

На правах рукописи



Николай Эдуардович Широких

**ИНИЦИАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ мРНК НА ЭФФЕКТИВНЫХ ЛИДЕРАХ:
ЗАВИСИМОСТЬ ОТ ФАКТОРОВ ИНИЦИАЦИИ И СТРУКТУРЫ ЛИДЕРА**

03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2010

Работа выполнена в Институте белка РАН

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор,
академик

Спирин Александр Сергеевич

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор,
член-корреспондент РАН

Донцова Ольга Анатольевна

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник

Дмитриев Сергей Евгеньевич

Ведущая организация:

Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН

Защита состоится «17» декабря 2010 года в 11 часов на заседании совета Д 501.001.76 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, ГСП-2, Ленинские горы, МГУ, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Лабораторный корпус «А», аудитория 536.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

Автореферат разослан «__» ноября 2010 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



И.А. Крашенинников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Экспрессия генов у эукариот в значительной степени регулируется после транскрипции ДНК. Многие регуляторные механизмы экспрессии генов эукариот сфокусированы на этапе биосинтеза белка и более всего – на стадии инициации трансляции.

Современная модель инициации трансляции у эукариот подразумевает реализацию двух разных механизмов. В случае кэпированной клеточной мРНК, нахождение правильного стартового кодона происходит благодаря механизму сканирования. Сканирование мРНК рибосомами было постулировано Мэрилин Козак в 1978 году. Основой этого механизма является присоединение рибосом к 5'-кэп-структуре мРНК через белки инициации трансляции, и их последующее АТФ-зависимое перемещение по 5'-нетранслируемой области мРНК до момента узнавания стартового кодона.

В другом случае, на мРНК ряда вирусов, узнавание стартового кодона мРНК рибосомой диктуется специальным пространственным модулем мРНК – сайтом внутренней посадки рибосом. Инициация трансляции на сайтах внутренней посадки рибосом впервые была описана в 1988 году для мРНК вируса энцефаломиокардита группой Виммера, и для полиовируса – группой Зоненберга. Сайт внутренней посадки рибосом специфически связывает белковые факторы инициации трансляции или рибосомы в строго определенном месте мРНК. Благодаря этому механизму, рибосома оказывается в непосредственной близости к инициаторному кодону и, как правило, не нуждается в продолжительном сканировании мРНК.

Некоторые лидерные последовательности мРНК известны своей способностью обеспечивать эффективную кэп-независимую инициацию трансляции. Как было показано ранее, 5'-поли(А) лидерная последовательность, характерная для мРНК осповирусов, и омега-последовательность 5'-нетранслируемой области РНК вируса табачной мозаики (ВТМ) могут усиливать трансляцию чужеродных кодирующих частей РНК в разных клетках и системах бесклеточной трансляции, не зависимо от наличия кэп-структуры. В то же время, обе этих лидерных последовательности не содержат явных сайтов внутренней посадки рибосом. Трансляционные свойства 5'-поли(А)- и омега-лидеров плохо описываются имеющейся моделью эукариотической инициации трансляции и могут быть объяснены реализацией иного механизма инициации трансляции на них.

Цель и задачи исследования. Основной целью работы было получение новых знаний о механизмах инициации трансляции у эукариот. Главной задачей работы было нахождение ответа на вопрос: какой механизм обеспечивает эффективную кэп-независимую инициацию трансляции на 5'-поли(А)- и омега-лидерах мРНК?

Чтобы выяснить механизм инициации трансляции на 5'-поли(А)- и омега-лидерах, мы исследовали зависимость эффективности инициации трансляции на мРНК, содержавших эти последовательности, от набора

факторов инициации трансляции в системе, собранной из отдельных очищенных компонентов. Мы применили методику ингибирования удлинения праймера мРНК-рибосомными комплексами (тупринтинг) – подход, ранее хорошо зарекомендовавший себя для решения подобных задач.

Вторичная и третичная структуры лидерной части мРНК могут оказывать существенное влияние на эффективность инициации трансляции. Структура полирибонуклеотидов типа $(A)_n$ изучалась ранее, и было показано, что в физиологических условиях поли(А)-РНК имеет тенденцию формировать нестабильную одноцепочечную спираль. Структура омега-РНК не была изучена ранее. Большинство исследователей предполагало, что омега-РНК лишена вторичной и третичной структуры, и что именно неструктурированность является первопричиной трансляционной эффективности омега-лидера. Мы исследовали структурную организацию омега-РНК в растворе при физиологических условиях с помощью методов скоростного ультрацентрифугирования, теплового плавления, ядерного магнитного резонанса и химического и ферментативного тестирования структур РНК.

Научная новизна работы. Нами создан усовершенствованный вариант метода тупринтинга, позволяющий обнаруживать и идентифицировать мРНК-рибосомные комплексы на всех стадиях трансляции (инициации, элонгации и терминации), а также быстро и точно подсчитывать количество обнаруженных мРНК-рибосомных комплексов и эффективность соответствующих стадий трансляции. В методе для мечения продуктов реакции обратной транскрипции используются флуоресцентные группы, а для их разделения применяется капиллярный электрофорез. Усовершенствованный метод тупринтинга имеет уникальные преимущества перед обычным вариантом метода с использованием радиоактивных изотопов: благодаря возможности применять флуорофоры с разными спектральными характеристиками, метод позволяет исследовать несколько мест сборки мРНК-рибосомных комплексов в одной и той же реакционной смеси независимо друг от друга.

Методом тупринтинга мы обнаружили, что как лидерная поли(А)-последовательность, так и омега-лидер мРНК способны обеспечивать эффективную инициацию трансляции без участия белков АТФ-зависимого сканирования eIF4A, eIF4B и eIF4F. Как следует из полученных результатов, инициация трансляции на этих мРНК протекает по особому механизму, исключаящему энергозависимое сканирование. Обнаруженный нами механизм инициации трансляции имеет значительные отличия как от канонической инициации трансляции посредством 5'-концевой кэп-структуры мРНК и последующего АТФ-зависимого сканирования, так и от инициации трансляции на сайтах внутренней посадки рибосом. По-видимому, целесообразно выделить такого механизма инициации трансляции как отдельного, третьего пути в существующей модели инициации трансляции у эукариот.

Мы обнаружили, что эффективная инициация трансляции на мРНК с поли(А)-лидером оказалась возможной и без самого большого мультисубъединичного белка инициации трансляции – eIF3. С помощью метода тупринтинга мы показали, что после стадии формирования 48S комплекса завершение инициации трансляции, включающее в себя объединение рибосомных субъединиц с образованием 80S инициаторного комплекса, способного к элонгации, может происходить без участия белка eIF3.

Методами скоростного ультрацентрифугирования и теплового плавления мы показали, что омега-РНК ВТМ имеет коэффициент седиментации компактно свернутой РНК и кооперативно плавится при высокой температуре. Методами химического и ферментатического тестирования, а также методом ядерного магнитного резонанса мы обнаружили, что центральная (САА)_n-содержащая часть омега-РНК не модифицируется агентами, действующими на одноцепочечную РНК, а вся структура омега-РНК формирует компактную укладку на основе неканонических взаимодействий нуклеотидов.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на российских и международных конференциях, а также в сборниках отчетов: «Конференция, посвященная 40-летию Института белка: Биосинтез, структура и функция белка» (Институт белка РАН, Пущино, Россия; 2007 год), «8-я Международная Энгельгардтовская конференция: РНК-белковые взаимодействия» («Буран», Сергиев-Посад, Россия; 2006 год); симпозиум «Пикорнавирусы: открывая большое в малом» (МГУ, Москва, Россия; 2009 год), «Ежегодная научная конференция Института белка» (Институт белка РАН, Пущино, Россия; 2005-2006, 2008-2010 годы), отчетные конференции по программе РАН «Молекулярная и клеточная биология» (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия; 2008, 2010 годы), «Итоговые аннотированные отчеты» (РФФИ, Москва, Россия, 2009 год), «Избранные научные отчеты 2008-2009» (Фонд содействия отечественной науке РАН, Москва, Россия, 2010 год), «Meeting on Mechanisms and Control of Posttranscriptional Gene Expression» (New York Academy of Sciences, New York, New York, США, 2005 год), «Translational Control Meeting» (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, США; 2004, 2008, 2010 годы), «EMBO Conference on Protein Synthesis and Translational Control» (EMBL, Heidelberg, Германия; 2007, 2009 годы).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах.

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на _____ страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы исследования, методы исследования, результаты и обсуждение результатов работы, резюме результатов работы, выводы и список цитированной литературы. Работа содержит ____ рисунков и ____ таблиц. Библиографический указатель включает _____ цитированных работ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Часть 1. Инициация трансляции на мРНК с поли(А)-лидером – 5'-нетранслируемой последовательностью мРНК осповирусов

1.1 мРНК с поли(А)-лидерами эффективно транслируются в зараженной осповирусами клетке и *in vitro*

Несмотря на то, что мРНК осповирусов никогда не находятся в ядре клетки хозяина, после транскрипции все они содержат 5'-концевую кэп-структуру и поли(А)-последовательность на 3'-конце длиной в несколько сотен нуклеотидов, как обычные клеточные мРНК. Во время инициации транскрипции промежуточных и поздних генов, РНК-полимераза осповирусов узнает последовательность ТАААТ в промоторах геномной ДНК и добавляет в среднем около 30 адениловых нуклеотидов с 5'-конца синтезируемой мРНК. Механизм необычен: ДНК-зависимая РНК-полимераза в этом случае синтезирует часть цепи РНК *de novo*, независимо от последовательности нуклеотидов в матричной цепи. Весь геном осповакцины кодирует приблизительно 35 мРНК, 5'-нетранслируемые области которых содержат только поли(А)-последовательности, которые возникают котранскрипционно при помощи нематричного синтеза. Таким образом, поли(А)-последовательности могут рассматриваться как универсальные лидеры для осповирусных мРНК. В то же время, данных относительно возможных функций поли(А)-лидеров в составе мРНК осповирусов в литературных источниках не имеется.

Осповирусы подавляют синтез белка на клеточных мРНК с самого начала развития инфекции, но особенно сильно на поздних стадиях своего развития. Подавление трансляции клеточных мРНК происходит без их деградации на фоне интенсивного синтеза белков осповирусов. Было показано, что синтез белка на осповирусных мРНК менее чувствителен к добавлению в реакционную смесь универсального ингибитора трансляции – полирибоадениловой кислоты, по сравнению с трансляцией клеточных мРНК. Предположительно, одним из факторов, подавляющих синтез белка на мРНК клетки-хозяина, могут быть относительно короткие поли(А)-содержащие РНК, входящие в состав вириона и синтезируемые также при развитии вируса в клетке. При этом такие РНК селективно не ингибируют синтез белка на осповирусных мРНК. Существуют данные, свидетельствующие о том, что ингибирование белкового синтеза в клетке хозяина осуществляется осповирусами без уменьшения активности лимитирующих факторов инициации трансляции, в отличие от стратегии развития многих других вирусов. В составе осповирусных мРНК не известно наличие сайтов внутренней посадки рибосом (= Internal Ribosome Entry Site, IRES). Возникает противоречие: если мРНК осповирусов имеют такую же организацию, как и клеточные мРНК (содержат кэп-структуру и 3'-поли(А) последовательность), то каким образом происходит выборочное усиление трансляции вирусных мРНК и

подавление трансляции клеточных мРНК? Единственным возможным объяснением могло бы служить использование осповирусами альтернативного механизма инициации трансляции, отличного от кэп- и IRES-зависимых путей инициации. Тот факт, что в составе некоторых мРНК осповирусов 5'-нетранслируемые области при помощи специального механизма целиком замещены на поли(А)-последовательности, может свидетельствовать о вкладе лидерных поли(А)-последовательностей в обеспечение эффективной трансляции вирусных мРНК.

Чтобы проверить предположение о функции поли(А)-лидеров как элементов, повышающих эффективность трансляции мРНК, ранее в нашей лаборатории исследовали свойства таких мРНК в бесклеточных системах трансляции (А.Т. Gudkov *et al.*, *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, **91**:468-473). Были обнаружены следующие факты: (1) поли(А)-лидеры обеспечивают эффективную трансляцию некэпированных мРНК, (2) поли(А)-лидеры обеспечивают эффективную трансляцию мРНК при высокой ее концентрации в реакционной смеси и (3) эффективность трансляции на мРНК с поли(А)-лидером прямо зависит от длины 5'-поли(А) последовательности. Свойства усилителя трансляции в этом случае нельзя списать только на предполагаемую неструктурированную природу поли(А)-последовательностей: в таких же экспериментах мРНК с истинно неструктурированными 5'-последовательностями, такими как поли(У), не проявили трансляционных свойств, характерных для лидерных поли(А)-последовательностей. Поэтому нами было предпринято детальное исследование механизма инициации трансляции на мРНК с поли(А)-лидерами.

1.2 Поли(А)-лидеры обеспечивают эффективную инициацию трансляции мРНК без факторов инициации группы eIF4 и мультисубъединичного белка eIF3

Чтобы выяснить детали механизма инициации трансляции на мРНК с поли(А)-лидером, мы исследовали эффективность инициации трансляции на этой мРНК при разных наборах факторов инициации методом ингибирования удлинения праймера. В качестве контрольного объекта мы использовали природную кэпированную мРНК бета-глобина кролика.

В наших экспериментах рекомбинантная мРНК с поли(А)-лидером содержала GA₂₅C последовательность как 5'-нетранслируемую область, после которой следовало 592 нуклеотида кодирующей части люциферазы американского светлячка (*Photinus pyralis*). Общая длина исследуемой мРНК была близка к таковой у цитоплазматической мРНК бета-глобина кролика (589 нуклеотидов плюс 3'-поли(А)-последовательность переменной длины). Длина 5'-поли(А) участка в 25 нуклеотидов в составе рекомбинантной мРНК оказалась достаточной для проявления им свойств усилителя трансляции и примерно соответствует длинам 5'-поли(А)-последовательностей осповирусов. Необходимо отметить, что транскрибируемая при помощи T7 РНК-полимеразы

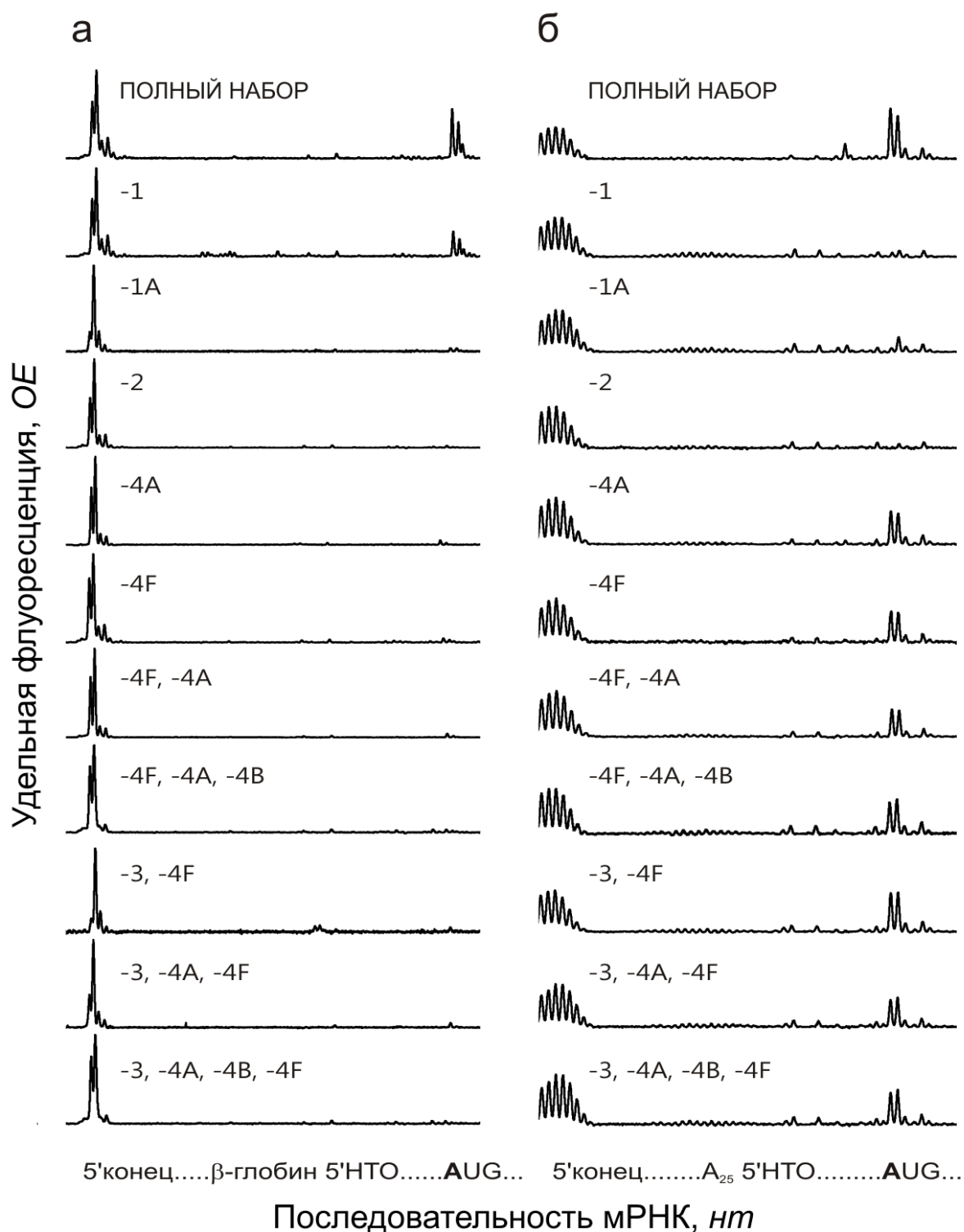


Рис. 1. Образование инициаторных 48S комплексов на природной экпированной мРНК белка бета-глобина кролика (**а**) и рекомбинантной некэпированной мРНК с поли(А)-лидером, кодирующей люциферазу (**б**), обнаруженное методом тупринтинга. Верхние графики показывают результат, полученный, когда в реакционных смесях присутствовал полный набор факторов инициации трансляции: eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3, eIF4A, eIF4B и eIF4F. Ниже расположенные графики – результаты, когда один или несколько факторов инициации трансляции не были добавлены в реакционные смеси. Показанные графики нормированы по общей флуоресценции каждого из образцов и выровнены с последовательностями соответствующих мРНК (показаны внизу графиков).

рекомбинантная мРНК с поли(А)-лидером имела гетерогенную длину, проистекающую из эффекта «проскальзывания» РНК-полимеразы на гомополимерных последовательностях. Обнаруженная микрогетерогенность мРНК с поли(А)-лидером не влияла на результаты, получаемые при реакции ингибирования удлинения праймера.

48S инициаторный комплекс собирался на кэпированной мРНК бета-глобина в присутствии полного набора факторов инициации (eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3, eIF4A, eIF4B, eIF4F) на правильном стартовом кодоне с высоким выходом (Рис. 1, а). Примерно 30% мРНК образовывали инициаторные комплексы в использованных условиях реакционной смеси (Табл. 1). Как можно было ожидать, исключение любого из перечисленных факторов, кроме фактора инициации eIF1, приводило к практически полному блокированию инициации трансляции на бета-глобиновой мРНК. Без eIF1 выход 48S комплекса уменьшался приблизительно вдвое, и появлялись дополнительные сигналы остановки обратной транскриптазы в неспецифической зоне 5'-нетранслируемой области бета-глобиновой мРНК. Эти данные в целом хорошо соответствуют данным, полученным ранее для кэпированной бета-глобиновой мРНК в других группах.

Табл. 1. Удельный выход инициаторных 48S комплексов (в процентах от всей мРНК), собранных на природной кэпированной мРНК белка бета-глобина кролика (мРНК бета-глобина) и рекомбинантной некэпированной мРНК с поли(А)-лидером (A₂₅-Luc мРНК), кодирующей люциферазу. Полный набор факторов инициации трансляции включал белки eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3, eIF4A, eIF4B и eIF4F (отмечен как «Все»). «Н/Д» – нет данных.

Набор факторов инициации трансляции, eIF	Зоны электрофореграмм реакции тупринтинга					
	мРНК бета-глобина			A ₂₅ -Luc мРНК		
	5' конец	Неспецифическая	AUG	5' конец	Неспецифическая	AUG
Все	65 ±3	5 ±1	30 ±3	64 ±4	6 ±3	30 ±4
-1	66 ±3	16 ±3	18 ±3	91 ±3	5 ±3	4 ±5
-1A	93 ±2	2 ±2	5 ±2	90 ±4	4 ±2	6 ±3
-1, -1A	87 ±2	5 ±2	6 ±3	93 ±3	4 ±3	3 ±2
-2	92 ±3	5 ±2	3 ±2	95 ±2	3 ±2	2 ±1
-4A	92 ±3	4 ±2	4 ±2	77 ±5	3 ±3	20 ±6
-4F	92 ±2	4 ±3	4 ±2	77 ±5	4 ±2	19 ±5
-4A, -4F	93 ±2	4 ±2	3 ±2	78 ±4	3 ±2	19 ±5
-4A, -4B, -4F	92 ±3	4 ±2	4 ±2	81 ±3	3 ±1	16 ±5
-3, -4F	93 ±2	4 ±2	3 ±2	80 ±3	3 ±2	17 ±4
-3, -4A, -4F	93 ±2	3 ±2	4 ±2	80 ±3	2 ±2	18 ±6
-3, -4A, -4B, -4F	94 ±2	3 ±3	3 ±2	80 ±4	3 ±1	17 ±5
Все, +PABP	Н/Д	Н/Д	Н/Д	68 ±3	4 ±2	28 ±2
-4F, +PABP	Н/Д	Н/Д	Н/Д	81 ±2	2 ±2	17 ±3

Иную зависимость от факторов инициации демонстрирует мРНК с некэпированным поли(А)-лидером (Рис. 1, б). В этом случае только фактор инициации eIF2 и факторы eIF1 и eIF1A оказались строго необходимыми для инициации трансляции. Факторы инициации eIF4A, eIF4B, eIF4F и самый большой белок инициации трансляции eIF3 оказались не обязательными для образования 48S инициаторного комплекса на этой мРНК. В отсутствие любого из перечисленных факторов, и даже в отсутствие сразу всех этих факторов (eIF3, eIF4A, eIF4B, eIF4F), эффективность сборки 48S комплекса на мРНК с поли(А)-лидером составляла более 55% от контрольных экспериментов с полным набором факторов инициации в реакционной смеси (Табл. 1).

Слабая зависимость инициации трансляции на мРНК с поли(А)-лидером от факторов АТФ-зависимого сканирования предполагает, что рибосомная субъединица связывается с поли(А)-последовательностью в случайных местах, и последующий поиск стартового кодона происходит за счет ненаправленной, энергонезависимой одномерной диффузии 40S субъединицы вдоль цепи лидера. Это также подтверждается данными, полученными в нашей лаборатории ранее: увеличение длины поли(А)-лидера с 5 до 25 адениловых остатков увеличивало эффективность трансляции мРНК с таким лидером. Увеличение вероятности инициации на мРНК может быть пропорционально увеличению длины лидерной последовательности только в случае связывания 40S субъединицы в случайных местах лидера. Некоторое уменьшение выхода 48S комплекса в отсутствие факторов сканирования свидетельствует о том, что АТФ-зависимое сканирование может происходить на мРНК с поли(А)-лидером, дополнительно улучшая (убыстряя) нахождение инициаторного кодона.

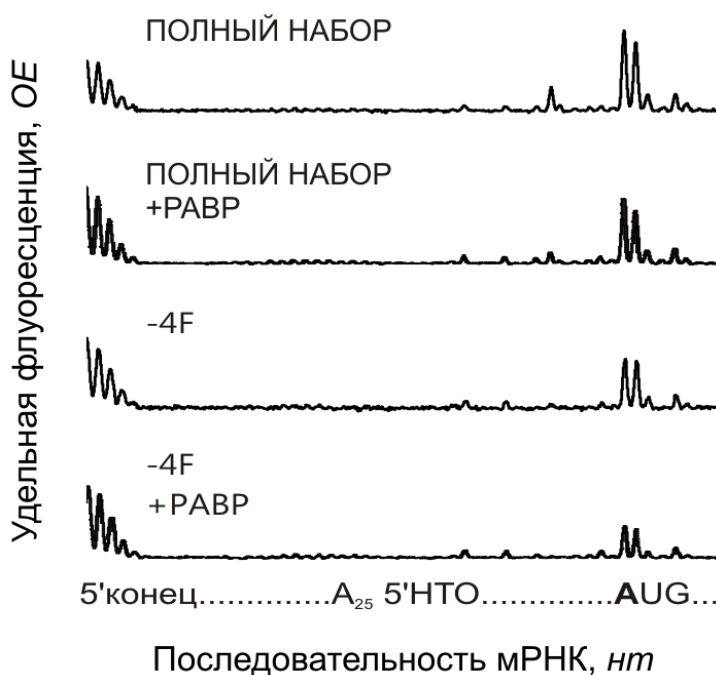


Рис. 2. Влияние поли(А)-связывающего белка (РАВР) на эффективность образования инициаторных 48S комплексов на рекомбинантной некэпированной мРНК с поли(А)-лидером, кодирующей люциферазу. Верхние два графика показывают результат, полученный, когда в реакционных смесях присутствовал полный набор факторов инициации трансляции: eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3, eIF4A, eIF4B и eIF4F. Нижние два графика – результаты, когда в реакционные смеси не был добавлен eIF4F. Добавление поли(А)-связывающего белка в реакционные смеси указано на графиках (+РАВР). Графики нормированы по общей

флуоресценции каждого из образцов и выровнены с последовательностью A₂₅-Luc мРНК (показана внизу графиков).

Таким образом, в основе эффективной трансляции мРНК с поли(А)-лидерами лежит особый механизм инициации трансляции на этой последовательности, а не комбинация ранее известных взаимодействий мРНК и белков. Очевидная идея о стимуляции трансляции мРНК поли(А)-лидерами посредством их кэп-независимого взаимодействия с eIF4F (или только eIF4G) через поли(А)-связывающий белок не подтверждается нашими экспериментами, где эффективная инициация трансляции происходила на некэпированных поли(А)-лидерах без поли(А)-связывающего белка (= Poly(A)-Binding Protein, PABP) в реакционной смеси. Добавление избытка PABP (20 молекул PABP на 1 молекулу мРНК) в аналогичных условиях реакции не приводило к стимуляции формирования 48S инициаторных комплексов как в присутствии eIF4F, так и без него (Рис. 2); наоборот, имело место некоторое ингибирование инициации, что может быть следствием РНК-связывающих свойств PABP.

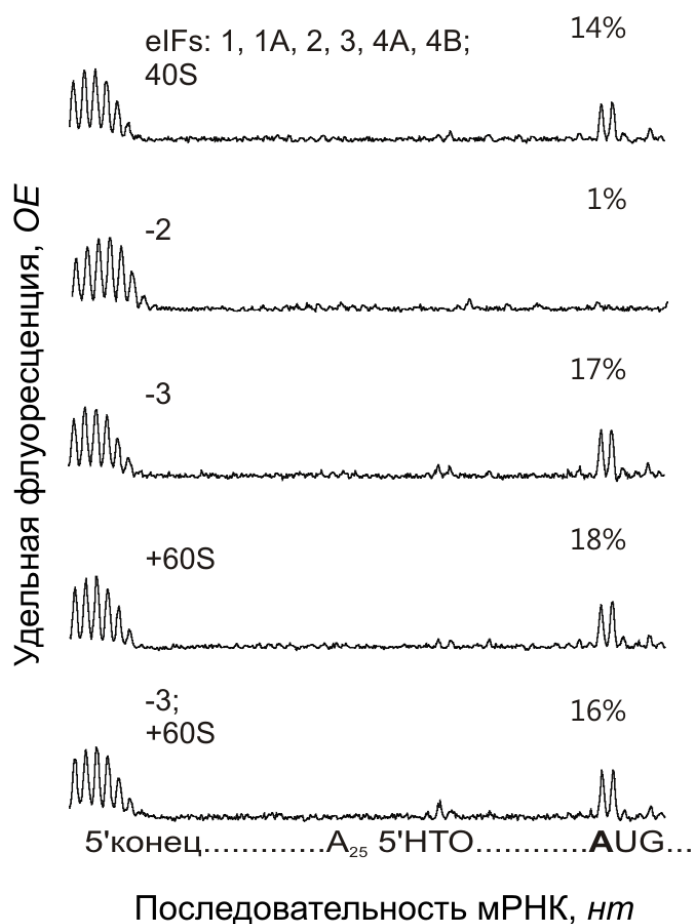


Рис. 3. Влияние 60S рибосомных субъединиц на эффективность образования инициаторных 48S комплексов на рекомбинантной некэпированной мРНК с поли(А)-лидером, кодирующей люциферазу, в присутствии и без eIF3. Базовый набор инициаторных факторов и субъединиц, использованный в реакционных смесях, указан на верхнем графике. На нижних графиках показаны результаты, когда факторы инициации трансляции и субъединицы рибосом были дополнительно введены в состав (+) или исключены из состава (-) реакционной смеси относительно базового набора факторов. Графики нормированы по общей флуоресценции каждого из образцов и выровнены с последовательностью A₂₅-Luc мРНК. Цифрами над зоной комплекса указан удельный выход 48S инициаторных комплексов относительно количества мРНК в долях из ста.

Особо следует отметить обнаруженную возможность инициации трансляции на мРНК с поли(А)-лидером без фактора инициации eIF3: таких свойств не было обнаружено у других стимулирующих трансляцию лидерных последовательностей, не содержащих сайтов внутренней посадки рибосом. Этот результат свидетельствует о том, что мРНК с поли(А)-лидерами используют механизм инициации трансляции, не характерный для других гомо- и гетеронуклеотидных последовательностей. С другой стороны, в этом

случае одной из функций белка eIF3 может быть обеспечение эффективной инициации трансляции на обычных гетеронуклеотидных последовательностях. Одной из возможных функций eIF3 также может быть предотвращение неспецифического объединения рибосомных субъединиц. Мы проверили влияние очищенных 60S рибосомных субъединиц на эффективность формирования 48S комплексов в экспериментах, где eIF3 был исключен из реакционной смеси (Рис. 3). 40S и 60S субъединицы в этих экспериментах находились в реакционной смеси вместе с самого начала эксперимента. Эффективность сборки 48S комплексов на мРНК с поли(А)-лидерами в таких условиях не отличалась от экспериментов, где eIF3 был добавлен в реакционную смесь. Таким образом, инициация трансляции на поли(А)-лидерах без белка eIF3 может осуществляться в условиях, похожих на физиологические. Так же, как и независимость поли(А)-лидеров от белков сканирования (eIF4A, eIF4B, eIF4F), eIF3-независимая инициация на поли(А)-последовательностях может быть основой трансляционных преимуществ мРНК осповирусов.

1.3 мРНК с поли(А)-лидерами обладают конкурентным преимуществом в трансляции по сравнению с обычными клеточными мРНК

Чтобы проверить возможные конкурентные преимущества мРНК с поли(А)-лидером над типичной клеточной мРНК в трансляции, мы воспользовались свойствами усовершенствованного метода тупринтинга. Тупринтинг с использованием флуоресцентной метки и капиллярного электрофореза позволяет различать и независимо анализировать сигналы от нескольких мРНК, одновременно находящихся в реакционной смеси. Используя такой подход, мы исследовали эффективность сборки 48S комплексов в эквимольной смеси некэпированной мРНК с поли(А)-лидером и природной бета-глобиновой мРНК. Указанные мРНК были одновременно добавлены в количестве 15 нМ каждая в реакционные смеси, содержавшие разные наборы факторов инициации.

В присутствии всех факторов инициации 48S комплекс собирался на стартовом AUG кодоне на обеих мРНК (Рис. 4). В контрольном эксперименте без фактора инициации eIF2 сигналы, соответствующие образованию 48S комплекса, отсутствовали в обоих случаях. Исключение из реакционной смеси РНК-хеликазы eIF4A полностью блокировало инициацию трансляции на бета-глобиновой мРНК, как и в случае без конкурирующей мРНК. Такой же эффект ингибирования сборки 48S комплекса на бета-глобиновой мРНК наблюдался, если в реакционную смесь не были добавлены факторы инициации eIF4F или eIF3 и их комбинации. В то же время, в реакционных смесях, собранных без факторов инициации eIF4A, eIF4F, eIF4A и eIF4F, а также eIF3 и eIF4F, формирование инициаторных комплексов на мРНК с поли(А)-лидером происходило с высокой эффективностью в присутствии конкурирующей клеточной мРНК. Во всех исследованных нами условиях реакции, выход 48S

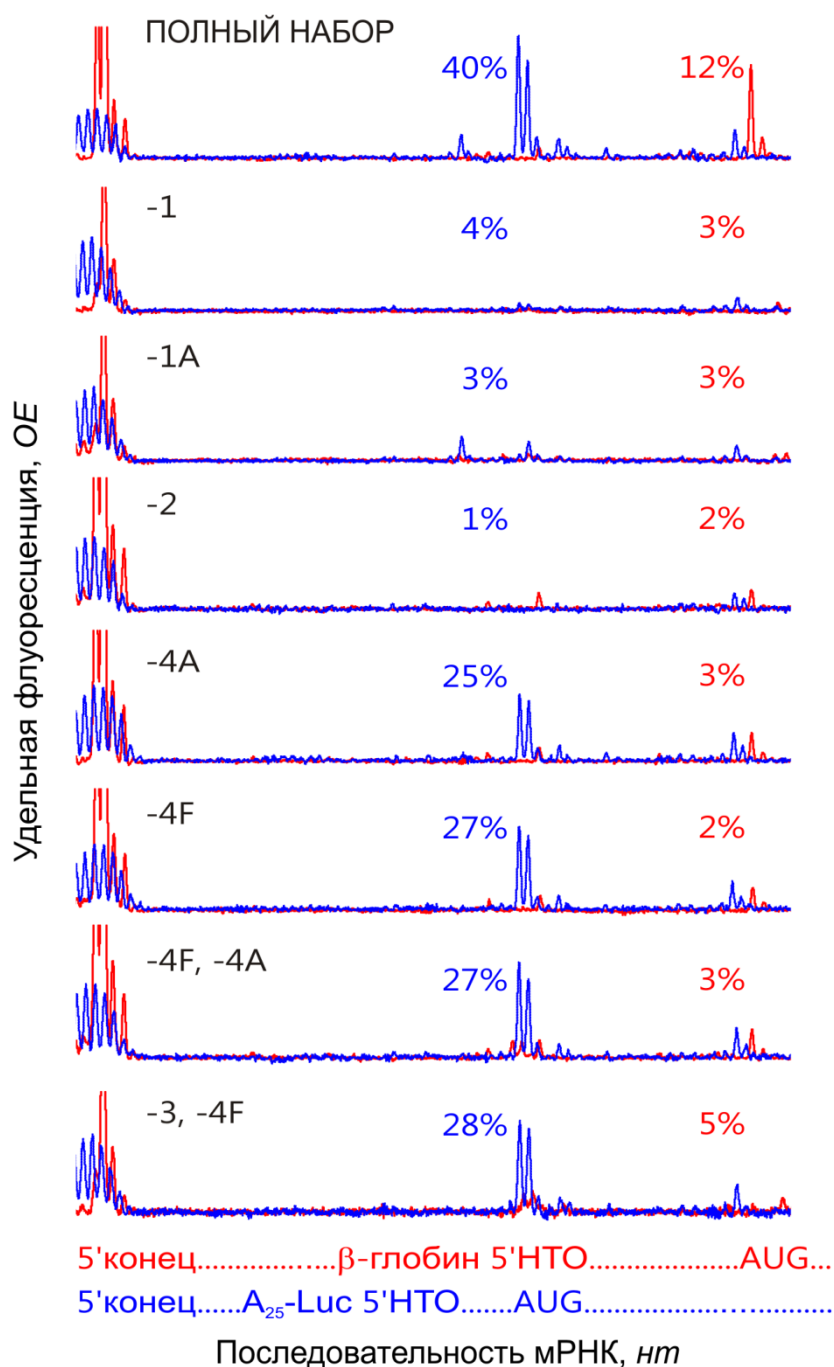


Рис. 4. Образование инициаторных 48S комплексов в эквимольной смеси природной кэпированной мРНК белка бета-глобина кролика (красные линии) и рекомбинантной некэпированной мРНК с поли(А)-лидером. Верхние графики показывают результат, полученный когда в реакционных смесях присутствовал полный набор факторов инициации трансляции: eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3, eIF4A, eIF4B и eIF4F. Ниже расположенные графики – результаты, когда один или несколько факторов инициации трансляции не были добавлены в реакционные смеси. Показанные графики нормированы по общей флуоресценции каждого из образцов и выровнены с последовательностями соответствующих мРНК (показаны внизу графиков). Цифрами над зоной комплекса указан удельный выход 48S инициаторных комплексов относительно каждой из мРНК в долях из ста.

инициаторных комплексов на мРНК с поли(А)-лидером был близок к выходу 48S комплексов на этой мРНК, обнаруженному в экспериментах без добавления конкурирующей мРНК (Рис. 4 и Табл. 1). Зависимость эффективности сборки 48S комплексов на мРНК с поли(А)-лидером от набора факторов инициации также была практически одинаковой в реакциях с и без добавления конкурирующей РНК.

Неожиданным результатом является то, что в случае бета-глобиновой мРНК, выход 48S инициаторных комплексов был существенно ниже во всех экспериментах, где конкурирующая мРНК с поли(А)-лидером была добавлена в реакционную смесь. В присутствии полного набора факторов инициации трансляции, эффективность инициации снизилась более чем в 2 раза для бета-глобиновой мРНК после добавления конкурента. Без фактора инициации eIF1,

но в присутствии eIF1A, eIF2, eIF4A, eIF4B, eIF3 и eIF4F, сборка инициаторных комплексов на бета-глобиновой мРНК была полностью заблокирована, когда в реакции находилось эквимольное количество мРНК с поли(А)-лидером.

Обнаруженное нами ингибирование образования 48S комплексов на природной бета-глобиновой мРНК при добавлении мРНК с поли(А)-лидером является свидетельством прямого конкурентного подавления синтеза белка на типичной клеточной мРНК. В реакционных смесях, одновременно содержащих бета-глобиновую мРНК и мРНК с поли(А)-лидером, отсутствовал поли(А)-связывающий белок или другие белки, кроме факторов инициации трансляции. Следовательно, мРНК с поли(А)-лидером непосредственно является агентом, вызывающим ингибирование синтеза белка на кэпированной клеточной мРНК.

По всей видимости, в основе конкурентных преимуществ мРНК с поли(А)-лидерами во время трансляции лежит упрощенный механизм инициации на таких мРНК. С одной стороны, для формирования 48S инициаторного комплекса на этих мРНК требуется минимальный набор факторов инициации: eIF1, eIF1A и eIF2. С другой стороны, эффективность инициации на таких мРНК практически не уменьшается при использовании только этого минимального набора факторов инициации. Кроме того, мРНК с поли(А)-лидерами могут участвовать в подавлении синтеза белка на других мРНК, инициация трансляции на которых происходит по каноническому кэп-зависимому пути. Благодаря непосредственному взаимодействию с 40S субъединицей рибосом мРНК с поли(А)-лидерами, вероятно, могут начинать трансляцию быстрее и затем связывать белковые факторы, необходимые для инициации трансляции на других мРНК.

1.4 Фактор инициации трансляции eIF3 не требуется для процесса объединения субъединиц рибосом во время инициации трансляции на мРНК с поли(А)-лидерами

Феномен образования 48S комплекса на мРНК с поли(А)-лидерами без фактора инициации eIF3 может быть использован для прояснения функций eIF3 в инициации трансляции. После образования 48S комплекса на инициаторном кодоне, следующим этапом процесса инициации является присоединение 60S рибосомных субъединиц, которое обеспечивают факторы инициации eIF5 и eIF5B, и формирование 80S рибосомы на стартовом кодоне мРНК. Способен ли 48S комплекс, сформированный без фактора инициации eIF3, к присоединению 60S рибосомных субъединиц? Этот вопрос особенно важен, так как eIF3 является фактором инициации с наименее ясно установленными функциями. Чтобы ответить на этот вопрос, мы собирали 48S инициаторные комплексы в присутствии и без eIF3. После сборки 48S комплексов, мы добавляли в реакционную смесь компоненты, необходимые для объединения рибосомных субъединиц – белки eIF5 и eIF5B – а также чистые 60S субъединицы рибосом. Эффективность формирования и выход 80S инициаторного комплекса на мРНК

с поли(А)-лидером были идентичными для реакций с участием или без eIF3 (Рис. 5). Таким образом, 48S комплекс, в состав которого не входит eIF3, является компетентным к присоединению 60S рибосомных субъединиц. Следовательно, белок eIF3 не принимает участия в процессе объединения рибосомных субъединиц и не нужен для формирования 80S рибосомы и

завершения инициации на мРНК с поли(А)-лидером.

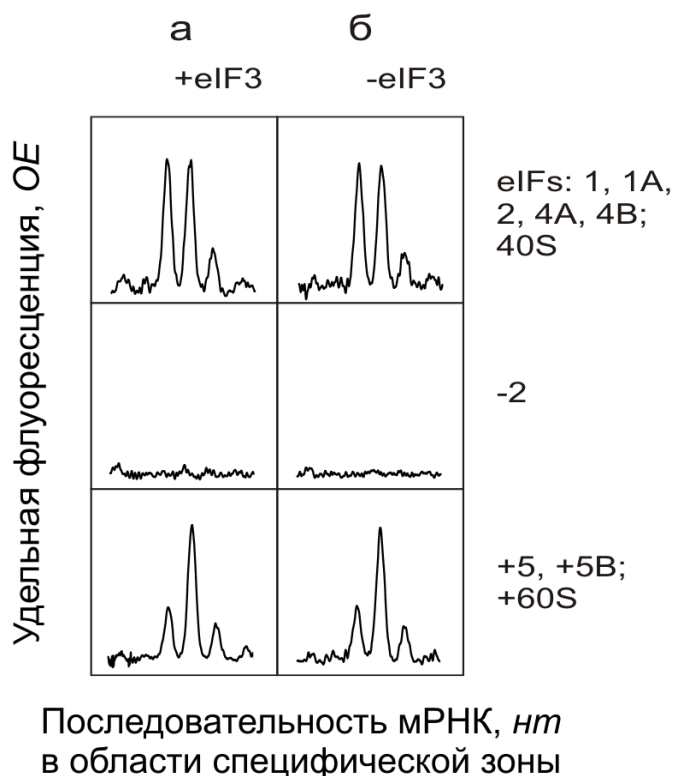


Рис. 5. Формирование инициаторных 80S комплексов из исходных 48S комплексов, собранных на неэкспонированной мРНК с A₂₅-лидером в присутствии (а) и без (б) фактора инициации eIF3. Вверху: образование 48S комплекса в присутствии факторов инициации eIF1, eIF1A, eIF2, eIF4A и eIF4B. В середине: контрольная реакция с теми же факторами инициации, что и на верхнем графике, но без eIF2. Внизу: результат добавления eIF5, eIF5B и 60S субъединиц рибосом к 48S комплексам, собранным, как это указано на верхних графиках. Показаны нормированные графики только в комплекс-специфической зоне электрофореграмм.

1.5 Предполагаемая модель механизма инициации трансляции на мРНК с поли(А)-лидерами

В случае мРНК с поли(А)-лидером достижение инициаторного кодона возможно без направленного сканирования, так как факторы eIF4A/B/F не влияли на эффективность инициации трансляции на этой мРНК. В то же время, эффективность поли(А)-лидера как усилителя трансляции зависела от длины этой последовательности: A₂₅ способствовала более эффективной трансляции, чем A₁₂, и еще большей, чем A₅. Этот факт подразумевает связывание иницирующей 40S субъединицы рибосом во внутренних областях лидерной поли(А)-последовательности. После внутреннего связывания с поли(А)-лидером мРНК, иницирующие рибосомные субъединицы могут производить энергонезависимое диффузионное движение вдоль цепи 5'-нетранслируемой области РНК, как следует из отсутствия потребности в eIF4A/F. Иницирующая рибосома фиксируется на стартовом кодоне по достижению его в результате одномерной диффузии вдоль поли(А)-последовательности, после чего инициация трансляции завершается так же, как в общем случае. Механизм инициации трансляции такого рода был ранее постулирован для объяснения процесса поиска инициаторного кодона между открытыми рамками считывания полицистронных мРНК у прокариот, и для его описания был предложен термин

«бесфазное блуждание» рибосомы по цепи мРНК. Впоследствии этот механизм был подтвержден с использованием прямых экспериментальных данных. Мы предполагаем, что такой же принцип «бесфазного блуждания» по цепи мРНК является основой механизма инициации трансляции на мРНК с поли(А)-лидерами.

Уникальные трансляционные свойства поли(А)-лидеров мРНК могут быть объяснены их структурными особенностями. В отличие от поли(У), поли(А) не может рассматриваться исключительно как пространственно неупорядоченный полимер. В условиях физиологических температур и нейтральных значений pH, поли(А)-РНК имеет тенденцию к образованию регулярной одноцепочечной спирали. Взаимодействие с белками и/или рибосомами может дополнительно стабилизировать эту структуру. Вероятно, одноцепочечная спираль, образуемая поли(А)-РНК, обладает специфическим сродством к мРНК-связывающему участку 40S субъединицы рибосом. Известно, что в случае прокариотической инициации трансляции 30S субъединица рибосом также вызывает формирование одноцепочечной спирали А-формы в 5'-части связываемой мРНК (G.L. Yusupova *et al.*, *Nature*, 2006, **444**:391-394). Возможно, что в случае гетеронуклеотидных лидерных последовательностей фактор инициации eIF3 необходим для обеспечения увеличенного сродства мРНК к 40S рибосомной субъединице или же приданию мРНК конформации одноцепочечной спирали. В рамках такого механизма действия, eIF3 мог бы служить функциональным аналогом последовательности анти-Шайн-Дальгарно, которая участвует в спирализации части связываемой рибосомой мРНК у прокариот.

Часть 2. Инициация трансляции на мРНК с омега-лидером – 5'-нетранслируемой областью РНК вируса табачной мозаики (ВТМ)

2.1 Особенности омега-лидера: необычная последовательность нуклеотидов и эффективная кэп-независимая инициация трансляции

Поскольку частица ВТМ не содержит никаких других компонентов, кроме геномной РНК и белка оболочки, весь репликационный цикл ВТМ зависит от успешности первого раунда прочтения геномной РНК рибосомами. За эффективность этого процесса отвечает 5'-нетранслируемая область РНК ВТМ, также называемая омега-последовательностью РНК. По-видимому, омега-последовательность РНК обеспечивает быстрое отсоединение белков оболочки и присоединение рибосом к РНК вириона ВТМ. Только после этого становится возможным дальнейшее котрансляционное освобождение РНК ВТМ от белка оболочки.

Нуклеотидная последовательность омега-лидера РНК ВТМ штамма U1 приведена на Рис. 6. Последовательность обладает необычной первичной структурой. Во-первых, омега-лидер практически полностью лишен остатков гуаниловых нуклеотидов (G). Во-вторых, более трети омега-последовательности составляет ее центральная часть, состоящая только из

адениловых и цитидиловых остатков. В-третьих, адениловые и цитидиловые остатки центральной части, а также адениловые и цитидиловые остатки примыкающих 5'- и 3'-проксимальных частей омега-последовательности, в основном сгруппированы в триплеты САА. В целом характер нуклеотидной последовательности омега-лидера указывает на невозможность образования собственной стабильной вторичной структуры за счет канонического уотсон-криковского спаривания нуклеотидов по типу G:C и A:U. Это обстоятельство долгое время служило доводом в пользу предположения, что именно «неструктурированность» омега-лидера обеспечивает ему легкую доступность для рибосом и, следовательно, свойства усилителя трансляции.

Из-за своей возможной физиологической функции, омега-последовательность ВТМ с самого начала привлекала внимание исследователей как потенциальный эффективный лидер для различных мРНК. Действительно, как было показано, в рекомбинантных конструкциях лидерная омега-последовательность усиливает трансляцию чужеродных РНК как *in vivo*, так и *in vitro* (в бесклеточных системах) и обеспечивает эффективную кэп-независимую инициацию трансляции. Омега-лидер может быть усилителем трансляции в разных типах клеток, как растительных, так и животных, и в разных бесклеточных системах трансляции, в том числе полученных из клеток бактерий. Механизм работы омега-лидера как усилителя трансляции не был выяснен.



Рис. 6. 5'-концевая последовательность рекомбинантной РНК, содержащая 67 нуклеотидов омега-последовательности ВТМ штамма U1. Жирным черным шрифтом выделена омега-последовательность ВТМ штамма U1. Подчеркнут и выделен жирным шрифтом стартовый кодон AUG открытой рамки считывания мРНК люциферазы.

2.2 Омега-лидер обеспечивает эффективную инициацию трансляции без факторов инициации eIF4F и eIF4A

Чтобы выяснить возможный механизм усиления трансляции мРНК лидерной омега-последовательностью, мы изучили эффективность сборки 48S комплекса на рекомбинантной мРНК с омега-лидером в зависимости от набора факторов инициации в системе инициации трансляции, собранной из очищенных компонентов. Для оценки эффективности сборки 48S комплекса мы использовали метод тупринтинга. Некэпированная рекомбинантная мРНК в качестве 5'-нетранслируемой области содержала омега-последовательность ВТМ штамма U1 без первого гуанилового остатка, которая была фланкирована десятинуклеотидными последовательностями (Рис. 6). После стартового AUG кодона следовали 589 нуклеотидов кодирующей части мРНК люциферазы.

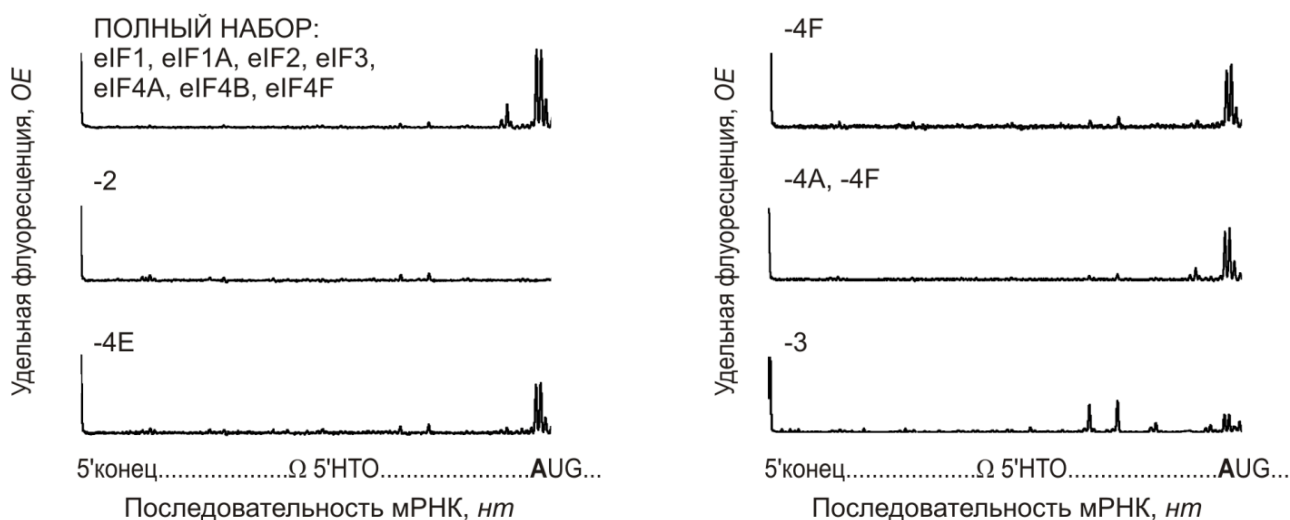


Рис. 7. Образование инициаторного 48S комплекса на неэпированной рекомбинантной мРНК с лидерной омега-последовательностью в системе инициации трансляции из очищенных компонентов. Показаны нормированные электрофореграммы реакций тупринтинга. Верхний левый график демонстрирует результаты, полученные при использовании полного набора факторов инициации трансляции (eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3, eIF4A, eIF4B и eIF4F) в реакционной смеси. Остальные графики показывают результат исключения одного или нескольких факторов инициации трансляции. На графиках отложена удельная флуоресценция продуктов обратной транскрипции против последовательности мРНК от 5'- к 3'-концу. Суммарная флуоресценция трех основных тупринтных пиков в области AUG кодона отражает эффективность образования 48S комплекса.

Так же, как и в случае мРНК, содержащей поли(А)-лидер, и бета-глобиновой мРНК, в присутствии полного набора факторов инициации (eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3, eIF4A, eIF4B, eIF4F) 48S инициаторный комплекс собирался на мРНК с омега-лидером на правильном стартовом кодоне с высоким выходом (Рис. 7). В контрольной реакции без фактора инициации eIF2 сборки 48S комплекса не было. В то же время, инициаторный 48S комплекс эффективно собирался на мРНК с омега-лидером без факторов АТФ-зависимого сканирования – белков eIF4F и eIF4A (Рис. 7). Без фактора инициации eIF3 эффективность образования 48S комплекса на мРНК с омега-лидером в использованных нами условиях реакции была пренебрежимо малой, что подтверждает уникальную способность поли(А)-лидера к eIF3-независимой инициации трансляции.

Практически полная независимость эффективности инициации трансляции от основных факторов АТФ-зависимого сканирования, которую демонстрирует омега-лидер, свидетельствует о неканоническом механизме инициации трансляции на этой последовательности. Возможно, что так же, как и в случае поли(А)-лидера мРНК, имеет место непосредственная посадка иницирующей рибосомы в неспецифическом месте омега-лидера, после чего происходит энергонезависимая одномерная диффузия иницирующей 40S субъединицы вдоль цепи этой РНК.

2.3 Омега-РНК обладает стабильной компактной структурой в растворе

Для того чтобы определить, обладает ли РНК с омега-последовательностью какими-либо структурными особенностями, которые могли бы служить объяснением феномена усиления трансляции ею, мы исследовали физические свойства этой РНК в растворе. Синтетические РНК, содержащие омега-последовательность РНК ВТМ штамма U1, а также полирибонуклеотид с $(\text{CAA})_{19}$ последовательностью, были получены нами при помощи транскрипции соответствующих ДНК РНК-полимеразой из фага Т7. Высокмолекулярный статистический сополимер $(\text{C}_n, \text{A}_{2n})$, полученный с помощью полирибонуклеотид-нуклеотидилтрансферазы, был частично гидролизован в щелочных условиях, и образовавшиеся фрагменты с длинами 50 ± 10 нт, 80 ± 10 нт, 85 ± 10 нт и 110 ± 10 нт были получены препаративной очисткой из денатурирующего полиакриламидного геля после электрофоретического разделения.

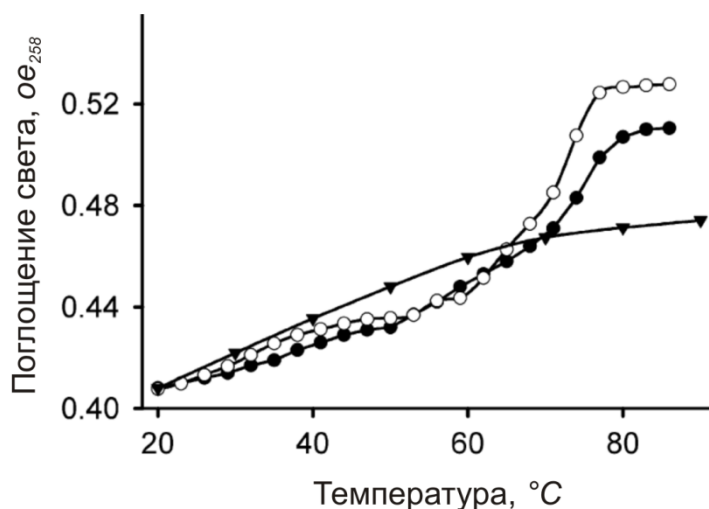


Рис. 8. Тепловое плавление 87 нт РНК с омега-последовательностью (○, незаполненные круги), 71 нт РНК с $(\text{CAA})_{19}$ -последовательностью (●, заполненные круги) и 80 ± 10 нт $(\text{C}_n, \text{A}_{2n})$ -сополимера (▼, заполненные треугольники). Условия плавления: водный буфер, содержащий 10 мМ какодилат натрия с рН 7,5, 100 мМ хлорид натрия и 0,5 мМ ЭДТА.

Мы исследовали тепловое разворачивание (плавление) указанных РНК в буфере, содержащем 10 мМ какодилат натрия с рН 7,5, 100 мМ хлорид натрия и 0,5 мМ ЭДТА. Статистический $(\text{C}_n, \text{A}_{2n})$ -сополимер обладал довольно низким гипохромизмом. Плавление $(\text{C}_n, \text{A}_{2n})$ -сополимера не сопровождалось кооперативными изменениями его структуры (Рис. 8). В отличие от $(\text{C}_n, \text{A}_{2n})$ -сополимера, как РНК с регулярной $(\text{CAA})_{19}$ -последовательностью, так и омега-РНК проявили значительный гипохромизм и кооперативный структурный переход при достаточной высокой температуре: более 60°C (Рис. 8). Кривые плавления омега-РНК и РНК с регулярной $(\text{CAA})_{19}$ -последовательностью напоминают кривые плавления тРНК — макромолекулы с хорошо развитой вторичной и третичной структурами.

Так как тепловое плавление РНК с $(\text{CAA})_{19}$ -последовательностью и омега-РНК показало наличие пространственной структуры в этих РНК, мы оценили компактность укладки этих структур с помощью аналитического ультрацентрифугирования. Мы сравнили коэффициент седиментации всех исследуемых РНК с таковым, полученным для известной компактно свернутой

молекулы РНК – фенилаланиновой тРНК дрожжей длиной 76 нт – в одних и тех же условиях: водном растворе, содержащем 20 мМ Трис-ацетат с рН 7,5, 100 мМ хлорид калия и 0,1 мМ ЭДТА. Все исследованные РНК обнаружили гомогенное распределение при седиментации (симметричные пики распределения), без появления денатурированных форм молекул или абсорбции света вне основных пиков поглощения. Расчетные коэффициенты седиментации составили: 2,2 ед. Сведберга для (C_n, A_{2n}) -сополимера, 3,5 ед. Сведберга для РНК с регулярной $(CAA)_{19}$ -последовательностью, 4,0 ед. Сведберга для $tRNA^{Phe}$ и 4,4 ед. Сведберга для омега-РНК.

Мы совместили полученные нами коэффициенты седиментации исследованных РНК, а также (C_n, A_{2n}) -сополимеров длиной 50 ± 10 нт, 85 ± 10 нт и 110 ± 10 нт, с уже известными данными о седиментации других РНК, структура которых хорошо охарактеризована, на графике зависимости коэффициента седиментации молекулы РНК от логарифма ее молекулярной массы (Рис. 9). Молекулы РНК статистических сополимеров (C_n, A_{2n}) всех длин оказались ближе всего к прямой, соответствующей развернутым цепям РНК. Все остальные РНК, исследованные нами, включая омега-РНК и РНК с регулярной $(CAA)_{19}$ -последовательностью, расположились вблизи прямой, характеризующей компактно свернутые молекулы РНК. При этом степень компактности омега-РНК оказалась не меньшей, чем у тРНК – молекулы, почти все мономерные звенья которой задействованы в образовании вторичных или третичных взаимодействий.

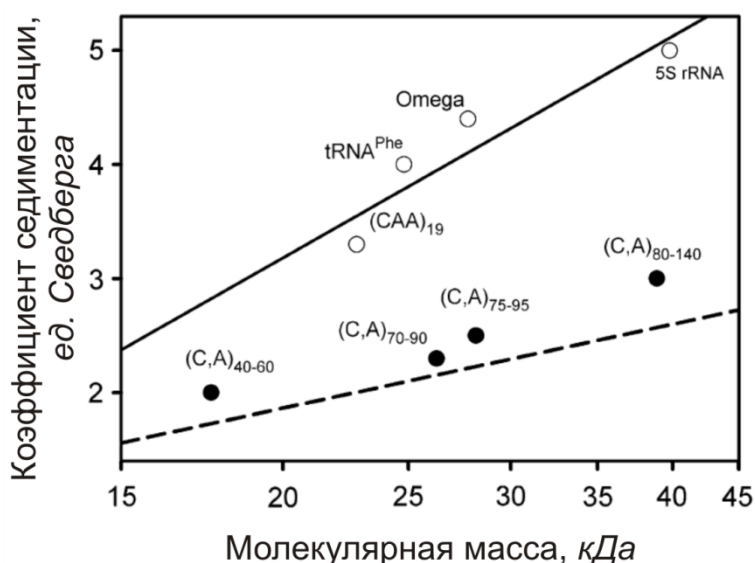


Рис. 9. Зависимость коэффициента седиментации молекул РНК в водных растворах от логарифма их молекулярной массы. Теоретическая прямая распределения полностью развернутых цепей РНК показана штриховой линией. Теоретическая прямая распределения компактно уложенных молекул РНК показана сплошной линией.

Мы также провели исследование спектров ядерного магнитного резонанса

протонов омега-РНК в водном растворе, содержавшем 10 мМ ортофосфат натрия рН 7,5, 100 мМ хлорид натрия, 0,2 мМ дейтерий-замещенный ЭДТА и 10 % дейтериевой воды, при разных температурах раствора. Во всем исследованном диапазоне температур (от 6 °С до 35 °С) обнаружилось не менее 19 различаемых сигналов от протонов, находящихся в составе имино-групп (Рис. 10). Так как в последовательности исследуемой РНК содержалось всего 5 гуаниловых остатков нуклеотидов, как минимум 14 сигналов резонанса имино-протонов должны происходить от уридиловых остатков, формирующих

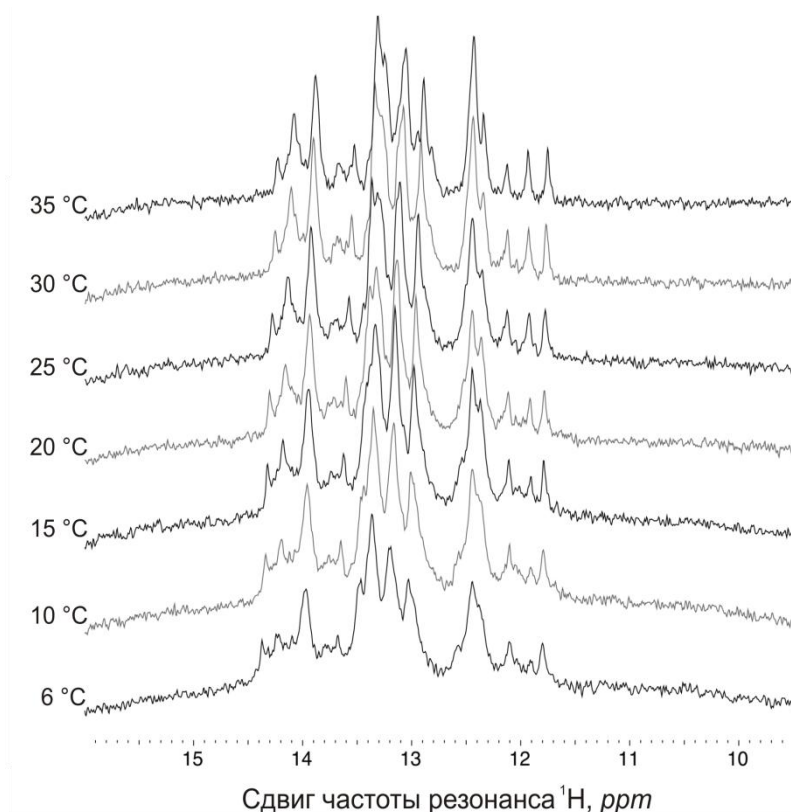


Рис. 10. Одномерные спектры резонанса протонов омега-РНК в области, соответствующей резонансам протонов в составе имино-групп, при разных температурах раствора (указаны слева от графиков). Условия записи спектра: водный раствор, содержащий 10 мМ ортофосфат натрия рН 7,5, 100 мМ хлорид натрия, 0,2 мМ дейтерий-замещенный ЭДТА и 10 % дейтериевой воды.

стабильные водородные связи по типу взаимодействия оснований Уотсона и Крика или Хугстена. Всего омега-РНК содержала 19 уридилых остатков. Мы сравнили

двумерные спектры резонанса протонов омега-РНК (второе направление разделения по величине ядерного эффекта Оверхаузера) с двумерными спектрами резонанса протонов другой высокоструктурированной РНК – TAR (Trans Activation Responsive = малая РНК, ответственная за транс-активацию) из вируса иммунодефицита человека 2. Известно, что TAR РНК образует развитую третичную структуру, в основе которой лежат взаимодействия нуклеотидов по типу Уотсона и Крика. Частоты резонанса протонов в составе омега-РНК формируют совершенно иную зависимость, чем таковые у TAR РНК вируса иммунодефицита человека 2 (Рис. 11). Это свидетельствует об ином принципе структурной организации омега-РНК.

Чтобы объяснить возможную структурную организацию ядра омега-РНК, А.В. Ефимов и А.С. Спирин предложили модель укладки цепи $(CAA)_n$ полимера (A.V. Efimov and A.S. Spirin, *BBRC*, 2009, **388**:127-130). Модель подразумевает образование тройной спирали РНК, где нуклеотиды разных участков цепи – два А и один С – располагаются в одной плоскости, взаимодействуя между собой при помощи пар водородных связей не-уотсон-криковского типа, формируя плоские триады, уложенные друг на друга. Ключевой особенностью модели является то, что при чередовании нуклеотидов по ходу цепи полимера $(CAA)_n$ нуклеотидные остатки также чередуются в составе триад нуклеотидов. При этом все возможные тройки нуклеотидов тройной спирали $(CAA)_n$ образуют триады оснований нуклеотидов с идентичными размерами и углами внешних валентных связей, что является основой образования регулярных спиральных структур. В то же время, из экспериментальных данных следует, что структура омега-РНК более компактна и стабильна, чем структура, образуемая полимером $(CAA)_{19}$ похожей длины.

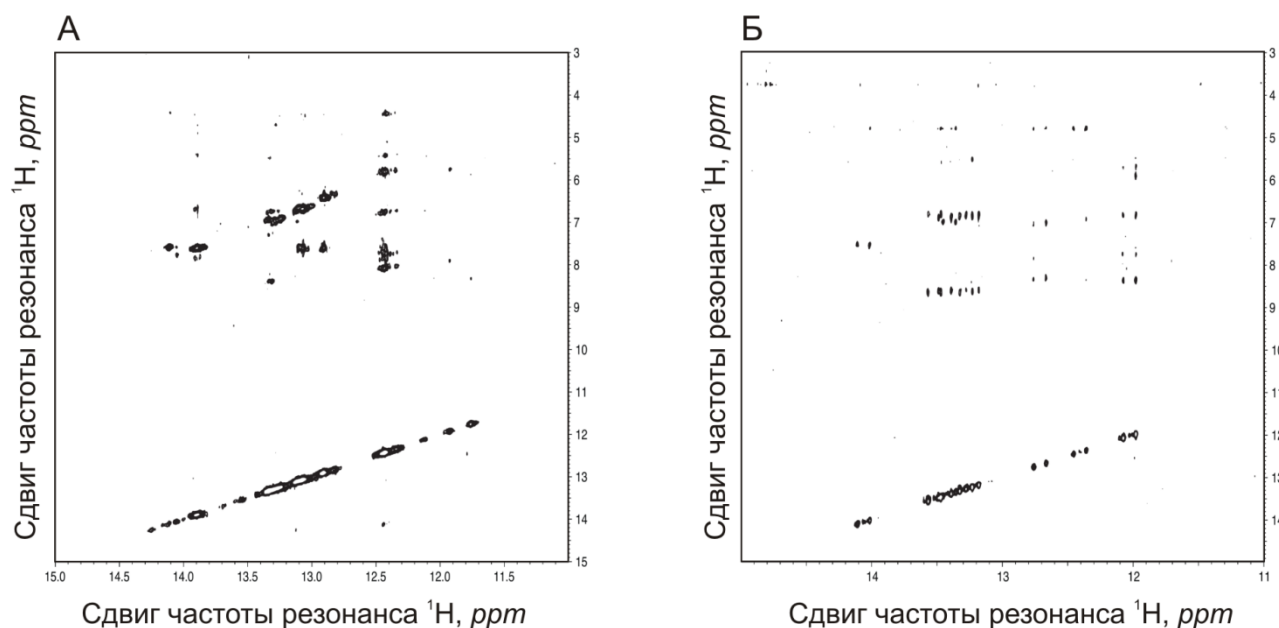


Рис. 11. Двумерные спектры резонанса протонов (второе направление разделения по величине ядерного эффекта Оверхаузера): (А) омега-РНК, (Б) TAR РНК вируса иммунодефицита человека 2. Условия записи спектров: температура 30 °С, водный раствор, содержащий 10 мМ ортофосфат натрия рН 7,5, 100 мМ хлорид натрия, 0,2 мМ дейтерий-замещенный ЭДТА и 10 % дейтериевой воды.

2.4 Стабильная и компактная пространственная укладка омега-РНК основана на вторичной структуре неканонического типа

Для того чтобы выяснить тип возможной структурной организации омега-лидера РНК и ее согласованность с предложенной моделью, мы применили стандартные методы неполной химической модификации оснований и ограниченной энзиматической дегградации, широко используемые при тестировании пространственных структур РНК.

РНК, содержащую нуклеотидную последовательность омега-лидера РНК ВТМ и 49 нуклеотидов кодирующей части мРНК люциферазы, обрабатывали модифицирующими или расщепляющими агентами при комнатной температуре (25 °С) в буфере, содержащем 40 мМ HEPES-KOH рН 7,5, 50 мМ KCl, 0,5 мМ ЭДТА, за исключением реакций с РНКазой V1, где в реакционный буфер был дополнительно добавлен ацетат магния до концентрации 10 мМ. Условия для всех реакций были подобраны таким образом, чтобы обеспечить модификацию или гидролиз менее половины молекул РНК в каждой реакционной смеси. Положение мест модификации или расщепления было определено при помощи анализа длин кДНК-продуктов обратной транскрипции (метод ингибирования удлинения праймера), полученных на матрице модифицированной или расщепленной омега-РНК.

(СAA)_n-повторами, слабо подвергались их воздействию. Значительная стабильность структуры центральной части по отношению к этим агентам сопровождалась также ее полной устойчивостью против РНКазы V1, расщепляющей полинуклеотидные цепи в составе уотсон-криковских двойных спиралей (Рис. 12). Эти экспериментальные данные хорошо согласуются с предложенной моделью тройной спирали РНК и подтверждают, что, во-первых, регулярная последовательность (СAA)_n, характерная для центральной части омега-лидера, действительно может формировать стабильную вторичную структуру и, во-вторых, формируемая структура не является канонической двойной спиралью уотсон-криковского типа или близкой к ней по характеру взаимодействий между основаниями.

2.5 Предполагаемое функциональное значение структуры омега-последовательности РНК

Уникальность укладки цепи РНК в полинуклеотиде, содержащем омега-последовательность, может способствовать образованию обособленной и стабильной структуры в составе полноразмерной РНК ВТМ. Известно, что белок оболочки тобамовирусов взаимодействует с развернутой одноцепочечной конформацией РНК. Таким образом, тенденция омега-последовательности к формированию стабильной структуры должна уменьшать сродство белка оболочки ВТМ к этой последовательности, что может объяснять начало 5'-проксимальной разборки вириона ВТМ при его попадании в клетку, которое жизненно необходимо для репликации этого вируса. Здесь уместна аналогия с 3'-частью РНК ВТМ, для которой ранее было показано образование стабильных тРНК-подобных и псевдоузловых структур. Другими исследователями было показано, что 3'-проксимальные структуры РНК ВТМ необходимы для успешной репликации этого вируса в клетках хозяина. Возможно, что наличие способности к образованию этих структур в 3'-концевой области РНК ВТМ также способствует началу репликации благодаря пониженному сродству белка оболочки к этой области РНК.

Несмотря на наличие стабильной вторичной и третичной структуры, омега-лидер обеспечивает эффективную кэп-независимую инициацию трансляции. Возможно, трехмерная конфигурация омега-РНК способствует облегченному присоединению 40S субъединиц к этому лидеру и формирование 48S инициаторного комплекса с высоким выходом без факторов сканирования – так же, как одноцепочечная спираль поли(А)-РНК, вероятно, обеспечивает eIF3-независимую инициацию трансляции. Вместе с этим, структура омега-РНК ВТМ не обеспечивает высокоаффинного (и специфического) сродства этой последовательности к рибосомам или факторам инициации трансляции, как это имеет место в случае инициации трансляции на сайтах внутренней посадки рибосом. Эти факты приводят нас к заключению о том, что инициация трансляции на омега-лидере ВТМ может происходить по альтернативному пути, отличному от кэп-зависимого сканирования и инициации на сайтах внутренней посадки рибосом.

ВЫВОДЫ

1. Разработан усовершенствованный метод ингибирования удлинения праймера мРНК-рибосомными комплексами (тупринтинг), в котором для мечения продуктов реакции обратной транскрипции используются флуоресцентные группы, а для их разделения применяется капиллярный электрофорез. Показано, что усовершенствованным методом тупринтинга можно обнаруживать, идентифицировать и количественно подсчитывать мРНК-рибосомные комплексы на всех стадиях трансляции: инициации, элонгации и терминации.
2. Методом тупринтинга показано, что поли(А)-лидер, характерный для мРНК осповирусов, обеспечивает эффективную инициацию трансляции на рекомбинантной мРНК без факторов инициации eIF4A, eIF4B и eIF4F, ответственных за АТФ-зависимое сканирование, а также без белка eIF3. Методом тупринтинга на мРНК с поли(А)-лидером показано также, что фактор инициации eIF3 не требуется для объединения субъединиц рибосом при инициации трансляции.
3. Методом тупринтинга показано, что для сборки инициаторного 48S комплекса на омега-лидере вируса табачной мозаики не требуется факторов инициации трансляции eIF4A и eIF4F, ответственных за АТФ-зависимое сканирование, но требуется eIF3.
4. Изучена структура омега-лидера РНК вируса табачной мозаики.
 - (а) Методами аналитического центрифугирования и теплового плавления показано, что РНК с последовательностью омега-лидера геномной РНК вируса табачной мозаики обладает коэффициентом седиментации, характерным для компактно уложенных РНК и имеет большую величину гиперхромного эффекта при плавлении, сопровождающимся кооперативным структурным переходом в области высоких температур
 - (б) Методами химического и ферментативного тестирования, а также методом ядерного магнитного резонанса, показано, что центральная (САА)_n-содержащая часть омега-РНК не модифицируется агентами, действующими на одноцепочечную РНК, а вся структура омега-РНК формирует укладку на основе неканонических взаимодействий нуклеотидов.
5. Предложена модель альтернативного механизма инициации трансляции на А-обогащенных лидерных последовательностях эукариотических мРНК. Модель предполагает посадку иницирующей субъединицы рибосом в произвольном месте лидерной последовательности мРНК и ее последующее энергонезависимое диффузионное движение («бесфазное блуждание») по цепи мРНК.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией:

1. Н.Э. Широких, С.Ч. Агаларов и А.С. Спирин (2010) Тестирование пространственной структуры лидерной последовательности РНК вируса табачной мозаики методами химической и энзиматической модификации. *Биохимия*, **75**, 405-411.

В рецензируемых журналах:

2. N.E. Shirokikh, E.Z. Alkalaeva, K.S. Vassilenko, Z.A. Afonina, O.M. Alekhina, L.L. Kisselev, A.S. Spirin (2010) Quantitative analysis of ribosome-mRNA complexes at different translation stages. *Nucleic Acids Research*, **38**, e15.
3. N.E. Shirokikh, A.S. Spirin (2008) Poly(A) leader of eukaryotic mRNA bypasses the dependence of translation on initiation factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, **105**, 10738-10743.
4. A.A. Kovtun, N.E. Shirokikh, A.T. Gudkov, A.S. Spirin (2007) The leader sequence of tobacco mosaic virus RNA devoid of Watson-Crick secondary structure possesses a cooperatively melted, compact conformation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **358**, 368-372.

В сборниках тезисов докладов конференций:

5. Е.А. Согорин, Н.Э. Широких, С.Ч. Агаларов и А.С. Спирин (2010) Исследование адресно-измененных форм РНК омега-последовательности ВТМ. *Ежегодная научная конференция Института белка РАН, Институт белка РАН, Пущино, Московская область, Россия, Сборник тезисов*, 8.
6. N.E. Shirokikh, E.A. Sogorin, S.C. Agalarov and A.S. Spirin (2010) Omega sequence of tobacco mosaic virus genomic RNA possesses a non-canonical compact tertiary structure. *Translational Control Meeting, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, США, Abstract book*, 254.
7. N.E. Shirokikh, E.Z. Alkalaeva, K.S. Vassilenko, Z.A. Afonina, O.M. Alekhina, L.L. Kisselev, A.S. Spirin (2009) Quantitative analysis of ribosome-mRNA complexes at different translation stages. *EMBO Conference on Protein Synthesis and Translational Control, EMBL, Heidelberg, Германия, Abstract book*, 236.
8. N.E. Shirokikh and A.S. Spirin (2008) Initiation of translation on eukaryotic high-expressible mRNAs with poly(A) leaders does not require eIF3 and eIF4F. *Translational Control Meeting, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, США, Abstract book*, 291.
9. N.E. Shirokikh and A.S. Spirin (2007) Localization of the ribosomal initiation 48S complex on eukaryotic mRNA by the method of primer extension inhibition with the use of fluorescent label. *40th Anniversary of the Institute of Protein Research meeting: Protein Biosynthesis, Structure and Function, Институт белка РАН, Пущино, Московская область, Россия, Conference abstracts book*, 10.
10. A.A. Kovtun, N.E. Shirokikh, A.T. Gudkov and A.S. Spirin (2007) Leader sequence of tobacco mosaic virus RNA possesses cooperatively melted, compact conformation. *40th Anniversary of the Institute of Protein Research meeting: Protein Biosynthesis, Structure and Function, Институт белка РАН, Пущино, Московская область, Россия, Conference abstracts book*, 70.
11. N.E. Shirokikh, T.V. Pestova, A.T. Gudkov and A.S. Spirin (2006) Translation initiation on non-capped eukaryotic mRNAs. *The 8th international Engelhardt Conference on Molecular Biology: RNA-Protein Interactions, пансионат «Буран», Сергиев-Посад, Московская область, Россия, Program and abstracts book*, 78.