HEK293T и HeLa.

m7G/A *in vivo* значительно варьируют от опыта к опыту и зависят от типа клеток и даже от стадии роста и состояния культуры (не показано), из типичных результатов, представленных на рис. 2а, можно видеть, что в целом наблюдается мощный эффект кепа на трансляционный потенциал каждой мРНК. При этом кратность стимулирования разных мРНК не одинакова. Как и в случае экстракта, наименьший эффект кеппирования отмечен у 5'-НТО мРНК Araf-1. Это весьма интригующий факт, он говорит о каких-то специфических особенностях этой 5'-НТО. Возможно, там действительно имеется IRES. Этот вопрос мы сейчас изучаем. Наконец, из рис. 2б видно, что нет драматических различий между трансляционными потенциалами коротких 5'-НТО и длинных сильно структурированных лидерных участков, что согласуется с данными, полученными в экстрактах S30.

Анализируя всю совокупность результатов, мы приходим к выводу, что устоявшееся мнение о том, что чем выше структурированность 5'-лидерной области, тем ниже ее активность в инициации трансляции, зиждется в основном на данных, получаемых в системе ЛРК (поскольку таких данных большинство). Действительно, мРНК с сильно структурированными лидерными участками транслируются в ЛРК очень плохо, что как будто полностью подтверждает сканирующий механизм, предложенный М. Козак, согласно которому чем больше “шпильки”, тем эффективность трансляции ниже [1]. Сама Козак работала в основном с недлинными 5'-НТО, в то время как анализ мРНК человека и мыши, выполненный в постгеномную эру, однозначно показал, что среднестатистическая 5'-НТО млекопитающих имеет длину 150–200 н. и высокое содержание (60%) GC [22]. Хорошо известно, что введение “шпильки” на самый 5'-конец мРНК очень сильно подавляет кепп-зависимую инициацию трансляции. Однако не исключено, что введение любой “шпильки” на 5'-конец мешает не столько сканированию, сколько первичному взаимодей-

ствию с 5'-концом кепп-связывающего комплекса eIF4F и факторов eIF4A + eIF4B. Другое дело, когда “шпильки” расположены уже достаточно далеко от 5'-конца и к тому же вписаны в общий структурный контекст природной, а не искусственной 5'-НТО. Следует заметить, что систематического сравнения трансляционного потенциала мРНК с разными природными лидерными участками в трансфицированных клетках или цитоплазматических экстрактах из этих клеток до нас никто не проводил.

Как сильно развитая вторичная структура 5'-НТО преодолевается сканирующей 40S рибосомой в животных клетках и экстрактах S30? На сегодняшний день это совершенно не ясно. Мы полагаем, что механизмы сканирования коротких лидерных последовательностей и больших структурированных 5'-НТО отличаются. Нельзя забывать, что со структурированными длинными лидерными участками взаимодействует множество мРНК-связывающих белков, образуя “5'-НТО РНП”, что может вносить серьезные изменения в механизм поиска иницирующего кодона.

Авторы выражают благодарность И.А. Оловникову и М.П. Рубцовой за помощь в приготовлении конструкций. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (07-04-01120, С.Е.Д.) и Фонда содействия отечественной науке (С.Е.Д.)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kozak M. 1989. The scanning model for translation: an update. *J. Cell Biol.* **108**, 229–241.
2. Pestova T.V., Kolupaeva V.G., Lomakin I.B., et al. 2001. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 7029–7036.
3. Macejak D.G., Sarnow P. 1991. Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature.* **353**, 90–94.
4. Oh S.K., Scott M.P., Sarnow P. 1992. Homeotic gene *Antennapedia* mRNA contains 5'-noncoding sequences

- that confer translational initiation by internal ribosome binding. *Genes Dev.* **6**, 1643–1653.
5. Johannes G., Sarnow P. 1998. Cap-independent polyosomal association of natural mRNAs encoding c-myc, BiP, and eIF4G conferred by internal ribosome entry sites. *RNA*. **4**, 1500–1513.
 6. Vagner S., Galy B., Pyronnet S. 2001. Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO J.* **2**, 893–898.
 7. Kozak M. 2001. New ways of initiating translation in eukaryotes? *Mol. Cell Biol.* **21**, 1899–1907.
 8. Schneider R., Agol V.I., Andino R., et al. 2001. New ways of initiating translation in eukaryotes. *Mol. Cell Biol.* **21**, 8238–8246.
 9. van Eden M.E., Byrd M.P., Sherrill K.W., Lloyd R.E. 2004. Demonstrating internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNAs using stringent RNA test procedures. *RNA*. **10**, 720–730.
 10. Bert A.G., Grepin R., Vadas M.A., Goodall G.J. 2006. Assessing IRES activity in the HIF-1 α and other cellular 5' UTRs. *RNA*. **12**, 1074–1083.
 11. Han B., Zhang J.T. 2002. Regulation of gene expression by internal ribosome entry sites or cryptic promoters: the eIF4G story. *Mol. Cell Biol.* **22**, 7372–7384.
 12. Young R.M., Wang S.J., Gordan J.D., et al. 2008. Hypoxia-mediated selective mRNA translation by an internal ribosome entry site independent mechanism. *J. Biol. Chem.* **283**, 16309–16319.
 13. Graber T.E., Lewis S.M., Holcik M. 2006. An approach to whole-genome identification of IRES elements. *Curr. Genomics*. **7**, 205–215.
 14. Dmitriev S.E., Andreev D.E., Terenin I.M., et al. 2007. Efficient translation initiation directed by the 900-nucleotide-long and GC-rich 5' untranslated region of the human retrotransposon LINE-1 mRNA is strictly cap dependent rather than internal ribosome entry site mediated. *Mol. Cell Biol.* **27**, 4685–4697.
 15. Stoneley M., Paulin F.E., Le Quesne J.P., et al. 1998. c-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene*. **16**, 423–428.
 16. Evstafieva A.G., Ugarova T.Y., Chernov B.K., Shatsky I.N. 1991. A complex RNA sequence determines the internal initiation of encephalomyocarditis virus RNA translation. *Nucl. Acids Res.* **19**, 665–671.
 17. Дмитриев С.Е., Быкова Н.В., Андреев Д.Е., Теренин И.М. 2006. Адекватная система для изучения инициации трансляции мРНК ретротранспозона L1 человека *in vitro*. *Мол. биол.* **40**, 25–30. Dmitriev S.E., Bykova N.V., Andreev D.E., Terenin I.M. 2006. Adequate system for investigation of translation initiation of the human retrotransposon L1 mRNA *in vitro*. *Mol. Biol. (Mosk)*. **40**, 25–30.
 18. Komar A.A., Hatzoglou M. 2005. Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence. *J. Biol. Chem.* **280**, 23425–23428.
 19. Nanbru C., Lafon I., Audigier S., et al. 1997. Alternative translation of the proto-oncogene c-myc by an internal ribosome entry site. *J. Biol. Chem.* **272**, 32061–32066.
 20. Thoma C., Bergamini G., Galy B., et al. 2004. Enhancement of IRES-mediated translation of the c-myc and BiP mRNAs by the poly(A) tail is independent of intact eIF4G and PABP. *Mol. Cell*. **15**, 925–935.
 21. Coldwell M.J., Mitchell S.A., Stoneley M., et al. 2000. Initiation of Apaf-1 translation by internal ribosome entry. *Oncogene*. **19**, 899–905.
 22. Rogozin I.B., Kochetov A.V., Kondrashov F.A., et al. 2001. Presence of ATG triplets in 5' untranslated regions of eukaryotic cDNAs correlates with a 'weak' context of the start codon. *Bioinformatics*. **17**, 890–900.