

ВЗАИМНОЕ ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ИНИЦИИИ ТРАНСЛЯЦИИ ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С IRES-ЭЛЕМЕНТОМ РНК ВИРУСА ЭНЦЕФАЛОМИОКАРДИТА

© 2004 г. А. В. Писарев, С. Е. Дмитриев, 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 07.07.2003 г.

Ключевые слова: инициация трансляции, IRES-элементы, иницирующие 48S комплексы, сборка *in vitro*, РТВ, вирус энцефаломиокардита.

В настоящее время известны три основных пути связывания мРНК с 40S субчастицей рибосомы у эукариот: классический кеп-зависимый путь, шунтирующий механизм и IRES-зависимый способ инициации трансляции [см. 1]. При IRES-зависимом способе, 40S субчастица связывается не с 5'-концом мРНК, а со специфическим внутренним участком ее 5'-НТО (Internal Ribosome Entry Site, IRES). Классический пример IRES-элементов представляют собой специфические участки связывания рибосомы РНК пикорнавирусов, к которым относится и вирус энцефаломиокардита мышей (ВЭМК, группа кардиовирусов). Известно, что IRES-элементы пикорнавирусов используют те же канонические факторы инициации трансляции, что и кеп-зависимые мРНК, но, в отличие от последних, главным компонентом, узнающим IRES-элемент, оказывается не кеп-связывающая субъединица (eIF4E) фактора инициации eIF4F, а его большая субъединица (eIF4G), обладающая РНК-связывающими свойствами (см. [2]). Третьим компонентом eIF4F является фактор eIF4A, который существует и в свободном состоянии, постоянно обмениваясь со связанным в eIF4F фактором 4A [3]. Фактор eIF4A обеспечивает разворачивание вторичной структуры РНК вблизи иницирующего кодона и, вероятно, укладку иницирующего участка РНК в соответствующий канал 40S рибосомной субчастицы. Фактор eIF4E связан с большой субъединицей eIF4F (eIF4G) приблизительно на расстоянии одной трети длины от ее N-конца, в то время как eIF4A связывается в двух местах eIF4G – в центре и в ее C-кон-

цевой части [4, 5]. мРНК-связывающий участок eIF4G, ответственный за первичное узнавание IRES-элементов пикорнавирусных РНК, также расположен в центральной части фактора [4]. У РНК ВЭМК и вируса ящура он взаимодействует с IRES-элементом в районе J-K-домена [6, 7], как показано на рис. 1. Главный мотив соответствующего узнающего участка IRES-элемента – последовательность 5' AAAAA(G/A) 3' [6], образующая внутреннюю петлю у соединения доменов J и K. Наконец, центральная часть eIF4G имеет также участок связывания фактора инициации eIF3, который, в свою очередь, связывается с 40S субчастицей [5]. Таким образом, первичное связывание РНК обеспечивается цепочкой взаимодействия IRES–eIF4G–eIF3–40S.

Из канонических иницирующих факторов для образования 48S предынициаторного комплекса требуются также фактор eIF2, приносящий на 40S субчастицу инициаторную тРНК, и eIF4B, стимулирующий хеликазную активность eIF4A. Тестировать образование 48S комплекса удобно с помощью метода тоупринтинга, подробно описанного в обзоре [8].

Помимо канонических иницирующих факторов трансляции, инициация на IRES-элементах пикорнавирусов требует также специальных вспомогательных мРНК-связывающих белков. Белок РТВ (Pyrimidine tract binding protein) требуется для образования 48S комплекса с IRES-элементами РНК ВЭМК и вируса Тейлера [9–11]. Для IRES-элементов вирусов полиомиелита и риновирусов требуются в дополнение к РТВ еще белки upg и PCBP (Poly(C)-binding protein) [12, 13], а для IRES-элемента вируса ящура – РТВ и так называемый белок ITAF 45 [11]. Функциональная роль этих белков и, в частности, РТВ не известна. По поводу потребности в РТВ для образования 48S комплекса на IRES-элементах РНК ВЭМК в литературе

Принятые сокращения: IRES-элемент – участок внутреннего связывания рибосомы (Internal Ribosome Entry Site); 5'-НТО – 5'-нетранслируемая область; РТВ – белок, связывающий пиримидин-богатые участки (Pyrimidine Tract-Binding Protein); ВЭМК – вирус энцефаломиокардита.

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

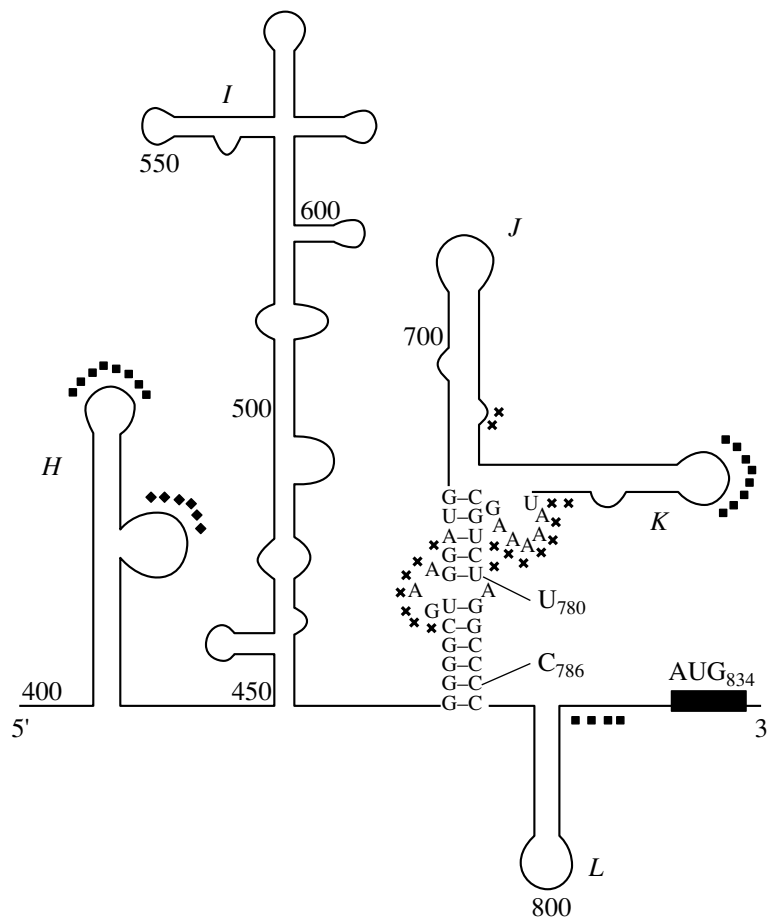


Рис. 1. Схематическое изображение IRES-элемента РНК ВЭМК. Домены вторичной структуры элемента обозначены латинскими буквами. Участки, защищаемые фактором eIF4F или РТВ от химической или ферментативной модификации, отмечены черными крестиками и квадратами соответственно. Стрелками указаны места остановки ревертазы при обратной транскрипции комплексов IRES-элемента с eIF4F (положение 786) и с eIF4F + eIF4A (780 и 786). Положение инициирующего кодона показано черным прямоугольником.

имеются противоречивые сведения. Мы показали [9], что РТВ сильно стимулирует инициацию трансляции на РНК ВЭМК, однако в дальнейшем обнаружили лишь незначительный эффект РТВ (не более чем в 2 раза) на сборку 48S комплекса из очищенных компонентов на этом IRES-элементе [14]. Справедливости ради следует отметить, что в работе [14] мы не проводили систематических исследований с этим белком и не определяли выход 48S комплекса в зависимости от количества добавленного РТВ. В дальнейшем группа Джексона, которая вначале поддерживала идею о сильной зависимости от РТВ сборки 48S комплекса на РНК ВЭМК [10], отказалась от своего мнения [15] и пришла к выводу, что IRES-элемент РНК ВЭМК не нуждается в РТВ для инициации трансляции. В данной работе мы представляем убедительные доказательства того, что РТВ очень сильно влияет на выход 48S комплекса при его сборке на IRES-элементе РНК ВЭМК дикого типа. Мы также получили некоторые важные данные о функциональной роли этого загадочно-го белка в образовании 48S комплекса на РНК

ВЭМК и, возможно, других пикорнавирусных РНК, имеющих сходный с РНК ВЭМК тип строения IRES-элемента.

Сборку 48S комплекса из очищенных компонентов проводили по описанному ранее протоколу [8] с использованием транскрипта, синтезированного в T7-полимеразной системе. Транскрипт покрывал последовательность 315–846 РНК ВЭМК, сцепленную с начальным участком кодирующей части мРНК люциферазы светлячка. Очистку факторов инициации и РТВ проводили по опубликованной ранее методике [14]. За образованием 48S комплекса следили с помощью метода ингибирования удлинения затравки (тоу-принтинга), как описано ранее [8]. Установление кодон-антикодонного взаимодействия между инициаторной Мет-тРНК и инициирующим кодоном РНК ВЭМК в 48S комплексе приводит к остановке обратной транскрипции в положениях +16–+18 в 3'-сторону от остатка А в инициирующем AUG кодоне (см. рис. 2). В результате такого рода опытов мы подтвердили, что сканирующие факторы eIF1 и eIF1A не нужны для инициации

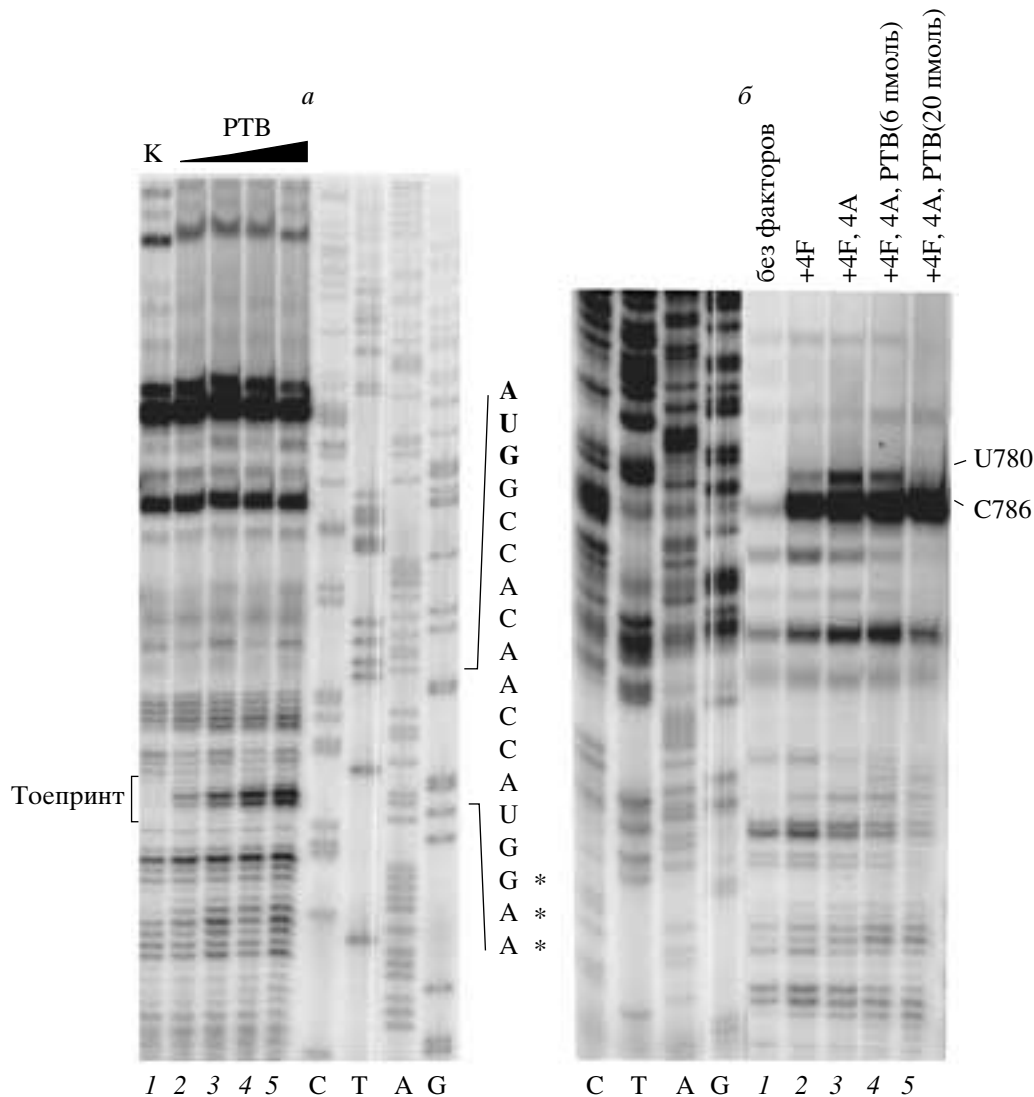


Рис. 2. *a* – Влияние РТВ на образование 48S иницирующего комплекса с IRES-элементом РНК ВЭМК. На дорожке “К” (контроль) представлен результат тоупринтинга инкубационной смеси, где не добавляли фактор eIF2 и инициаторную тРНК. Молярное соотношение РТВ/РНК в дорожках 3–5 равно 2, 6 и 20 соответственно. В дорожке 2 РТВ отсутствует. Справа от дорожек с тоупринтом показана последовательность того же участка, полученная с использованием той же затравки для соответствующей кДНК. Места остановки обратной транскрипции отмечены звездочкой. *б* – Влияние РТВ на остановку обратной транскрипции для комплексов IRES-элемента с факторами eIF4F и eIF4A + eIF4A. В скобках указаны количества РТВ, добавленного в инкубационную смесь, в расчете на 1 пмоль РНК. Положения U780 и C786 соответствуют специфическим для комплексов местам остановки обратной транскрипции. Последовательность соответствующего участка РНК ВЭМК приведена слева.

трансляции на РНК ВЭМК, а фактор eIF4B стимулирует образование 48S комплекса не более, чем в 2 раза (данные не показаны). Таким образом, из канонических иницирующих факторов IRES РНК ВЭМК строго “требует” только eIF2, eIF3, eIF4F (последний может быть заменен на eIF4G + eIF4A) и избытка свободного eIF4A.

Добавление рекомбинантного белка РТВ в возрастающих количествах к системе реконструкции 48S комплекса приводит к прогрессивному возрастанию выхода 48S комплекса (возрастанию интенсивности полос тоупринта). Максимальная стимуляция, оцененная с помощью

фосфоимиджера, составляет от 5 до 6 раз (рис. 2*a*). Мы полагаем, что в споре о необходимости РТВ для инициации трансляции на РНК ВЭМК можно наконец-то поставить точку: РТВ необходим для инициации трансляции на всех изученных к настоящему моменту IRES-элементах РНК для групп кардио-, афто-, рино- и полиовирусов, хотя его отсутствие сказывается на образовании 48S комплекса с РНК ВЭМК не столь фатальным образом, как в случае других пикорнавирусов. Отсутствие стимулирующего эффекта экзогенного РТВ в исследованиях, проведенных группой Джексона [15], вероятно объясняется тем, что

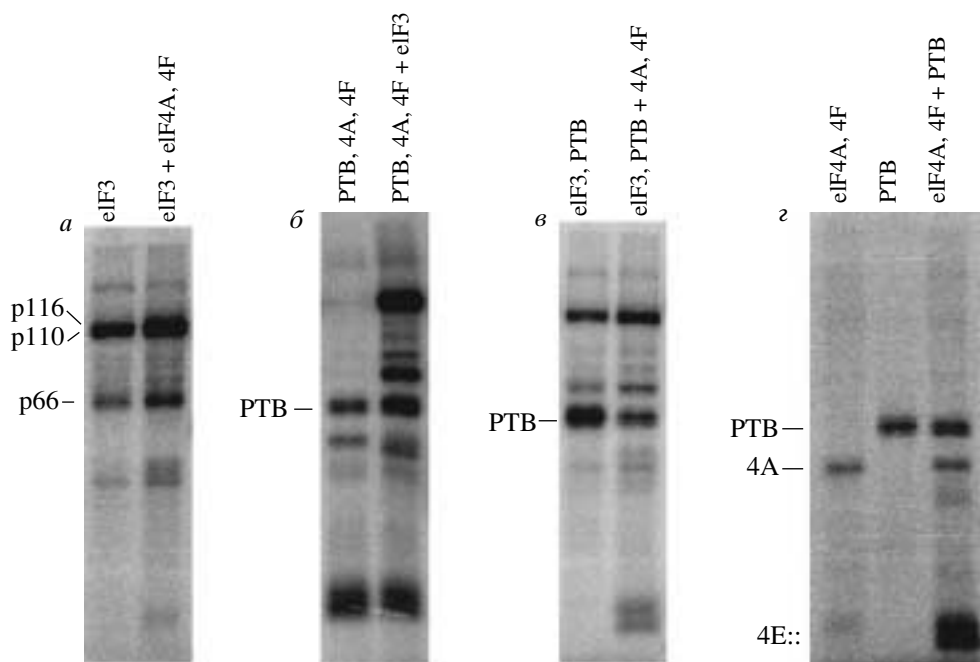


Рис. 3. Результаты опытов по УФ-сшиванию различных комбинаций eIF3, eIF4F + eIF4A и PTB с [³²P]-меченым IRES-элементом РНК ВЭМК. Обозначения p116, p110 и p66 слева от геля (а) соответствуют субъединицам eIF3. б, в, и з – результаты пришивки компонентов, указанных сверху. Подробности в тексте.

эти авторы применили не совсем удачный экспериментальный подход. Они использовали ретикулоцитный лизат, истощенный по эндогенному РТВ пропусканием лизата через аффинную колонку. Аффинный сорбент представлял собой короткую РНК, соответствующую домену Н РНК ВЭМК (см. рис. 1), пришитую к сефарозе 4В. Такая колонка, помимо РТВ, с неизбежностью связывала в какой-то степени и факторы инициации, так что полностью удалить РТВ без значительной потери активности лизата этим авторам не удалось. Вероятно, поэтому они и не получили заметной стимуляции трансляции в таком лизате при добавлении экзогенного белка. Наличие остаточного РТВ в истощенном лизате в описанной работе никак не контролировали.

В соответствии с опубликованными данными [14] образование бинарного комплекса между фактором 4F и IRES-элементом РНК ВЭМК стабилизирует GC-обогащенный стебель у основания домена J-K, что, в свою очередь, приводит к резкому усилению остановки обратной транскрипции в положении 786 (см. рис. 2а и 2б, а также схему на рис. 1). В присутствии eIF4F и избытка eIF4A появляется ранее никем не замеченная дополнительная полоса в положении 780 (рис. 2б). Это согласуется с данными Ломакина и соавт. [4], показавшими, что роль eIF4A-субъединицы eIF4F в проявлении его взаимодействия с J-K-доменом РНК ВЭМК весьма существенна. Интересно, что в присутствии РТВ происходит резкое ослабление этой полосы, причем отрицательного влияния на интенсивность полосы в положении 786 это не

оказывает. Эти данные позволили предположить, что РТВ каким-то образом влияет на взаимодействие eIF4F с доменом J-K IRES-элемента РНК ВЭМК.

Подтверждение этому предположению получено в опытах по УФ-сшиванию комплексов иницирующих факторов с РНК ВЭМК. РНК метили в системе Т7-транскрипции [³²P]УТР, инкубировали со смесью факторов и РТВ в буфере для реконструкции 48S комплексов и облучали УФ-светом с длиной волны 257 нм. Для снятия фона от неспецифических РНК-белковых взаимодействий в смесь также добавляли одנותяжевую РНК в 10-кратном весовом избытке. После облучения смесь переваривали РНКазами и пришитые белки анализировали в полиакриламидном геле по методу Лэммли.

На рис. 3 показано взаимное влияние факторов и РТВ при взаимодействии с IRES-элементом. Фактор eIF4F усиливает пришивку eIF3 (рис. 3а), что естественно, поскольку центральный участок eIF4G взаимодействует с eIF3. В свою очередь фактор eIF3 стимулирует пришивку РТВ (рис. 3б), а eIF4F + eIF4A ее уменьшают (рис. 3в). Уровень пришивки eIF4A не изменяется при различных комбинациях остальных белков. Отсутствие на представленных гелях полосы для пришитого eIF4G не удивительно. Во-первых, это очень большой белок (подвижность в геле соответствует подвижности белка с мол. весом 220 кДа) и его сшитый комплекс плохо входит в гель. Во-вторых, в участке связывания eIF4G почти нет неспаренных остатков U, несущих метку [³²P].

Однако самое замечательное наблюдение, сделанное в этом опыте, это появление интенсивной полосы пришивки фактора eIF4E (он обычно представлен дублетом, вероятно, вследствие частичного фосфорилирования), обусловленной присоединением РТВ к IRES-элементу (рис. 3z). Само по себе взаимодействие eIF4E с РНК ВЭМК вряд ли имеет какое-нибудь функциональное значение, поскольку достоверно известно (см. выше), что eIF4E не нужен для взаимодействия eIF4F (вернее, его большой субъединицы eIF4G) с IRES-элементом РНК ВЭМК. По нашему мнению, резкое усиление его пришивки говорит о том, что под действием РТВ район eIF4G, прилежащий к участку связывания eIF4E, входит в контакт с каким-то участком IRES-элемента РНК ВЭМК. В результате такой конформационной перестройки IRES-элемента и/или фактора eIF4G последний, вероятно, переходит из менее в более компетентное состояние для развития дальнейшего процесса инициации трансляции на РНК ВЭМК. Например, можно предположить, что при этом корректируются контакты с РНК других иницирующих факторов, взаимодействующих с фактором eIF4G и принимающих участие в узнавании иницирующего кодона.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (02-04-48798) и грантом ИНТАС (01-0293).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hershey J.W.B., Merrick W.C. 2000. The pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. In: *Translational control of gene expression* (Eds Sonenberg N. et al.), Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 33–88.
- Pestova T.V., Kolupaeva V.G., Lomakin I.B., Pilipenko E.V., Shatsky I.N., Agol V.I., Hellen C.U.T. 2001. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 7029–7036.
- Pause A., Methot N., Svitkin Y., Merrick W.C., Sonenberg N. 1994. Dominant negative mutants of mammalian translation initiation factor eIF4A define a crucial role for eIF4F in cap-dependent and cap-independent initiation of translation. *EMBO J.* **13**, 1205–1215.
- Lomakin I.B., Hellen C.U.T., Pestova T.V. 2000. Physical initiation of eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) with eIF4A strongly enhances binding of eIF4G with to the internal ribosomal entry site of encephalomyocarditis virus and is required for internal initiation of translation. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6019–6029.
- Lamphear B. J., Kirchweger R., Skern T., Rhoads R.E. 1995. Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translation initiation. *J. Biol. Chem.* **270**, 21975–21983.
- Kolupaeva V.G., Pestova T.V., Hellen C.U.T., Shatsky I.N. 1998. Translation eukaryotic initiation factor 4G recognizes a specific structural element within the internal ribosome entry site of encephalomyocarditis virus RNA. *J. Biol. Chem.* **273**, 18599–18604.
- Lopez de Quinto S., Lafuente E., Martinez-Salas E. 2001. IRES interaction with translation initiation factors: functional characterization of novel RNA contacts with eIF3, eIF4B, and eIF4GII. *RNA*. **7**, 1213–1226.
- Шатский И.Н. 2001. Реконструкция иницирующих комплексов *in vitro* для исследования молекулярных механизмов инициации трансляции у млекопитающих. *Молекуляр. биология*. **35**, 628–637.
- Borovjagin A., Pestova T., Shatsky I. 1994. Pyrimidine tract binding protein strongly stimulates *in vitro* encephalomyocarditis virus RNA translation at the level of preinitiation complex formation. *FEBS Lett.* **351**, 299–302.
- Kaminski A., Hunt S.L., Patton J.G., Jackson R.J. 1995. Direct evidence that polypyrimidine tract binding protein (PTB) is essential for internal initiation of translation of encephalomyocarditis virus RNA. *RNA*. **1**, 924–938.
- Pilipenko E.V., Pestova T.V., Kolupaeva V.G., Khitriina E.V., Poperechnaya E.V., Agol V.I., Hellen C.U.T. 2000. A cell cycle-dependent protein serves as a template-specific translation initiation factor. *Genes Dev.* **14**, 2028–2045.
- Belsham G.J., Jackson R.J. 2000. Translation initiation on picornavirus RNA. In *Translational control of gene expression* (Eds Sonenberg N. et al.), Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 869–900.
- Boussadia O., Niepmann M., Creancier L., Prats A-C., Dautry F., Jacquemin-Sablon H. 2003. Unr is required *in vivo* for efficient initiation of translation from the internal ribosome entry sites of both rhinovirus and poliovirus. *J. Virol.* **77**, 3353–3359.
- Pestova T.V., Hellen C.U.T., Shatsky I.N. 1996. Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6859–6869.
- Kaminski A., Jackson R.J. 1998. The polypyrimidine tract binding protein (PTB) requirement for internal initiation of translation of cardiomyovirus RNAs is conditional rather than absolute. *RNA*. **4**, 626–638.