

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

---

На правах рукописи

Андреев Дмитрий Евгеньевич

Роль 5' нетранслируемых областей мРНК в регуляции  
синтеза белка у млекопитающих

Специальность 02.00.10 – биоорганическая химия,

03.01.03 – молекулярная биология

Диссертация на соискание учёной степени доктора  
химических наук

Научный консультант

Доктор химических наук, профессор Шатский И.Н.

Москва – 2019

## Содержание

|                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Список сокращений                                                                                                                      | 5  |
| Введение.                                                                                                                              | 7  |
| 1. Обзор литературы                                                                                                                    | 17 |
| 1.1 Трансляционный аппарат млекопитающих                                                                                               | 17 |
| 1.2 Свойства 5'НТО мРНК, которые влияют на эффективность инициации                                                                     | 22 |
| 1.2.1. Вторичные структуры в 5'НТО                                                                                                     | 23 |
| 1.2.2. РНК-белковые взаимодействия в 5'НТО                                                                                             | 24 |
| 1.2.3. Факторы, влияющие на выбор стартового кодона                                                                                    | 30 |
| 1.2.4. Короткие рамки считывания uORF – реинициация и регуляция трансляции при стрессе                                                 | 34 |
| 1.3 Влияние цис-действующих элементов в 3'НТО на инициацию трансляции                                                                  | 38 |
| 1.3.1. GAIT элемент                                                                                                                    | 39 |
| 1.3.2. РНК-связывающий белок Sex lethal (SXL) и репрессия трансляции мРНК msl-2                                                        | 41 |
| 1.3.3. Трансляционный контроль при формировании Anterior-posterior axis patterning у Дрозофилы с участием кеп-связывающего белка 4E-HP | 43 |
| 1.3.4. Подавление трансляции мРНК cyclin B1 при помощи комплекса CREB-Maskin в ооцитах Xenopus                                         | 44 |
| 1.3.5. Белки, содержащие MIF4G домен, которые регулируют трансляцию через 3'НТО                                                        | 46 |
| 1.3.6. 3' кеп независимые энхансеры в 3'НТО (CITE) мРНК вирусов растений                                                               | 49 |
| 1.3.6.1 ВТЕ CITE связывает eIF4G                                                                                                       | 49 |
| 1.3.6.2 РТЕ CITE связывает eIF4E                                                                                                       | 50 |

|                                                                                                                                           |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1.3.6.3. TSS CITE связывает 60S субъединицу рибосомы                                                                                      | 51  |
| 1.4 Эпитранскриптомный контроль трансляции                                                                                                | 52  |
| 1.5 Внутренняя инициация трансляции                                                                                                       | 57  |
| 1.5.1. IRES элементы типа I                                                                                                               | 57  |
| 1.5.2. IRES элементы типа II                                                                                                              | 59  |
| 1.5.3. IRES элементы типа III                                                                                                             | 61  |
| 1.5.4. IRES элементы типа IV                                                                                                              | 65  |
| 1.6 Новый инструмент для изучения трансляционного контроля – рибосомный профайлинг                                                        | 68  |
| 2. Материалы и методы исследования                                                                                                        | 70  |
| 2.1. Реактивы                                                                                                                             | 70  |
| 2.2. Олигонуклеотиды                                                                                                                      | 71  |
| 2.3 Антитела                                                                                                                              | 75  |
| 2.4 Буферы и растворы.                                                                                                                    | 76  |
| 2.5 Методы                                                                                                                                | 79  |
| 3. Результаты и обсуждение                                                                                                                | 94  |
| 3.1 Особенности инициации трансляции на IRES элементах типа I и II                                                                        | 94  |
| 3.1.1 Влияние факторов инициации на выбор стартового кодона на IRES элементе FMDV                                                         | 94  |
| 3.1.2 Открытие необычного транс-действующего фактора, стимулирующего трансляцию на IRES-элементах группы I – глицил-тРНК синтетазы (GARS) | 102 |
| 3.2 Изучение кеп-независимой инициации трансляции у эукариот                                                                              | 114 |

|                                                                                                                                                 |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2.1. Концепция о существовании CITE в 5'НТО клеточных мРНК                                                                                    | 133 |
| 3.3 Стартовые кодоны в 5'НТО клеточных мРНК: роль в регуляции трансляции при стрессе и в экспрессии альтернативных белков.                      | 136 |
| 3.3.1 Использование рибосомного профайлинга для изучения трансляции в 5'НТО, и инициация трансляции на не-AUG кодонах                           | 137 |
| 3.3.2 Изучение клеточного ответа на удаление кислорода и глюкозы с помощью рибосомного профайлинга выявило изменения в выборе стартовых кодонов | 144 |
| 3.3.3 Анализ 5'НТО мРНК факторов инициации трансляции у млекопитающих                                                                           | 147 |
| 3.3.4 Изучение роли 5'НТО в регуляции трансляции при фосфорилировании eIF2                                                                      | 151 |
| 4. Заключение                                                                                                                                   | 170 |
| 5. Выводы                                                                                                                                       | 179 |
| 6. Список литературы                                                                                                                            | 180 |
| 7. Благодарности                                                                                                                                | 210 |

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

60S – большая субчастица рибосомы

40S – малая субчастица рибосомы

мРНК – матричная РНК

тРНК – транспортная РНК

рРНК – рибосомная РНК

НТО – нетранслируемая область

ТС – тройной комплекс eIF2\*тРНК<sub>и</sub>\*ГТФ (triple complex)

РИС – прединициаторный комплекс (Pre Initiation Complex)

eIF – эукариотические факторы инициации

aa-тРНК – аминоксил-тРНК

КриоЭМ – крио-электронная микроскопия

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПААГ – полиакриламидный гель

DMS - диметилсульфат

uORF – короткая рамка считывания (upstream open reading frame)

IRES – сайт внутренней посадки рибосомы (internal ribosome entry site)

ITAF – факторы, регулирующие сайты внутренней инициации трансляции (IRES Trans Acting Factor)

CITE – энхансер кэп-независимой трансляции (cap independent translation enhancer)

Для обозначения аминокислотных остатков, нуклеотидов, олиго- и полинуклеотидов использовали символы, рекомендованные Комиссией по номенклатуре союза биохимиков (IUB). Префикс «d» (дезокси) при обозначении нуклеозидов, олигорибонуклеотидов, НКдуплексов в большинстве случаев опущен. Все сокращения названий химических соединений даны в латинской транскрипции. Латинские названия генов приводятся курсивом со строчной буквы, а белков – прямым шрифтом с заглавной.

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

Синтез белков с мРНК является заключительной стадией реализации генетической информации, заложенной в белок-кодирующих генах всех живых организмов. За биосинтез белка в клетке отвечает рибосома и набор вспомогательных трансляционных факторов, необходимых для узнавания стартового кодона, синтеза полипептида, и последующей терминации белкового синтеза.

Биосинтез белка подвержен строгой регуляции – в клетке существует множество сигнальных каскадов, которые регулируют активности ключевых трансляционных факторов и рибосом. 5' нетранслируемые области (5'НТО) мРНК играют важнейшую роль в регуляции трансляции. Некоторые мРНК за счет специфических элементов в 5'НТО способны эффективно транслироваться в условиях, когда основной белковый синтез подавлен. Некоторые вирусы используют особые элементы в 5'НТО своих геномных мРНК для того, чтобы, полностью подавив трансляцию клеточных мРНК, переключить клеточный трансляционный аппарат на синтез вирусных белков.

На данный момент известно два механизма инициации трансляции – это сканирование и внутренняя инициация. Считается, что сканирование используется для инициации трансляции на большинстве мРНК. Согласно этому механизму, предложенному Мэрилин Козак в конце прошлого века, малая рибосомная субъединица привлекается на 5'конец мРНК за счет взаимодействия инициаторных факторов с m7G кепом, а затем начинает “сканирование” мРНК нуклеотид за нуклеотидом в поисках стартового кодона. После обнаружения инициаторного кодона и присоединения большой субъединицы начинается синтез полипептида. Внутренняя инициация используется некоторыми РНК содержащими вирусами,

реплицирующимися в цитоплазме. Их геномные мРНК не имеют кепы, зато в их 5'НТО находятся сложные элементы, получившие название сайтов внутренней инициации (Internal Ribosome Entry Site, IRES). IRES-зависимая трансляция не требует наличия кепы на 5'конце мРНК, и их 5'НТО не сканируются рибосомой полностью. Существует четыре структурно и функционально различных типа вирусных IRES-элементов. Некоторые типы вирусных IRES-элементов требуют для своей активности не только компоненты трансляционного аппарата, но и дополнительные белковые факторы. Другие типы вирусных IRES-элементов могут обходиться вообще без большинства факторов инициации, и даже без инициаторной met-tRNA<sup>i</sup>. Общей чертой всех IRES-элементов является способность эффективно направлять трансляцию в условиях, когда основной механизм, кеп-зависимая трансляция, подавлен. Однако стоит отметить, что, несмотря на большой прогресс в изучении молекулярных механизмов функционирования вирусных IRES-элементов, многие ключевые моменты остаются невыясненными до сих пор.

По аналогии с вирусными IRES-элементами, механизм внутренней инициации был предложен и для многих клеточных мРНК, кодирующих важнейшие регуляторные белки (например – онкогены, регуляторы клеточного цикла, факторы роста, и т.д.). Наличие клеточных IRESов должно было объяснить избирательную трансляцию таких мРНК в стрессовых условиях. Однако, появляется все больше опровержений известных ранее “клеточных IRESов”. Очевидно, что тогда должен существовать альтернативный механизм инициации трансляции, объясняющий избирательную трансляцию некоторых мРНК при стрессе.

До недавнего времени, возможности изучения трансляции клеточных мРНК были весьма ограничены, в основном исследователи использовали репортерные конструкции для изучения регуляции конкретных 5'НТО в нормальных и стрессовых условиях. Однако, развитие методов

высокопроизводительного секвенирования привело к появлению революционного метода в изучении трансляции – рибосомного профайлинга. Это метод, основанный на секвенировании фрагментов мРНК, защищаемых транслирующими 80S рибосомами от разрезания рибонуклеазами, позволяет изучать то, как изменилась трансляция всех мРНК в клетке в заданный момент времени. В частности, использование рибосомного профайлинга позволяет определить, какие мРНК на самом деле избирательно транслируются при подавлении “стандартной” кеп-зависимой трансляции, что представляется весьма ценным для поиска новых механизмов регуляции трансляции и регуляторных элементов в 5'НТО. Рибосомный профайлинг активно использовался в ходе выполнения данной работы.

Хотя 5'НТО мРНК млекопитающих (и вирусов млекопитающих) главным образом определяют эффективность и регуляцию синтеза белка, на данный момент невозможно предсказать регуляторный потенциал какой-либо 5'НТО, исходя только из ее последовательности. Для того, чтобы приблизиться этой цели, необходимо детально изучить молекулярные механизмы инициации трансляции.

Таким образом, представлялось актуальным изучение особенностей 5'НТО мРНК млекопитающих и вирусов, которые отвечают за регуляцию белкового синтеза в нормальных условиях, и в различных стрессовых условиях, при которых меняется активность факторов инициации.

### **Цель и задачи исследования**

Целью настоящей работы являлось изучение особенностей 5'НТО мРНК млекопитающих и вирусов, которые отвечают за регуляцию белкового синтеза.

Для достижения поставленной цели предполагалось решить следующие задачи:

Изучить молекулярные механизмы внутренней инициации трансляции на IRES элементе FMDV (IRES элемент II типа) с помощью системы сборки инициаторных комплексов из очищенных компонентов. В частности – изучить, какие факторы инициации и дополнительные белковые факторы (ITAF) необходимы для инициации на двух стартовых AUG кодонах, используемых вирусом для синтеза полипротеина.

Идентифицировать дополнительные белковые факторы (ITAF), которые необходимы для инициации трансляции на IRES элементе полиовируса (IRES элемент I типа)

Разработать альтернативный подход детекции инициаторных комплексов с помощью бактериального токсина RelE.

Исследовать влияние кеп-капа на трансляцию клеточных мРНК. Охарактеризовать цис-действующие элементы в 5'НТО, которые способны снижать зависимость трансляции от кеп-капа, но неспособны промотировать внутреннюю инициацию.

Разработать и сформулировать концепцию о новом типе инициации трансляции у эукариот – кеп-независимом сканировании, которое опосредуется энхансерами кеп-независимой трансляции (Cap Independent Translation Enhancers, CITE)

Изучить инициацию трансляции на не-AUG кодонах в 5'НТО мРНК млекопитающих с помощью рибосомного профайлинга

Исследовать роль 5'НТО в регуляции трансляции при стрессовых воздействиях, приводящих к инактивации eIF2. Охарактеризовать особенности регуляторных коротких рамок считывания (upstream open reading frames, uORFs), опосредующих такую регуляцию трансляции.

**Объект исследования** – регуляция экспрессии генов у эукариот

**Предмет исследования** – 5'нетранслируемые области мРНК эукариот

### **Научная новизна работы и практическая значимость работы**

Настоящая работа представляет собой комплексное исследование функциональных свойств 5'НТО клеточных мРНК и мРНК вирусов. Так, в ходе выполнения исследования было впервые показано, что для инициации трансляции на двух инициаторных кодонах мРНК FMDV используются разные наборы факторов инициации. Так, eIF1 необходим для инициации трансляции на втором старте трансляции, и препятствует инициации на первом старте трансляции. Это первая демонстрация того, что выбор двух стартовых кодонов под контролем общего IRES элемента может регулироваться фактором инициации. Также, в ходе выполнения данной работы было обнаружено, что IRES элемент полиовируса, и, видимо, все IRES элементы I группы, связывает глицил-тРНК синтетазу (GARS). GARS узнает элемент вторичной структуры в мРНК, похожий на антикодоновую петлю глициловой тРНК, и связывание GARS необходимо для активации трансляции.

Впервые было показано, что эффект кеп-ка на трансляцию клеточных мРНК варьирует для различных 5'НТО, и что некоторые элементы в 5'НТО могут усиливать трансляцию некепированной мРНК, но при этом не функционируют как IRES элементы. На основании этих наблюдений предложена фундаментальная концепция о существовании третьего механизма инициации трансляции у эукариот – кеп-независимого сканирования, которое сочетает в себе черты и обычного сканирования, и внутренней инициации. Введено понятие энхансеров кеп-независимой инициации в клеточных мРНК (5'CITE), и описан возможный

молекулярный механизм их функционирования. Впервые предложена теория, которая объясняет устойчивость трансляции клеточных мРНК к стрессам без участия IRES элементов.

Изучена роль инициации на неоптимальных кодонах в 5'НТО с помощью рибосомного профайлинга. Впервые показано, что при стрессе удаления кислорода и глюкозы в клетке активируется множество неоптимальных сайтов инициации трансляции. Наконец, впервые исследовано влияние интегрированного стрессового ответа на трансляцию на полногеномном уровне. В результате этого исследования было показано, что определяющую роль в дифференциальной регуляции трансляции при инактивации eIF2 играют uORF в 5'НТО клеточных мРНК.

Получены новые данные о регуляции трансляции IRES элементов пикорнавирусов, которые могут иметь большое практическое значение. Так, открыт новый транс-действующий фактор, необходимый для трансляции мРНК полиовируса и некоторых других пикорнавирусов, способных вызывать заболевания человека. Полученные знания могут быть использованы для разработки новых противовирусных препаратов, действующих на стадии подавления синтеза вирусных белков.

Предложенная в ходе выполнения работы теория энхансеров кеп-независимой трансляции (CITE) имеет, на наш взгляд, крайне важное теоретическое значение. На данный момент опубликованы сотни работ, посвященных клеточным IRESам, однако мы полагаем, что большая часть работ ошибочна вследствие неверной методологии и интерпретации данных. Наша теория предлагает альтернативу клеточным IRES элементам. Есть основания рассчитывать на то, что наша концепция со временем заменит теорию клеточных IRES элементов, таким образом, изменится представление о механизмах инициации трансляции у эукариот.

Также, в ходе выполнения работы получены новые данные, уточняющие роль альтернативных сайтов инициации трансляции в 5'НТО, что расширяет представления о важной роли 5'НТО в регуляции экспрессии генов.

### **Методология диссертационного исследования**

В работе был использован широкий набор самых современных подходов к изучению РНК и РНК-белковых комплексов. Использовались молекулярно-биологические, химические, и биоинформатические методы исследований. Так, для анализа инициации трансляции была использована система сборки комплексов из очищенных компонентов – факторы инициации трансляции и рибосомы выделялись из клеточных лизатов или экспрессировались и выделялись из *E. Coli*. Методы анализа РНК-белковых комплексов включали в себя метод терминации удлинения праймера (ту-принтинг), центрифугирование в градиенте сахарозы, а также химический и энзиматический пробинг вторичной структуры мРНК. Генетическими методами создавались репортерные конструкции с различными 5'НТО и их вариантами, включающими делеции и точечные замены. На основе этих конструкций, с помощью РСР и Т7 транскрипции получали репортерные мРНК, кодирующие разные варианты люцифераз в качестве репортера, и содержащие 5'НТО интереса, m7G кеп и поли-А последовательность. Такие мРНК транслировали в бесклеточной системе трансляции, или трансфецировали в культуральные клеточные линии, и измеряли активность люциферазы. Полногеномное изучение трансляции проводили с помощью рибосомного профайлинга.

## **Основные положения, выносимые на защиту**

Инициация трансляции на двух стартовых кодонах в мРНК FMDV по-разному зависит от eIF1. Инициация трансляции, направляемая IRES элементом FMDV, протекает значительно медленнее инициации на кеп-зависимой мРНК

Глицил-тРНК синтетаза связывается с IRES элементом полиовируса и стимулирует инициацию трансляции. Связывание происходит за счет наличия в IRES консервативного структурного элемента, мимикрирующего под глициловую тРНК

Трансляция, направляемая 5'НТО клеточных мРНК, по-разному зависит от наличия кеп-ка. 5'НТО мРНК с низкой кеп-зависимостью, тем не менее, не способны промотировать внутреннюю инициацию. На основании полученных данных предложена теория о кеп-независимых энхансерах трансляции, которые способны стимулировать кеп-независимое сканирование.

Инициация трансляции на не-AUG кодонах протекает гораздо реже, и менее эффективно, чем сообщалось ранее, на основании анализа данных рибосомного профайлинга. Тем не менее, определенные 5'НТО способны довольно эффективно промотировать инициацию трансляции с не-AUG кодонов. Так, 5'НТО мРНК опухолевого супрессора PTEN содержит AUU кодон, с которого синтезируется удлиненная с N-конца протеоформа.

При стрессе удаления кислорода и глюкозы (OGD) уже через 20 минут после начала стресса наблюдаются значительные изменения на

трансляционном уровне, при этом активируется трансляция с неоптимальных кодонов, расположенных в 5'НТО.

При фосфорилировании фактора инициации трансляции eIF2 происходит глобальное подавление белкового синтеза, однако трансляция около 10 мРНК не подавляется, или даже стимулируется. Все эти мРНК имеют регуляторные uORF. В ряде случаев, единственной uORF в 5'НТО достаточно для устойчивости трансляции к стрессу. На основании полученных данных предложена модель, которая объясняет регуляторную функцию uORF при стрессе за счет столкновений сканирующих и элонгирующих рибосом.

### **Степень достоверности результатов**

В работе использовали современные методики измерений и приборы. Использовались реактивы от ведущих российских и международных производителей. Последовательности фрагментов ДНК проверялись секвенированием.

### **Апробация работы**

Диссертация апробирована на заседании кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Результаты работы в виде устных и стендовых докладов были представлены автором лично на международных конференциях и конгрессах: EMBO Conference: Protein Synthesis and Translation Control, г. Гейдельберг, Германия (2005, 2007, 2009, 2011, 2013, 2015, 2017, 2019), FEBS Congress г. Афины, Греция, и г. Санкт-Петербург (2008, 2013), RNA

Society Meeting, г. Киото, Япония (2011), Ribosomes, г. Орвието, Италия (2010) и др.

### **Публикации**

Основные результаты диссертационной работы представлены в 16 публикациях в международных рецензируемых журналах, индексируемых в системах Web of Science, Scopus и РИНЦ.

### **Личный вклад автора**

Результаты исследований были получены лично автором, либо сотрудниками под его непосредственным руководством. В совместных работах ему принадлежит ключевая роль в выборе методов исследования, постановке задач, анализе литературы, интерпретации полученных данных. Автор принимал непосредственное участие в планировании и проведении экспериментов, в обработке экспериментальных данных, в написании публикаций, и в представлении полученных данных на конференциях.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Трансляционный аппарат млекопитающих

У эукариот, инициация трансляции осуществляется за счет механизма сканирования, при котором каждый триплет в мРНК проверяется на комплементарность к антикодону инициаторной метионил-тРНК (Met-tRNA<sub>i</sub>). Met-tRNA<sub>i</sub> доставляется на 40S рибосомную субчастицу в составе тройного комплекса (Triple Complex, TC) с GTP и фактором инициации eIF2. Аффинность Met-tRNA<sub>i</sub> к eIF2-GTP примерно в 10 раз больше, чем к eIF2-GDP, и зависит от наличия остатка метионина – деацилированная тРНК не связывается с eIF2 [1, 2]. Некоторые особенности структуры в инициаторной тРНК также влияют на специфичность связывания с eIF2.

Связывание TC с 40S субъединицей осуществляется при помощи факторов инициации eIF1, eIF1A и eIF3, которые имеют аддитивный эффект [3]. eIF1A и eIF1 – небольшие белки, связываются в районе А- и Р-сайта рибосомы соответственно. eIF3 является огромным мультисубъединичным комплексом, состоящим из 13 субъединиц (обозначаются eIF3A - M). Множественные контакты eIF3 с другими факторами инициации и структурными белками малой рибосомной субчастицы играют важную роль в последующих стадиях инициации трансляции. Рибосома, связанная с тройным комплексом и другими перечисленными факторами инициации, называется 43S прединициаторным комплексом (43S PreInitiation Complex, PIC).

Первая стадия инициации трансляции – это связывание 43S PIC с мРНК, которое происходит на 5' конце мРНК. Ключевую роль в промотировании связывания 43S PIC с 5' концом мРНК играет фактор инициации eIF4F. Кеп связывающая субъединица eIF4F, eIF4E,

18

Далее, eIF4G привлекает 43S PIC на мРНК за счет взаимодействия с eIF3, а именно – с его субъединицей eIF3E [5]. Кроме контакта eIF4G/eIF3, связывание 43S PIC на 5' конец мРНК стабилизируется дополнительными взаимодействиями: А) Взаимодействием поли-А связывающего белка РАВР, связанным с полиА хвостом на 3'конце мРНК, с eIF4G. Такое взаимодействие приводит к “закольцовыванию” мРНК. Взаимодействие eIF4G/РАВР, однако, далеко не во всех случаях оказывает влияние на эффективность трансляции; Б) eIF5 способен взаимодействовать одновременно с eIF4G и eIF3 (по крайней мере у дрожжей), и, таким образом, стабилизировать связывание 43S PIC [6]. Кроме того, eIF5 может напрямую связываться с 40S, создавая дополнительное стабилизирующее взаимодействие [7]. В) eIF4В стимулирует хеликазную активность eIF4А, и таким образом по всей видимости способствует посадке 43S на 5'конец мРНК. Кроме того, eIF4В взаимодействует с eIF3 (с субъединицей eIF3А), образуя дополнительный контакт между eIF4F и 43S PIC [8]. Более того, было показано, что eIF4В может одновременно связываться с мРНК и с 18S рРНК через два РНК-связывающих домена, привлекая 43S PIC на мРНК напрямую [9]. Г) eIF4G и несколько субъединиц eIF3 содержат РНК-связывающие домены, которые способны дополнительно стабилизировать взаимодействие 43S PIC с мРНК. Суммируя вышесказанное, множественные белок-белковые и РНК белковые взаимодействия необходимы для эффективного связывания 43S PIC с 5'концом мРНК.

После рекрутирования 43S PIC на 5'конец мРНК происходит его движение в 3' направлении мРНК, сопровождаемое сканированием нуклеотидной последовательности. Для продуктивного сканирования необходима определенная, открытая конформация 40S субъединицы, и расплетение вторичных структур в мРНК, необходимое для пропускания мРНК в мРНК-связывающий канал 40S. Согласно измерениям кинетики трансляции *in vitro*, скорость сканирования составляет примерно 8 нт/сек.

Расположение eIF4F на рибосоме в процессе сканирования точно неизвестно. Согласно одним данным, eIF4G может быть расположен у выхода из рибосомного канала, и работает, протягивая мРНК через канал рибосомы [10]. Согласно другим – eIF4G располагается между входом и выходом из канала рибосомы и позиционирует eIF4A и eIF4B в районе входа мРНК, для того чтобы расплетать вторичные структуры мРНК перед сканирующей рибосомой [11]. Известно, что в некоторых случаях активности eIF4A/eIF4B недостаточно для преодоления особенно стабильных вторичных структур мРНК, и тогда необходимы вспомогательные РНК хеликазы, такие как DHX29 [12] и DDX3 [13].

Сканирование продолжается до того момента, пока не установится комплементарное взаимодействие между стартовым кодоном и met-tRNA<sub>i</sub>. Инспектирование этого взаимодействия при помощи инициаторных факторов и конформационных изменений в 40S определяет то, что произойдет дальше – узнавание стартового кодона с последующим синтезом белка, или пропуск данного триплета и дальнейшее продолжение сканирования. Согласно современным представлениям [3], тройной комплекс связывается прединициаторным рибосомным комплексом, находящимся в открытой конформации, получившем название Rout. Конформация Rout, в которой met-tRNA<sub>i</sub> не полностью находится в Р сайте 40S субъединицы рибосомы, продуктивна для сканирования. Конформация Pin (закрытая конформация), напротив, продуктивна для узнавания стартового кодона и непродуктивна для сканирования - в этой конформации Met-tRNA<sub>i</sub> полностью позиционирована в Р сайте рибосомы. Для перехода Rout в Pin необходима предварительная диссоциация eIF1, поскольку этот фактор препятствует полной аккомодации Met-tRNA<sub>i</sub> в Р-сайте рибосомы. Считается, что сканирующий 43S PIC переходит в Pin конформацию для инспекции каждого триплета, но очень быстро переходит обратно в Rout, если комплементарного взаимодействия между

антикодоном тРНК и мРНК не происходит [3]. Связывание eIF1A с 40S влияет на конформацию оснований рРНК в декодирующем центре таким образом, что они выпетливаются – это способствует сканированию, так как минимизирует взаимодействия между мРНК и рРНК в канале рибосомы [14].

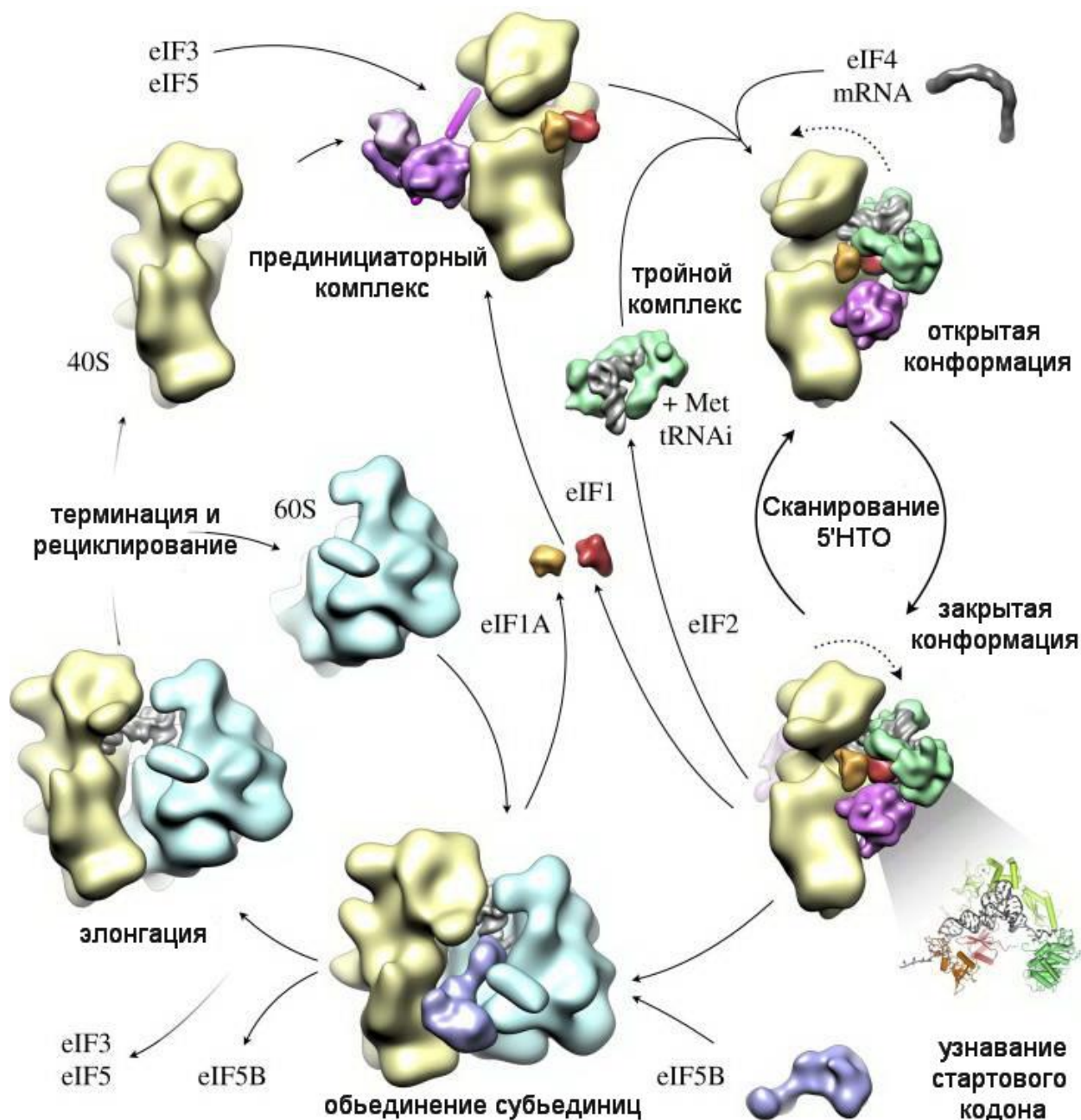


Рис. 2. Структурные аспекты сканирования у эукариот [15]

eIF2 является ГТФазой, и при связывании с рибосомой и образовании 43S PIC ГТФ сразу гидролизуетсЯ посредством ГТФаза - активирующего фактора eIF5. Однако, высвобождение неорганического фосфата Pi из комплекса происходит только при образовании стабильного кодон-антикодонного взаимодействия в Р-сайте и диссоциации eIF1 [15]. Затем, происходит диссоциация eIF5, eIF2-ГДФ, и eIF3 (хотя считается, что eIF3 еще какое-то время может оставаться связанным с участком 40S субъединицы, обращенным в цитоплазму).

Диссоциация инициаторных факторов делает возможным присоединение большой рибосомной субъединицы. eIF5B-GTP связывается с 40S субъединицей и ускоряет присоединение 60S субъединицы [16]. eIF5B привлекается в 48S комплекс за счет взаимодействия с С-концевыми аминокислотами eIF1A, оставшегося после диссоциации остальных факторов инициации [17], в то время как другие домены eIF5B образуют контакты с 60S и 40S. Гидролиз GTP, связанного с eIF5B, стимулируется рибосомой. Хотя гидролиз непосредственно не нужен для объединения субчастиц, он необходим для того, чтобы eIF5B покинул комплекс вместе с eIF1A [18]. После этого, процесс инициации трансляции считается завершенным – 80S рибосома готова к синтезу полипептида.

## 1.2 Свойства 5'НТО мРНК, которые влияют на эффективность инициации

Каждая мРНК в клетке транслируется с различной эффективностью, и это в основном определяется свойствами 5'НТО. РНК-РНК и РНК белковые взаимодействия в 5'НТО могут оказывать влияние на присоединение 43S PIC на 5'конец мРНК, на сканирование, и на узнавание

стартового кодона. Более того, значительная часть эукариотических мРНК содержит стартовые кодоны, расположенные раньше открытой рамки считывания. Инициация трансляции с таких стартовых кодонов приводит к трансляции коротких открытых рамок считывания (upstream Open Reading Frame, uORF). uORFs обычно кодируют короткие пептиды, которые, как считается, не нужны клетке. Все эти препятствия на пути сканирующей рибосомы к стартовому кодону основной рамки считывания не только позволяют влиять на уровень продукции белка, но и способны драматически регулировать уровень трансляции при активации определенных сигнальных каскадов, действующих на трансляционный аппарат.

#### 1.2.1. Вторичные структуры в 5'НТО.

Вторичные структуры в 5'НТО мРНК расплетаются при сканировании при помощи хеликазной активности инициаторных факторов, в первую очередь – eIF4A. Известно, что ингибирующее действие шпильчатых структур на трансляцию зависит от расположения вторичной структуры по отношению к 5'концу мРНК – чем ближе к 5'концу, тем сильнее проявляется ингибирующий эффект на трансляцию. Это по всей видимости связано с ингибированием посадки 43S РИС на мРНК. В то же время, более удаленные от 5' конца мРНК структуры обычно эффективно преодолеваются сканирующими рибосомами. Для расплетания наиболее стабильных структур по всей видимости используются дополнительные РНК хеликазы, такие как DHX29 [12] и DDX3 [13], и, возможно, другие РНК хеликазы. Дополнительные хеликазы по всей видимости привлекаются для расплетания определенных структур, расположенных в определенном контексте 5'лидера. Например, DDX3 необходим для расплетания 5'-проксимальных структур, что необходимо для усиления связывания eIF4F [19]. По всей видимости, полный

репертуар вспомогательных “трансляционных” хеликаз далеко не ограничивается вышеперечисленными случаями.

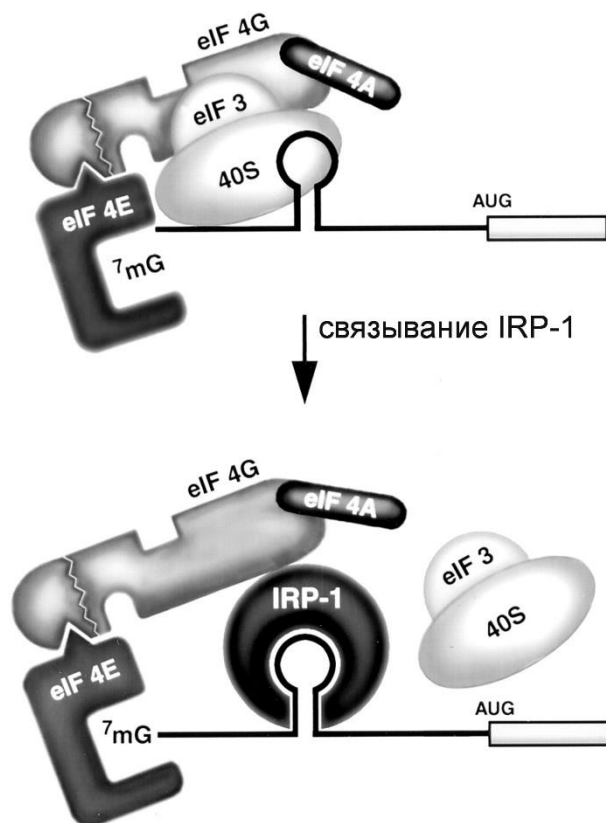
Неструктурированные участки в 5'НТО мРНК, напротив, могут снижать требования к хеликазной активности. Например, мРНК, содержащая неструктурированный лидер, состоящий из нескольких десятков повторов ССА, способна образовывать инициаторный комплекс в отсутствие eIF4F и без гидролиза АТФ [20]. Класс мРНК, имеющих так называемый TISU мотив (очень короткий 5'НТО со специфическим нуклеотидным контекстом вокруг стартового кодона), способен транслироваться без участия eIF4A, но, тем не менее, трансляция зависит от наличия кепка на 5'конце мРНК [21, 22].

### 1.2.2 РНК-белковые взаимодействия в 5'НТО

мРНК в клетке существует в виде комплекса с РНК-связывающими белками. Соответственно, сканирующая рибосома должна не только расплетать вторичные структуры в мРНК, но также “справляться” с белками, связанными с 5'НТО. РНК-связывающие белки, в свою очередь, способны стабилизировать вторичные структуры в мРНК и препятствовать сканированию. На этом построена трансляционная регуляция мРНК, кодирующей ферритин [23, 24]

Ферритин – белок, ответственный за хранение железа в клетках. Высокий уровень ионов железа способствует трансляции ферритина, в то время как недостаток железа блокирует его синтез. Трансляционный контроль зависит от связывания белков IRP1 и IRP2 со специфическим элементом мРНК IRE, находящемся в 5'НТО мРНК ферритинов (FTN и FTL) в непосредственной близости от кепка. IRP1 и IRP2 связываются с IRE в условиях недостатка железа, но при восстановлении уровня железа IRP1

инактивируется, связываясь с [4Fe-4S] кластером, приобретая конформацию,



**Рис. 3.** Ингибирование посадки 43S PIC на 5'конец мРНК при связывании IRP с IRE [25]

в которой не способен взаимодействовать с IRE. IRP2, в свою очередь, подвергается протеасомной деградации. Связывание IRP с IRE на мРНК ферритина приводит к тому, что, хотя связывание eIF4F с кепом не нарушается, блокируется рекрутирование 40S на 5'конец мРНК.

IRE элементы также были обнаружены в ряде других мРНК (например – *TRFC*, *ALAS2*, *SDHB*, *ACO2*, *HAO1*, *SLC11A2*, *NDUFS1*, *SLC40A1*, *CDC42BPA*, *CDC14*, *EPAS1*), причем далеко не всегда - в непосредственной близости к 5'концу мРНК. Довольно часто IRE находятся в 3'НТО – в таких случаях связывание IRE с IRP регулирует стабильность мРНК [26].

Другой пример регуляции трансляции за счет РНК белковых взаимодействий связан с так называемыми 5'TOP (Terminal Oligopyrimidine Tract) мотивами. 5'TOP – мотив представляет собой

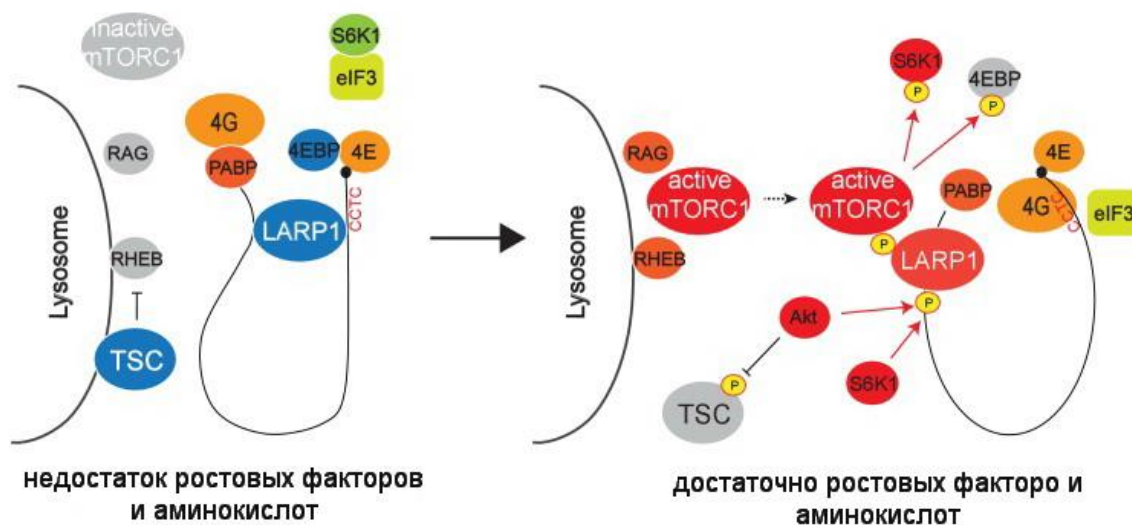
цитозин в положении +1 транскрипта, за которым следует последовательность из 4 до 15 пиримидинов. мРНК, содержащие 5'ТОР мотивы, кодируют большую часть рибосомных белков, некоторые факторы инициации, а также несколько белков, не имеющих прямого отношения к регуляции трансляции. Основной особенностью 5'ТОР мРНК является то, что их трансляция активно регулируется: митогенные сигнальные пути, факторы роста, и др приводят к активации их трансляции, в то время как аминокислотное голодание, отсутствие ростовых факторов, контактное торможение, гипоксия, и многие другие стимулы приводят к подавлению их трансляции [27].

По всей видимости, трансляционная регуляция 5'ТОР мРНК зависит от активности киназы mTOR, однако как именно mTOR регулирует трансляцию, остается неизвестным. mTOR в комплексе со специфическими кофакторами, образующими киназный комплекс mTORC1, фосфорилирует белки 4EВР – репрессоры трансляции. В фосфорилированном состоянии 4EВР неактивны, однако при подавлении активности mTORC1, 4EВР дефосфорилируется, и в таком состоянии приобретает способность связывать кеп связывающий белок eIF4Е, вытесняя его из eIF4F [28-30]. Хотя некоторые исследователи считают, что mTOR зависящая инактивация кеп-связывающего белка играет ключевую роль в инактивации трансляции 5'ТОР мРНК [31], это, по всей видимости, далеко не всегда так. Например, было показано, что 5'ТОР мРНК регулируются на трансляционном уровне в ответ на обработку инсулином в условиях, когда 4EВР не фосфорилируется (при инактивации mTORC1 за счет подавления его субъединицы Raptor) [32].

Основная гипотеза о том, каким образом происходит трансляционная регуляция 5'ТОР мРНК, заключается в вовлечении РНК-связывающего белка, взаимодействующего с 5'концевым мотивом: в нормальных условиях, этот белок не препятствует связыванию eIF4F с кепом. В

неблагоприятных условиях данный РНК-связывающий белок начинает эффективно конкурировать за связывание eIF4F, таким образом подавляя посадку 43S PIC на мРНК.

Какой именно РНК-связывающий белок вовлечен в трансляционный контроль 5'TOP мРНК, до сих пор остается неизвестным. Среди кандидатов числятся РНК-связывающие белки La [33-35]; LARP7 [36], CNBP [37], TIA-1/TIAR [38] и LARP1 [39]. Вполне возможно, что в трансляционный контроль 5'TOP мРНК могут быть вовлечены сразу несколько из этих белков, каждый из которых способен осуществлять свою регулируемую функцию в определенных клетках в ответ на определенные воздействия. По крайней мере это могло бы объяснить большое количество несостыковок и противоречивых данных в области трансляционного контроля 5'TOP мРНК.



**Рис. 4.** Предполагаемый механизм регуляции трансляции 5'TOP мРНК с помощью LARP1 и mTOR [40]

Одним из возможных объяснений того, почему 5'TOP мРНК специфически регулируются при помощи mTOR, может являться то, что mTOR регулирует активность не только eIF4E (за счет фосфорилирования

4E-BP), но и РНК-связывающего белка. Одна из последних работ, посвященная роли LARP1 в регуляции трансляции 5'ТОР мРНК, подтверждает это предположение. LARP1 напрямую фосфорилируется mTOR [41, 42], что может приводить к изменению взаимодействия LARP1 с мРНК. Действительно, оказалось, что нефосфорилированный LARP1 взаимодействует напрямую с 5'НТО и 3'НТО 5'ТОР мРНК и ингибирует их трансляцию, в то время как фосфорилирование с помощью mTOR приводит к диссоциации LARP1 с 5'НТО и де-репрессии трансляции (при этом взаимодействие с 3'НТО сохраняется) [40]. Более того, оказалось, что фосфорилированный LARP1, связанный с 3'НТО, связывает mTORC1, позволяя данной киназе стимулировать трансляцию 5'ТОР мРНК напрямую (рис. 4). Таким образом, LARP1 может являться одновременно и активатором, и репрессором трансляции 5'ТОР мРНК, в зависимости от статуса своего фосфорилирования [40].

И в случае с IRE, и в случае 5'ТОР мРНК, трансляционный контроль за счет РНК-белковых взаимодействий осуществляется на стадии посадки 43S на 5'конец мРНК, ведь оба цис-действующих элемента находятся близко к кепу. Однако и более удаленные от 5'конца мРНК сайты связывания белков могут оказывать влияние на трансляцию. Один из примеров такой регуляции был обнаружен в мРНК *PABPC1*, кодирующей поли-А связывающий белок PABP. PABP связывается с поли-А хвостами мРНК и участвует в регуляции трансляции и стабильности мРНК. Интересно, что в 5'НТО мРНК *PABPC1* был обнаружен участок, богатый аденинами (58-146 относительно 5'конца мРНК). При избытке свободного PABP, он связывается с этим участком в лидере собственной мРНК и, таким образом, подавляет собственную трансляцию [43]. Интересно, что при стрессе, вызванном глюкозным голоданием, в гене *PABPC1* активируется альтернативный старт транскрипции, благодаря которому



функциями – связывание eIF3 с 5'НТО *c-Jun* стимулирует трансляцию, а сайт связывания в *BTG1* репрессирует трансляцию. Таким образом, связывание eIF3 в 5'НТО способно как стимулировать, так и подавлять трансляцию мРНК.

Каким образом связывание eIF3 может стимулировать трансляцию? В работе [46] было показано, что eIF3 способен связываться с m<sup>7</sup>G кепом через специфическое взаимодействие m<sup>7</sup>G с субъединицей фактора eIF3D. Авторы работы предполагают, что связывание eIF3 с цис-действующим элементом в 5'НТО *c-Jun* приводит к связыванию eIF3D с кепом и к рекрутированию 43S РИС без помощи кеп-связывающей субъединицы eIF4E, что делает инициацию трансляции независимой от eIF4F. Однако, в другой работе, результаты были оспорены – было показано, что eIF3l, а не eIF3D, связывает m<sup>7</sup>G кеп [47]. Так или иначе, какая-то субъединица eIF3, по всей видимости, действительно способна связывать m<sup>7</sup>G кеп и регулировать инициацию трансляции на некоторых мРНК, конкурируя с eIF4E.

Подводя итог, РНК-белковые взаимодействия, по всей видимости, оказывают очень большое влияние на эффективность трансляции, протекающей по механизму кеп-зависимого сканирования. Роль РНК-связывающих белков в регуляции трансляции может не ограничиваться классическими РНК-связывающими белками, содержащими канонические РНК-связывающие домены, такие как RRM (RNA Recognition Motif), или цинковые пальцы. Существуют сотни белков, на первый взгляд не обладающих никакими РНК-связывающими свойствами, но на самом деле способными связывать РНК [48]. Среди таких необычных РНК-связывающих белков можно встретить классические ферменты GAPDH [49], GDH [50], TS [51], DHFR [52], и др. Интересной особенностью таких неканонических РНК-связывающих белков является не только возможная регуляция их связывания с РНК метаболитами (как в случае с IRE и

железом) – но также и регуляция их энзиматической активности при связывании с РНК [48].

### 1.2.3. Факторы, влияющие на выбор стартового кодона

Как сказано выше, 43S PIC после связывания с 5'концом мРНК начинает сканирование 5'НТО в поисках стартового кодона. Если бы выбор стартового кодона определялся только взаимодействием антикодона Met-tRNA<sub>i</sub> и соответствующего триплета в мРНК в Р-сайте рибосомы, то инициация трансляции всегда происходила бы на самом первом AUG кодоне. В реальности, это далеко не так – 43S PIC способен как пропускать некоторые AUG и иницировать на следующих AUG (это процесс называется проскальзывающее сканирование, или leaky scanning), так и иницировать на триплетах, отличных от AUG. Почему это происходит, и какие факторы влияют на выбор стартового кодона?

Дело в том, что установление кодон антикодонного взаимодействия в Р-сайте рибосомы является необходимым, но не достаточным условием для инициации. Факторы инициации, рибосомные белки и рРНК также устанавливают дополнительные взаимодействия с основаниями РНК, окружающими стартовый кодон. При наличии подходящего нуклеотидного контекста эффективность инициации повышается. Кроме того, эффективность инициации зависит от времени, которое 43S PIC проводит на определенном стартовом кодоне – препятствия, мешающие 43S PIC “уехать” со стартового кодона, могут приводить к эффективной инициации даже на неоптимальных стартах.

Нуклеотидный контекст инициаторного кодона, определяющий эффективность инициации, был открыт Мэрилин Козак в своих пионерских работах. Результаты этих работ позволили сформулировать механизм сканирования у эукариот. Соответственно, оптимальный

стартовый контекст получил название контекста Козак, что используется и по сей день. На основании данных активности репортерных конструкций, а также сравнения контекстов стартовых кодонов для 699 мРНК животных, Козак пришла к выводу, что наибольший эффект на инициацию трансляции оказывают положения -3 и +4 по отношению к нуклеотиду А стартового кодона AUG [53-55]. По Козак, контекст, оптимальный для инициации выглядит следующим образом: GCCRCCAUGG. Для эффективной инициации трансляции, в -3 и +4 положении должны быть пурины, их замена на пиримидины делает стартовый кодон неэффективным, что открывает возможность для проскальзывающего сканирования через этот кодон. До недавнего времени, информация об оптимальном контексте стартового кодона была ограничена результатами, полученными Козак, однако развитие методов “секвенирования следующего поколения” (NGS) позволило провести полномасштабный анализ эффективности десятков тысяч вариантов контекста стартового кодона в клетках млекопитающих [56]. Согласно уточненным данным, оптимальный контекст стартового кодона у человека выглядит следующим образом: RYMRMVAUGGC, где Y = U или C, M = A или C, R = A или G, and V = A, C, или G.

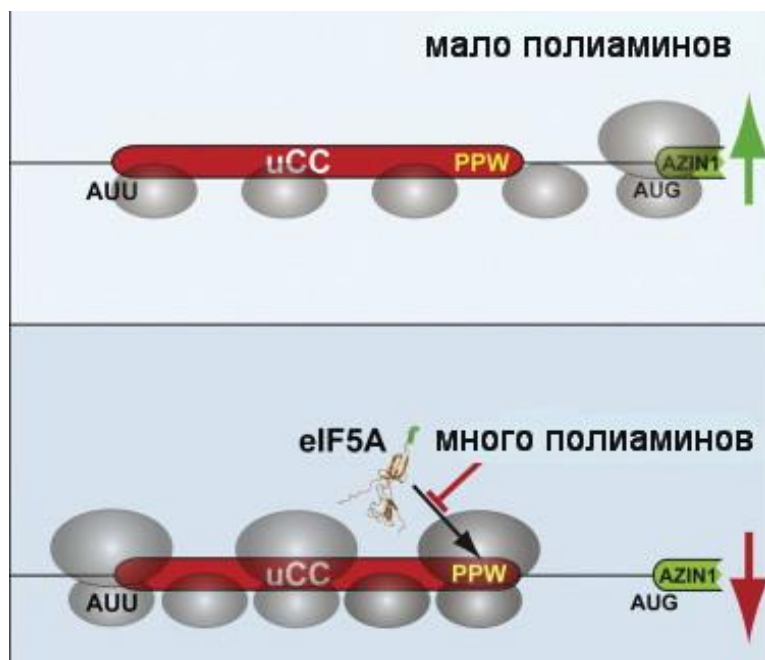
Инициаторная тРНК может образовывать менее стабильные кодон-антикодоновые взаимодействия и с триплетами, отличающимися от AUG на один нуклеотид – такими, как CUG, GUG, UUG, AUA и несколькими другими кодонами. Менее стабильное кодон антикодоновое взаимодействие обычно приводит к значительно менее эффективной инициации на не-AUG кодонах (в среднем – 3-5% от эффективности AUG в том же положении). Логично предположить, что дополнительные факторы, такие как нуклеотидный контекст и длительность паузы на не-AUG кодоне, должны играть значительно большую роль для инициации, чем в случае с AUG с его идеальным кодон антикодоновым

взаимодействием. Действительно, в недавней работе [57], также основанной на анализе множества вариантов инициаторных контекстов для не-AUG, было показано, что нуклеотидный контекст играет значительно большую роль для инициации трансляции, чем в случае с AUG. Например, для инициации на CUG, в отличие от AUG, критическую роль играет наличие G в +4 положении. Интересно, что некоторые контексты могут сделать инициацию на не-AUG почти такой же эффективной, как для AUG в том же контексте. Стоит ожидать, что в ближайшее время будут проведены структурные исследования, которые объяснят влияние специфических нуклеотидных контекстов на эффективность инициации на не-AUG кодонах.

Вторым важным фактором, влияющим на эффективность узнавания стартового кодона, является наличие препятствия после стартового кодона: если 43S PIC не может продолжить сканирование и при этом находится на неоптимальном стартовом кодоне, инициация произойдет и на таком кодоне. В качестве такого препятствия могут выступать вторичные структуры. В работе [58] для репортерной мРНК с неоптимальным стартовым кодоном, после старта на расстоянии 5, 11, 17, и 35 нуклеотидов были расположены шпилечные структуры со стабильностью 19 кКал/моль. Оказалось, что для стимуляции трансляции необходимо, чтобы структура была расположена на расстоянии 17 нуклеотидов. Такое позиционирование сканирующей рибосомы по отношению к стартовому кодону также стимулировало инициацию на CUG и UUG [58].

Роль препятствия, приводящего к эффективной инициации на неоптимальных кодонах, могут также играть элонгирующие рибосомы, “застрявшие” после стартового кодона. В качестве примера можно привести трансляционную регуляцию мРНК *AZIN1*, кодирующую регулятор уровня полиаминов в клетке. Было показано, что при снижении уровня полиаминов рибосомы, транслирующие короткую рамку

считывания в 5'НТО, инициирующую на AUU кодоне, испытывают паузу при декодировании Pro-Pro-Trp (PPW) мотива. Это приводит к образованию “очереди” из элонгирующих рибосом, позиционированию 43S PIC на AUU кодоне, и, как следствие, к более эффективной инициации на AUU (рис. 5, [59]).



**Рис. 6** Регуляция инициации на AUU кодоне мРНК AZIN1 за счет паузы элонгирующей рибосомы [59]

Эффективность инициации на неоптимальных кодонах может динамично регулироваться за счет появления препятствия (как в случае с AZIN1), так и при изменении количества или активности факторов инициации, отвечающих за выбор стартового кодона. Например, eIF1 способен регулировать собственную трансляцию, поскольку его мРНК имеет слабый стартовый кодон. Было показано, что избыток eIF1 подавляет его собственную продукцию, в то время как недостаток eIF1 стимулирует трансляцию собственной мРНК [60]. Сигнальные пути, приводящие к изменению эффективности инициации на неоптимальных стартовых кодонах, еще предстоит изучить.

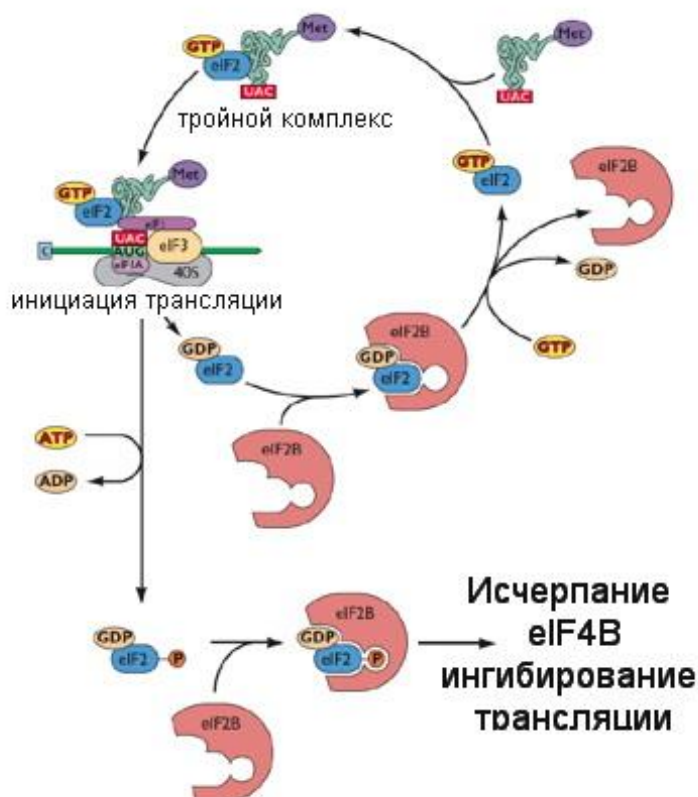
1.2.4. Короткие рамки считывания uORF – реинициация и регуляция трансляции при стрессе

В 5'НТО млекопитающих обнаруживается множество стартовых кодонов, находящихся раньше старта трансляции основной рамки считывания. Как минимум 20% мРНК содержат эволюционно консервативные uORF, иницирующие с AUG кодона [61]. uORF в большинстве случаев ингибируют трансляцию основной рамки считывания – ведь они не только “забирают” значительную часть сканирующих рибосом, но и препятствуют сканированию за счет того, что транслирующие 80S создают препятствие для сканирующих рибосом [62-64].

Однако, если сканирующая рибосома узнала старт uORF и начала ее транслировать, это не значит, что она уже не сможет добраться до основного старта трансляции. Возобновление трансляции после прочтения uORF получило название реинициации. Несмотря на некоторый прогресс в изучении молекулярных механизмов реинициации, многое до сих остается неясным. Считается, что длина uORF играет важную роль в эффективности реинициации – чем короче uORF, тем эффективнее протекает реинициация. Согласно современным представлениям, реинициация возможна потому, что некоторые инициаторные факторы (в частности – eIF3) после узнавания uAUG не сразу диссоциируют с рибосомы, но могут какое-то время оставаться в непосредственной близости от 40S в составе элонгирующей 80S. После терминации трансляции, эти факторы снова приводят к образованию 43S PIC, который продолжает сканирование в поисках следующего старта [65, 66]. При трансляции длинных uORF, или же uORF, которые медленно декодируются рибосомой, инициаторные факторы полностью диссоциируют, что препятствует реинициации. Однако, в некоторых случаях, реинициация возможна и после прочтения длинной рамки и регулируется цис-действующими элементами в мРНК. Так, в случае с бицистронной мРНК из Calicivirus, которая кодирует мажорный и минорный капсидные белки VP1 и VP2 соответственно,

реинициация и трансляция VP2 зависит от 70 нуклеотидного мотива TURBS (Termination Upstream Ribosomal Binding Site) [67]. Ввиду невозможности уместить все известные факторы в данном литературном обзоре, я не буду подробно останавливаться на механизмах реинициации.

Необходимо отметить, что реинициация трансляции после прочтения коротких рамок считывания несколько отличается от обычного поведения 43S PIC. Считается, что при реинициации сканирующая рибосома может какое-то время двигаться “вслепую” без тройного комплекса met-tRNAi/eIF2/GTP. Концентрация тройного комплекса в клетке определяет, через какое именно время реиницирующая рибосома загрузится тройным комплексом – такой феномен получил название отложенная реинициация (delayed reinitiation). Отложенная реинициация, как считается в литературе, играет важную роль в трансляционном контроле некоторых мРНК при интегральном стрессовом ответе (Integrated Stress Response, ISR).



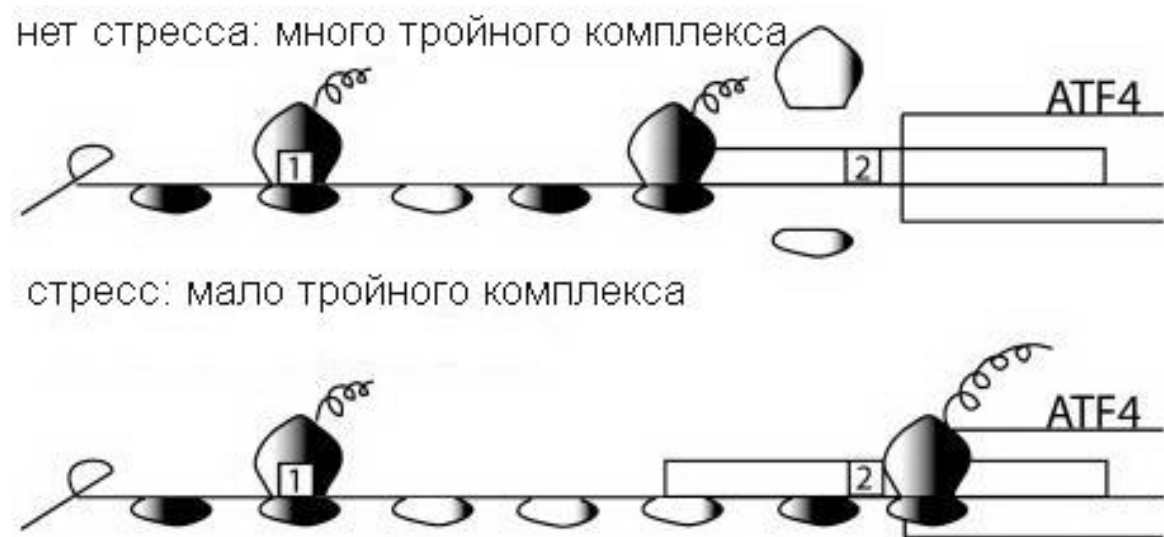
**Рис. 7.** Регуляция трансляции за счет фосфорилирования eIF2.

Как уже упоминалось, после успешного раунда инициации eIF2-ГДФ высвобождается из комплекса с рибосомой. Для того, чтобы eIF2 был

способен вновь участвовать в последующих раундах инициации, необходимо произвести обмен ГДФ на ГТФ, за этот обмен отвечает специализированный фактор eIF2B. Именно стадия “перезарядки” eIF2 регулируется четырьмя разными киназами: HRI, PERK, PKR и GCN2. Эти киназы в ответ на различные стрессовые стимулы, такие как стресс несвернутых белков (PERK), недостаток гема (HRI), узнавание двухцепочечной РНК при вирусной инфекции (PKR) или накопление деацилированной тРНК вследствие дефицита аминокислот (GCN2), фосфорилируют Ser51 в альфа субъединице eIF2. Фосфорилированный eIF2 связывается с eIF2B в неактивный комплекс, что приводит к быстрому истощению активного тройного комплекса и к глобальному падению белкового синтеза. Именно из-за вовлеченности совершенно разных сигнальных путей в фосфорилирование одной и той же аминокислоты инициаторного фактора этот путь получил название интегрального стрессового ответа [68, 69].

Известно, что развитие ISR, несмотря на подавление глобальной трансляции, приводит к стимуляции трансляции некоторых мРНК, содержащих систему uORF. Наиболее изученные случаи – трансляционный контроль мРНК *GCN4* у дрожжей [70-72] и мРНК *ATF4* у млекопитающих [73, 74], которые, как считаются, регулируются сходным образом. Рассмотрим регуляцию на примере *ATF4*. мРНК *ATF4* имеет в своем 5'НТО две uORF; первая uORF<sub>1</sub> короткая и позволяет эффективную реинициацию, вторая uORF<sub>2</sub> - длинная и перекрывается с основной рамкой считывания. Трансляция uORF<sub>2</sub> сильно ингибирует трансляцию основной рамки считывания, поскольку реинициация на основном старте невозможна из-за перекрывания рамок (считается, что рибосома обычно не может реиницировать, если терминация происходит после стартового кодона). В нормальных условиях, рибосома узнает uORF<sub>1</sub>, а затем реиницирует на uORF<sub>2</sub>, что приводит к подавлению синтеза *ATF4*. В

условиях стресса, после трансляции uORF<sub>1</sub> происходит отложенная реинициация – сканирующая рибосома загружается тройным комплексом уже после того, как она просканирует сквозь стартовый кодон uORF<sub>2</sub>. Отложенная реинициация, таким образом, позволяет стимулировать трансляцию ATF4 в условиях недостатка тройного комплекса.



**Рис. 8.** Механизм отложенной реинициации позволяет мРНК ATF4 активно транслироваться в условиях ISR [74]

Механизм отложенной реинициации - как минимум не единственный механизм, позволяющий регулировать трансляцию мРНК при помощи uORF в условиях подавления активности фактора инициации eIF2. Например, избирательная трансляция мРНК *DDIT3* при стрессе требует наличия одной uORF в 5'НТО [75]. Более подробному рассмотрению данного вопроса посвящен раздел в результатах.

### 1.3 Влияние цис-действующих элементов в 3'НТО на инициацию трансляции

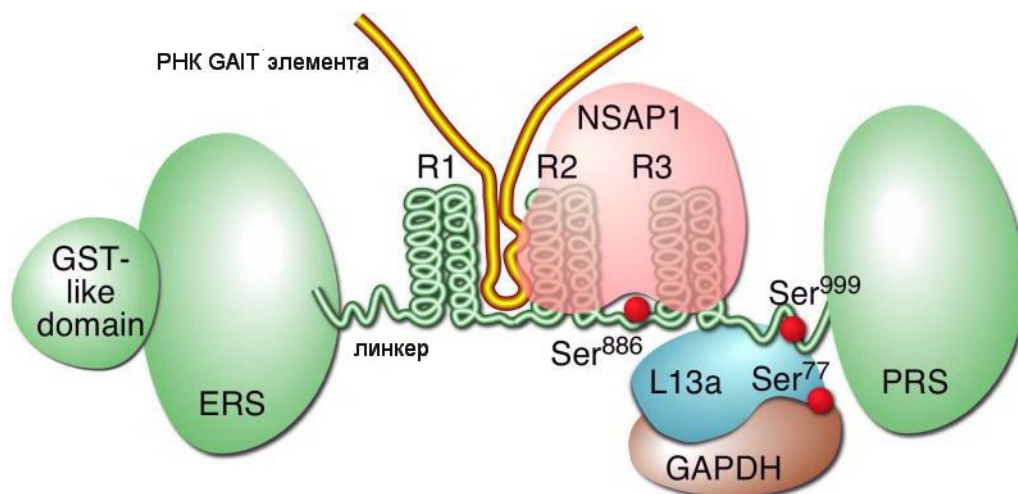
3'НТО эукариотических мРНК часто бывают гораздо длиннее 5'НТО. Роль этих некодирующих участков мРНК по всей видимости в первую очередь заключается в регуляции стабильности мРНК [76], они также отвечают за локализацию мРНК в клетке, и даже за локализацию закодированных в мРНК белков [77]. Наиболее известные элементы в 3'НТО, которые ответственны за регуляцию экспрессии - сайты связывания микроРНК. В качестве других регуляторных цис-действующих элементов, отвечающих за стабильность мРНК, приведем несколько примеров. Так, AU-богатые элементы (AU-rich elements (AREs)) считаются наиболее распространёнными цис-действующими элементами, регулирующими стабильность мРНК млекопитающих [78-80].

Основной мотив ARE выглядит следующим образом: AUUUA. Считается, что ARE узнаются специализированными РНК-связывающими белками, AUF1 [81], KSRP [82], HuR [83], NF90 [84], TIA-1 и TIAR [85, 86], которые конкурируют между собой. Другой пример – GU богатые элементы (GU-rich elements, GRE), которые обнаруживаются в 5% мРНК человека [87, 88]. Классический мотив GRE выглядит следующим образом: GUUUG. Этот элемент способен связывать такие белки, как CUGBP1 и CUGBP2 [88]. Эти, а также некоторые другие известные цис-действующие элементы в первую очередь отвечают за стабильность мРНК, поэтому я не буду подробно на них останавливаться, а сфокусируюсь на тех элементах, которые по литературным данным влияют на инициацию трансляции.

### 1.3.1. GAIT элемент

Система ингибирования трансляции, активируемая интерфероном гамма, опосредует мРНК специфическое подавление трансляции. В миелоидных клетках, IFN- $\gamma$  индуцирует образование мульти-субъединичного комплекса GAIT, который связывается с цис-элементами GAIT в 3'НТО ряда мРНК,

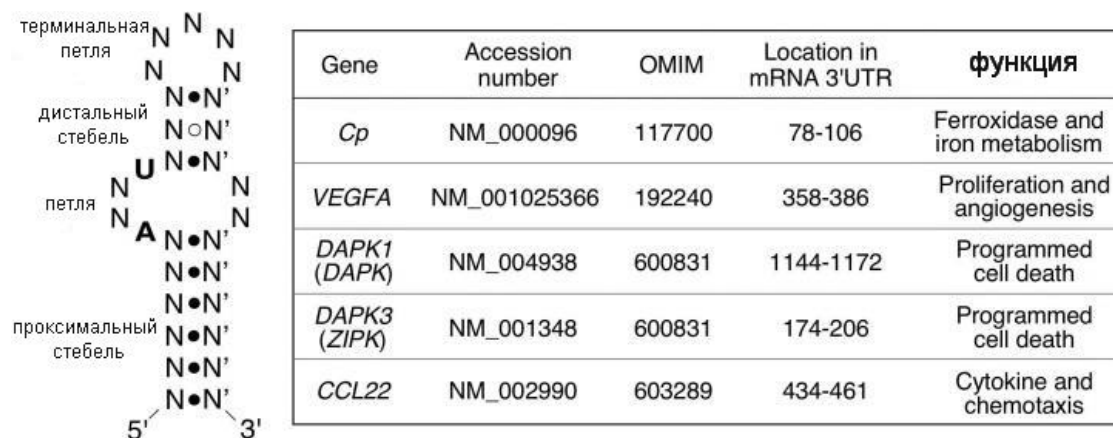
связанных с воспалением – таких как мРНК *CP* и *VEGF-A* [89]. Связывание GAIT приводит к подавлению трансляции мРНК.



**Рис. 9.** GAIT элемент связывает специфический белковый комплекс, вовлеченный в регуляцию трансляции [89].

GAIT комплекс состоит из четырех белков: глутамил-пролил тРНК синтетазы (EPRS), NS1-ассоциированного белка (NSAP1), рибосомного белка L13a (L13a), и глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH). Сборка GAIT комплекса активируется киназным сигнальным каскадом, который запускает IFN- $\gamma$ : активация киназ CDK5, mTORC1, и S6K1 индуцирует высвобождение EPRS из мультикомплекса аминокислот тРНК синтетаз (multi-aminoacyl tRNA synthetase complex) и связывание EPRS с NSAP1. В результате образуется “pre-GAIT” комплекс. Затем, сигналинг, опосредованный киназами DAPK и ZIPK, приводит к высвобождению L13a из 60S рибосомной субъединицы и его связыванию с GAPDH. Два комплекса связываются друг с другом и образуют функциональный комплекс GAIT (рис. 9). Каждый компонент комплекса имеет свою роль: EPRS связывает GAIT элемент в мРНК, NSAP1 ингибирует связывание мРНК, GAPDH защищает L13a от протеасомной деградации. L13a является

ключевым элементом системы регуляции трансляции – он взаимодействует с eIF4G и, таким образом, блокирует посадку 43S на мРНК. L13a связывается в непосредственной близости, или прямо с тем участком eIF4G, который связывает eIF3 [90].



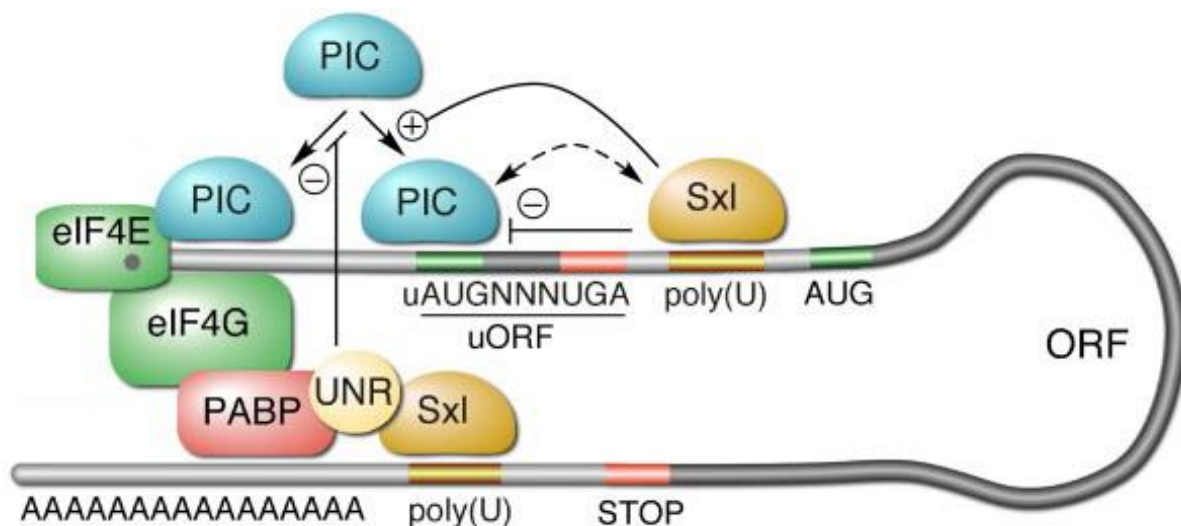
**Рис. 10** Вторичная структура GAIT РНК элемента, и некоторые мРНК, в которых обнаружен этот элемент [89].

### 1.3.2. РНК-связывающий белок SXL (Sex lethal) и репрессия трансляции мРНК *msl-2*

Трансляционный контроль мРНК *msl-2* у дрозофилы при помощи РНК-связывающего белка SXL – один из первых примеров регуляции трансляции специфических мРНК при помощи РНК-связывающих белков. Продукт трансляции MSL2 необходим для образования комплекса dosage compensation у мух мужского пола, который обеспечивает активную транскрипцию с единственной X-хромосомы [91]. Подавление трансляции мРНК *msl-2* необходимо для выживания особей женского пола. Репрессия трансляции осуществляется за счет связывания белка SXL с U-богатыми участками, расположенными в 5'НТО и в 3'НТО мРНК *msl-2*. Интересно, что элементы в 5'НТО и в 3'НТО подавляют трансляцию разными способами и аддитивно усиливают репрессию. Считается, что наличие

двух типов репрессорных элементов необходимо для полного подавления трансляции [92].

Элемент, расположенный в 3'НТО, действует следующим образом: SXL связывается совместно с ко-репрессорным белком UNR (Upstream of N-Ras) [93-96]. UNR, находящийся в составе репрессорного комплекса, взаимодействует с PABP, что является необходимым для подавления трансляции [97]. Интересно, что UNR не нарушает взаимодействие PABP с eIF4G, возникающее при циклизации мРНК, но каким-то образом блокирует присоединение 40S субъединицы [97]. Возможно, что UNR может нарушать взаимодействие eIF4G с eIF3.



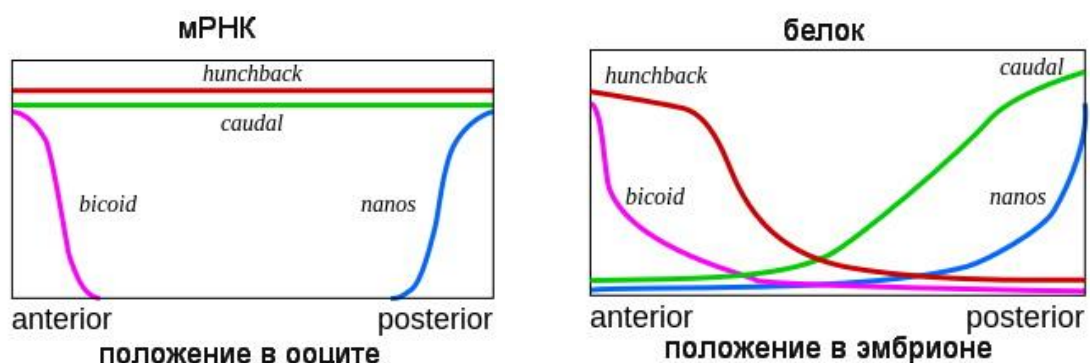
**Рис. 11.** Механизм двойной репрессии трансляции мРНК *msl-2* дрозофилы за счет cis-действующих элементов в 5' и 3'НТО [92]

Элемент в 5'НТО действует по-другому. мРНК *msl-2* содержит три uORF пред сайтом связывания SXL, но в регуляции трансляции принимает участие только последняя uORF (которая расположена ближе всего к сайту связывания SXL). Было показано, что связывание SXL приводит к повышенной инициации на uAUG и к замедлению последующего сканирования. Интересно, что замена сайта связывания SXL на сайт связывания другого РНК-связывающего белка, РТВ, не приводила к

репрессии трансляции, зависимой от uAUG [98]. Таким образом, SXL по всей видимости специфически взаимодействует с каким-то компонентом трансляционного аппарата, однако эти детали пока остаются невыясненными. Наиболее интересными кандидатами, которые могут опосредовать специфический эффект SXL на трансляцию, являются субъединицы eIF3 - eIF3I и eIF3H, которые способны специфически взаимодействовать с SXL [98].

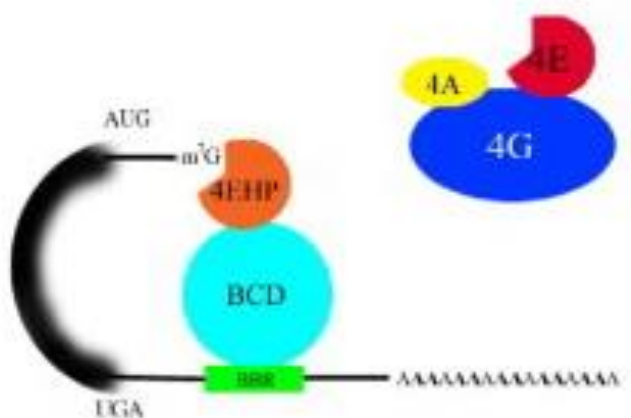
### 1.3.3. Трансляционный контроль при формировании передне-задней оси симметрии у дрозофилы с участием кеп-связывающего белка 4E-HP

Caudal и Hunchback являются одними из наиболее важных генов материнского эффекта у дрозофилы, которые начинают транслироваться при оплодотворении и образуют градиенты концентрации соответствующих транскрипционных факторов, которые отвечают за формирование головы и брюшка. Интересно, что мРНК этих факторов распределена по всему яйцу, в то время как трансляция локализована в нужном сегменте яйца.



**Рис. 12.** Распределение мРНК и белков BICOID и HUNCHBACK в раннем эмбрионе дрозофилы

мРНК *CAUDAL* репрессируется на трансляционном уровне за счет связывания BICOID с цис-действующим элементом в 3'НТО, получившим название Bicoid Responsible Element (BRE). BICOID, в свою очередь, связывает белок 4E-HP – гомолог фактора инициации eIF4E. Интересно, что сайт связывания Bicoid и 4E-HP похож на сайт связывания eIF4G и eIF4E – YxxxxLφ. Более того, 4E-HP также способен связывать m<sup>7</sup>G-кеп структуру. Таким образом, 4E-HP, связываясь с кепом, препятствует связыванию eIF4F и подавляет трансляцию в тех участках эмбриона, где много адапторного белка BICOID [99].



**Рис. 13.** Репрессия трансляции за счет связывания белка 4E-HP с BICOID на цис-действующем элементе BRE в 3'НТО мРНК *CAUDAL* [99].

4E-HP также участвует в подавлении трансляции мРНК *HUNCHBACK* в заднем отделе эмбриона. 3'НТО *HUNCHBACK* содержит цис-действующий элемент Nanos-response element (NRE), который связывает белковый комплекс, состоящий из Nanos, Pumilio и Brain Tumor (BRAT и NHL-domain содержащий белок) [100]. 4E-HP в этом случае рекрутируется на мРНК за счет взаимодействия с NHL доменом белка BRAT.



дефосфорилирования MASKIN при прогрессии клеточного цикла (с помощью киназы CDK1 и фосфатазы CALCINEURIN). Это способствует диссоциации MASKIN и eIF4E и активации трансляции [102-104].

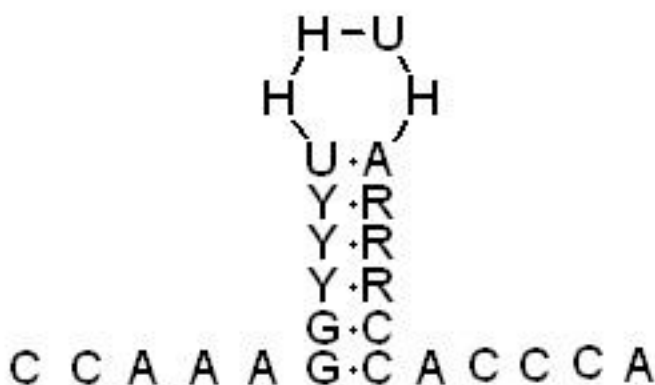
### 1.3.5. Белки, содержащие MIF4G домен, которые регулируют трансляцию через 3'НТО

До сих пор были описаны случаи, когда белковые комплексы, связываясь с 3'НТО, подавляют инициацию трансляции мРНК. В работе [105] был открыт белок MEXTL1 (MXT), который, наоборот, промотирует инициацию трансляции в процессе эмбриогенеза у дрозофилы. N-концевой регион MXT (аминокислота 1-130) содержит домен MIF4G, который обнаруживается, в частности, у фактора инициации eIF4G. За ним следует РНК-связывающий домен KH-domain, а на С-конце белка обнаруживается “канонический” сайт связывания eIF4E - YXXXXLL (аминокислоты 581 – 587). Ортологи MXT есть у всех видов *Drosophilidae*, а также у *Caenorhabditis elegans*, но отсутствуют у позвоночных.

Было показано, что MXT взаимодействует с eIF4E и с eIF3, но не взаимодействует с eIF4A. MXT, связанный с eIF4E, способен связываться с m<sup>7</sup>G-кепом. Трансляция кеп-зависимой репортерной мРНК в бесклеточной системе, полученной из мутантных мух (MXT с мутацией, препятствующей связыванию с eIF4E), была значительно подавлена, и стимулировалась при добавлении рекомбинантного белка дикого типа. Из этого эксперимента был сделан вывод, что MXT стимулирует трансляцию, однако остается непонятным специфичность действия MXT. По всей видимости, MXT не универсальный, а специфический фактор инициации трансляции, который регулирует определенный набор мРНК. Интересно, что MXT и eIF4E взаимодействуют таким образом, что комплекс,

вероятно, не разрушается 4E-ВР [106]. Вероятно, что трансляция мРНК, зависимых от МХТ, должна быть устойчива к инактивации mTOR.

Другой пример – регуляция трансляции гистоновых мРНК с помощью белка SLIP1. Отличительной чертой мРНК гистонов является отсутствие в их 3'НТО полиА хвоста, вместо этого на конце мРНК находится специфическая шпилечная структура.

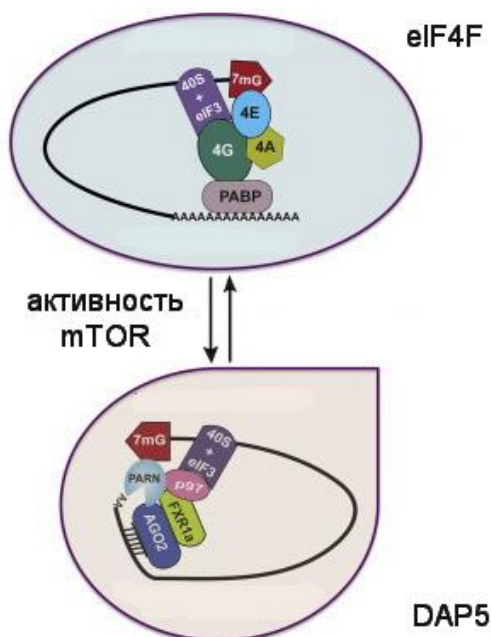


**Рис. 15.** Шпилечная структура в 3'НТО гистоновых мРНК.

Со шпилечной структурой связывается РНК-связывающий белок SLBP, который, в свою очередь, связывает белок SLIP1 (SLBP-interacting protein 1). SLIP1 содержит MIF4G домен. Было показано, что SLIP1 стимулирует трансляцию репортерной мРНК с 3'НТО гистонов [107]. SLIP1 связывает субъединицу фактора инициации eIF3 – eIF3E, и это взаимодействие необходимо для эффективной трансляции гистонов в S-фазе клеточного цикла [108]). Предполагается, что взаимодействие SLIP1 с 3'НТО мРНК гистонов и с eIF3 способно стимулировать трансляцию за счет циркуляризации мРНК на мРНК без поли-А хвоста.

Еще один пример, когда eIF4G подобный белок способен стимулировать трансляцию мРНК, связываясь в 3'НТО – был описан относительно недавно для фактора инициации трансляции eIF4G2 (DAP5).

DAP5 также имеет MIF4G домен, связывает eIF3 и eIF4A, но не связывает eIF4E и PABP [109, 110].



**Рис. 16.** Специфический миРНП промотирует связывание DAP5 и неканоническую инициацию трансляции в G-0 клетках.

В работе [111] был предложен механизм, по которому DAP5 рекрутируется на 3'НТО мРНК через специфический комплекс с микро-РНК, образующийся в G0 клетках и в незрелых ооцитах. В таких клетках, каноническая кеп-зависимая трансляция подавлена из-за низкой активности mTOR, и из-за укорочения поли-А хвостов мРНК. Ранее было показано, что в таких условиях микро-РНК каким-то образом активируют трансляцию [112, 113]. В этих условиях на мРНК в 3'НТО образуется рибонуклеопротеиновый комплекс, содержащий микро-РНК, AGO2, и РНК-связывающий белок FXR1A, но не содержит канонический компонент микроРНП комплексов, GW182. Такой микро-РНП рекрутирует DAP5 и PARN, причем PARN связывается с m<sup>7</sup>G кепом мРНК, привлекая остальные компоненты трансляционной машинерии на 5'конец мРНК. Этот механизм позволяет мРНК транслироваться независимо от наличия и активности eIF4F [111, 114].

Стоит отметить, что это пока единственная работа, в которой предложен механизм, каким образом DAP5 привлекается на специфические мРНК для регуляции трансляции. В том, что DAP5

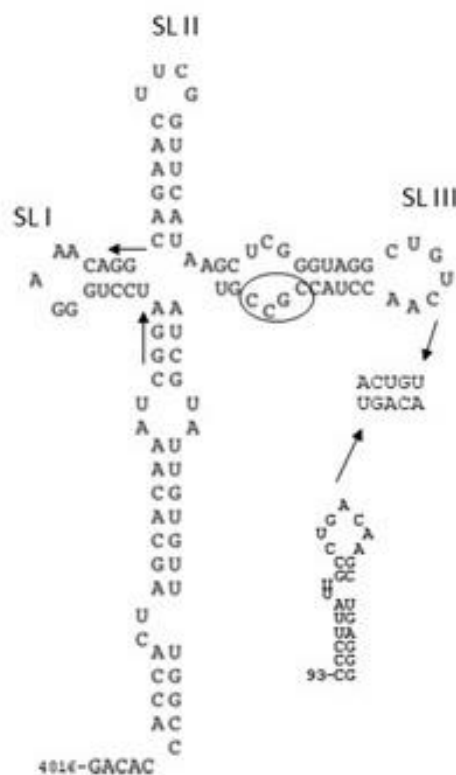
регулирует трансляцию определенного набора мРНК, не возникает никаких сомнений [115-120]. Интересно, всегда ли DAP5 привлекается на свои мРНК мишени через микро-РНК, или существуют какие-то другие адапторные РНК-связывающие белки и цис-действующие элементы.

#### 1.3.6. 3' кеп независимые энхансеры в 3'НТО (CITE) мРНК вирусов растений

До сих пор были описаны случаи, когда компоненты трансляционного аппарата или репрессоры трансляции привлекаются на 3'НТО мРНК с помощью адапторных РНК-связывающих белков. У множества вирусов растений из семейства *Tombusviridae* и рода *Luteovirus*, обнаружены цис-действующие элементы в 3'НТО, которые связывают компоненты трансляционного аппарата и стимулируют кеп-независимую трансляцию. Эти элементы получили название 3'CITE (Cap Independent Translation Enhancers in 3'UTR). На данный момент известно несколько типов CITE, которые отличаются по структурной организации и по связыванию различных компонентов трансляционного аппарата. Рассмотрим несколько примеров CITE, связывающих три различных компонента трансляционного аппарата – eIF4G, eIF4E, и рибосому (существует несколько структурно различных классов CITE, которые связывают один и тот же компонент трансляционного аппарата, они будут рассматриваться по одному примеру)

##### . 1.3.6.1 ВТЕ CITE и связывание eIF4G.

Этот элемент был впервые обнаружен у Barley yellow dwarf virus (BYDV), и присутствует у всех представителей родов *Luteovirus* (семейство *Luteoviridae*), *Necrovirus*, *Dianthovirus*, и *Umbravirus* (семейство *Tombusviridae*).

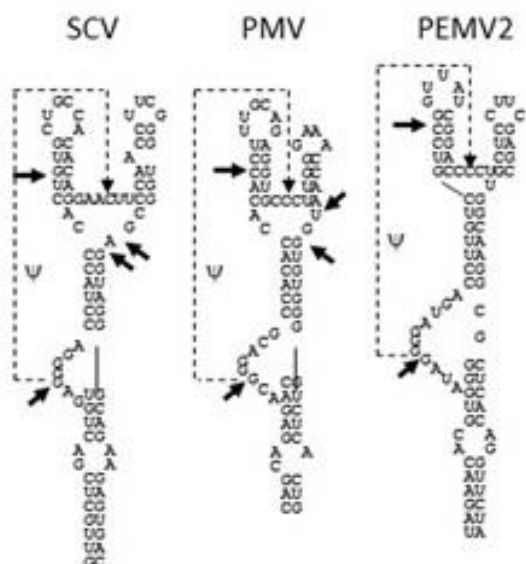


**Рис. 17.** Вторичная структура 3' CITE из вируса BYDV [121]. Кругом выделены нуклеотиды, защищаемы eIF4G.

ВТЕ связывает eIF4F через взаимодействие с eIF4G с высокой аффинностью ( $K_d = 177$  нМ) [122]. При этом связывание с eIF4F происходит еще эффективнее ( $K_d = 37$  нМ). Для активации кеп независимой трансляции, достаточно фрагмента eIF4G, содержащего сайты связывания eIF4A и eIF3, а также близлежащий РНК-связывающий домен; при этом сайты связывания eIF4E и РАВР не нужны [123-125].

#### 1.3.6.2. РТЕ CITE связывает eIF4E

Первый представитель этого типа CITE был обнаружен в мРНК *Panicum mosaic virus* (PMV) [126], а затем – и у мРНК вируса *Pea Enation Mosaic Virus RNA 2* (PEMV2) (*Tombusviridae*) [127].



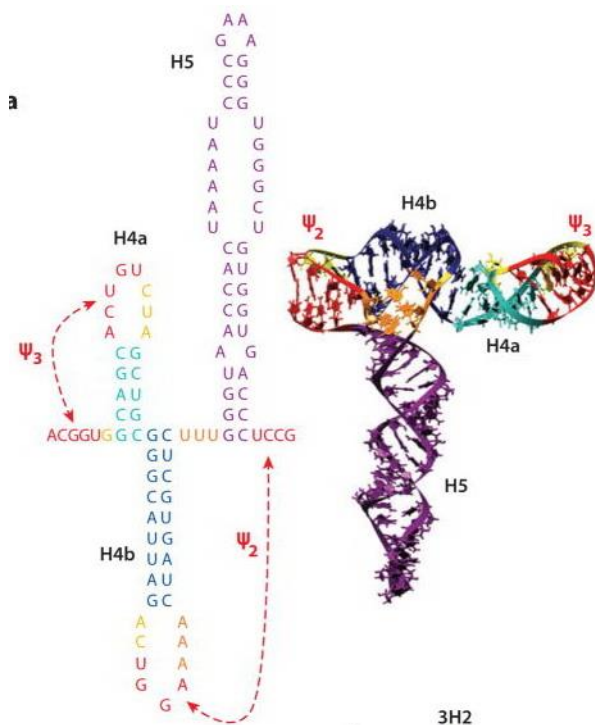
**Рис. 18.** Структурная организация РТЕ из *Saguaro cactus virus* (SCV), *Panicum mosaic virus* (PMV), *Pea enation mosaic virus* RNA 2 (PEMV2). Пунктиром обозначены участки мРНК, образующие псевдоузел.

РТЕ состоит из участка с двумя апикальными шпилечными структурами, соединенными пиримидин-богатым участком, который вовлечен в образование псевдоузла с дистальной частью шпилечной структуры (рис. 18).

Наиболее хорошо функционально изучен РТЕ из PEMV2. Было показано, что этот РТЕ с высокой аффинностью связывает eIF4E ( $K_d = 58$  пМ) даже в отсутствии eIF4G, при этом аффинность eIF4F к РТЕ не меняется по сравнению с одним eIF4E [127]. eIF4E связывается в области формирования псевдоузла, при этом одно из оснований в дистальной части структуры (G<sub>17</sub> в случае PEMV2 РТЕ) проникает непосредственно в кеп-связывающий пакет eIF4E и стабилизирует связывание фактора с цис-действующим элементом [128].

#### 1.3.6.3. TSS CITE связывает 60S субъединицу рибосомы

CITE этого типа был впервые обнаружен у *Turnip Crinkle Virus* (TCV) [129].



**Рис. 19.** Структурная организация TSS CITE из Turnip crinkle virus (TCV) [130]

Этот элемент состоит из трех шпилечных структур и двух псевдоузлов. TCV TSS связывается с 80S и 60S субъединицей рибосомы из дрожжей и *Arabidopsis*, и это взаимодействие важно для кеп-независимой инициации трансляции [131]. Было показано, что TCV TSS конкурирует с тРНК в Р-сайте рибосомы [131]. До сих пор неопубликованные структурные данные группы И. Франка о комплексе TSS с рибосомой говорят о том, что TSS непосредственно размещается в Р-сайте, взаимодействуя со шпильками H<sub>89</sub>/H<sub>90</sub> пептидил-трансферазного центра рибосомы, а также со шпильками H<sub>69</sub> и H<sub>95</sub> в 25S рРНК и рибосомными белками L10 и L11 [130].

#### 1.4Эпитранскриптомный контроль трансляции

РНК в клетке может подвергаться более 100 химических модификаций [132], в основном они обнаруживаются в некодирующих РНК, таких как рРНК и тРНК. Однако, все больший интерес вызывают модификации в мРНК.

Еще в 70х годах прошлого века было показано, что мРНК млекопитающих могут подвергаться химическим модификациям, и самая распространенная модификация, обнаруживаемая в мРНК – метилирование аденозина по N6 положению ( $m^6A$ ) [133]. На данный момент известно еще несколько менее распространенных модификаций в мРНК, но я не буду подробно на них останавливаться и сфокусируюсь на  $m^6A$ , поскольку именно эта

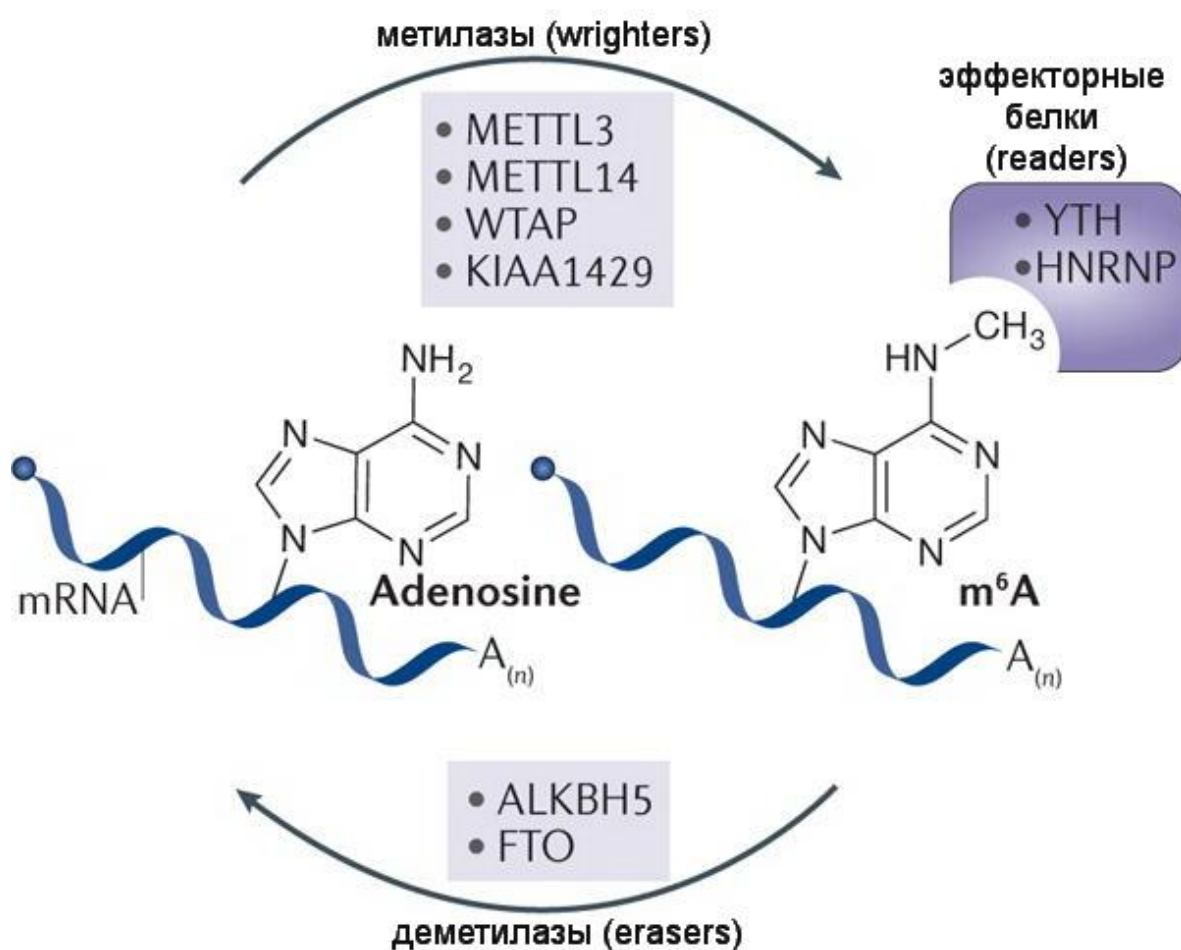


Рис. 20. Белки, вовлеченные в модификацию  $m^6A$  в мРНК млекопитающих [134].

модификация, как оказалось, играет важнейшую роль в регуляции трансляции.

Несмотря на то, что о  $m^6A$  в мРНК было известно довольно давно, всплеск интереса к этой модификации в мРНК возник в тот момент, когда стало понятно, что данная модификация обратима. На данный момент известны белки, которые участвуют в метилировании мРНК (их называют writers), в деметилировании мРНК (erasers), а также в узнавании метилированных аденозинов в мРНК (readers) [134].

Разработка полногеномных методов анализа последовательностей РНК с использованием антитела, узнающего  $m^6A$ , позволила определить расположение модифицированных оснований в мРНК. Было обнаружено более чем 10000 сайтов метилирования аденозина в более чем 25% мРНК. Наиболее часто эти сайты встречаются в длинных экзонах, около стоп-кодонов и в 3'НТО. В 5'НТО также обнаруживаются  $m^6A$ , при этом уровень метилирования в 5'НТО сильно варьирует в зависимости от организма, клеточных линий и условий роста клеток [135-137].

N6-метилирование аденозина контролирует практически каждую стадию жизни мРНК, от процессинга мРНК в ядре до деградации мРНК в цитоплазме. Нас в первую очередь интересует роль  $m^6A$  в регуляции трансляции. Первые указания на то, что  $m^6A$  вовлечен в регуляцию трансляции, были получены в 1996 году – тогда было показано, что внутренние  $m^6A$  в мРНК *DHFR* повышают эффективность трансляции *in vitro* [138, 139]. Затем, с помощью рибосомного профайлинга было показано, что белок YTHDF1, который узнает  $m^6A$ , способен стимулировать трансляцию метилированных мРНК [140]. Используя так называемый tethering assay – подход, при котором белок, слитый с  $\lambda$  пептидом, специфически привлекается на репортерную мРНК, содержащую в 3'НТО шпилечные структуры BoxB, авторы показали, что N-концевая часть белка YTHDF1 стимулирует трансляцию репортера. Также, было показано, что N-концевая часть белка YTHDF1 напрямую (не через РНК) способна связывать компоненты трансляционного аппарата –

eIF3 и 40S [140]. Однако, в следующей работе было показано, что eIF3 способен напрямую связывать m<sup>6</sup>A без помощи YTHDF1 [141]. Удивительно, но единственный остаток m<sup>6</sup>A в 5'НТО репортерной мРНК позволил собрать инициаторный комплекс из очищенных компонентов без участия факторов инициации четвертой группы. Более того, оказалось, что мРНК, содержащие m<sup>6</sup>A в 5'НТО, способны эффективно транслироваться в лизате HeLa, в котором отсутствует eIF4E. Интересно, что введение шпилечной структуры на 5'конец мРНК с m<sup>6</sup>A значительно ингибировало трансляцию, что говорит о том, что посадка 43S PIC происходит на 5'конец мРНК [141].

Каким именно образом происходит регуляция трансляции за счет m<sup>6</sup>A, во многом до сих пор остается неясным. Суммируя вышесказанное, можно сделать следующие выводы: m<sup>6</sup>A напрямую (или через “readers”) способна привлекать компоненты трансляционного аппарата на 5'НТО или 3'НТО, которые, в свою очередь, стимулируют кеп-независимую трансляцию. Каким образом eIF3 связывает m<sup>6</sup>A, и каким образом сканирование может происходить без факторов инициации 4 группы, остается неясным. Данный способ регуляции трансляции напоминает описанный выше механизм вирусных CITE, но с одним большим отличием – m<sup>6</sup>A является динамической модификацией в отличие от цис-действующих элементов в мРНК, закодированных в геноме. Одна и та же мРНК может иметь или не иметь модификации в зависимости от активности метилаз и деметилаз в определенных условиях, что делает изучение данного механизма регуляции трансляции весьма сложным.

Подводя итог, в данном разделе мы рассмотрели основные аспекты классического механизма кеп-зависимого сканирования у эукариот, а также свойства 5'НТО и 3'НТО мРНК, которые влияют на эффективность инициации трансляции, на выбор стартового кодона, и на дифференциальную регуляцию трансляции при стрессовых условиях.

Стоит отметить тот факт, что несмотря на то, что механизм сканирования был открыт довольно давно и на данный момент является общепринятым, мы до сих пор не знаем множество деталей этого процесса, и даже близко не знаем всех тех белков, которые регулируют сканирование.

### 1.5 Внутренняя инициация трансляции

В тот момент, когда стало ясно, что m<sup>7</sup>G кеп критически важен для инициации трансляции, стало очевидно, что должен существовать альтернативный механизм инициации трансляции. Дело в том, что геномные РНК ряда РНК-содержащих вирусов, реплицирующихся исключительно в цитоплазме, не имеют m<sup>7</sup>G кепы и содержат множество AUG кодонов в 5'НТО. Эти РНК, тем не менее, каким-то образом транслируются. В конце 1980 годов, был открыт механизм, получивший название внутренней инициации. Этот механизм, сформулированный при изучении трансляции мРНК полиовируса (PV) [142, 143] и вируса энцефаломиокардита (EMCV) [144], заключается в следующем – на этих мРНК рибосома и факторы инициации непосредственно садятся внутрь мРНК, а затем иницируют на нужном стартовом кодоне.. Соответственно, структурные элементы 5'НТО, опосредующие внутреннюю инициацию, получили название сайта внутренней посадки рибосомы (Internal Ribosome Entry Site, IRES). Самая главная, и, пожалуй, единственная особенность механизма внутренней инициации – инициация происходит без участия 5'конца мРНК, и, соответственно, без стадии аккомодации 43S PIC на 5'конце мРНК. Связывание 43S PIC происходит непосредственно с IRES-элементами, которые могут быть расположены в сотнях нуклеотидов от 5'конца РНК.

На данный момент хороши изучены и охарактеризованы 4 типа вирусных IRES элементов [145]. Несколько недавно охарактеризованных

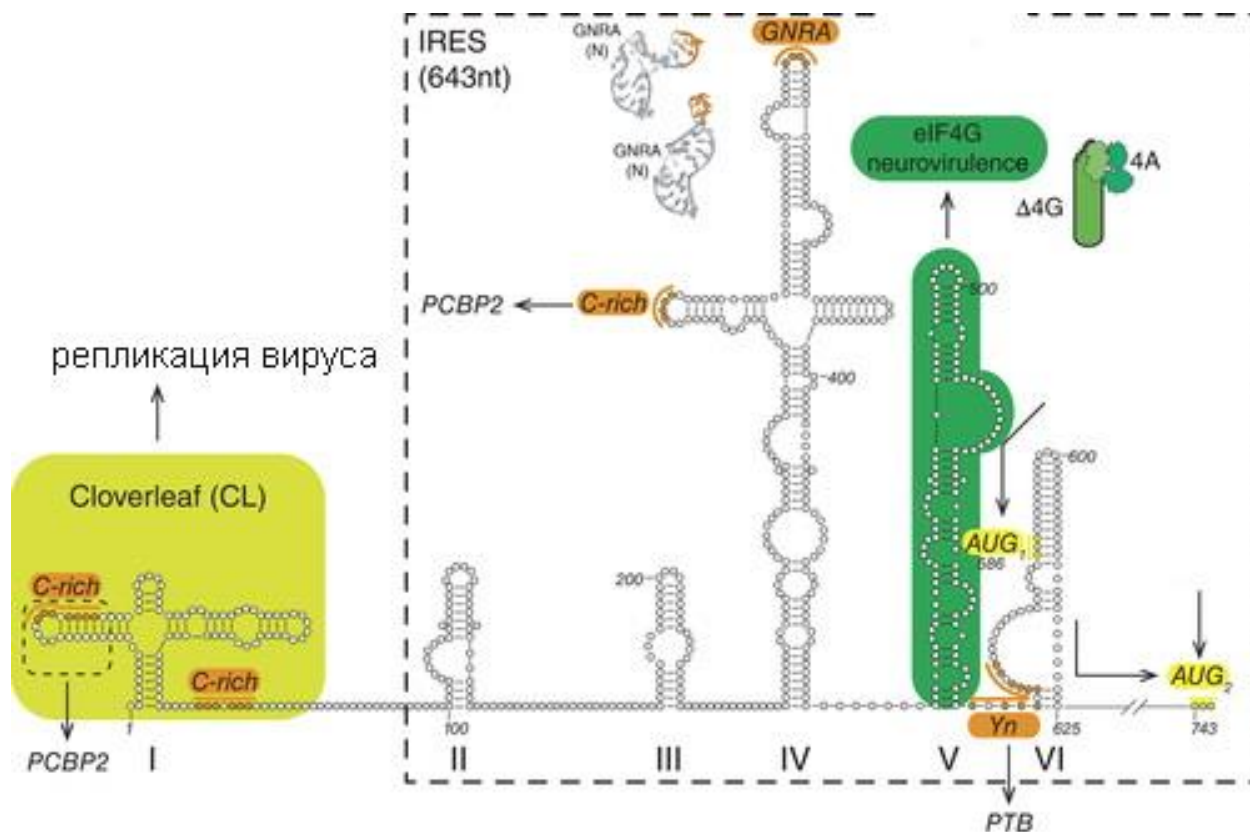
экзотических вирусных IRES элементов, которые, по всей видимости, не относятся ни к одному из четырех типов, в данном обзоре не будут обсуждаться в целях экономии места. Механизмы инициации трансляции на IRES-элементах четырех типов отличаются кардинальным образом. В то время как одни IRES-элементы используют полный набор факторов инициации и дополнительные белковые факторы ITAF (IRES Trans Acting Factors), для других не нужен ни один фактор инициации. На одних IRES-элементах, инициация протекает без сканирования – рибосома позиционируется прямо на стартовый кодон, в то время как на других IRES-элементах, после внутренней посадки рибосома вовлекается в сканирование десятков, а то и сотен нуклеотидов, для достижения стартового кодона. Наконец, некоторые IRES элементы обходятся не только без инициаторных факторов, но даже без Met-tRNA<sub>i</sub>. Рассмотрим особенности функционирования четырех групп вирусных IRES элементов.

#### 1.5.1. IRES элементы типа I

Встречаются в основном у вирусов семейства *Picornaviridae*, таких, как Poliovirus (PV), Coxsackievirus B3 (CVB3), Human Rhino Virus (HRV) и др. В качестве примера, рассмотрим IRES полиовируса.

5'НТО полиовируса имеет длину 743 нуклеотида и содержит 6 структурных доменов (рис. 21). Для функционирования IRES-элемента, необходимы домены II-VI (домен I нужен для репликации плюс и минус цепей вирусной мРНК [146], [147]). Кроме того, домен III и домен VI по всей видимости не являются критически необходимыми для внутренней инициации [148, 149]. Интересно отметить, что в домене VI находится AUG кодон (AUG<sub>586</sub>), расположенный не в рамке считывания вирусного полипротеина, который иницирует на AUG<sub>743</sub>. Похожая ситуация с двумя AUG наблюдается и у других IRES элементов первой группы, хотя

расстояние между AUG варьирует у разных вирусов. Первый AUG (AUG<sub>586</sub> в случае полиовируса) называется криптоическим. Предполагается, что рибосома сначала узнает криптоический AUG, но не инициирует на нем, а начинает сканировать и только затем узнает основной старт [150].



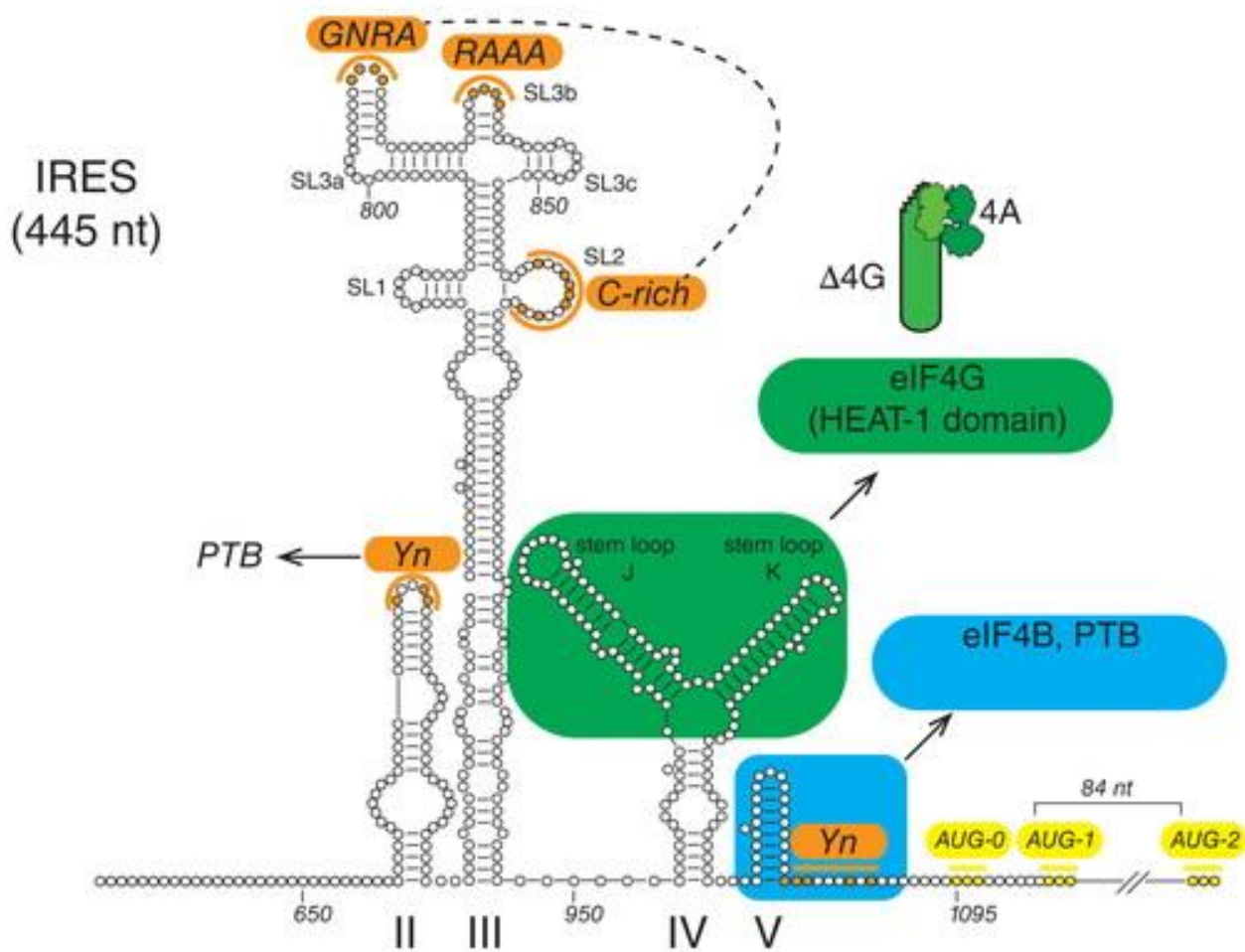
**Рис. 21.** Структурная и функциональная организация IRES элементов первого типа на примере PV [145]

Считается, что инициация на IRES элементах I типа требует все факторы инициации, кроме eIF4E. Соответственно, для инициации не нужен полноразмерный фактор eIF4G, достаточно его фрагмента, который не имеет сайта связывания eIF4E. Полиовирусная протеаза 2A, отщепляет N-концевой фрагмент eIF4G, который отвечает за связывание с eIF4E, что приводит к полной остановке белкового синтеза и переключению трансляционного аппарата на синтез вирусных белков [151]. В недавней работе, исследователям удалось реконструировать инициаторный комплекс на IRES элементах I типа из очищенных компонентов.

Оказалось, что для сборки инициаторного комплекса необходимы факторы инициации eIF2, eIF3, eIF4A, eIF4G (или его фрагмент), eIF4B, eIF1A, и РНК-связывающий белок PCBP2 [152]. eIF4G связывается в области основания домена V. Интересно, что для рекрутирования eIF3 на IRES элемент и сборки инициаторного комплекса необходим eIF3 связывающий домен eIF4G – более короткий фрагмент eIF4G связывается с IRES с той же эффективностью, но сборки комплекса не происходит. eIF3 при рекрутировании на IRES через взаимодействие с eIF4G начинает взаимодействовать с верхней частью домена IV и с основанием домена IV. PCBP2 связывается в домене IV. Интересна также роль eIF1 – он ингибирует образование комплекса на основном старте кодоне AUG<sub>743</sub>, но при этом разрушает абберрантные инициаторные комплексы на не-AUG кодонах между “криптическим” AUG<sub>586</sub> и AUG<sub>743</sub>. Роль “криптического” AUG в инициации трансляции так и остается невыясненной - в очищенной системе, рибосомы не используют этот кодон для инициации.

Несмотря на значительный прогресс в понимании механизма функционирования IRES элементов I типа [152], многое остается неясным. В частности, авторы не обнаружили никакого влияния нескольких ITAF, таких как La [153], PTB [154, 155], PCBP1 [156], SRp20 [157], Unr [158, 159] на образование инициаторного комплекса (ранее было показано, что эти белки вовлечены в трансляцию IRES элементов I типа). Значит ли это, что PCBP2 – действительно единственный ITAF? Вероятно, реальная ситуация несколько сложнее: возможно, PCBP2 действительно является центральным компонентом мРНП, необходимым для образования инициаторного комплекса, однако другие ITAF, которые (в отличие от системы из очищенных компонентов) присутствуют в цитоплазме и связывают IRES, помогая в конечном итоге PCBP2 и факторам инициации запустить инициацию трансляции на нужном стартовом кодоне.

### 1.5.2. IRES элементы типа II



**Рис. 22.** Структурная и функциональная организация IRES элементов второго типа на примере FMDV [145]

IRES элементы этого типа обнаруживаются у вирусов семейства *Picornaviridae* из родов *Cardiovirus* и *Aphtovirus*. Наиболее хорошо охарактеризованы IRES элементы EMCV (*Cardiovirus*) и FMDV (*Aphtovirus*). Оба эти IRES элемента, несмотря на различную нуклеотидную последовательность, имеют сходную структурную организацию и размер (439 нт для EMCV и 445 нт для FMDV) [145].

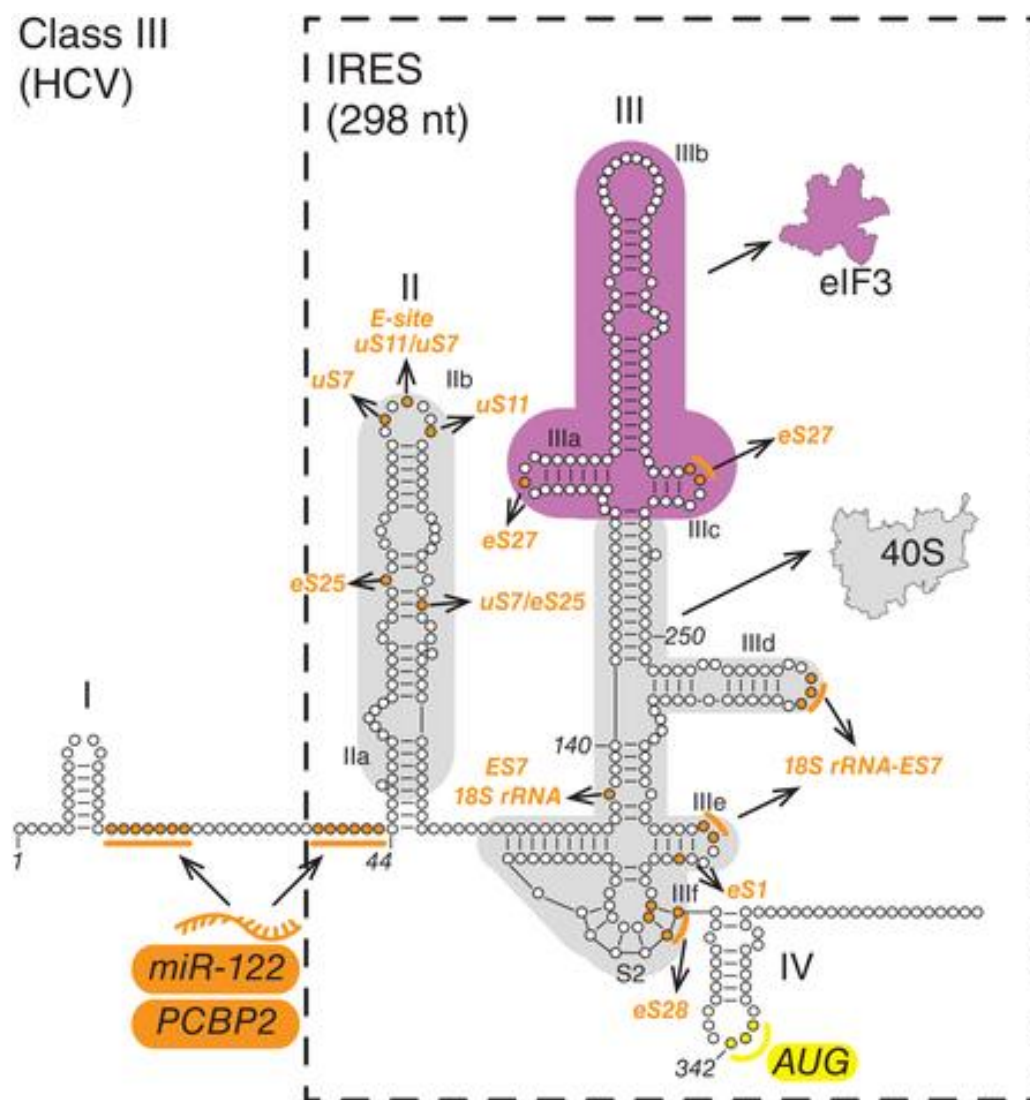
Известно, что домен II и домен V ответственны за связывание РНК-связывающего белка PTB, необходимого для активности IRES элемента [160-162]. Роль домена III, самого большого домена в IRES, неизвестна, однако он критически необходим для внутренней инициации [163]. Домен

IV, также известный как JK-домен, ответственен за связывание фактора инициации eIF4G [164, 165]. Интересно, что в отличие от IRES элементов первого типа, сборку инициаторного комплекса на IRES EMCV можно осуществить с помощью фрагмента eIF4G, не имеющего сайт связывания eIF3, но при этом eIF3 необходим для сборки инициаторного комплекса [166]. Можно предположить, что в случае с IRES элементами второго типа eIF3 может рекрутироваться самостоятельно, возможно – через взаимодействие с доменом III. Наконец, домен V содержит полипиримидиновый тракт, который рекрутирует РТВ [161, 162, 167] и другие РНК-связывающие белки. Интересно, что несмотря на схожесть, IRES элементы EMCV и FMDV отличаются по набору транс действующих факторов, необходимых для эффективного образования инициаторного комплекса: IRES FMDV, в отличие от EMCV, требует дополнительный РНК-связывающий белок ITAF45 (также известный как PA2G4 или EBP1). Предполагается, что различный репертуар ITAF для этих IRES элементов может опосредовать оптимальную активность IRES элемента в определенных клетках и тканях [168].

Как и в случае с IRES элементами первого типа, после IRES элемента находятся несколько AUG кодонов. Однако в отличие от IRES элементов первого типа, эти AUG кодоны расположены в одной рамке считывания. Более того, в случае с FMDV оба AUG кодона, разделенные 84 нуклеотидами, используются для синтеза вирусного полипептида, однако неясно, для чего это нужно, и отличаются ли требования к факторам инициации и ITAF для трансляции с первого и второго стартового кодона.

### 1.5.3. IRES элементы типа III

### Class III (HCV)



**Рис. 23.** Структурная и функциональная организация IRES элементов третьего типа на примере HCV [145]

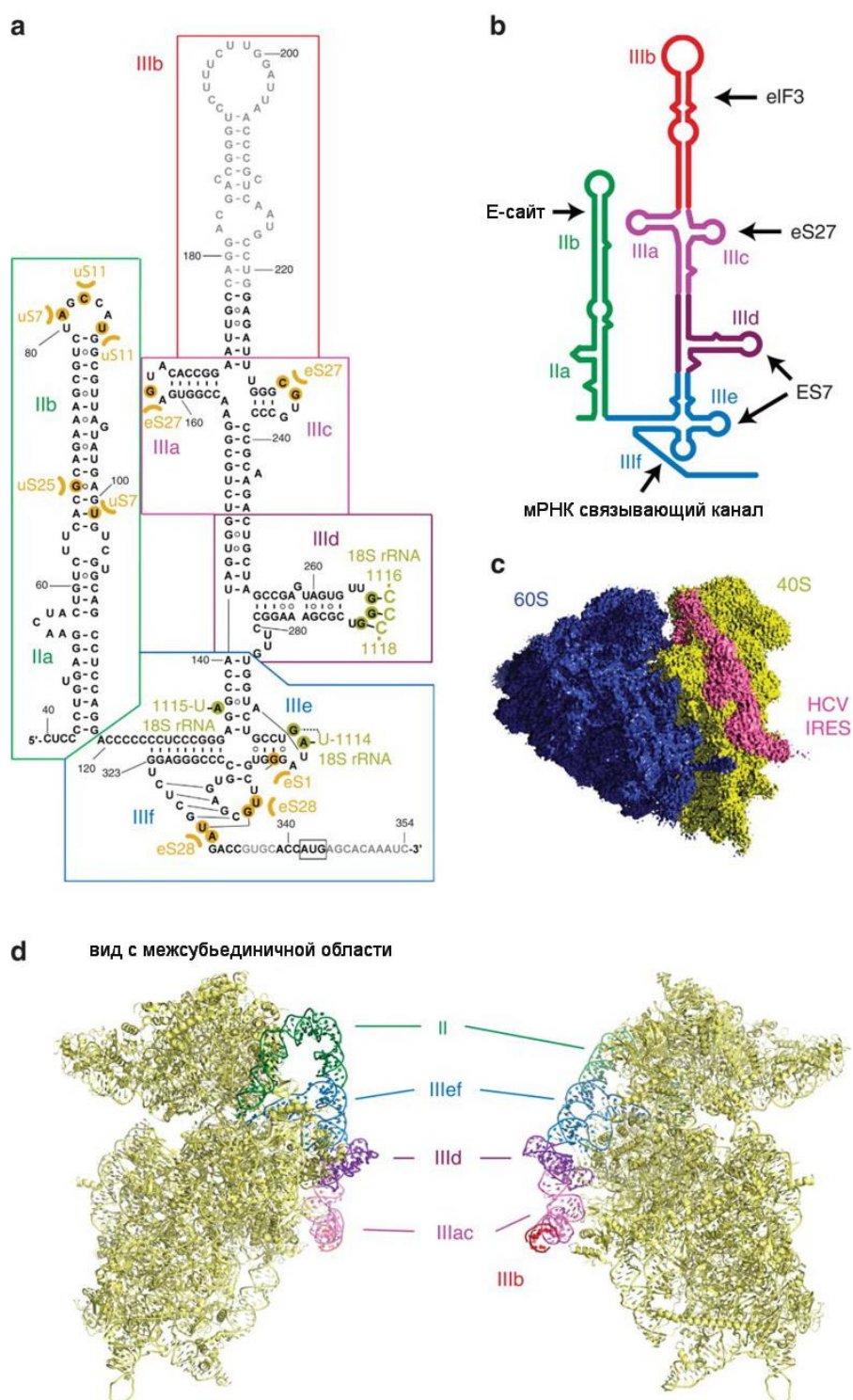
IRES элементы этого типа обнаруживаются у вирусов семейства *Flaviviridae*, таких как Hepatitis C Virus (HCV), Classical Swine Fever Virus (CSFV), а также у некоторых представителей семейства *Picornaviridae* (PTV, PEV8, SV2). Механизм инициации трансляции для этих IRES элементов кардинально отличается от IRES первого и второго типа. Во многом благодаря структурным исследованиям, на данный момент о механизме инициации известно очень много. Рассмотрим пример IRES элемента HCV.

5'НТО HCV содержит 4 структурных домена, IRES элемент расположен в доменах II-IV (рис. 23). В этом участке происходит высокоафинное связывание двух ключевых компонентов трансляционного аппарата - 40S и eIF3 [169, 170]. Стартовый кодон AUG находится в шпильчатой структуре домена IV. Стоит отметить, что, кроме минимального IRES элемента, в спейсере между доменом I и II также находится участок, необходимый для эффективной трансляции, репликации, и защиты вирусной мРНК от деградации в клетках печени (этот участок взаимодействует с микроРНК 122, специфической для клеток печени [171-173]).

Для активности IRES элемента в инициации трансляции необходимо связывание eIF3 с апикальной частью домена III. Несмотря на множество работ, роль связывания eIF3 с IRES элементом HCV до конца не ясна. До недавнего времени считалось, что eIF3 рекрутируется на IRES элемент для того, чтобы стимулировать образование 48S PIC, однако в недавней работе был предложен совершенно другой механизм – связывание eIF3 с IRES элементом разобщает взаимодействие eIF3 с рибосомой, позволяя IRES связать 40S. Другими словами, eIF3 конкурирует с IRES элементом за связывание с тем же участком на 40S, и апикальная часть домена III нужна для того, чтобы освободить сайт связывания IRES элемента от eIF3. eIF3, в свою очередь, перестает взаимодействовать с 40S, и теперь образует контакты только с IRES элементом [174].

После аккомодации стартового кодона в Р-сайте рибосомы и установления кодон - антикодонного взаимодействия с инициаторной тРНК, происходит присоединение 60S. Интересно, что инициаторная тРНК может доставляться на 40S как при помощи, так и без участия eIF2. Во втором случае, факторы инициации eIF5B [175, 176] или eIF2D [177] могут отвечать за стабилизацию инициаторной тРНК в Р-сайте рибосомы. Ключевую роль в корректной аккомодации тРНК также играет

взаимодействие домена II IRES элемента с Е-сайтом рибосомы. IRES элемент с мутированным (или удаленным) доменом II способен образовывать 48S, который, однако, не может перейти в 80S [178].



**Рис. 24.** Структура комплекса HCV IRES и рибосомы [179]

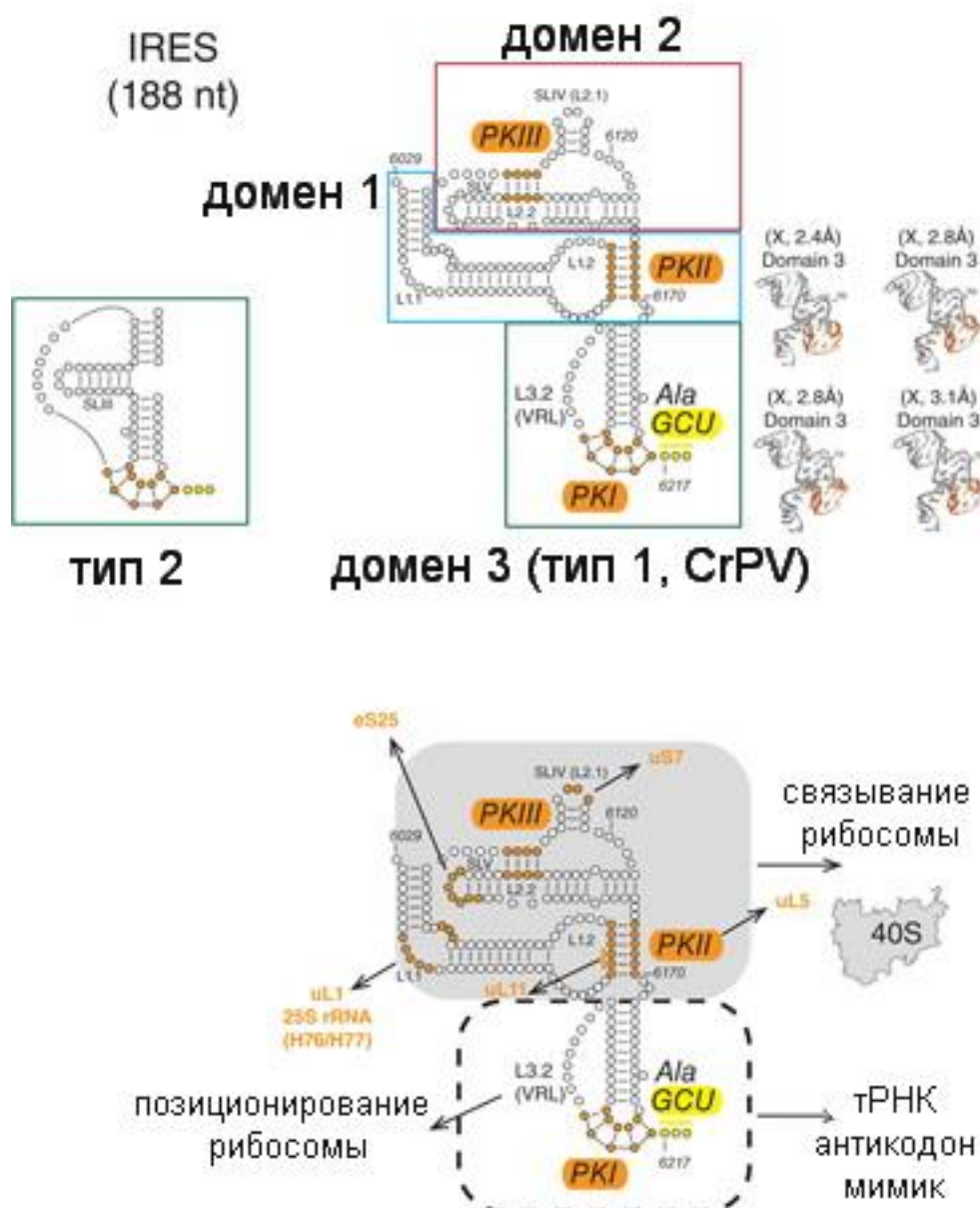
Подводя итог, ключевые особенности функционирования IRES элементов III типа следующие: 1) инициация проходит без участия

большинства трансляционных факторов, 2) доставка инициаторной тРНК на рибосому может осуществляться независимо от eIF2, 3) наблюдается полное отсутствие сканирования, инициаторный кодон позиционируется непосредственно в Р-сайт рибосомы, 4) эффективное связывание 40S и eIF3 не является достаточным для внутренней инициации, IRES элемент вызывает серию структурных перестроек в 40S рибосоме и манипулирует ее структурой таким образом, чтобы инициация трансляции осуществилась

#### 1.5.4. IRES элементы типа IV

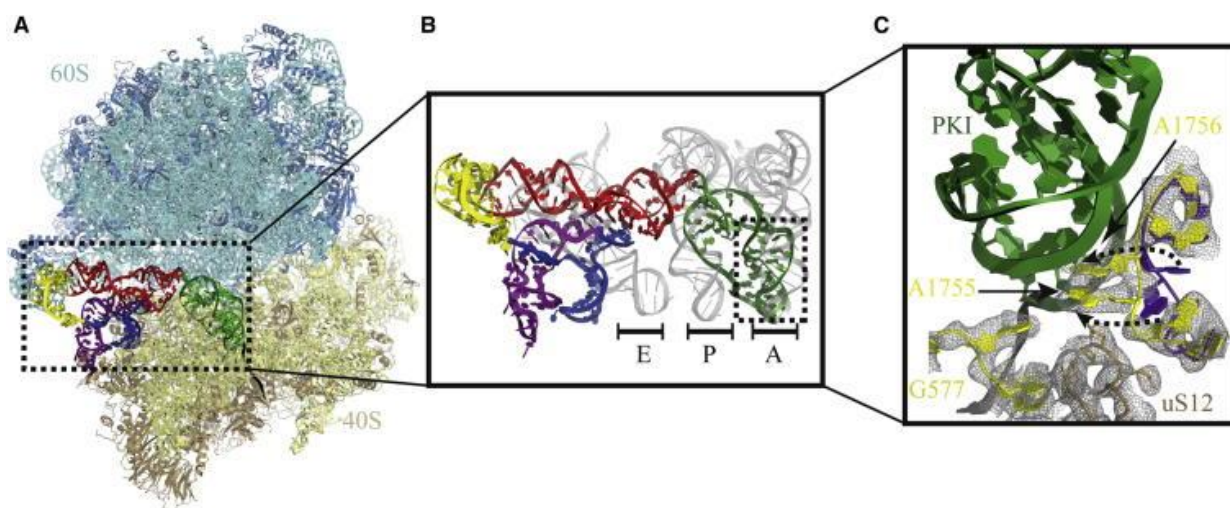
IRES элементы типа IV обнаруживаются в межцистронном участке вирусов семейства *Dicistroviridae*. Это самые маленькие IRES элементы, их размер составляет около 200 нуклеотидов. Лучше всего изучен IRES элемент вируса паралича сверчка (*Cricket Paralysis Virus*, CrPV). В составе данного IRES элемента можно выделить три структурных домена, каждый из которых содержит псевдоузел, необходимый для внутренней инициации. В отличие от описанных ранее трех групп IRES элементов, IRES элементы IV типа не требуют вообще никаких факторов инициации, необходимы только 40S и 60S. Более того, инициация трансляции происходит без Met-tRNA<sub>i</sub>, а первой используемой аминокислот-тРНК в случае CrPV является Ala-тРНК.

Домены I и II необходимы для связывания рибосомных субчастиц, в то время как домен III не участвует в связывании с 80S [180]. Однако, после образования комплекса, домен III необходим для эффективной инициации трансляции (рис. 25) [181, 182].



**Рис. 25.** Структурная и функциональная организация IRES элементов четвертого типа на примере CrPV [145]

Процесс инициации трансляции происходит следующим образом. Сначала, происходит образование комплекса 40S-IRES, после чего происходит присоединение 60S субчастицы. Домен III при этом оказывается помещен в А-сайт рибосомы [183].



**Рис. 26.** Структура CgPV IRES элемента в комплексе с 80S рибосомой [184]

Домен III имеет конформацию, которая напоминает кодон – антикодонный дуплекс. Затем, фактор элонгации eEF2 промотирует псевдотранслокацию, и домен III перемещается с Р-сайт рибосомы. Структура IRES элемента в этом состоянии позволяет рекрутирование тРНК в А-сайт рибосомы и установление транслируемой рамки считывания. Затем, происходит еще одна псевдо транслокация, при которой первая тРНК помещается в Р-сайт, а IRES помещается в Е-сайт рибосомы (рис. 26) [184].

Подводя итог, в данном разделе мы ознакомились с молекулярными механизмами инициации трансляции на вирусных IRES элементах четырех типов. Благодаря тому, что IRES элементы способны инициировать трансляцию в отсутствие некоторых факторов инициации, IRES опосредованная трансляция оказывается устойчивой к некоторым стрессовым условиям, которые приводят к подавлению активности инициаторных факторов. Однако трансляционная активность при стрессе зависит как от типа стресса, так и от типа IRES элемента. Поскольку ни один из описанных IRES элементов (кроме IRES-элемента HAV [185-187]) не требует eIF4E, все четыре типа устойчивы к инактивации eIF4E посредством связывания с 4E-BP, которое наблюдается при инактивации

mTOR. При инактивации eIF2, которое наблюдается при ISR, не нарушается трансляция только IRES элементов типа III и IV (IRES элементы I и II типа не могут функционировать без eIF2).

Устойчивость IRES зависимой трансляции к стрессовым условиям хорошо задокументирована. Кроме того, как уже упоминалось ранее, некоторые вирусы сами инактивируют трансляционный аппарат таким образом, чтобы переключить трансляционный аппарат на синтез собственных белков. Неудивительно, что после открытия внутренней инициации на вирусных мРНК, исследователи сконцентрировали свое внимание на поиске IRES элементов в клеточных мРНК. Действительно, вскоре после открытия внутренней инициации у некоторых вирусных мРНК были предложены и кандидаты на IRES-элементы у ряда клеточных мРНК [188]. На данный момент опубликованы более сотни предполагаемых IRES элементов в клеточных мРНК, однако ни для одного из них детальный механизм инициации трансляции не был охарактеризован. Более того, по всей видимости большая часть IRES элементов не являются таковыми на самом деле. Осуждению проблемы внутренней инициации на клеточных мРНК посвящен раздел результатов данной работы, в котором мы выдвигаем концепцию Cap Independent Translation Enhancers (CITE) в качестве нового, альтернативного механизма кап-независимой инициации трансляции у эукариот.

## 1.6 Новый инструмент для изучения трансляционного контроля – рибосомный профайлинг.

Необходимо отметить факт небывалого технологического прогресса в области изучения механизмов трансляционного контроля. Развитие новых технологий, в частности, методов секвенирования следующего поколения, привело к появлению революционного метода – рибосомного

профайлинга. Рибосомный профайлинг, разработанный в лаборатории Джонатана Вайсмана, основан на глубоком секвенировании фрагментов мРНК, защищаемых рибосомой от разрезания рибонуклеазами [189-191]. Анализ данных рибосомного профайлинга позволяет получить “моментальный снимок” трансляции всех мРНК в клетке в заданный момент времени. Благодаря рибосомному профайлингу, теперь можно изучить, трансляция каких мРНК меняется в клетке как при стрессовых условиях, так и при направленной инактивации определенных инициаторных факторов с помощью генетического нокаута/нокдауна или под действием специфических низкомолекулярных ингибиторов. В комбинации с классическими методами молекулярной биологии, рибосомный профайлинг может помочь исследовать трансляционный контроль на полногеномном уровне. Использованию рибосомного профайлинга для изучения раннего ответа на стресс посвящен раздел в результатах.

## Материалы и методы исследования

### 2.1. Реактивы.

Неорганические кислоты, органические кислоты и растворители:  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , этанол, метанол, изоамиловый спирт, фенол, хлороформ, реактивы класса «ХЧ», фирмы Химмед (Россия) и Sigma (Германия);

Вода очистки до степени 1 по ГОСТ Р 52501- 2005 (мQ) из системы очистки воды Milli- Q, Millipore (Франция)

Сухие соли, щелочи и кислоты:  $\text{NaOH}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaOAc}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ ,  $\text{KOH}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{LiCl}$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{OAc}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , Tris, HEPES, агароза, акриламид, сахароза, бис-акриламид, имидазол компаний Хеликон (Россия), Merck (Германия) и Sigma (Германия)

Органические реактивы: индивидуальные аминокислоты, темед, глицерин, полиэтилен гликоль, дитиотриэтол, тритон X-100, додецил сульфат натрия, NP-40, спермидин, циклогексимид, среда LB, агар, компаний Хеликон (Россия), Merck (Германия), Amresco (США), и Sigma (Германия)

Ферменты: эндонуклеазы рестрикции – Сибэнзим (Россия), NEB (США), Thermo Fisher Scientific (США). Рибонуклеазы и ингибиторы рибонуклеаз: Turbo DNase (Invitrogen, США), SUPERase·In (Invitrogen США), RNase I (Invitrogen, США), RNase A (Thermo Fisher Scientific, США), Ribolock RNase inhibitor (Thermo Fisher Scientific, США), рибонуклеаза V1 (Ambion,

США), рибонуклеаза T2 (Invitrogen, США). T4 полинуклеотид киназа (NEB, США), T4 РНК лигаза 2 (NEB, США), обратная транскриптаза SuperScript III (Invitrogen, США), ДНК полимеразы для ПЦР Phusion polymerase (NEB, США), Лигаза одноцепочечной ДНК CircLigase II (Epicentre, США), протеаза Prescisson (Amersham, США).

Ni- NTA- агароза (Qiagen, Германия)

Олиго dT агароза Oligotex (Qiagen, Германия)

Магнитные шарики со стрептавидином MyOne streptavidin C1 DynaBeads (Invitrogen, США)

Глутатион сефароза Glutathione-Sepharose 4B (Amersham, США)

Соосадитель GlycoBlue, (Invitrogen, США)

Краситель для детекции нуклеиновых кислот SYBR Gold (Invitrogen, США)

Набор для выделения плазмид GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, США)

Набор для измерения активности люцифераз Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega, США)

Набор для выделения ДНК из агарозного геля Wizard SW Gel and PCR cleanup system (Promega, США)

## 2.2. Олигонуклеотиды

Олигонуклеотиды были синтезированы компаниями Евроген (Россия), Синтол (Россия), IDT (США) и NEB (США). Приводится список наиболее важных олигонуклеотидов, использованных в данной работе

| название | Последовательность 5'-3'       | назначение    |
|----------|--------------------------------|---------------|
| ПР1      | T(50)AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATG | Получение ПЦР |

|      |                                                                                  |                                                |
|------|----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
|      | G                                                                                | продуктов для транскрипции                     |
| ПР2  | CGCCGTAATACGACTCACTATAGGGAC<br>ACTTGCTTTTGACACAACCTGTG                           | Получение ПЦР<br>продуктов для транскрипции    |
| ПР3  | CCGGCACTAGTGTAATACGACTCACTAT<br>AGG                                              | Получение ПЦР<br>продуктов для транскрипции    |
| ПР4  | CCGCCGTAATACGACTCACTATAGGGCG<br>GAGGAGCCAAGATGGCCGAATAGG                         | Получение ПЦР<br>продуктов для транскрипции    |
| ПР5  | CGCCGTAATACGACTCACTATAGGGAA<br>GAAGAGGTAGCGAGTGGACG                              | Получение ПЦР<br>продуктов для транскрипции    |
| ПР6  | CGCCGTAATACGACTCACTATAGGGCTG<br>CGCGCAACTCGCTGTAGTAATTCCAGC                      | Получение ПЦР<br>продуктов для транскрипции    |
| ПР7  | CGCCGTAATACGACTCACTATAGGGAG<br>CTTATCGATACCGTCG                                  | Получение ПЦР<br>продуктов для транскрипции    |
| ПР8  | CGCCGTAATACGACTCACTATAGGGAGT<br>GGACTTCGGTCCACTCCCAGCTTATCGA<br>TACCGTCG         | Получение ПЦР<br>продуктов для транскрипции    |
| ПР9  | CGCCGtaatacgactcactataGGGCAACAACAA<br>CAACAACAACAACATGTATCGTTTTTCGA<br>TCACAGCTC | Получение ПЦР<br>продуктов для транскрипции    |
| ПР10 | GATTGTCACCATAAGCAGCCAC                                                           | Энзиматический<br>пробинг домена V PV<br>IRES; |
| ПР11 | AAACAGATAGATAATGAGTC                                                             | RelE принтинг, AUG 586<br>PV IRES;             |
| ПР12 | TGCAGTTGCTCTCCAGCG                                                               | RelE принтинг, AUG 743<br>PV IRES;             |
| ПР13 | CCTGCAGTCCGTGGTAGG                                                               | Toe-printing, FMDV                             |

|      |                                                                                                                                  |                                                                          |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
|      |                                                                                                                                  | AUG1                                                                     |
| ПР14 | TGCAGTTGCTCTCCAGC                                                                                                                | Toe-printing, FMDV<br>AUG2                                               |
| ПР15 | AUGUACACGGAGUCGACCCGCAACGCG<br>A                                                                                                 | РНК олигонуклеотид –<br>нижний маркер для<br>рибосомного<br>профайлинга  |
| ПР16 | AUGUACACGGAGUCGAGCUCAACCCGC<br>AACGCGA                                                                                           | РНК олигонуклеотид –<br>верхний маркер для<br>рибосомного<br>профайлинга |
| ПР17 | 5rApp/CTGTAGGCACCATCAAT/3ddC                                                                                                     | Преаденилированный<br>линкер для рибосомного<br>профайлинга              |
| ПР18 | (Phos)AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG<br>GAAAGAGTGTAGATCTCGGTGGTCGC/S<br>pC18/CACTCA/SpC18/TTCAGACGTGTGCT<br>CTTCCGATCTATTGATGGTGCCTACAG | Праймер для обратной<br>транскрипции для<br>создания библиотек           |
| ПР19 | (biotin)GCGGCTTTGGTGA CTCTAGATAA<br>CCTCGGGCCGATCGCACG                                                                           | Праймер для удаления<br>рРНК из библиотек                                |
| ПР20 | (biotin)CCGCTCGTGGGGGGCCCAAGTCC<br>TTCTGATCGAGGCCCAGC                                                                            | Праймер для удаления<br>рРНК из библиотек                                |
| ПР21 | (biotin)CGAGGGGCTCTCGCTTCTGGCGC<br>CAAGCGCCCGGCCGCGCG                                                                            | Праймер для удаления<br>рРНК из библиотек                                |
| ПР22 | (biotin)GCCGCGGAGCCTCGGTTGGCCTC<br>GGATAGCCGGTCCCCCGC                                                                            | Праймер для удаления<br>рРНК из библиотек                                |
| ПР23 | (biotin)CACATTGATCATCGACACTTCGA<br>ACGCACTTGCGGCCCGG 3'                                                                          | Праймер для удаления<br>рРНК из библиотек                                |
| ПР24 | (biotin)ATCGTTTTTTCACTGACCCGGTGA<br>GGCGGGGGGGCGAGCCC                                                                            | Праймер для удаления<br>рРНК из библиотек                                |
| ПР25 | (biotin)GGTTCCTCCCGGGGCTACGCCTGT<br>CTGAGCGTCGCTTGCCG                                                                            | Праймер для удаления<br>рРНК из библиотек                                |

|      |                                                                       |                                                                  |
|------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| ПР26 | (biotin)GGAGCCTCGGTTGGCCTCGGATA<br>GCCGGTCCCCCGCCTGTC                 | Праймер для удаления<br>рРНК из библиотек                        |
| ПР27 | (biotin)CAGTCCGCCGAGGGCGCACCAACC<br>GGCCCGTCTCGCCCGCCG                | Праймер для удаления<br>рРНК из библиотек                        |
| ПР28 | (biotin)CTTCGCGGGGGGGATGCGTGCAT<br>TTATCAGATCAAAACCAA                 | Праймер для удаления<br>рРНК из библиотек                        |
| ПР29 | (biotin)TGATCGTTTTTTCACTGACCCGGT<br>GAGGCGGGGGGGCGAGC                 | Праймер для удаления<br>рРНК из библиотек                        |
| ПР30 | AATGATACGGCGACCAACCGAGATCTAC<br>AC                                    | Прямой универсальный<br>праймер для<br>амплификации<br>библиотек |
| ПР31 | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGT<br>GATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTC<br>TTCCG | Обратный праймер с<br>индексом для<br>амплификации<br>библиотек  |
| ПР32 | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACA<br>TCGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTC<br>TTCCG | Обратный праймер с<br>индексом для<br>амплификации<br>библиотек  |
| ПР33 | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCC<br>TAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTC<br>TTCCG | Обратный праймер с<br>индексом для<br>амплификации<br>библиотек  |
| ПР34 | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGG<br>TCAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTC<br>TTCCG | Обратный праймер с<br>индексом для<br>амплификации<br>библиотек  |
| ПР35 | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCAC<br>TGTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTC<br>TTCCG | Обратный праймер с<br>индексом для<br>амплификации<br>библиотек  |
| ПР36 | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATT<br>GGCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTC          | Обратный праймер с<br>индексом для                               |

|      |                                                                        |                                                                 |
|------|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
|      | TTCCG                                                                  | амплификации<br>библиотек                                       |
| ПР37 | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGAT<br>CTGGTGAAGTGGAGTTCAGACGTGTGCTC<br>TTCCG | Обратный праймер с<br>индексом для<br>амплификации<br>библиотек |
| ПР38 | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCA<br>AGTGTGAAGTGGAGTTCAGACGTGTGCTC<br>TTCCG | Обратный праймер с<br>индексом для<br>амплификации<br>библиотек |
| ПР39 | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTG<br>ATCGTGAAGTGGAGTTCAGACGTGTGCTC<br>TTCCG | Обратный праймер с<br>индексом для<br>амплификации<br>библиотек |
| ПР40 | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAAG<br>CTAGTGAAGTGGAGTTCAGACGTGTGCTC<br>TTCCG | Обратный праймер с<br>индексом для<br>амплификации<br>библиотек |
| ПР41 | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTA<br>GCCGTGAAGTGGAGTTCAGACGTGTGCTC<br>TTCCG | Обратный праймер с<br>индексом для<br>амплификации<br>библиотек |
| ПР42 | CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTAC<br>AAGGTGAAGTGGAGTTCAGACGTGTGCTC<br>TTCCG | Обратный праймер с<br>индексом для<br>амплификации<br>библиотек |

### 2.3. Антитела

anti-GARS (sc-98614, Santa Cruz, США)

anti-GAPDH (Proteintech Group INC, PTG10494-1-AP, США)

anti-eIF4GI antibodies (предоставлены Dr. R. Rhoads).

anti-EIF4EBP1 (AB3251; Chemicon International, Германия)

anti-GAPDH (PTG10494-1-AP; Proteintech, США),

anti-ATF4 (10835-1-AP; Proteintech, США),

anti-phospho-p70 S6 kinase (Thr389) (9205S; Cell Signalling, США),

anti-phospho-S6 ribosomal protein (Ser235/236) (2211S; Cell Signalling, США)

anti-S6 ribosomal protein (2217S, Cell Signalling, США)

anti-phospho eIF2 (S51) (SA-405; Enzo, США)

anti-FLAG-M2 (SigmaAldrich, Германия).

#### 2.4. Буферы и растворы.

Все буферы и растворы делались на деионизированной воде. Приводится состав наиболее важных буферов и растворов, использованных в данной работе

Буфер Б1: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% glycerol

Буфер Б2: 150 mM NaCl, 35 mM Tris-HCl pH 7.5

Буфер Б3: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM KCH<sub>3</sub>COO, 1.5 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 2.5 mM DTT

Буфер Б4: 20 mM Hepes-KOH pH 7.6, 1 mM DTT, 0.5 mM spermidine-HCl, 0.6 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 8 mM creatine phosphate, 1 mM ATP, 0.2 mM GTP, 120 mM KCH<sub>3</sub>COO и 25 μM каждой аминокислоты

Буфер Б5: 80 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 8 mM creatine phosphate

Буфер Б6: 80 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>

Буфер Б7: 100 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 1 mM DTT, complete EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets (Roche) (1 таблетка на 50 мл буфера)

Буфер Б8: 100 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 1 mM DTT, complete EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets (Roche) (1 таблетка на 50 мл буфера)

Буфер Б9: 80 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 8 mM creatine phosphate, 2 mM GMPPNP

Буфер Б10: 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 0,5% Triton X-100, 100 ug/ml cycloheximide, 20 U/ml TURBO DNase

Буфер Б11: 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM NaCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% или 60% сахарозы (масса на объем), 1mM DTT, 100 ug/ml cycloheximide

Буфер Б12: 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1M NaCl, 2 mM EDTA, 0.2% SDS

Буфер Б13: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA

Буфер Б14: 5 mM Tris-HCl, pH 7.5

Буфер Б15: 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 9.2, 2 mM EDTA

Буфер Б16: 6M мочевины, 25% сахароза, бромфеноловый синий, ксиленцианол

Буфер Б17: 0,3M NaCH<sub>3</sub>COO, pH 5.1, 1mM EDTA, 0,1% SDS

Буфер Б18: 3.0 M NaCl, 0.3 M sodium citrate, at pH 7.0

Буфер 2ХБ19: 2M NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2%  
(объем/объем) Triton X-100

15% денатурирующий гель (соотношение акриламид/бис-акриламид 20:1)

10ХТВЕ – 40 мл

мочевина – 168 г

акриламид - 60 г

бис-акриламид – 3 г

довести водой до 400 мл, профильтровать

Смесь олигонуклеотидов для удаления рРНК Subtraction Oligo Mix 5X  
(необходимо разбавить водой в 5 раз перед использованием)

|                  |        |
|------------------|--------|
| ПР19 500 $\mu$ M | 20 мкл |
|------------------|--------|

|                  |        |
|------------------|--------|
| ПР20 500 $\mu$ M | 20 мкл |
|------------------|--------|

|                  |        |
|------------------|--------|
| ПР21 100 $\mu$ M | 10 мкл |
|------------------|--------|

|                  |        |
|------------------|--------|
| ПР22 100 $\mu$ M | 10 мкл |
|------------------|--------|

|                  |        |
|------------------|--------|
| ПР23 100 $\mu$ M | 10 мкл |
|------------------|--------|

|                  |        |
|------------------|--------|
| ПР24 100 $\mu$ M | 10 мкл |
|------------------|--------|

|                  |        |
|------------------|--------|
| PP25 100 $\mu$ M | 10 мкл |
| PP26 100 $\mu$ M | 10 мкл |
| PP27 100 $\mu$ M | 10 мкл |
| PP28 100 $\mu$ M | 10 мкл |
| PP29 100 $\mu$ M | 10 мкл |
| H20              | 20 мкл |

Олигонуклеотиды, использованные для удаления рРНК, содержат 5'biotin-TEG модификацию и очищены при помощи HPLC (произведены компанией IDT по индивидуальному заказу)

## 2.5 Методы

### Выделение белков и факторов инициации

Рибосомные субъединицы и индивидуальные факторы инициации выделяли из RRL, HeLa, или Cerebs-2 по протоколу, опубликованному в [192]. Дополнительная очистка факторов инициации осуществлялась при помощи FPLC с использованием колонок MonoS и MonoQ HR 5/5 column (Amersham Biosciences).

eIF1 и eIF1A экспрессировали в *E. coli* и выделяли согласно протоколу [193]

Рекомбинантный GARS выделяли следующим образом: pGEX-6p1 GARS, pGEX-6p1 GARS  $\Delta$ WHEP and pGEX-6p1 GARS  $\Delta$ ABD экспрессировали в *E. coli* Rosetta (DE3) при 30C, белки выделяли с использованием Glutathione–Sepharose 4B и PreScission Protease (Amersham), следуя

рекомендациям производителя (за исключением одной модификации - буфер PBS был заменен буфером Б1)

Рекомбинантный 4E-BP-1 получали следующим образом: белок с плазмиды pGEX-6p1-h4E-BP1 (любезно предоставлена N. Sonenberg, McGill University, Montreal) экспрессировали в *E. coli* и очищали с помощью Glutathione-Sepharose 4B и PreScission Protease (Amersham), после чего проводили диализ в буфере Б1.

#### Сборка инициаторных комплексов из очищенных компонентов

Рибосомные 48S инициаторные комплексы собирались в реакционном объеме 20 мкл так же, как было описано ранее [193, 194]. Реакционная смесь содержала 40S субъединицы (2.5 pmol), мРНК (0,5 pmol), eIF1 (0,5 мкг), eIF1A (0,5 мкг), eIF2 (2 мкг), eIF3 (3 мкг), eIF4F (0,5 мкг), eIF4A (0,5 мкг), eIF4B (0,5 мкг), аминокислотилированную tRNA<sup>i</sup> Met из *Escherichia coli* (5 pmol), АТФ (1 mM), и ГТФ (0.4 mM).

#### Транскрипция *in vitro*

Для приготовления полиаденилированных мРНК вначале получали ПЦР продукты с соответствующих плазмид. Использовали стандартный обратный праймер ПР1, и прямые праймеры, содержащие Т7 промотор и участок, комплементарный специфической 5'НТО: ПР2 для  $\beta$ -globin НТО, ПР3 для  $\beta$ -actin НТО, ПР4 для LINE-1 НТО, ПР5 для Araf-1 НТО, ПР6 для с-Мус НТО), или универсальный праймер ПР7 комплементарный к участку плазмиды перед вставленной последовательностью НТО.

Для введения шпилечной структуры на 5' конец НТО использовали ПР8. Для введения последовательности САА6 в НТО IFRD1 использовали ПР9.

ПЦР продукты использовали как матрицу для транскрипции *in vitro* с помощью T7 RiboMAX Large Scale RNA Production kit (Promega, США). Для получения m<sup>7</sup>G- или A-кепированных мРНК, 3'-O-Me-m<sup>7</sup>GpppG или ApprpG (NEB) добавляли в транскрипционную смесь в соотношении 10:1 к ГТФ. РНК очищали с помощью осаждения LiCl и проверяли на целостность в денатурирующем акриламидном геле с мочевиной.

Для получения биотинилированной РНК, biotin-16 UTP (Roche, США) добавлялся в транскрипционную смесь в соотношении 1:10 к UTP.

### Трансляция *in vitro*

Клетки асцита Krebs-2 собирали центрифугированием в изотоническом буфере Б2 и промывали четыре раза с помощью центрифугирования (Beckman JA-20, 1200 rpm, 10 min). После финальной промывки, клетки ресуспендировали в 1.5 объёма гипотонического буфера Б3 и инкубировали на льду 20 минут. Затем, клетки разрушали с помощью гомогенизатора Даунса (пестик типа Б, 15 ударов) и центрифугировали лизат 20 минут при 15000 rpm. Супернатант разделяли на аликвоты и хранили при -75С.

Реакционную смесь для трансляции замешивали в объеме 10 мкл, смесь содержала 5мкл лизата S30, трансляционный буфер Б4, 2u рибонуклеазного ингибитора (HPRI, Fermentas), и 0.25 pmol мРНК.

Трансляцию в RRL (nuclease treated, Promega, США) проводили согласно инструкции производителя.

Трансляцию в необработанном нуклеазами RRL (любезно предоставленном Л.П. Овчинниковым) с добавлением HeLa проводили следующим образом. Реакционная смесь содержала 0.1 мкг полиаденилированной мРНК, кодирующей Firefly люциферазу, 1 нг

кепированной мРНК, кодирующей Renilla люциферазу, 6 мкл RRL (или 4.8 мкл RRL и 1.2 мкл HeLa), 0,4U ингибитора рибонуклеаз RiboLock (Fermentas), и буфер для трансляции Б5.

Во всех случаях, трансляцию проводили при 30С. Измерение люциферазной активности осуществлялось при помощи набора Dual Luciferase Assay kit (Promega, США) через 1 час после инкубации.

#### Очистка мРНК

RRL экстракт был любезно предоставлен Л. Овчинниковым, HeLa цитоплазматический экстракт был приобретен в компании CilBiotech (Бельгия) . 256 мкл RRL и 64 мкл HeLa инкубировали с 40мкг биотинилированной РНК в буфере Б6, 40 U ингибитора рибонуклеаз Ribolock RNase inhibitor (Fermentas) в финальном объеме 400 мкл. Инкубацию проводили при 30 С в течение 15 мин. После инкубации, проба разводилась буфером А до объема 2 мл, и в пробирку добавляли 50 мкл суспензии стрептавидин сефарозы (Streptavidin Sepharose High Prefomance, GE Healthcare, США), предварительно промытой в буфере Б7. Затем, пробы инкубировали при интенсивном качании в горизонтальном положении во льду в течение 1 часа. После инкубации и удаления супернатанта, стрептавидин сефароза два раза промывалась 2 мл буфера Б8. Затем, стрептавидин сефароза ресуспендировалась в 80 мкл буфера Б8, добавляли 2мМ CaCl<sub>2</sub> и 300 U микрококковой нуклеазы (Fermentas), и инкубировали 30 мин при 37С. Супернатант, содержащий РНК-связывающие белки, использовали для электрофореза.

#### Трансфекция мРНК в клетки млекопитающих

Клетки культивировали в DMEM с добавлением 10% FBS по стандартному протоколу. В день перед трансфекцией, клетки пересевали в 24-х луночные планшеты, таким образом, чтобы к моменту трансфекции

плотность клеток достигала 60-80%. 0.5 мкг смеси репортерных мРНК, кодирующих Firefly и Renilla люциферазы, инкубировали с 1.3 мкл трансфецирующего реагента Unifectin56 (RusBioLink, Россия) в 50 мкл DMEM без сыворотки в течении 20 минут при комнатной температуре, после чего смесь добавляли в лунки. Через 2-4 часа, клетки лизировали с помощью буфера PLB (Promega, США), и люциферазную активность измеряли при помощи набора Dual Luciferase Assay kit (Promega, США). В некоторых случаях, трансфекцию мРНК проводили с помощью альтернативного трансфецирующего реагента Lipofectamine2000 согласно инструкции производителя.

Для трансфекции siRNA, использовали GlyRS siRNA (sc-75153, Santa Cruz, США) и контрольную siRNA (sc-37007, Santa Cruz, США). siRNA трансфецировали с помощью реагента RNotion (5 Prime, США) согласно инструкциям производителя. Через 24 часа после трансфекции siRNA, в те же клетки трансфецировали мРНК, как описано выше.

В качестве альтернативного метода трансфекции, использовали магнитно-ассоциированную трансфекцию (Magnet Assisted Transfection (MATra)). 0.6 мкг смеси репортерных мРНК смешивали с 50 мкл DMEM без сыворотки и 1.2 мкл MATra-A Reagent (IBA, Германия). После инкубации при комнатной температуре в течении 20 минут, смесь добавляли в лунку, и плашку помещали на магнит Universal Magnet Plate (IBA, Германия) на протяжении 1 часа. Затем, магнит убирали, и через различные промежутки времени клетки лизировали и измеряли люциферазную активность.

#### Энзиматический пробинг

Для анализа бинарного комплекса GARS-PV IRES, 0.2 мкг РНК инкубировали с 1 мкг GARS в буфере Б6 в финальном объеме 20 мкл в течение 5 минут при 30°C. Затем, в реакционную смесь добавляли 0.002 U

рибонуклеазы V1 (Ambion, США) или 0.5 U рибонуклеазы T2 (Invitrogen, США) и дополнительно инкубировали 10 минут при 30°C. Затем, реакция останавливалась добавлением фенол-хлороформа, РНК экстрагировалась и высаживалась спиртом. Препарат РНК подвергался обратной транскрипции.

## RelE прайтинг

RelE прайтинг осуществлялся следующим образом: 2мкг РНК инкубировали с 12 мкл RRL, 3 мкл HeLa, и 0,4 U Ribolock RNase inhibitor (ThermoFisher, США) в буфере Б9. В случае со сборкой комплексов на мРНК PV IRES, в реакционную смесь также добавлялся 0.2 mM m<sup>7</sup>GTP. Инкубацию проводили 5 минут при 30°C. Затем, добавляли очищенный RelE до концентрации 2μM, и образцы инкубировали в течение 10 минут при 37°C. Затем, реакция останавливалась добавлением фенол-хлороформа, РНК экстрагировалась и высаживалась спиртом. Препарат РНК подвергался обратной транскрипции.

## Рибосомный профайлинг.

### 1.1 Обработка и лизис клеток

Клетки растили в стандартных условиях в CO<sub>2</sub> инкубаторе. Для эксперимента брали две 15-см культуральные чашки в расчете на одну экспериментальную точку. Клетки росли до 70% конфлюэнтности. После проведения воздействия с клеток отбиралась культуральная среда, чашки ставились на лед, и клетки промывали 10 мл PBS с циклогексимидом (100 микрограмм/мл). После промывки, к клеткам добавлялся 0,5 мл буфера Б10 (в расчете на одну чашку), клетки максимально быстро соскребались с чашки и переносились в 2 мл пробирки и инкубировались на льду 10 минут. После инкубации, клеточные лизаты откручивали на максимальных оборотах 10 мин, 4°C. Супернатант (2.2 мл с двух чашек)

разделяли на две порции – для получения рибосомных футпринтов (1 мл) и для получения мРНК (1.2 мл)

## 1.2 Получение рибосомных футпринтов

Для определения концентрации лизата, аликвоту лизата разводили в 10 раз буфером I и измеряли оптическое поглощение при длине волны 260 нм при помощи спектрофотометра. Эта стадия необходима для того, чтобы добавлять стандартные количества рибонуклеазы. РНКазы I (100 у/мкл) добавлялась из расчета 1 мкл рибонуклеазы на 3 оптические единицы лизата (обычно выход составляет 10-40 оптических единиц). Лизат клеток обрабатывался РНКазой 50 минут при комнатной температуре. После инкубации, РНКазы инактивировались с помощью добавления двукратного (по отношению к использованному количеству РНКазы) объема SUPERASE inhibitor. После обработки, лизат наносился на градиент сахарозы 10-60%.

Градиенты готовились заранее следующим образом. В пробирку для бакетного ротора SW41 наносились два раствора сахарозы Б11: сначала 5.5 мл 60% раствора сахарозы, затем, медленно, чтобы не допустить перемешивания с нижним слоем – 5.5 мл 10% сахарозы. После нанесения, верх пробирки заклеивался парафильмом, и пробирки медленно переводились в горизонтальное положение. В таком положении пробирки оставляли на комнатной температуре 4 часа, после чего они медленно возвращались в вертикальное положение.

После нанесения лизата на градиент, проводилось центрифугирование на роторе SW41Ti при 35000 rpm, 3 часа, +4С.

После завершения центрифугирования, содержимое пробирки разделялось на фракции 300 мкл и фракционировалось в оптически прозрачный планшет Costar UV 96 well plate (США). Фракции отбирались сверху пробирки при помощи пипетатора. Поглощение при 260 нм отобранных фракций градиента измерялось на планшетном спектрофотометре. Пик 80S субъединиц обычно обнаруживается во фракциях 13-16 градиента. Четыре фракции (1200 мкл), соответствующие пику 80S, содержащему рибосомные футпринты, переносились в отдельную пробирку. Для того, чтобы разбавить сахарозу, добавлялось 400 мкл воды, после чего объединенную фракцию 80S разделяли на две аликвоты по 800 мкл. К каждой аликвоте, добавляли 800 мкл кислого фенол-хлороформа (Sigma, США), интенсивно трясли 5 минут при помощи вортекса, после чего центрифугировали 5 минут на максимальных оборотах на настольной ультрацентрифуге. Отбирали водную фазу, содержащую РНК. К водной фазе добавляли 80 мкл 3М NaAc pH5.1, 800 мкл изопропанола, и 1 мкл соосадителя GlycoBlue. Инкубировали на -20С в течении как минимум 3 часов.

### 1.3 Выделение и фрагментация мРНК

1200 мкл лизата разделяли на 3 пробирки. К каждой добавляли 1200 мкл Trizol-LS (Invitrogen, США), аккуратно ресуспендировали и оставляли на комнатной температуре в течении 5 минут. После инкубации, добавляли 320 мкл хлороформа и интенсивно перемешивали 15 секунд, после чего инкубировали на комнатной температуре 15 минут. Затем, пробы центрифугировали 12000 RCF, +4С, 15 минут. Отбирали верхнюю водную фазу (1 мл), переносили в новую пробирку, добавляли 1 мл изопропанола, перемешивали и инкубировали 15 минут при комнатной температуре. Затем, проводили центрифугирование 15 минут на максимальных оборотах при комнатной температуре. Осадок РНК промывался 80% этанолом и

высушивался при комнатной температуре. РНК растворяли в 200 мкл воды и проводили измерение концентрации РНК. Типичный выход total RNA составляет 200-300 мкг.

Затем, проводили выделение мРНК (полиА<sup>+</sup>) с помощью Oligotex олиго-dT агарозы (Quiagen, США). 200 мкг РНК доводили с помощью воды до объема 250 мкл, добавляли 250 мкл буфера B12 и 30 мкл суспензии Oligotex. Нагревали смесь до 70°C, инкубировали 3 минуты, после чего инкубировали при комнатной температуре еще 10 минут. После инкубации, центрифугировали при максимальных оборотах на настольной центрифуге 2 минуты. Выбрасывали супернатант, после чего ресуспендировали агарозу в 500 мкл буфера B13. Затем, центрифугировали на максимальных оборотах 2 минуты. Отбирали супернатант, агарозу ресуспендировали в 100 мкл предварительно нагретого до 70°C буфера B14, и инкубировали 1 минуту при 70°C. Элюат содержит частично очищенную фракцию мРНК. Для дополнительной очистки мРНК, все процедуры повторялись еще раз: 100 мкл элюата доводилось водой до 250 мкл, после чего опять добавляли 250 мкл B12 и 30 мкл агарозы (той же самой, что использовалась на первой стадии очистки для этой же пробы). Повторение очистки позволяет снизить долю рибосомальной рРНК с 30% (одна стадия очистки) до 5% (две стадии очистки). Типичный выход очищенной полиА<sup>+</sup> мРНК составляет 2-4 мкг (в зависимости от клеточной линии, с которой проводят эксперимент).

Затем, производится щелочной гидролиз мРНК. Для этого, к 100 мкл фракции очищенной мРНК добавляют 100 мкл буфера B15, гидролиз проводят при 95°C в течении 1 часа. После проведения реакции, добавляли 200 мкл 3M NaAc pH 5.1, 1,5 мкл GlycoBlue, 400 мкл изопропанола, и высаживали РНК на -20°C в течении как минимум 3 часов.

#### 1.4 Очистка фрагментов РНК и получение библиотек для секвенирования следующего поколения

Пробы, содержащие рибосомные футпринты (полученные в 1.2) и фрагментированную мРНК (полученную в 1.3), осаждали центрифугированием, осадок растворяли в 4 мкл воды и 2 мкл Б16. Перед нанесением, пробы прогревали при 80С в течении 1.5 минуты. Пробы наносились совместно с маркером, состоящим из смеси двух РНК олигонуклеотидов длиной 28 нт (ПР15) и 34 нт (ПР16). Проводили электрофорез в 15% акриламидном геле с мочевиной. Перед нанесением проб, проводили префорез в течении 30 минут при 15мА (буфер – 1ХТВЕ). После нанесения проб, проводили электрофорез при 15 мА в течении 40-60 минут, следя за миграцией ксиленцианола (в этих условиях подвижность ксиленцианола примерно соответствует подвижности РНК длиной 30 нт). После проведения электрофореза, гель извлекали и помещали в емкость с 50 мл буфера ТВЕ, содержащего 3 мкл красителя SybrGold. Инкубировали гель в течении 5 минут, после чего полосы РНК визуализировали при помощи облучения ультрафиолетом на трансиллюминаторе. Фрагменты геля, содержащие РНК из пробы рибосомных футпринтов и фрагментированной мРНК длиной от 28 до 34 нт, вырезали с помощью лезвия и переносили в пробирки. Затем, гель измельчали, и подвергали двум циклам заморозки-разморозки в жидком азоте. В пробирки с фрагментами геля добавляли 1 мл буфера Б17, помещали в горизонтальное положение, и трясли на шейкере 12 часов при 600 оборотах в минуту. После экстракции, переносили буфер в новую пробирку, добавляли 1 мл изопропанола и 1.5 мкл Glycobluе. Высаживали РНК на -20С в течении минимум 3х часов.

Полученные пробы РНК высаживали центрифугированием, осадки промывали спиртом, растворяли в 10 мкл воды и переносили в новую

пробирку. Затем, добавляли 33 мкл воды и нагревали 1.5 мин при 80С, после чего пробы переносили на лед. Для дефосфорилирования фрагментов, замешивали следующую реакционную смесь:

|            |          |
|------------|----------|
| RNA sample | 43.0 мкл |
|------------|----------|

|               |         |
|---------------|---------|
| T4 PNK buffer | 5.0 мкл |
|---------------|---------|

|             |         |
|-------------|---------|
| SUPERase·In | 1.0 мкл |
|-------------|---------|

|        |         |
|--------|---------|
| T4 PNK | 1.0 мкл |
|--------|---------|

Инкубировали 1 час при 37С, затем пробы нагревали до 70С и инкубировали 10 минут. После окончания инкубации, РНК высаживалась по стандартному протоколу с добавлением изопропанола и GlycoBlue в течение как минимум 3х часов.

Осадки промывали 80% этанолом и растворяли в 8.5 мл воды, и добавляли 1.5 мкл преаденилированного РНК линкера РР17 (IDT, 0.5 мкг/мкл). Смесь нагревали до 80С и инкубировали 90 сек, после чего оставляли на комнатной температуре. Для лигирования линкера, замешивали следующую реакционную смесь:

|              |          |
|--------------|----------|
| РНК и линкер | 10.0 мкл |
|--------------|----------|

|                |         |
|----------------|---------|
| T4 Rnl2 buffer | 2.0 мкл |
|----------------|---------|

|                        |         |
|------------------------|---------|
| PEG 8000 (50%, wt/vol) | 6.0 мкл |
|------------------------|---------|

|             |         |
|-------------|---------|
| SUPERase·In | 1.0 мкл |
|-------------|---------|

|             |         |
|-------------|---------|
| T4 Rnl2(tr) | 1.0 мкл |
|-------------|---------|

Инкубировали смесь 2.5 часа при комнатной температуре, после чего РНК высаживали по стандартному протоколу. Растворяли РНК в 4 мкл воды и 2 мкл Б16 и проводили электрофорез в 15% геле с мочевиной, как описано ранее. Фрагменты геля с РНК с добавленным линкером вырезали с помощью лезвия, и экстрагировали РНК из геля с помощью буфера Gel Extraction как описывалось ранее. РНК высаживалась с помощью изопропанола и GlycoBlue по стандартному протоколу, как описывалось ранее.

Для проведения реакции обратной транскрипции, РНК растворяли в 10 мкл воды и переносили в 200 мкл пробирку для ПЦР. Добавляли 2 мкл праймера ПР18 (1.25  $\mu$ M), инкубировали в течении 2 минут при 80С, после чего переносили пробирку в лед и замешивали следующую реакционную смесь:

|                          |          |
|--------------------------|----------|
| РНК и ПР18               | 12.0 мкл |
| First-strand buffer      | 4.0 мкл  |
| dNTPs (10 mM)            | 1.0 мкл  |
| DTT (0.1 M)              | 1.0 мкл  |
| SUPERase <sup>•</sup> In | 1.0 мкл  |
| SuperScript III          | 1.0 мкл  |

Инкубировали 30 минут при 48С в термоциклере, после чего добавляли 2.2 мкл 1N NaOH и инкубировали 20 мин 98С. Высаживали ДНК при помощи изопропанола и Glycobluе по стандартному протоколу.

ДНК растворяли в 4 мкл воды и 2 мкл Б16 и проводили электрофорез в 7.5 % акриламидном геле с мочевиной (кроме сниженного количества

акриламида и бис-акриламида, все остальные компоненты те же). Продукт реакции обратной транскрипции в этом геле также мигрирует с ксиленианолом. После проведения электрофореза и покраски геля с помощью SybrGold, продукт обратной транскрипции вырезали, стараясь полностью отделить от избытка непрореагировавшего праймера RT. Затем, экстракцию ДНК из геля и высаживание ДНК проводили так же, как и в случае с РНК.

Осадок ДНК растворяли в 16 мкл воды и замешивали следующую реакционную смесь:

|                           |          |
|---------------------------|----------|
| ДНК                       | 15.0 мкл |
| CircLigase buffer         | 2.0 мкл  |
| MnCl <sub>2</sub> (50 mM) | 1.0 мкл  |
| CircLigase II             | 1.0 мкл  |

Инкубировали 2 часа при 60С в термоциклере, после чего реакцию инактивировали инкубацией в течении 10 мин при 80С. Затем, проводили высаживание ДНК по стандартному протоколу.

Следующая стадия – удаление примесей рРНК из библиотеки рибосомных футпринтов. На этой стадии реакция проводится только с библиотеками футпринтов, библиотеки RNAseq не используются.

ДНК растворяли в 16.5 мкл воды и переносили в тонкостенную 200 мкл пробирку для ПЦР. Добавляли 1.5 мкл Subtraction Oligo Mix и 2 мкл буфера Б18. Поместили в термоциклер и устанавливали следующие параметры: нагрев 90 сек 99С, охлаждение до 37С со скоростью 0.1 С/сек, инкубация при 37С 15 мин. Промывали 50 мкл суспензии магнитных шакриков MyOne Streptavidin C1 Dynabeads (Invitrogen, США), затем три

раза - в 0.5 мл буфера 1ХБ19, затем ресуспендировали их в 20 мкл 2ХБ19. Смешивали пробу с шариками и инкубировали 15 мин при 37С на термошейкере (400 об/мин). Супернатант, содержащий очищенные библиотеки рибосомных футпринтов, отбирали с помощью магнита и высаживали с помощью изопропанола и GlycoBlue по стандартному протоколу.

Далее, проводилась амплификация и получение финальных библиотек. Смешивали следующую реакционную смесь:

|                       |           |
|-----------------------|-----------|
| Phusion 5X HF Buffer  | 4 мкл     |
| dNTPs 10mM            | 0,4 мкл   |
| праймер ПР30 50 uM    | 0,2 мкл   |
| праймер ПР31/43 50 uM | 0,2 мкл   |
| Phusion полимераза    | 0,2 мкл   |
| ДНК                   | 1 мкл     |
| H2O                   | до 20 мкл |

Проводили ПЦР со следующими параметрами:

| Номер цикла | Денатурация   | отжиг         | элонгация    |
|-------------|---------------|---------------|--------------|
| 1           | 98 °C, 30 сек |               |              |
| 2–15        | 98 °C, 10 сек | 65 °C, 10 сек | 72 °C, 5 сек |

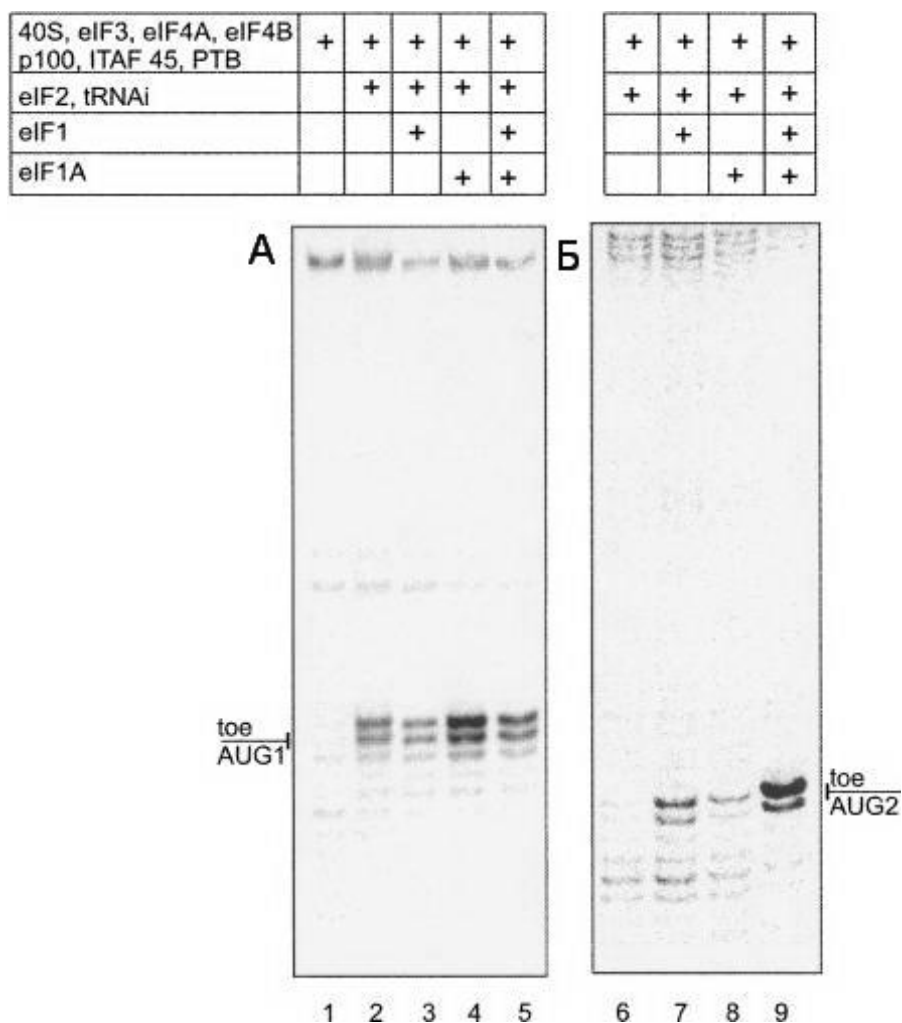
Тестируя разное число циклов ПЦР, подбирали условия, когда наблюдалось появление ПЦР продукта, а количество свободных праймеров еще не уменьшалось. Обычно это 6-10 циклов ПЦР. После подбора условий, амплифицировали 5 мкл ДНК. Полученные ПЦР продукты разгоняли в 2% агарозном геле в 1хТАЕ с добавлением 1 мкл SybrGold в гель перед застыванием. В процессе электрофореза, наблюдали за оптимальным разделением ПЦР продуктов и праймеров. ПЦР продукты вырезали из геля, и ДНК очищали с помощью набора Wizard SW Gel and PCR cleanup system (Promega, США). Очищенную ДНК использовали для секвенирования следующего поколения на платформе Illumina HiSeq.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Особенности инициации трансляции на IRES элементах типа I и II

#### 3.1.1. Влияние факторов инициации на выбор стартового кодона на IRES элементе FMDV

мРНК вируса FMDV, содержит IRES элемент второго типа (рис. 22), и для синтеза вирусных белков использует, как уже упоминалось ранее, два стартовых кодона AUG, разделенных 84 нт спейсером. Механизм инициации трансляции на AUG<sub>1</sub> был проанализирован ранее [20, 168, 193], но ничего не известно про требования к инициаторным факторам для инициации на AUG<sub>2</sub>. Мы решили изучить механизм инициации трансляции на AUG<sub>2</sub> в системе из очищенных компонентов.



**Рис. 27.** Сборка инициаторных комплексов на IRES элементе FMDV1: на AUG<sub>1</sub> (А) и на AUG<sub>2</sub> (Б) в присутствии полного набора факторов инициации, 40S, Met-tRNA<sub>i</sub>, eIF1 и eIF1A, при добавлении. ITAF45 и PTB.

Для этого, индивидуальные факторы инициации, мРНК FMDV IRES-FLuc, и инициаторная тРНК смешивались и инкубировались, после чего образование комплекса детектировали с помощью реакции торможения удлинения праймера (Toe Printing). Вкратце, к мРНК добавляется радиоактивно меченный праймер, смесь дезоксирибонуклеотидов и обратная транскриптаза. Обратная транскриптаза удлиняет праймер, но, если в процессе удлинения попадает препятствие, например, инициаторный комплекс, то он терминирует обратную транскрипцию. По длине укороченного фрагмента кДНК можно понять, где именно на мРНК образовался инициаторный комплекс, и насколько эффективно комплекс образовался.

Первый полученный нами результат заключался в следующем: полного набора инициаторных факторов и двух ITAF оказалось достаточно для того, чтобы комплекс образовался и на AUG<sub>1</sub>, и на AUG<sub>2</sub> (рис. 27, дорожка 5 и 9). Однако, исключение из реакционной смеси факторов eIF1 и eIF1A оказывало различный эффект на сборку комплексов на двух стартовых кодонах. На AUG<sub>1</sub>, образование 48S происходит и без eIF1 с eIF1A, причем также эффективно, как и в присутствии обоих факторов инициации (рис 27, дорожка 2 и 5). На AUG<sub>2</sub>, сборка комплекса в отсутствие этих факторов не происходит вовсе (рис. 27, дорожка 6 и дорожка 9). Интересно, что добавление этих факторов по отдельности также оказывает дифференциальный эффект в зависимости от кодона: на AUG<sub>1</sub>, eIF1 ингибирует сборку, в то время как eIF1A значительно стимулирует сборку 48S (рис. 27, дорожки 2, 3, 4). На AUG<sub>2</sub>, оба фактора по отдельности стимулируют сборку инициаторного комплекса, причем eIF1 обладает более выраженной стимулирующей активностью.

Полученные результаты говорят о том, что факторы первой группы оказывают различное влияние при инициации на AUG<sub>1</sub> и AUG<sub>2</sub>. Можно сделать вывод о том, что eIF1 способен подавлять образование

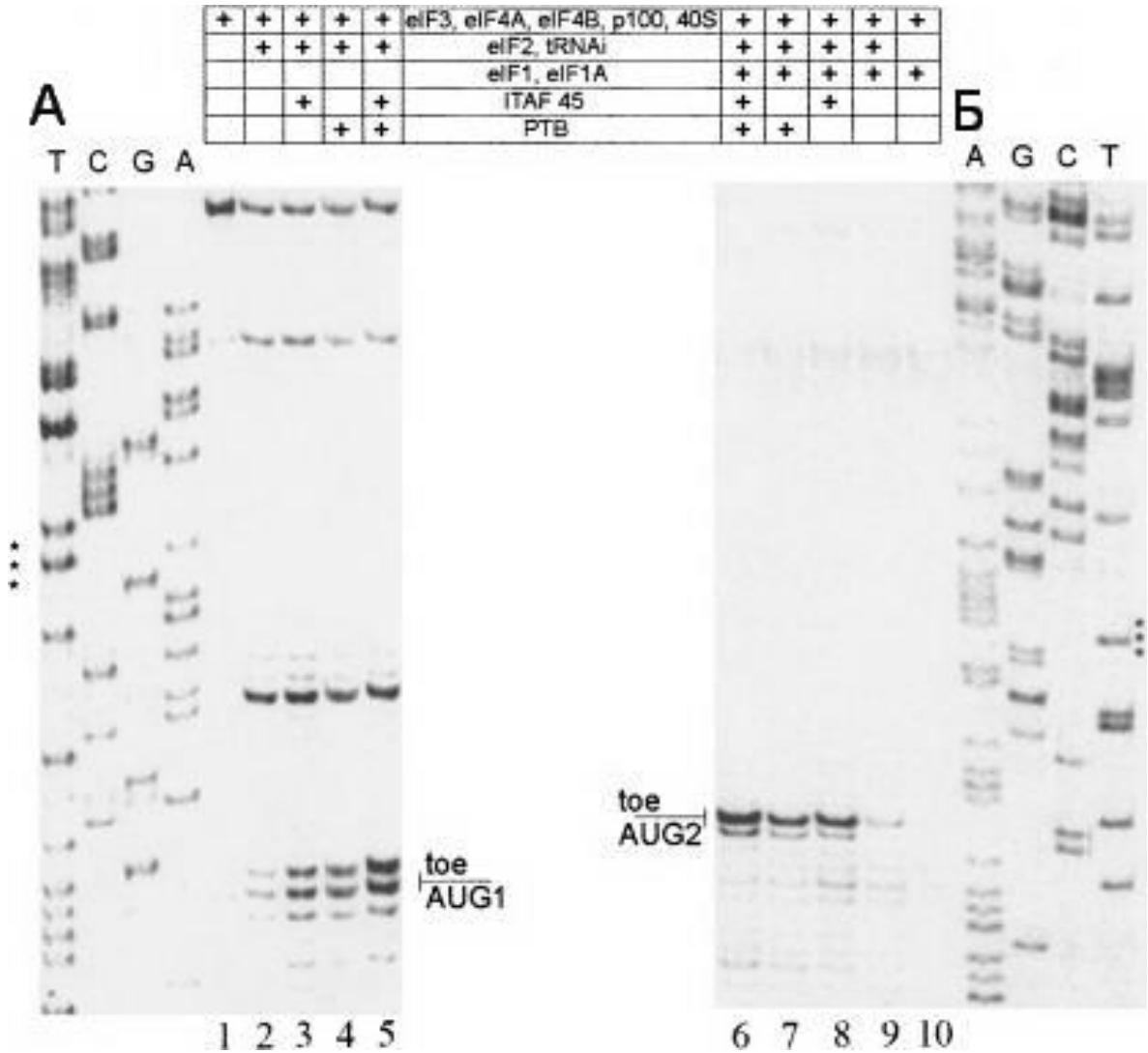
инициаторного комплекса на AUG<sub>1</sub> и стимулировать инициацию на AUG<sub>2</sub>. Таким образом, при изменении концентрации или активности eIF1 в клетке могут происходить изменения в выборе стартового кодона на мРНК FMDV. Учитывая тот факт, что на данный момент неизвестно никаких функциональных различий в вирусном полипептиде, который синтезируется с первого и со второго старта, можно предположить следующее: система из двух стартовых кодонов используется для того, чтобы эффективно транслировать вирусный белок вне зависимости от условий. В условиях строгой селекции стартового кодона (высокий уровень или высокая активность eIF1) трансляция будет идти с AUG<sub>2</sub>, а в условиях ослабленной селекции стартового кодона (низкий уровень или активность eIF1) трансляция будет направляться с AUG<sub>1</sub>. Таким образом, вне зависимости от активности eIF1 в клетке, продукция вирусных белков не будет нарушена.

Далее, мы решили изучить, каким образом транс-действующие факторы, ITAF45 и РТВ, влияют на выбор стартовых кодонов. Мы рассматривали две возможности. Если взаимодействие ITAF45 и РТВ необходимо для общей активации IRES элемента, например, для усиления связывания eIF4G или eIF3, то эти транс-действующие факторы должны одинаково стимулировать инициацию на обоих AUG. Если же ITAF45 и РТВ (или один из этих факторов) необходимы для позиционирования AUG<sub>1</sub> в Р-сайт рибосомы, то эти факторы могли бы оказывать дифференциальный эффект на инициацию трансляции на AUG<sub>1</sub> и AUG<sub>2</sub>.

Результаты эксперимента по сборке инициаторных комплексов из очищенных компонентов подтвердило наше первое предположение: оба фактора оказывают одинаковый стимулирующий эффект на обоих AUG, а их комбинация приводит к еще большей стимуляции инициации (рис. 28).

Как уже упоминалось ранее, расстояние между AUG<sub>1</sub> и AUG<sub>2</sub> составляет 84 нуклеотида, наличие и длина спейсера между двумя

стартовыми кодонами консервативно у полевых изолятов FMDV [195]. Анализ вторичной структуры спейсерного участка предсказал возможное образование шпильчатой структуры перед AUG<sub>2</sub>.



**Рис. 28.** Сборка инициаторных комплексов на IRES элементе FMDV1: на AUG<sub>1</sub> (А) и на AUG<sub>2</sub> (Б) в присутствии полного набора факторов инициации, 40S, Met-tRNA<sub>i</sub>, eIF1 и eIF1A, при добавлении. ITAF45 и PTB.

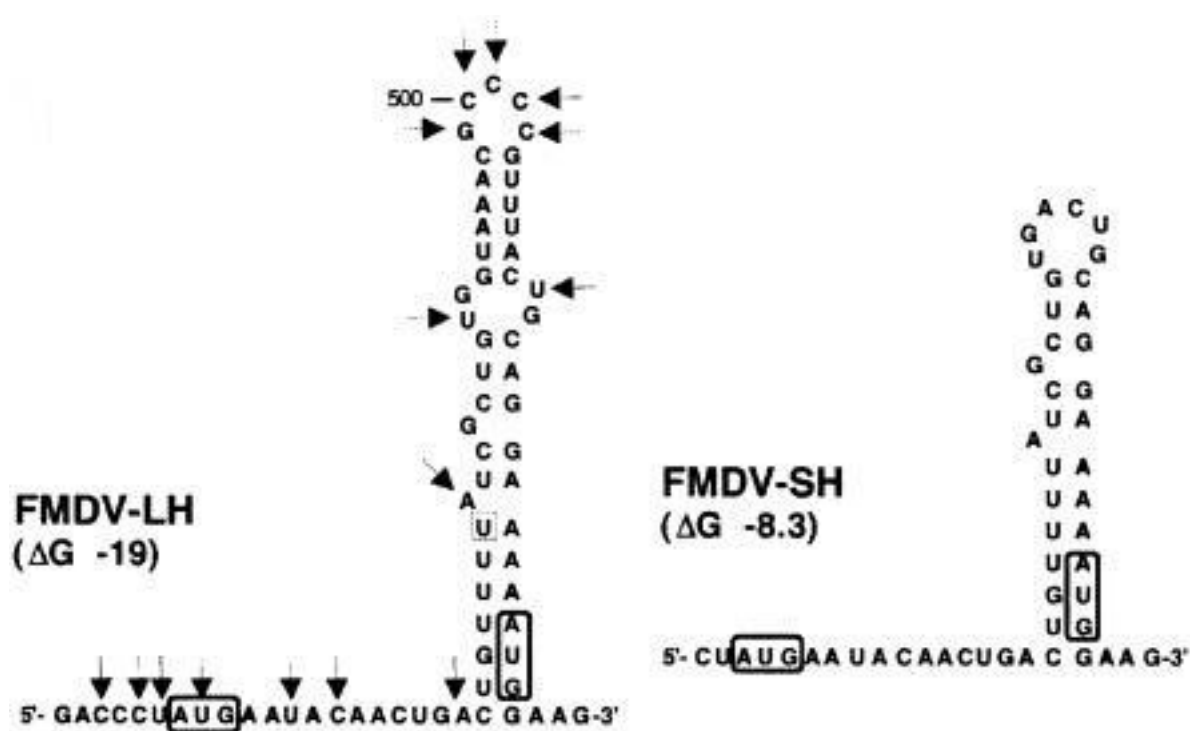
Возникает вопрос – если узнавание AUG<sub>2</sub> происходит по механизму сканирования, то стабильность предполагаемой шпильчатой структуры может оказывать эффект на инициацию на AUG<sub>2</sub>. Было решено проверить, действительно ли эта шпильчатая структура существует в мРНК. Для этого, проводили энзиматический пробинг РНК с использованием

диметилсульфоксида (DMS) , РНКазы T2 и РНКазы А, а также филогенетический анализ изолятов FMDV.



**Рис. 29.** Вторичная структура спейсерного региона FMDV, полученная в результате пробинга с использованием DMS, РНКазы T2 и РНКазы А. Пары нуклеотидов, для которых показана ковариация для различных изолятов FMDV, отмечены серым цветом.

На основании полученных данных, было показано, что действительно перед AUG<sub>2</sub> существует шпилечная структура со стабильностью -16.20 кКал/моль. Для проверки эффекта шпилечной структуры на инициацию трансляции на AUG<sub>2</sub>, было решено создать две дополнительные конструкции с более стабильной шпилькой (FMDV-LH), и с дестабилизированной шпилькой (FMDV-SH). Полученные производные также были проанализированы с помощью пробинга, результаты подтвердили образование желаемых шпилек.

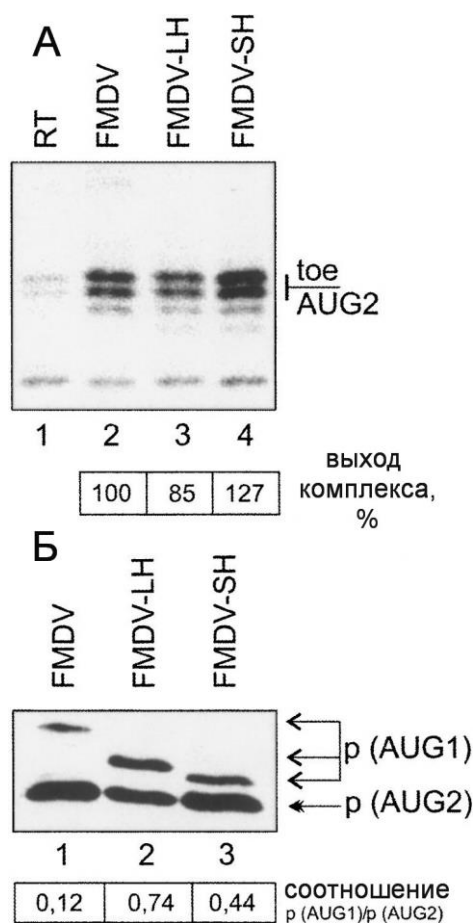


**Рис. 30.** Вторичные структуры спейсерных регионов FMDV-LH и FMDV-SH. Стартовые кодоны выделены черным прямоугольником.

В случае с FMDV-LH, стабильность шпильчатой структуры оценивалась как  $\Delta G$ , -19 кКал/моль. AUG<sub>2</sub> находится в правой части основания шпильчатой структуры, таким образом, для его узнавания необходимо расплести всю структуру. В случае с FMDV-SH, стабильность шпильчатой структуры была снижена до  $\Delta G$ , -8.3 кКал/моль. Соответствующие мРНК транслировали в клетках ВНК-2, а также анализировали сборку инициаторных комплексов на AUG<sub>2</sub> в системе из очищенных компонентов.

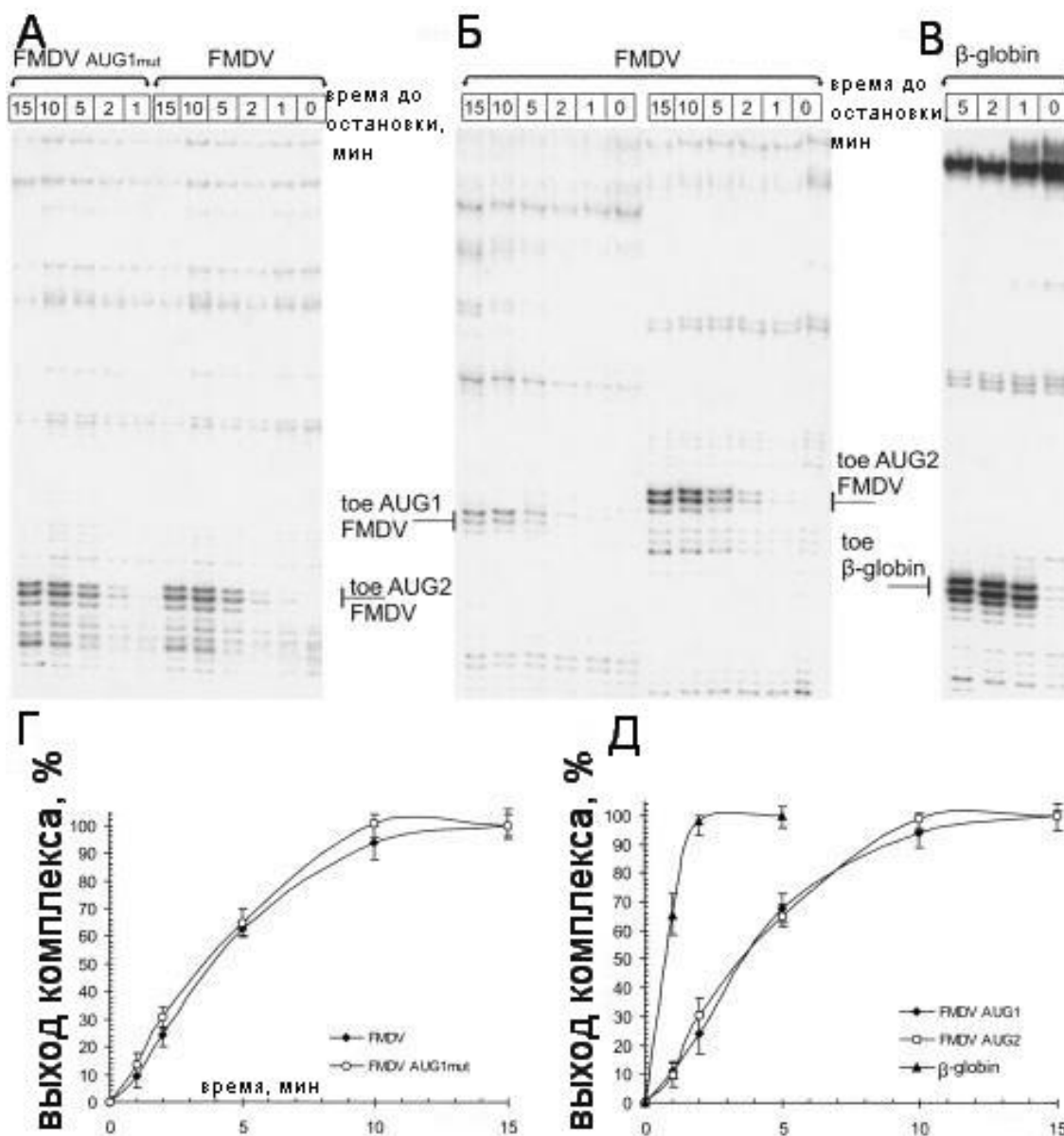
Оказалось, что более стабильная шпильчатая структура LH снижает инициацию трансляции на AUG<sub>2</sub> как при трансляции в клетках, так и в системе сборки инициаторных комплексов из очищенных компонентов. В то же время, менее стабильная шпилька SH оказывает противоположный эффект. Полученные результаты подтверждают предположение о том, что

43S комплекс сканирует спейсерный регион, и для инициации трансляции на AUG<sub>2</sub> необходимо расплетание локальной шпилечной структуры.



**Рис. 31.** Сборка инициаторных комплексов (А) и трансляция в ВНК-2 (Б) на мРНК, содержащих спейсерный регион дикого типа (FMDV), стабилизированную шпилечную структуру (FMDV-LH), и шпилечную структуру со сниженной стабильностью (FMDV-SH)

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что инициация происходит следующим образом: после активации IRES элемента с помощью ITAF45 и PTV, происходит связывание инициаторных факторов и рибосомы и посадка 43S комплекса в непосредственной близости от AUG<sub>1</sub>, после чего факторы eIF1 и eIF1A могут стимулировать проскальзывающее сканирование с последующим узнаванием AUG<sub>2</sub>. В процессе сканирования происходит расплетание шпилечной структуры и последующее узнавание AUG<sub>2</sub>. Учитывая это, стоит ожидать, что сборка комплекса на AUG<sub>1</sub> должна предшествовать сборке на AUG<sub>2</sub>, поскольку для инициации трансляции на AUG<sub>2</sub> необходимо какое то время для сканирования линкерного региона.



**Рис. 32.** Изучение скорости образования инициаторных комплексов на AUG<sub>1</sub> и AUG<sub>2</sub> FMDV с помощью “кинетического тоу-принта” (А, Б). В качестве контроля использовалась мРНК β-глобина, которая иницирует трансляцию по кеп-зависимому механизму (В). Количественные результаты обсчета интенсивностей сигнала, соответствующего 48S комплексу, представлены на графиках Г и Д.

Для того, чтобы изучить скорость инициации трансляции на IRES элементе FMDV, мы разработали метод “кинетического тоу-принтинга” в бесклеточной трансляционной системе из лизата ретикулоцитов кролика (RRL). мРНК FMDV-FLuc добавлялась в RRL, и через короткие промежутки времени в систему добавлялся 30mM MgCl<sub>2</sub> – при этой

концентрации магния происходит стабилизация собранных инициаторных комплексов и ингибирование сборки новых комплексов.

К нашему удивлению, увидеть разницу в скорости накопления инициаторных комплексов не удалось, при этом скорость образования комплексов на обоих кодонах оказалась очень низка (рис. 32 А и Б). Особенно хорошо это видно при сравнении с мРНК с лидером  $\beta$ -глобина, который иницирует трансляцию по кеп-зависимому механизму (рис. 32 В): максимальное накопление комплексов на стартовых кодонах FMDV происходит только через 10 минут после начала инкубации мРНК в RRL, в то время как в случае  $\beta$ -глобина сборка завершается через две минуты (рис 32 Г и Д). Из результатов данного эксперимента можно сделать вывод, что инициация трансляции на IRES элементе FMDV идет значительно медленнее, чем кеп-зависимая трансляция.

3.1.2 Открытие необычного транс-действующего фактора, стимулирующего трансляцию на IRES-элементах группы I – глицил-тРНК синтетазы (GARS).

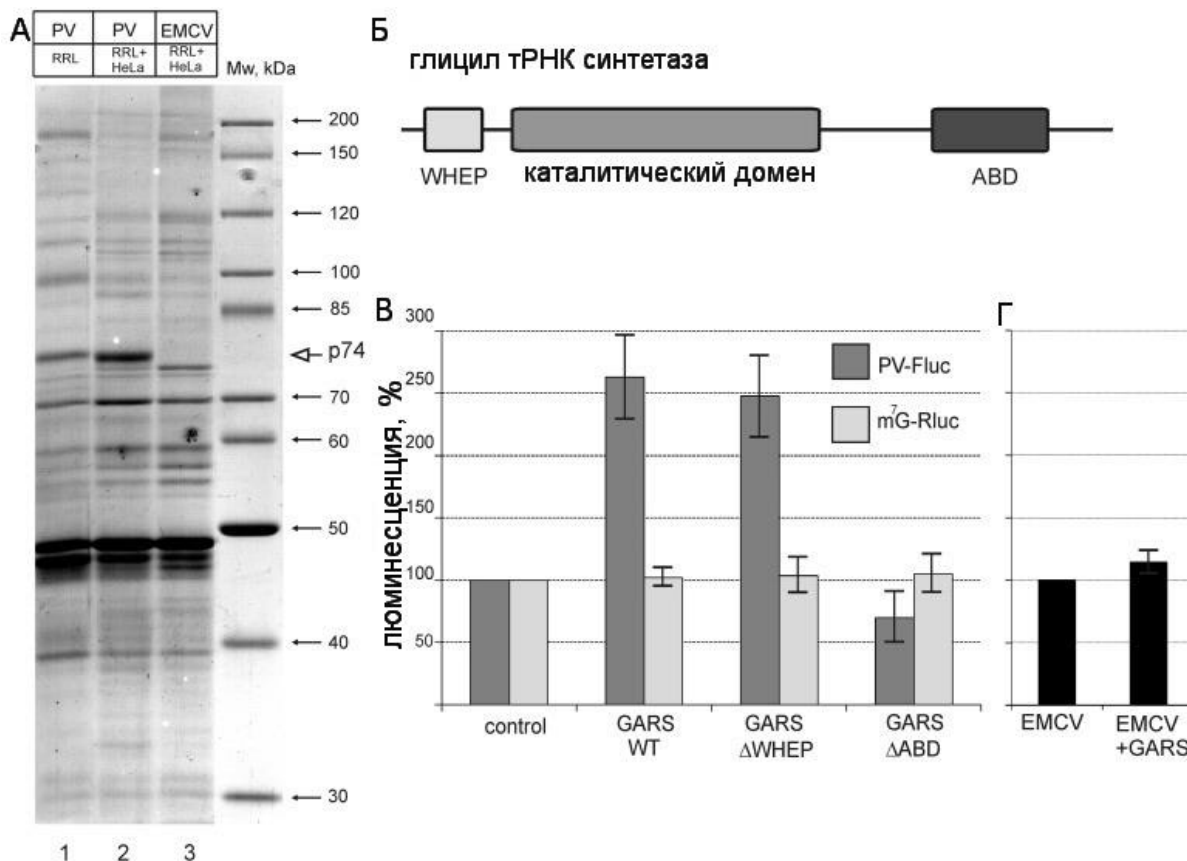
До недавнего времени, IRES элементы I типа оставались самыми малоизученными, в первую очередь благодаря тому факту, что попытки собрать инициаторный комплекс на данных IRES элементах не приносили успех. В то же время, инициаторные комплексы были успешно собраны из очищенных компонентов на довольно похожих IRES элементах II типа (EMCV, FMDV). Очевидно, что для инициации трансляции на IRES элементах I типа необходим один или несколько дополнительных транс-действующих факторов (ITAF), которые не нужны для IRES типа II. Мы решили изучить, какие факторы специфически связываются с IRES элементами I типа по сравнению с IRES элементами II типа. В качестве представителя IRES элемента I типа мы выбрали IRES элемент

полиовируса (PV IRES), а в качестве представителя II типа – IRES элемент EMCV.

С начала 90х годов было известно, что трансляция, направляемая PV IRES (и другими IRES элементами I типа) идет крайне неэффективно в лизате ретикулоцитов кролика (RRL), и стимулируется при добавлении экстракта из клеток HeLa (20%). В то же время, IRES элемент EMCV активен и в RRL, и в RRL+HeLa. Отсюда и возникла идея о наличии в экстракте HeLa одного или нескольких дополнительных факторов, необходимых для трансляции IRES элементов I типа. Мы решили идентифицировать эти факторы. Для этого, синтезировали соответствующие РНК, меченные биотином по остаткам уридина, инкубировали их в RRL или RRL+HeLa, и затем связывали образовавшийся рибонуклеопротеиновый комплекс со стрептавидин сефарозой. Элюцию РНК-связывающих белков проводили обработкой рибонуклеазой А – эта стадия позволяет минимизировать эффект от неспецифического связывания белков из бесклеточного экстракта с носителем.

Паттерн РНК-связывающих белков, взаимодействующих с IRES элементами PV и EMCV в смеси RRL+HeLa, оказался очень похож (рис. 33 А, дорожки 2 и 3).

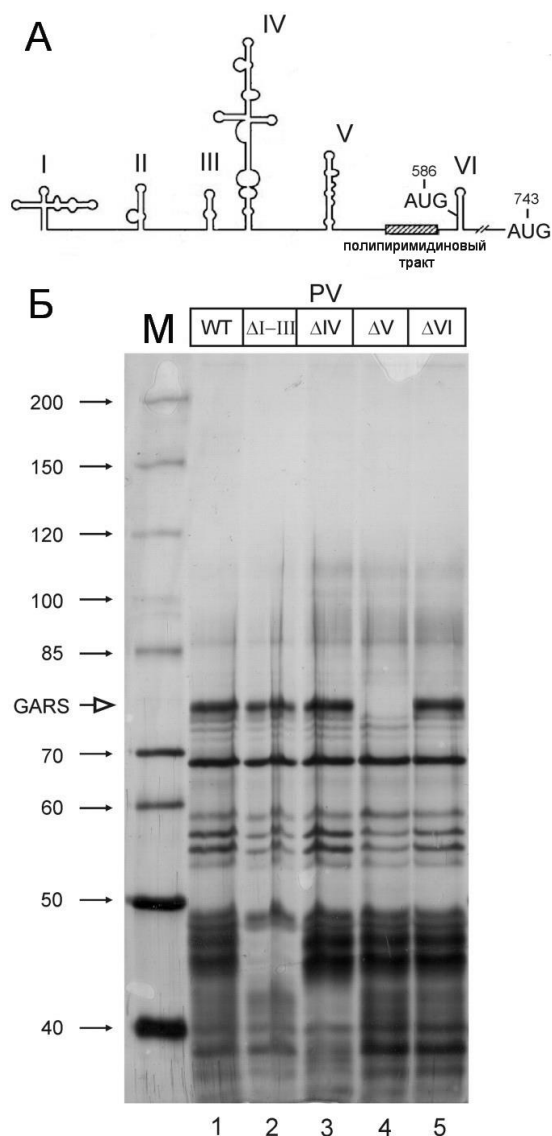
Однако, мы обратили внимание на полосу, мигрирующую в области 70 кДа – она полностью отсутствовала в случае EMCV (рис. 33 А, дорожка 3), и при этом добавление экстракта HeLa к РНК PV IRES приводило к усилению связывания этого белка (рис. 33 А, дорожка 1 и 2, полоса отмечена как Р74). Данный белок по всем критериям подходил под искомый транс-действующий фактор. Анализ данной белковой полосы с помощью масс-спектрометрии показал, что это – глицил-тРНК синтетаза (GARS).



**Рис. 33.** Идентификация глицил-тРНК синтетазы (GARS) - нового транс действующего фактора IRES PV. А) электрофореграмма РНК связывающих белков, взаимодействующих с мРНК IRES элемента полиовируса и EMCV, выделенная из системы RRL и RRL+HeLa; Б) доменная организация глицил-тРНК синтетазы млекопитающих; В и Г) трансляция репортерных мРНК в бесклеточной системе трансляции RRL с добавлением белка GARS

GARS принадлежит ко II классу аминоксил-тРНК синтетаз и имеет три основных домена – WHEP домен в своей N-концевой части, каталитический “core”, и C-концевой антикодон - связывающий домен ABD (рис. 33 Б). Для того, чтобы проверить, стимулирует ли GARS трансляцию, направляемую IRES PV, мы экспрессировали этот белок в *E. coli*, выделили его и добавили в RRL. Кроме полноразмерного GARS, мы также выделили белки, не содержащие WHEP, и не содержащие ABD. Добавление рекомбинантного полноразмерного GARS в RRL привело к специфической стимуляции трансляции репортера IRES PV Fluc (рис.33 В), при этом никакого эффекта на трансляцию контрольной кеп-зависимой

мРНК и мРНК EMCV-Fluc не наблюдалось (рис. 33 В и 4 Г). Делеция WHER домена не оказала никакого влияния на стимулирующее действие GARS, в то время как делеция ABD полностью инактивировала GARS в регуляции трансляции (рис. 33 В).



**Рис. 34.** Связывание GARS с IRES PV, содержащим делеции структурных доменов А) схематическое изображение 5'НТО мРНК полиовируса, Б) электрофореграмма РНК связывающих белков, взаимодействующих с мРНК IRES элемента полиовируса с последовательными делециями структурных доменов

Далее, мы решили картировать сайт связывания GARS. В IRES элементах I типа можно выделить 6 структурных доменов (рис. 34 А). Биотинилированные РНК с соответствующими делециями инкубировали с экстрактом HeLa, и РНК-связывающие белки разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле. Как можно видеть из геля, представленного на рис. 34 Б, делеция домена V привела к полной потере связывания GARS с

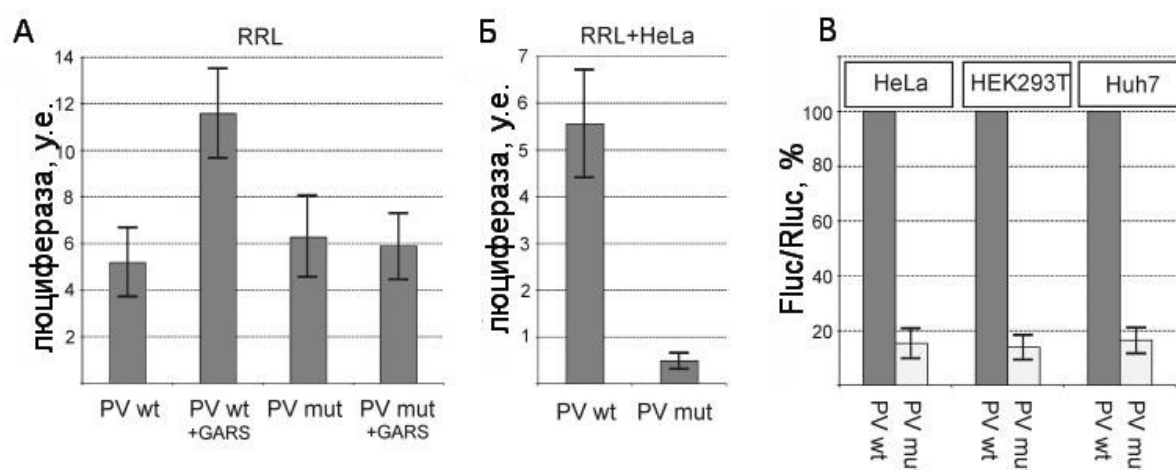


принтинга, В) анализ бинарного комплекса методом защиты от атак рибонуклеаз, Г) анализ консервативности “антикодоновой петли” в домене V IRES элементов I типа у 2893 пикорнавирусных мРНК (высота каждой буквы соответствует уровню консервативности, значение 2 соответствует инвариантному нуклеотиду в данном положении)

Действительно, оказалось, что в присутствии GARS усиливались две полосы ТУ-принтинга в области нуклеотидов 534–535 и 512–513 (рис. 35 Б, дорожки 1 и 2). При этом, добавление GARS к PV mut не приводило к образованию комплекса. Из этого мы сделали вывод о том, что связывание GARS с доменом V действительно зависит от наличия “антикодона” в петле домена V. Для более детального изучения комплекса GARS с IRES элементом полиовируса, использовали энзиматический пробинг: к РНК или к комплексу РНК с GARS добавляли небольшое количество специфической рибонуклеазы, которая гидролизует незащищенные белком участки РНК. В частности, использовали РНКазу V1 (специфическая для двухцепочечных участков РНК) и РНКазу T2 (специфическая для разрезания одноцепочечной РНК и петель РНК). Результаты эксперимента показали защищенность антикодоновой петли в домене V и прилегающих к ней нуклеотидов в комплексе РНК с GARS (рис. 35 В, дорожки 5,6 и 9,10). В случае мутированного антикодона (PV mut), защиты от разрезания РНК рибонуклеазы не наблюдалось (рис. 35 В, дорожки 7,8 и 11,12). Таким образом, можно сделать вывод о том, что “антикодон” ACC является ключевой детерминантой, определяющей связывание GARS с IRES элементом.

У глициловой тРНК, первое положение в антикодоне может быть любым (NCC, где N-любой нуклеотид). Мы провели филогенетический анализ последовательности домена V у 2893 различных пикорнавирусов. Оказалось, что нуклеотиды CC “антикодоновой” петли оказались

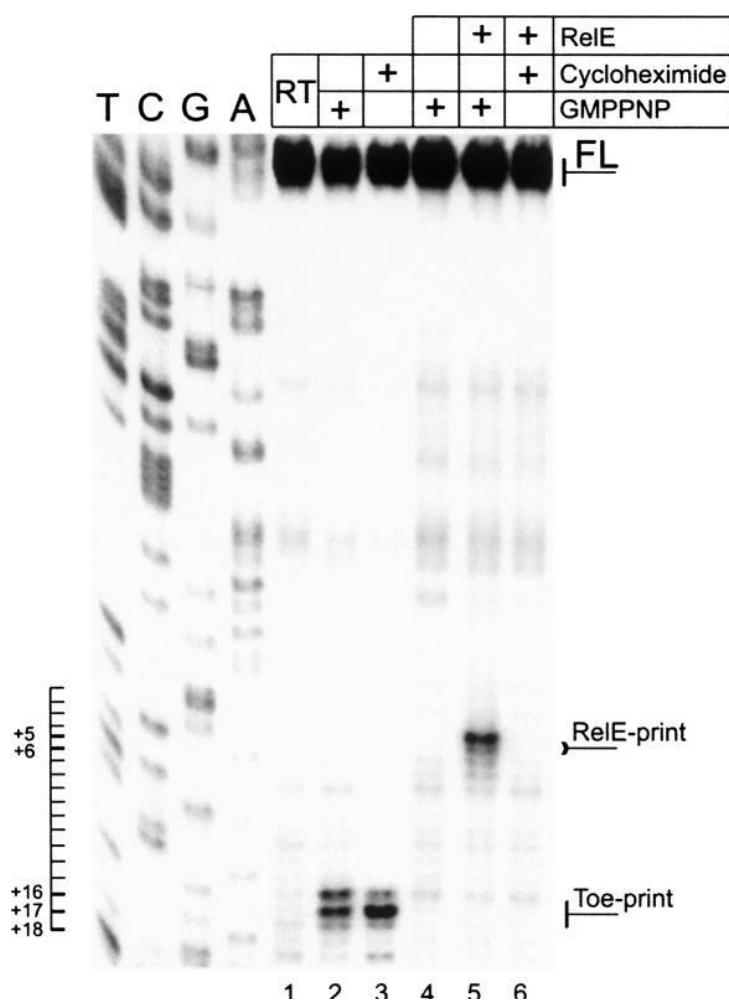
абсолютно консервативными, в то время как нуклеотид в первом положении “антикодона” (нуклеотид 495 по отношению к последовательности полиовируса) бывает абсолютно любым (рис. 35 Г). Этот факт говорит не только о том, что GARS узнает домен V и тРНК сходным образом, но также и о том факте, что GARS, по всей видимости, является универсальным транс-действующим фактором для очень многих, если не всех, вирусов, имеющих IRES элемент I типа.



**Рис. 36.** Мутация в антикодонной петле домена V PV IRES нарушает трансляцию репортерной мРНК (А) в лизате ретикулоцитов кролика при добавлении GARS, (Б) в RRL+HeLa, (В) в клетках HeLa, Hek293T, Huh7

Учитывая полученные результаты, мы предположили, что мутация в антикодонной петле может сказаться на активности IRES элемента полиовируса. Действительно, оказалось, что мутантный IRES элемент крайне неэффективно работает как в бесклеточной системе RRL+HeLa (рис. 36 Б), так и в культивируемых клеточных линиях человека (рис. 36 В). Более того, добавление рекомбинантного GARS в RRL перестает стимулировать трансляцию мутантного IRES-элемента (рис. 36 А). Из совокупности всех этих данных мы сделали вывод о том, что GARS является ключевым фактором, необходимым для активности IRES элемента полиовируса.

На какой именно стадии инициации трансляции GARS оказывает свой стимулирующий эффект на трансляцию? На этот вопрос мог бы ответить анализ эффективности сборки инициаторных комплексов на IRES элементе полиовируса в присутствии ингибиторов трансляции, блокирующих образование инициаторных комплексов на различных стадиях [196]. Так, негидролизуемый аналог GTP блокирует инициацию на стадии образования 48S комплекса, а циклогексимид блокирует инициацию на стадии образования 80S. Используя в RRL+HeLa IRES-элемент дикого типа и с мутацией в домене V, можно понять, на какой именно стадии инициации трансляции необходимо связывание GARS.

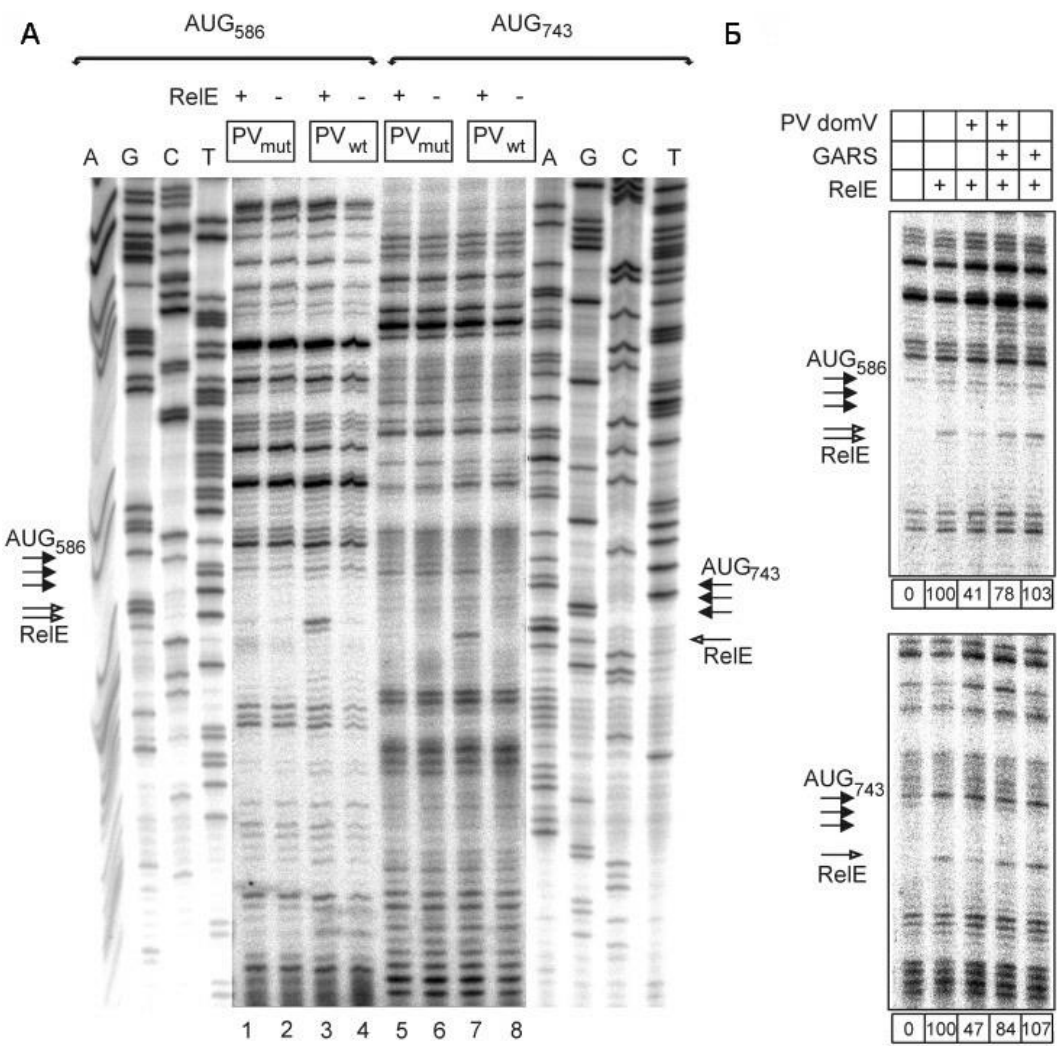


**Рис. 37.** Разработка и применение RelE – прайтинга для анализа инициаторных комплексов. Электрофореграмма кДНК продуктов, полученных до обработки RelE (дорожки 1-4) и после обработки RelE (дорожки 5 и 6)

Однако, есть существенная проблема, которая препятствует использованию метода ту-принтинга в RRL+HeLa – при добавлении праймера для обратной транскрипции происходит быстрая деградация

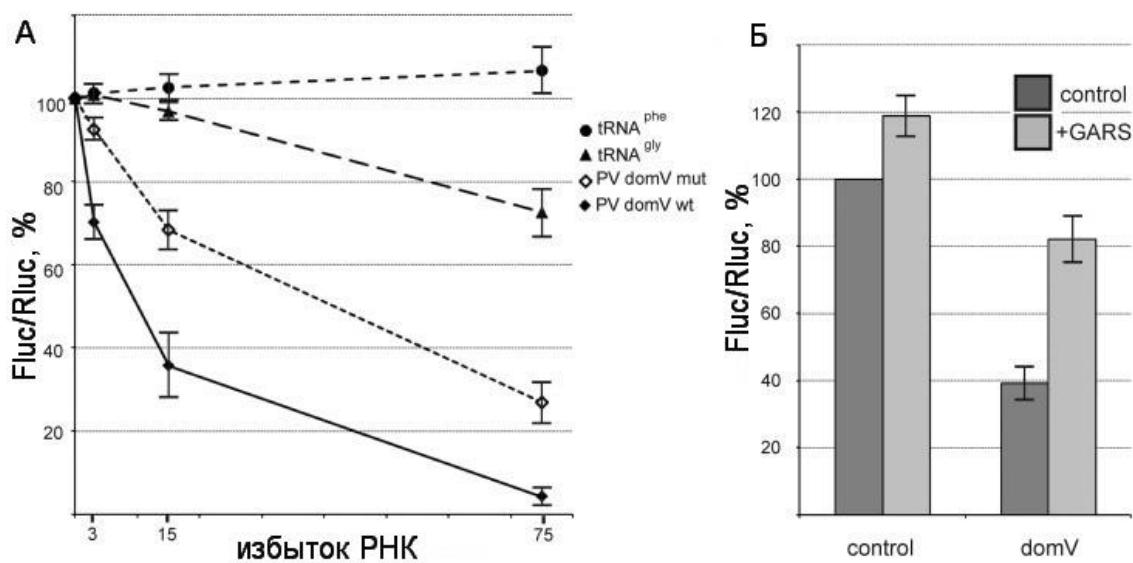
мРНК (по всей видимости из-за присутствия в системе РНКазы H, которая гидролизует РНК-ДНК дуплексы). Чтобы решить данную проблему, мы разработали альтернативный метод, который позволяет изучать образование инициаторных комплексов в RRL+HeLa с помощью RelE.

RelE - бактериальный токсин, который способен связываться с А-сайтом рибосомы и приводить к разрезанию мРНК в А-сайте [197]. Мы показали, что RelE работает и с эукариотической рибосомой, способен связываться с 48S и производить разрезание мРНК (рис. 37). Таким образом, можно собрать инициаторный комплекс, обработать его RelE, затем экстрагировать РНК и провести реакцию обратной транскрипции на очищенной РНК. В этом случае, компоненты из HeLa, которые препятствуют обратной транскрипции, уже не присутствуют в реакции, а терминация удлинения праймера происходит на разрывах в мРНК.



**Рис. 38.** А) Анализ образования инициаторных комплексов, образованных на мРНК PV в бесклеточной системе RRL+HeLa, методом RelE принтинга. Место разрезания мРНК при помощи RelE обозначено стрелкой. Б) RelE принтинг при добавлении в систему GARS и избытка конкурирующей РНК домена V

Мы провели RelE принтинг на мРНК IRES полиовируса в RRL+HeLa. Изучали образование 48S исследовали как на основном AUG<sub>743</sub>, так и на “криптическом” AUG<sub>586</sub> - этот стартовый кодон находится в непосредственной близости от IRES-элемента и необходим для эффективной трансляции с AUG<sub>743</sub>. Оказалось, что на мутантном по “антикодону” IRES элементе образование 48S комплексов нарушено на обоих AUG кодонах (рис. 38 А, дорожки 1,2 и 5,6). В то же время, 48S комплексы эффективно образуются на обоих кодонах в случае IRES элемента дикого типа.



**Рис. 39.** Изолированный домен V способен эффективно подавлять трансляцию, направляемую IRES PV; А) зависимость трансляции PV-Fluc от добавления различного количества коротких синтетических РНК, Б) Добавление GARS в RRL+HeLa способно снимать ингибирующий эффект от РНК домена V

Мы предположили, что фрагмент IRES элемента, способный связывать GARS, может приводить к подавлению трансляции с IRES элемента полиовируса. Действительно, так и оказалось: добавление в бесклеточную систему трансляции избытка РНК домена V, но не глициловой тРНК, эффективно подавляет трансляцию репортерной мРНК (рис. 39 А). При этом, такой же эффект от добавления конкурирующей наблюдался на образование 48S комплексов в эксперименте с RelE принтингом (рис. 38 Б). Добавление GARS вместе с доменом V при этом способно в значительной мере восстанавливать как трансляцию репортера (рис 39 Б), так и образование 48S (рис. 38Б). Полученный результат говорит о том, что GARS вовлечен в инициацию трансляции на стадии образования 48S комплекса, а не на последующих стадиях инициации.

Подводя итог, было показано, что GARS является универсальным фактором, вовлеченным в регуляцию трансляции PV IRES. Филогенетический анализ вирусных IRES элементов I группы и наши собственные неопубликованные данные говорят о том, что GARS необходим для инициации трансляции на всех IRES-элементах I типа.

В связи с этим, необходимо обсудить недавнюю работу, посвященную механизму инициации трансляции на IRES элементах I типа [152]. В этой работе, опубликованной в 2014 году (после нашей работы) исследователям из лаборатории Татьяны Пестовой и Кристофера Хеллена удалось реконструировать инициаторный комплекс на IRES элементе полиовируса в присутствии только одного ITAF – PCBP2. Особенно для нас важен тот факт, что в данной работе тестировался и GARS, и, по их данным, GARS не оказывает никакого влияния на сборку 48S (однако стоит отметить, что, как и у нас, специфическое связывание GARS с доменом V детектируется методом ту-принтинга). Мы считаем, что несмотря на очевидное противоречие, из данной работы нельзя сделать вывод о том, что GARS не нужен для инициации. Во-первых, в системе из

очищенных компонентов факторы инициации добавляются в большом избытке, в то время как в клетке факторов меньше, и, более того, клеточные кепированные мРНК эффективно за них конкурируют. Соответственно, если GARS нужен для того, чтобы увеличить аффинность какого-либо инициаторного фактора к IRES элементу, этого может не наблюдаться при избытке соответствующего фактора в системе сборки, но это может быть критично для трансляции вирусной мРНК в клетке. О вероятности такого объяснения говорит тот факт, что мутантный IRES, неспособный связывать GARS, крайне неэффективно транслируется не только в бесклеточной системе трансляции, но и при трансфекции репортерной мРНК в клетки.

Во-вторых, авторы упомянутой работы использовали в своей системе сборки из очищенных компонентов укороченный с N и C конца фрагмент eIF4G, 4Gm. Из представленных авторами результатов очевидно, что такой минимальный фрагмент фактора способен участвовать в инициации трансляции на IRES элементе, но имеет ли это отношение к реальному механизму инициации трансляции? Известно, что полиовирусная протеаза 2A про индуцирует протеолиз eIF4G до фрагмента, получившего название P100, но P100 укорочен только с N-конца, он гораздо длиннее 4Gm. В отличие от P100, 4Gm в клетке никогда не бывает. Поэтому мы предполагаем, что GARS для стимулирующей активности может кооперировать с P100, или даже с полноразмерным eIF4G, ведь при попадании вирусной мРНК в клетку никакой протеазы еще не синтезировано, необходим хотя бы один раунд трансляции с полноразмерным eIF4G. В пользу нашего предположения о том, что P100 и GARS кооперируют при эффективной трансляции PV IRES, говорят результаты наших неопубликованных экспериментов – добавление в RRL+HeLa очищенной 2A протеазы приводит к драматическому подавлению кеп - зависимой трансляции и к стимуляции трансляции PV

IRES репортерной мРНК. Однако, трансляция PV mut не только не стимулируется, но подавляется при расщеплении eIF4F.

Мы считаем, что наши доводы, приведенные выше, не позволяют сделать вывод о том, что механизм инициации трансляции на IRES элементах первого типа охарактеризован и изучен. На данный момент мы продолжаем исследование роли GARS в инициации трансляции.

### 3.2. Изучение кеп-независимой инициации трансляции у эукариот

В предыдущем разделе, мы рассмотрели некоторые особенности функционирования IRES элементов, найденных ранее в вирусных мРНК. IRES элемент опосредует внутреннюю инициацию трансляции. Главная особенность внутренней инициации трансляции – это то, что 5'конец мРНК никак не вовлечен в инициацию. Именно это универсальное свойство IRES элементов определяет то, как можно искать новые IRES элементы. Для этого необходимо использовать репортерную конструкцию, у которой репортерный ген под контролем предполагаемой последовательности, содержащей IRES элемент, будет находиться в таком контексте, что 5'конец мРНК будет заблокирован для инициации.

Каким образом можно создать репортерную конструкцию, в которой трансляция репортерного гена может протекать только по механизму внутренней инициации? Как уже упоминалось в обзоре литературы, введение стабильной шпилечной структуры на 5'конец мРНК значительно ингибирует посадку 43S на мРНК, но, с другой стороны, полностью не подавляет ее. Существуют дополнительные трансляционные хеликазы, которые способствуют расплетанию таких шпилечных структур. Соответственно, такая конструкция не может быть использована для определения механизма инициации, поскольку невозможно установить,

является ли остаточная активность репортера следствием внутренней инициации или обычного сканирования.

Существуют две альтернативы. Первая – создание кольцевой мРНК. Действительно, если такая мРНК транслируется, то только за счет внутренней инициации, ведь у нее вообще нет 5'конца. Однако стоит отметить, что создание данного репортера сопряжено с техническими сложностями, более того, трансляция с данного репортера может объясняться наличием продуктов эндонуклеотического расщепления кольцевой мРНК.

Вторая альтернатива - использование бицистронного репортера. В этом случае, создается репортерная конструкция, в которой первый репортерный ген находится содержит обычную 5'НТО, которая иницирует трансляцию за счет сканирования. Далее, после первого репортерного гена, в конструкцию помещается 5'НТО, которую хотят протестировать на возможность внутренней инициации, после которой следует второй репортерный ген. Кажется очевидным, что если мы наблюдаем трансляцию только первого цистрона, то IRES элемента в тестируемой 5'НТО нет. Если же наблюдается трансляция и первого, и второго цистрона – то IRES элемент есть. Система бицистронных конструкций была впервые опробована на вирусных IRES элементах, где подтвердила наличие внутренней инициации. Создание бицистронной репортерной конструкции не требует каких-либо сложных манипуляций и нестандартных методик (как в случае с созданием кольцевой РНК). Наличие положительного контроля (вирусный IRES элемент) и отрицательного контроля (неспецифическая последовательность), легкость измерения активности репортеров, возможность создание репортера в виде плазмидной ДНК (pDNA), и кажущаяся легкость трактовки результатов сделали метод бицистронных конструкций “золотым стандартом” для изучения внутренней инициации у млекопитающих. Благодаря этому

подходу, были открыты сотни IRES элементов, расположенных в 5'НТО клеточных мРНК. Однако, на данный момент мы можем сделать вывод, что метод бицистронных конструкций, к сожалению, нанес огромный вред трансляционному сообществу, поскольку большинство (если не все) клеточные IRES элементы не существуют в действительности. Рассмотрим, почему это так.

Для изучения внутренней инициации, репортерные конструкции необходимо доставить в клетки. Сделать это можно, используя либо плазмидную ДНК (pDNA), либо репортерную мРНК (mRNA). Для обоих вариантов есть свои преимущества и недостатки, однако недостатков в случае pDNA трансфекции гораздо больше. Напомним, что речь идет не о методическом аспекте трансфекции в целом, а о использовании трансфекции для изучения механизмов инициации трансляции.

ДНК репортеры обычно содержат либо конститутивно активный промотор (SV40, CMV, и другие), либо клеточно-специфичный или индуцируемый промотор. Считается, что pDNA попадает в клетку через эндосомы, затем происходит высвобождение в цитоплазму, и попадание в ядро. Соответственно, pDNA трансфекция обычно крайне неэффективна в неделящихся клетках, поскольку для попадания в ядро необходимо исчезновение ядерной оболочки при делении. При трансфекции клеточных культур, начало экспрессии репортерного гена для индивидуальных клеток может варьировать от 2 до 20 часов [198]. Это, по всей видимости, объясняется различным временем попадания pDNA в ядра при делении несинхронизированных клеточных культур [199-202]. Соответственно, условия, которые сказываются на прогрессии клеточного цикла, сказываются на репортерной активности pDNA: например, клетки, арестованные в G1 фазе при обработке афидиколином, продуцируют в 20 раз меньше репортера по сравнению с несинхронизированными клетками [200].

Далее, следующий недостаток рDNA связан со стадией транскрипции. Действительно, каким образом можно понять, что изменения в активности репортера связаны с изменением трансляции, а не транскрипции? Области в геноме, в которых закодированы 5'НТО, часто содержат сайты связывания транскрипционных факторов и регуляторов. Соответственно, участок 5'НТО может влиять на транскрипцию непредсказуемым образом. Более того, криптические энхансеры транскрипции могут присутствовать даже в самой последовательности вектора, и таким образом могут регулировать транскрипцию в зависимости от используемой клеточной линии [203]. Теоретически, можно подавить в клетках транскрипцию, и тогда экспрессия репортерного гена в течении некоторого времени будет определяться только на уровне трансляции. Однако тут стоит учитывать тот факт, что ингибиторы транскрипции часто оказывают эффект на трансляцию. Так, было показано, что обработка клеток актимидомицином Д или 5,6-дихлоро-1-β-d-рибобензимидазолом (DRB) приводит к ингибированию трансляции через фосфорилирование фактора инициации eIF2 [204, 205]. Данную проблему можно решить, включая продукцию репортерной мРНК в заданный момент времени, используя индуцируемые промоторы.

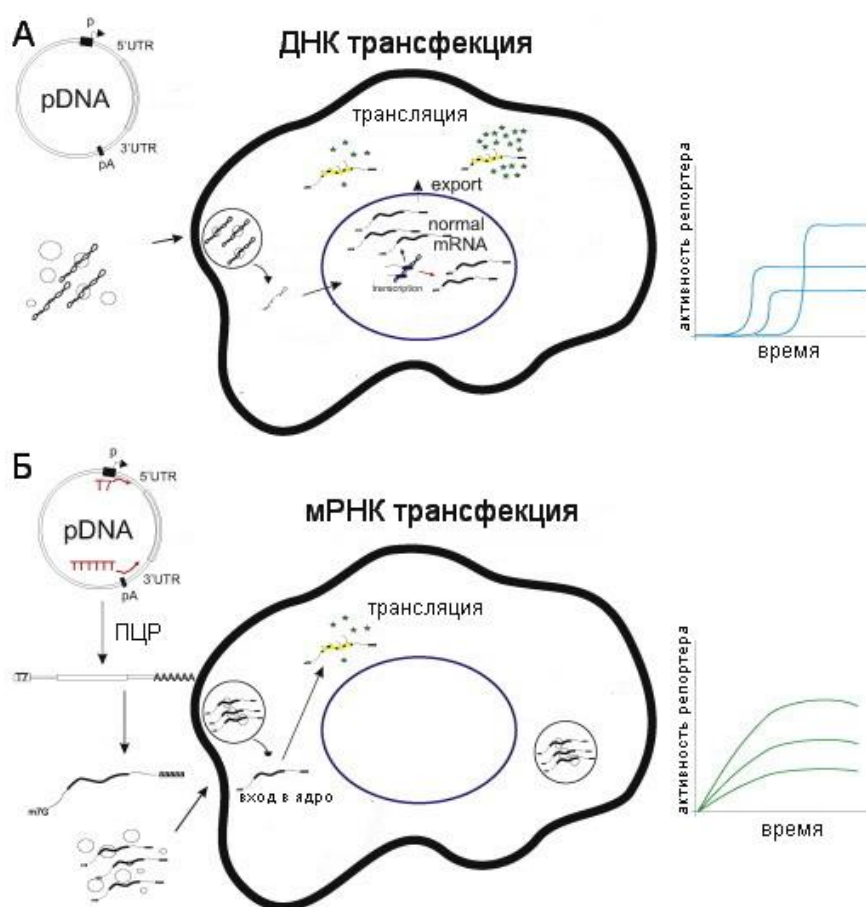
Однако, самая главная опасность при использовании рDNA кроется в том, что с плазмиды могут продуцироваться не только бицистронная мРНК, но также и альтернативные транскрипты. Это может происходить из-за наличия альтернативных промоторов, сайтов альтернативного сплайсинга, или их комбинации. Криптический промотор может находиться не только в исследуемой 5'НТО, но и в самом репортерном гене [206], и в самом векторе [207]. Хорошим примером может служить работа, в которой было показано, что вектор рGEM-4Z, предназначенный для работы с бактериями, эффективно продуцирует репортерный ген в эукариотических клетках, несмотря на отсутствие эукариотического

промотора в конструкции [208]. Более того, с самого вектора могут продуцироваться короткие РНК, которые могут оказать влияние на множество процессов в клетке совершенно непредсказуемым образом. Так, при полнотранскриптомном анализе клеток, трансфецированных различными плазмидами, было обнаружено множество коротких РНК, например – популяция смысловых и антисмысловых коротких РНК, продуцируемых с Neo/Kan кассеты устойчивости [209]. Это может объяснять ранее известную способность некоторых плазмид вызывать клеточный стресс – эти короткие РНК могут образовывать дуплексы, соответствующие РНК дуплексы активируют PKR, что приводит к фосфорилированию и инактивации eIF2 [210, 211].

С рDNA могут продуцироваться различные мРНК с непредсказуемыми 5'НТО. В случае с бицистронным вектором, особую проблему представляет продукция моноцистронных мРНК, которые могут транслировать второй цистрон по кеп-зависимому механизму. Даже небольшого количества такой мРНК может оказаться достаточно для продукции значительного количества репортера, из-за чего можно сделать ошибочный вывод о внутренней инициации [212-216].

Многие, но не все, проблемы можно решить, если трансфецировать в клетки не рDNA, а мРНК (рис. 40). мРНК можно получить с той же конструкции рDNA с помощью *in vitro* транскрипции. Соответствующая мРНК должна быть полиаденилирована и иметь m<sup>7</sup>G кеп. Поли А последовательность можно ввести на стадии ПЦР, а ввести кеп – с помощью ко-транскрипционного или ферментатического кепирования. Принципиальная возможность трансфекции мРНК в клетки человека была экспериментально продемонстрирована еще в конце 80х годов [217], однако в настоящее время применяется не так часто, как можно было бы представить, в основном из-за широко распространенного мнения о нестабильности РНК по сравнению с ДНК. Главное преимущество

трансфекции мРНК для изучения трансляции очевидно: в клетках будет транслироваться только эта самая мРНК и никаких альтернативных транскриптов.



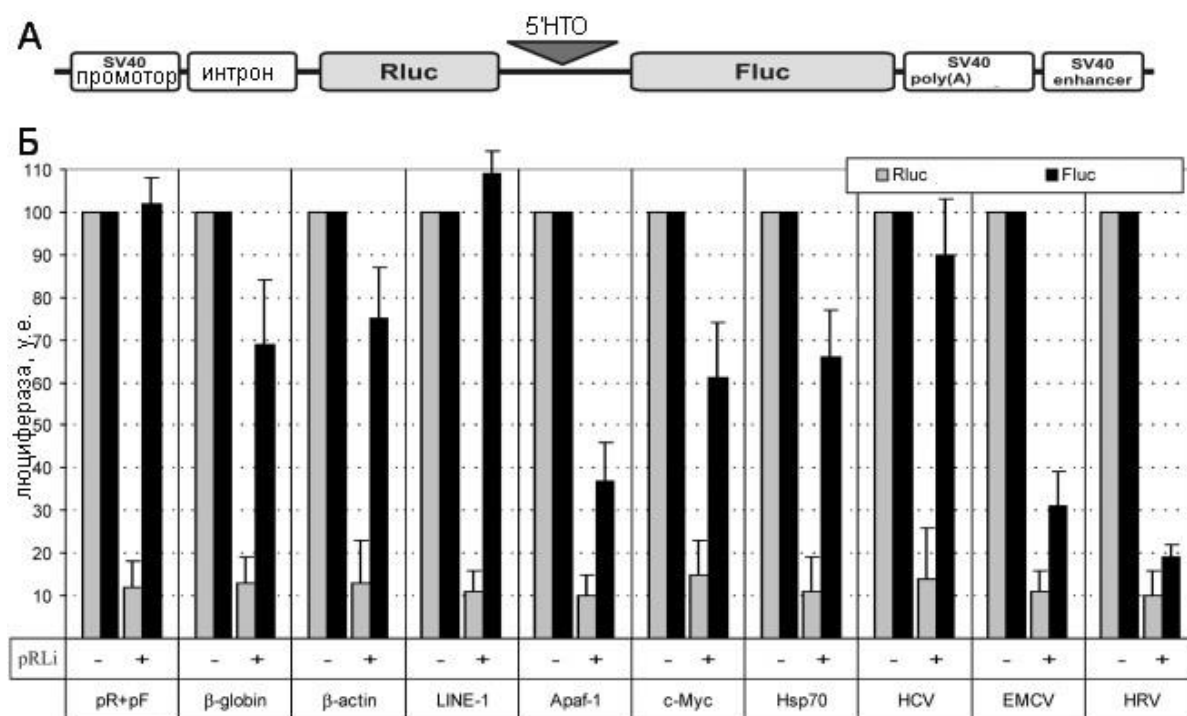
**Рис. 40.** Особенности pDNA (А) и мРНК трансфекции (Б) в клетки млекопитающих.

Мы решили использовать трансфекцию мРНК для того, чтобы изучить механизм инициации трансляции для некоторых клеточных 5'НТО, которые, по литературным данным, содержали IRES элементы. В качестве трех модельных клеточных IRES элементов были выбраны следующие 5'НТО. 1) APAF-1 – белок необходим для активации апоптоза, образует комплекс апоптосому, которая рекрутирует “инициаторную” каспазу 9 и приводит к ее активации. В 5'НТО мРНК APAF-1 ранее был обнаружен IRES элемент [218]. 2) с-Мус - транскрипционный фактор, протоонкоген. Также по литературным данным имеет IRES элемент в

своей 5'НТО [219, 220]. 3) мРНК белка теплового шока HSP70 также по литературным данным имеет IRES элемент [221].

Далее, мы выбрали три 5'НТО, не содержащих IRES элементы – лидеры  $\beta$ -актина,  $\beta$ -глобина, а также неспецифическую последовательность из вектора. Эти последовательности не имеют каких-либо специфических черт, и слишком коротки для того, чтобы иметь какой-либо IRES. Наконец, мы выбрали три вирусных IRES элемента, относящихся к группе I (HRV), группе II (EMCV) и группе III (HCV). Соответствующие 5'НТО были заклонированы в межцистронное положение вектора pGL3, в котором первый цистрон кодирует люциферазу Renilla, а второй цистрон – люциферазу Firefly.

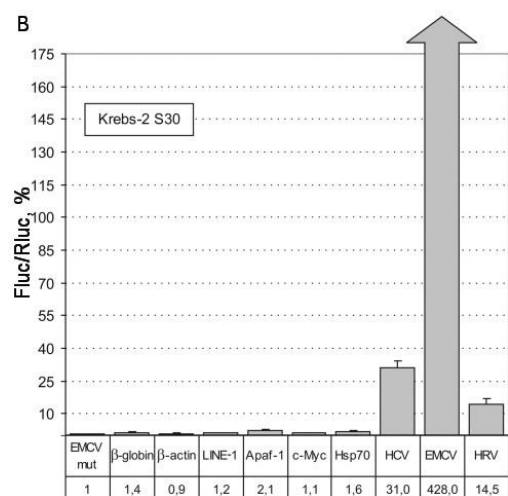
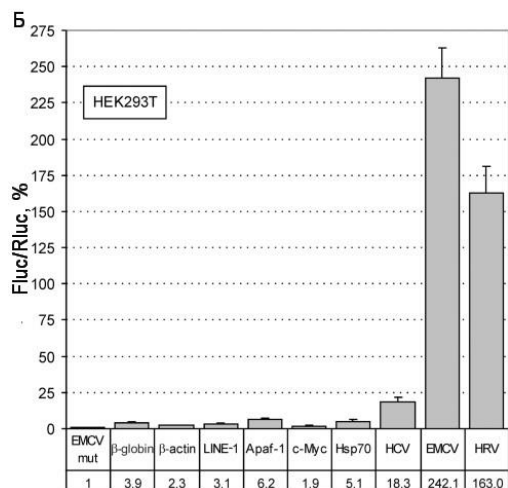
Для начала мы решили проверить, в какой степени трансфекция ДНК может использоваться для изучения внутренней инициации. Конструкции были трансфицированы в виде плазмид в клетки Нек293Т и HeLa, и после лизиса клеток измерялась репортерная активность. Во всех случаях, наблюдалась трансляция и первого, и второго цистрона (рис 41).



**Рис. 41.** ДНК трансфекция репортерных конструкций в клетки Hek293T. А) схематическое изображение бицистронных конструкций, Б) и эффект экспрессии короткой интерферирующей РНК, действующей последовательности Renilla, на активность репортерных конструкций. Серые столбики показывают активность первого цистрона (Renilla), черные столбики – активность второго цистрона (Firefly)

Однако для интерпретации результатов было необходимо ответить на вопрос, действительно ли активность второго цистрона Firefly (Fluc) происходит из-за внутренней инициации трансляции с бицистронной мРНК. Мы применили подход, основанный на использовании плазмиды pRLi, которая кодирует короткую интерферирующую РНК, комплементарную последовательности Renilla (Rluc) [212]. Если с плазмидной ДНК продуцируется только бицистронная мРНК, тогда pRLi подавит активность Fluc и Rluc одинаковым образом. Если же, кроме бицистронной мРНК, с плазмиды также транскрибируются криптические моноцистронные транскрипты, не содержащие последовательности Renilla, то такие транскрипты будут устойчивы к РНК-интерференции. Тогда активность Fluc подавится меньше, чем подавится активность Rluc. Именно это и наблюдалось абсолютно во всех случаях (рис. 41, сравнить 3 и 4 столбец в каждой серии). Из теста с pRLi можно сделать однозначный вывод – при ДНК трансфекции в контексте вектора pGL3 всегда наблюдается значительная продукция аберрантных моноцистронных транскриптов, даже в случае “настоящих” вирусных IRES элементов (особенно яркий результат наблюдается в случае HCV, рис. 41). Таким образом, не стоит использовать ДНК бицистронные репортеры для изучения внутренней инициации.

Далее, с помощью ПЦР и T7- транскрипции были получены соответствующие бицистронные кепированные и полиаденилированные мРНК, которые затем трансфецировали в клетки Hek293T (рис. 42 Б), или транслировали в бесклеточной системе из клеток Krebs-2 (рис. 42 В).

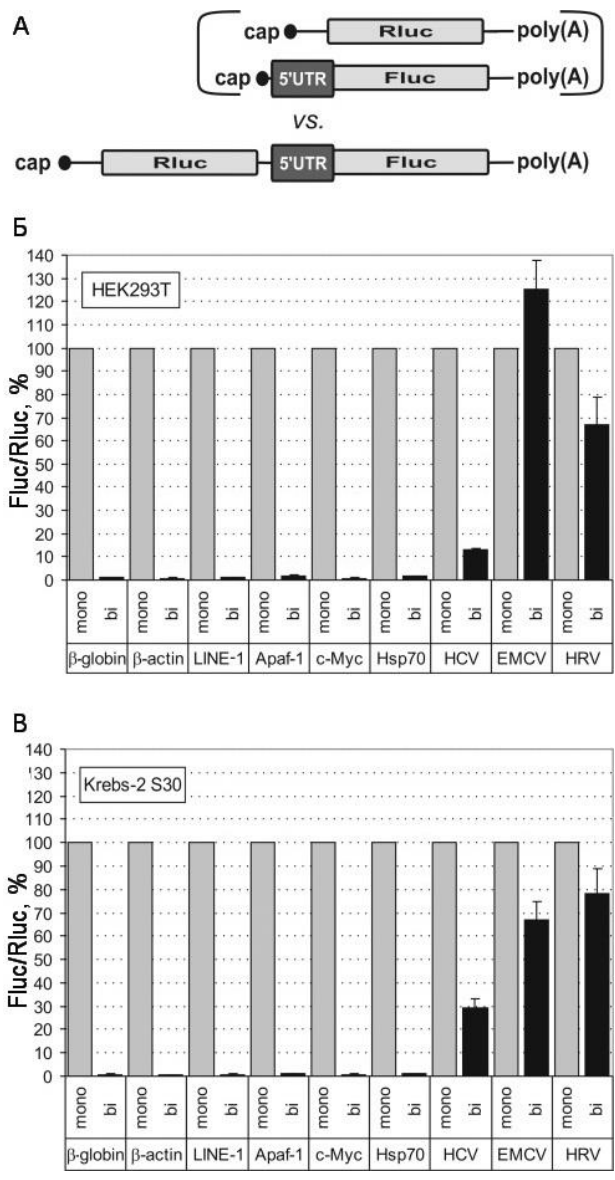


**Рис. 42.** Трансфекция бицистронных мРНК (схема представлена на рис. А) в клетки Нек293Т (Б), и трансляция в бесклеточной системе трансляции Krebs-2 (В)

Был получен принципиально другой результат: в то время как все вирусные IRES элементы, как и ожидалось, оказались активны в бицистронном контексте, все клеточные 5'НТО давали крайне низкую активность. Казалось бы, теперь можно сделать вывод об отсутствии IRES элементов в изучаемых 5'НТО из клеточных мРНК, но на самом деле делать такой вывод преждевременно. Сторонники клеточных IRESов могут возразить следующим образом: да, активность клеточных IRES элементов низкая, но она такая и должна быть, продукция регуляторного белка и не должна быть большой.

Для того, чтобы оценить эффективность трансляции 5'НТО во внутреннем положении, необходимо сравнить ее с трансляцией той же

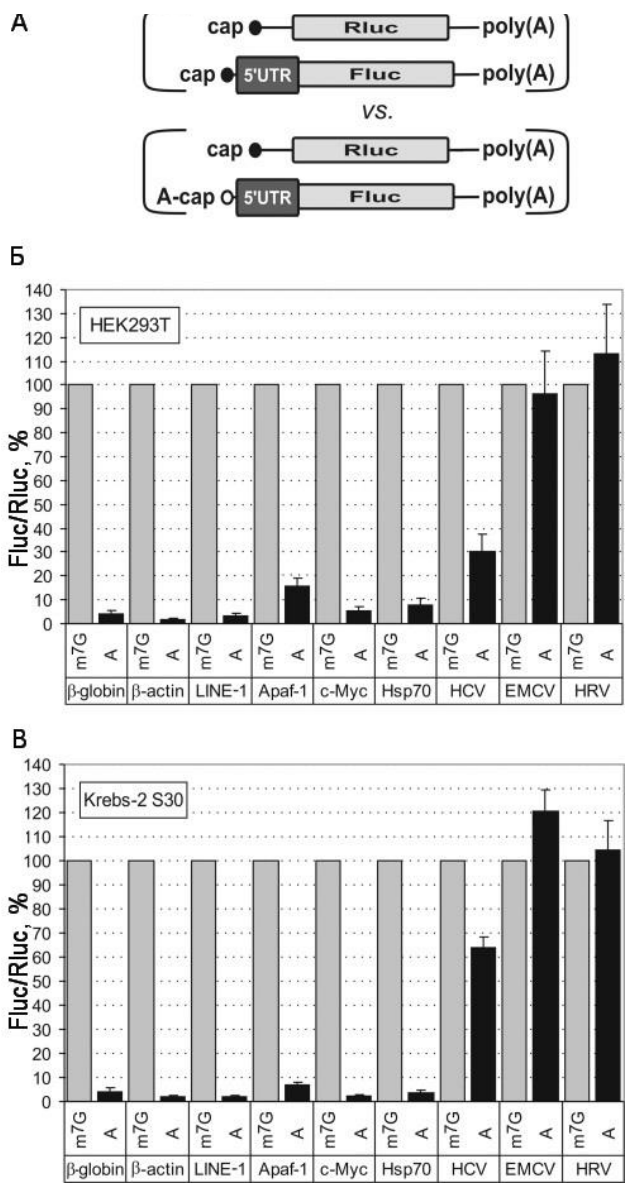
5'НТО в составе моноцистронной кепированной мРНК. Мы провели соответствующий эксперимент, результаты представлены на рис. 43. Можно сделать следующий вывод: только вирусные IRES элементы эффективно функционируют как в моноцистронном, так и в бицистронном контексте, в то время как все тестируемые клеточные мРНК неактивны в бицистронном контексте.



**Рис. 43.** Сравнение эффективности трансляции моноцистронных и бицистронных репортерных мРНК (А) в клетках Нек293Т (Б), и в бесклеточной системе трансляции Krebs-2 (В). Серыми столбиками обозначены значения эффективности Fluc в моноцистронном положении, черными столбиками — значения Fluc в бицистронном положении.

Однако, можно предположить, что довешивание на 5'НТО мРНК искусственного протяженного участка РНК может нарушать пространственную структуру IRES элемента в случае клеточных мРНК. Действительно, даже некоторые вирусные IRES менее активны в

бицистронном положении по сравнению с моноцистронным (см данные на рис. 43 для HCV IRES). Мы решили посмотреть, какой эффект на трансляцию оказывает m7G кеп. Кроме определяющей роли в инициации кеп-зависимой трансляции, кеп защищает мРНК от деградации. Замена m7G кеп на его нефункциональный аналог, “А-кеп” (AppppN) позволяет получить мРНК, неспособную связывать eIF4E, но защищенную от деградации [222]. А-кепированные мРНК были получены с помощью транскрипции в присутствии соответствующего аналога нуклеотида, затем они трансфецировались в клетки или транслировались в бесклеточной транслационной системе.



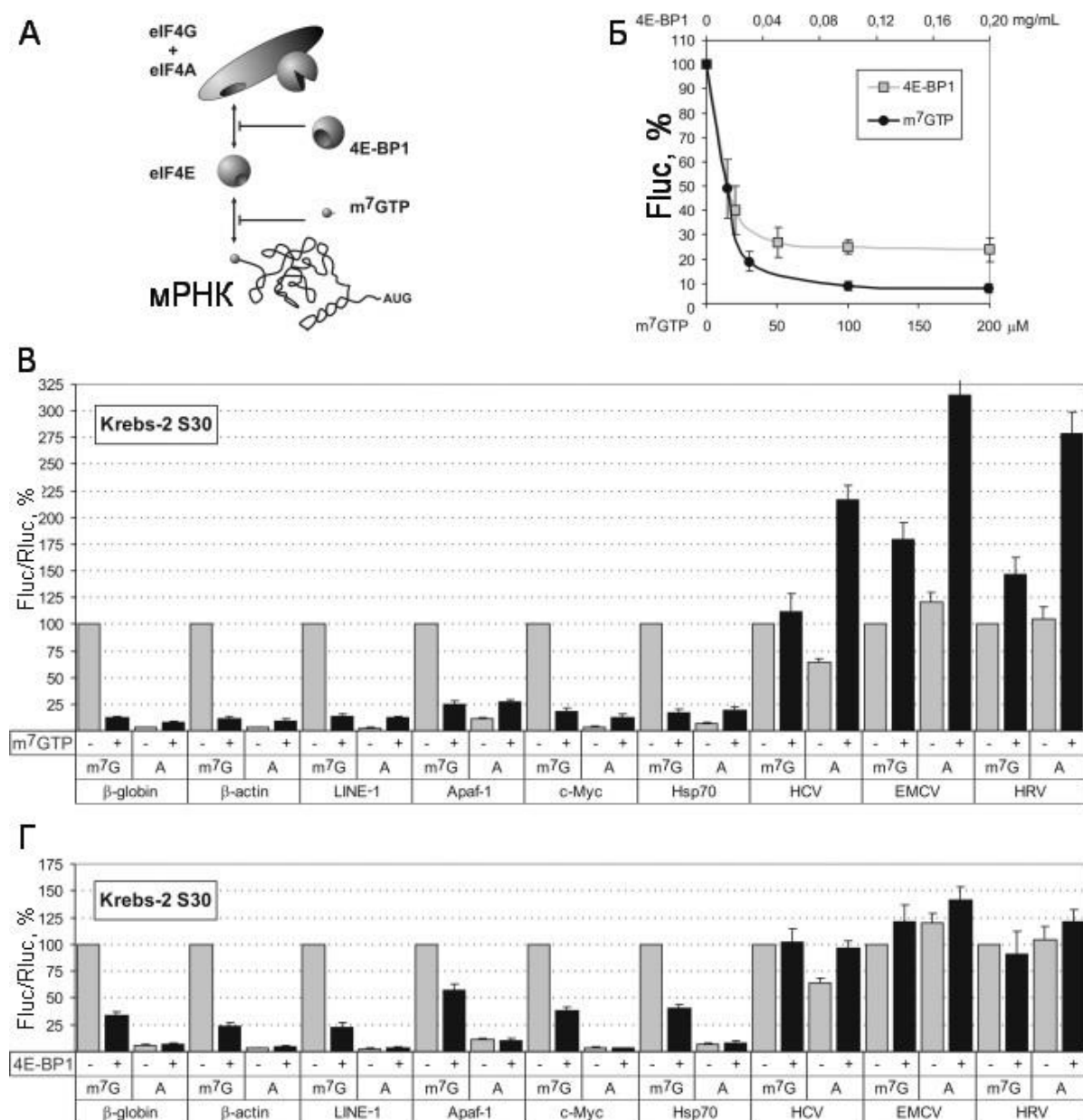
**Рис. 44.** Соотношение трансляции m7G и А-кепированных мРНК (А) (кеп-зависимость) в клетках Нек293Т (Б) и в бесклеточной системе трансляции Krebs-2 (В)

Эффективность трансляции таких А-кепированных мРНК сравнивалась с соответствующими m<sup>7</sup>G-кепированными мРНК. Соотношение эффективностей m<sup>7</sup>G/А трансляции мы назвали кеп-зависимостью. Оказалось, что кеп-зависимость у клеточных мРНК может значительно отличаться между собой, и при этом не коррелирует ни с длиной, ни со вторичной структурой 5'НТО. Так, наибольшая зависимость от кеп-а была обнаружена для β-глобина, а наименьшая среди 5'НТО клеточных мРНК – у АРАФ-1 (рис 44). При этом, напомним, все клеточные 5'НТО были неактивны в бицистронном положении.

Далее, мы решили изучить, зависит ли от кеп-зависимости каждой данной 5'НТО то, как меняется трансляция этой мРНК при инактивации кеп-зависимой трансляции. Логично предположить, что для мРНК с низкой кеп-зависимостью, ингибирование кеп-зависимой трансляции будет влиять на трансляцию слабее, чем для мРНК с высокой кеп-зависимостью. Пользуясь преимуществами бесклеточной системы трансляции, в которую достаточно просто добавить ингибиторы инициации трансляции, мы изучили влияние m<sup>7</sup>GTP- аналога кеп-а, который эффективно конкурирует с кепированной мРНК за связывание с eIF4E.

Далее, мы решили изучить, как кеп-зависимость коррелирует с подавлением трансляции мРНК при ингибировании кеп-зависимой трансляции. Логично предположить, что для мРНК с низкой кеп-зависимостью, ингибирование кеп-зависимой трансляции будет влиять на трансляцию слабее, чем для мРНК с высокой кеп-зависимостью. Используя бесклеточную трансляционную систему, мы изучили влияние m<sup>7</sup>GTP на трансляцию репортерных мРНК (m<sup>7</sup>GTP эффективно конкурирует с кепированной мРНК за связывание с eIF4E). При добавлении m<sup>7</sup>GTP, трансляция m<sup>7</sup>G кепированных мРНК, содержащих клеточные 5'НТО, значительно подавлялась, в то время как трансляция вирусных IRES и А-кепированных мРНК стимулировалась (рис 45 В).

Стимуляция трансляции этих мРНК происходит, по всей видимости, из-за снятия конкуренции за трансляционные факторы. Интересно, что степень ингибирования трансляции при добавлении  $m^7GTP$  также варьировала и для разных 5'НТО и коррелировала с кеп-зависимостью. Так, наименьшее подавление трансляции наблюдалось, как и ранее, в случае с 5'НТО АРАФ-1 (рис 45 В).



**Рис. 45.** Изучение воздействия ингибиторов кеп-зависимой трансляции на эксперссию репортерных мРНК. (А) Схематическое изображение механизма действия  $m^7GTP$  и 4Е-ВР1. (Б) Концентрационная зависимость эффективности трансляции, Эффект от подавления кеп-зависимой трансляции при помощи кеп-аналога  $m^7GTP$  (В) и при

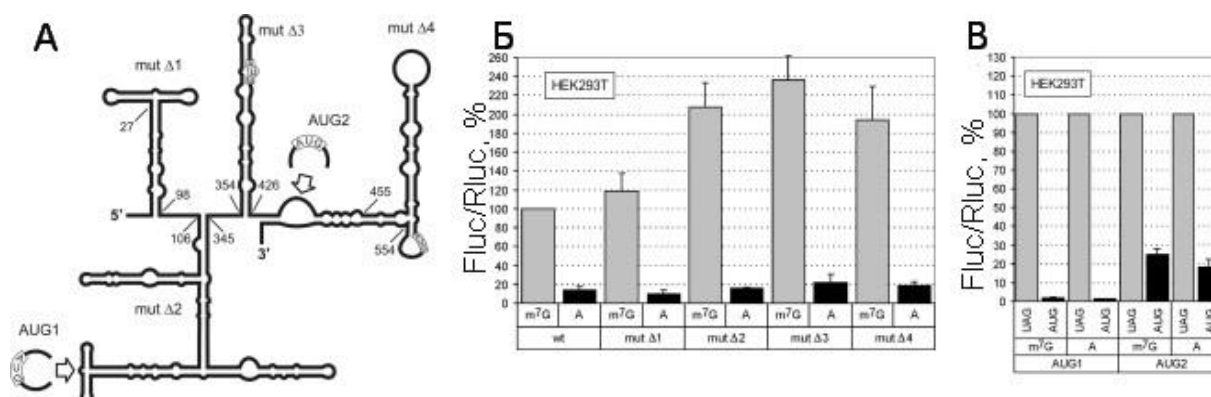
помощи рекомбинантного 4E-ВР (Г) на трансляцию m<sup>7</sup>G и А-кепированных мРНК с различными 5'НТО в бесклеточной системе трансляции

Сходный результат был получен при добавлении в бесклеточную систему трансляции репрессора кеп-зависимой инициации 4E-ВР (рис. 45 Г). Интересен тот факт, что 4E-ВР слабее подавляет трансляцию по сравнению с m<sup>7</sup>GTP (рис. 45 Б), и не стимулирует трансляцию А-кепированных мРНК. Такое отличие может быть обусловлено тем, что взаимодействие eIF4E с eIF4G необходимо для активации хеликазной активности eIF4A в составе комплекса eIF4F. 4E-ВР, в отличие от m<sup>7</sup>GTP, вытесняет eIF4E из комплекса с eIF4G. Наименьшее подавление трансляции при помощи 4E-ВР наблюдалось, как и ранее, в случае с 5'НТО АРАФ-1.

Итак, результаты данной работы позволяют сделать однозначный вывод об отсутствии IRES элементов у протестированных 5'НТО клеточных мРНК. Результаты эксперимента с трансфекцией плазмидной ДНК и рRli говорят о том, что IRES элементы были ошибочно идентифицированы из-за артефакта, связанного с продукцией моноцистронных кепированных мРНК. Однако, стоит обратить внимание на тот факт, что некоторые мРНК обладают пониженной кеп-зависимостью, и, как следствие, трансляция таких мРНК более устойчива к условиям, когда кеп-зависимая инициация подавлена. Что именно опосредует пониженную кеп-зависимость у мРНК, 5'НТО которых не способны направлять внутреннюю инициацию? Чтобы ответить на этот вопрос, мы решили детально изучить 5'НТО АРАФ-1, которая опосредует низкую кеп-зависимость трансляции.

Для того, чтобы определить, какой именно элемент в 5'НТО АРАФ-1 может опосредовать пониженную кеп-зависимость, мы последовательно удалили 4 структурных домена [223] и трансфецировали соответствующие репортерные мРНК в клетки Нек293Т. Ни одна из делеций не привела к

значимому снижению кеп-зависимости (рис. 46 Б). из чего мы сделали вывод о том, что в этой 5'НТО могут иметься несколько элементов (модулей), независимо друг от друга снижать зависимость от кеп-а (к этому вопросу мы вернемся чуть позже).



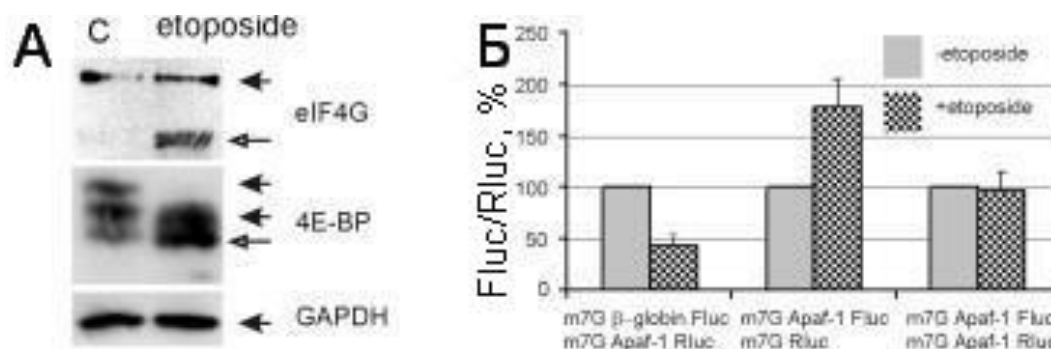
**Рис. 46.** Структурная организация 5'НТО APAF-1 (А) и анализ активности репортеров с мутациями в 5'НТО APAF-1 в клетках HEK293Т (Б и В).

На следующем этапе, мы постарались ответить на вопрос – сканируется ли 5'НТО APAF-1 с 5'конца? Если это так, то введение AUG кодонов в 5'НТО должно подавлять трансляцию репортера. Мы создали две репортерные конструкции, в которых в 5'НТО APAF-1 в два различных положения вводился AUG кодон в хорошем нуклеотидном контексте (рис. 46 А). Оказалось, что оба uAUG приводят к сильному подавлению трансляции как m<sup>7</sup>G, так и А-кепированной мРНК (рис. 46 В).

Этот результат очень важен. То, что введение uAUG подавляет трансляцию m<sup>7</sup>G кепированной мРНК, является ожидаемым. Однако тот же эффект uAUG на трансляцию А-кепированной мРНК позволяет сделать следующий ключевой вывод: даже в отсутствие m<sup>7</sup>G кеп-а, мРНК сканируется с 5'конца. При этом, напомним, 5'конец мРНК абсолютно необходим для трансляции, поскольку в бицистронном контексте трансляция не идет.

До сих пор речь шла о трансляции репортерных мРНК в нормальных условиях. Сторонники теории “клеточных IRESов” придерживаются следующей теории – в нормальных условиях трансляция IRES зависимых мРНК протекает по механизму сканирования, однако при стрессе, когда кеп-зависимая трансляция подавлена, такие мРНК начинают использовать механизм внутренней инициации. Мы решили проверить, каким образом транслируется репортерная мРНК с 5'НТО APAF-1 в условиях апоптоза – известно, что в этих условиях кеп-зависимая трансляция подавляется. В частности, на поздних стадиях апоптоза происходит разрезание eIF4G с помощью каспазы 3 [224]. Именно в этих условиях стоит ожидать избирательной трансляции мРНК APAF-1, продукт которой является компонентом апоптосомы.

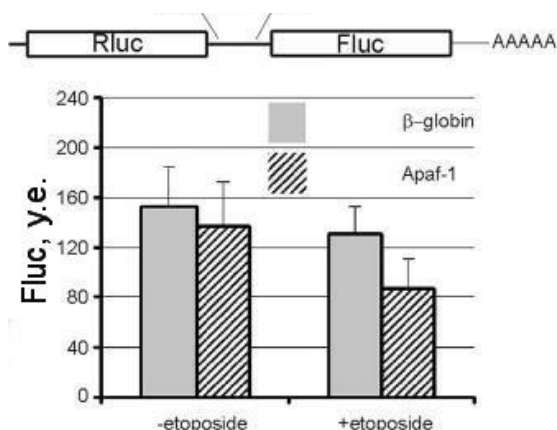
Репортерные мРНК трансфецировали в клетки, предварительно обработанные этопозидом. Этопозид ингибирует топоизомеразу II, что приводит к накоплению двухцепочечных разрывов в геномной ДНК и последующему развитию апоптоза.



**Рис. 47.** А) Инактивация компонентов трансляционного аппарата в клетках Hek293T, обработанных этопозидом: расщепление фактора инициации eIF4G1 и дефосфорилирование 4E-BP1 (вестерн-блоттинг), Б) трансляция репортерных мРНК с 5'НТО APAF-1 и β-глобина

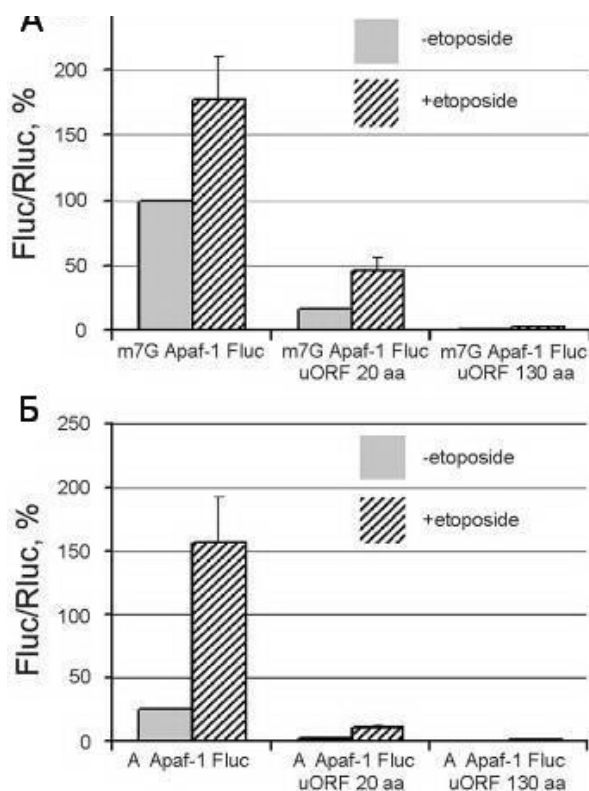
Обработка клеток этопозидом, как и ожидалось, приводила к дефосфорилированию 4E-BP и к частичному расщеплению eIF4G при помощи эффекторной каспазы. В этих условиях, трансляция m<sup>7</sup>G

кепированной мРНК с 5'НТО АРАФ-1 происходит более эффективно по сравнению с  $\beta$ -глобиновым лидером (рис. 47 Б).



**Рис. 48.** Трансляция репортерных бицистронных мРНК с 5'НТО  $\beta$ -глобина и АРАФ-1 в условиях апоптоза, вызванного обработкой клеток этопозидом

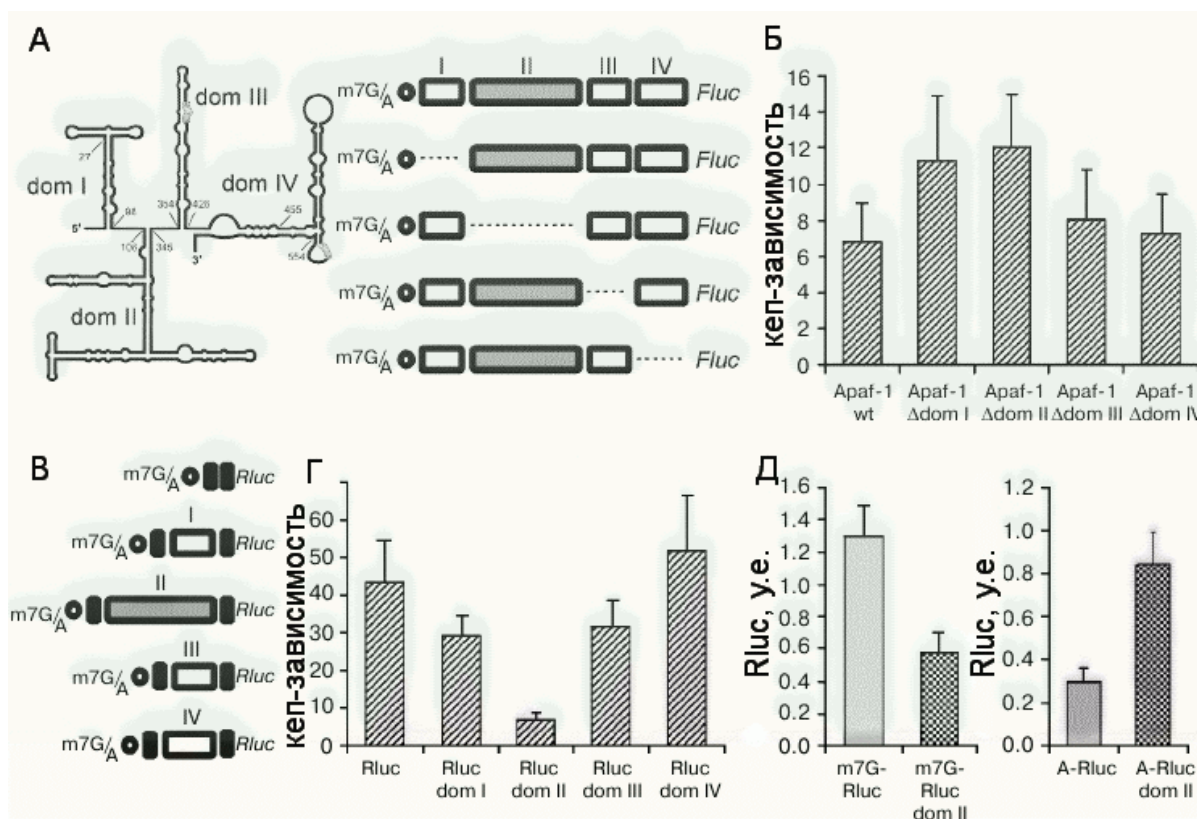
Можно было бы ожидать, что в таких условиях действительно происходит активация IRES элемента. Однако, бицистронная репортерная мРНК с 5'НТО АРАФ-1, неактивная в нормальных условиях, еще менее активна в условиях апоптоза (рис. 48). Таким образом, можно сделать вывод о том, что никакой активации внутренней инициации при данном стрессе не происходит.



**Рис. 49.** Трансляция репортерных m7G-кепированных (А) и А-кепированных (Б) мРНК с 5'НТО АРАФ-1 в условиях апоптоза, вызванного обработкой клеток этопозидом.

Каким образом протекает инициация трансляции при таких стрессовых условиях? Мы протестировали те же самые m<sup>7</sup>G кепированные и А-кепированные моноцистронные мРНК с 5'НТО АРАФ-1 дикого типа, и с введенными uAUG в 5'НТО. Оказалось, что и в случае m<sup>7</sup>G кепированных, и в случае А-кепированных мРНК, введение uAUG кодонов сходным образом подавляет трансляцию при стрессовых условиях (рис. 49 А и Б).

Из результатов данных экспериментов можно сделать вывод о том, что при подавлении кеп-зависимой трансляции 5'НТО АРАФ-1 сканируется с 5'конца, и при этом не происходит активации IRES элемента. Значит, существует какой-то другой элемент, который опосредует кеп-независимое, но 5'конец зависимое сканирование. Можно ли этот элемент в 5'НТО локализовать и картировать?



**Рис. 50.** Картирование элемента в 5'НТО АРАФ-1, который обеспечивает пониженную кеп-зависимость. А) Схематическое изображение 5'НТО АРАФ-1. (Б) эффект делеции индивидуальных доменов на зависимость трансляции репортерных мРНК от кеп-зависимости, В) Схематическое изображение репортерных конструкций с индивидуальными доменами АРАФ-1, введенными внутрь неспецифической 5'НТО, и кеп-зависимость

соответствующих мРНК (Г) кеп-зависимость репортерных конструкций с индивидуальными доменами, (Д) значения люциферазной активности для m<sup>7</sup>G и А-кепированных мРНК

Как уже упоминалось ранее, делеции индивидуальных доменов в 5'НТО АРАФ-1 практически не сказываются на кеп-зависимости (рис 50. Б). Мы решили вставить индивидуальные домены АРАФ-1 внутрь неспецифической 5'НТО (рис 50 В). Оказалось, что индивидуальный домен II сам по себе может придавать трансляции репортерной мРНК пониженную кеп-зависимость (рис. 50 Г). Если сравнить эффективность трансляции индивидуальных m<sup>7</sup>G кеированных и А-кепированных мРНК, то трансляция m<sup>7</sup>G кепированной мРНК с доменом II идет хуже, чем у мРНК с тем же лидером без вставки, а трансляция А-кепированной мРНК, наоборот, идет лучше (рис. 50 Д). Отсюда и получается низкая кеп-зависимость.

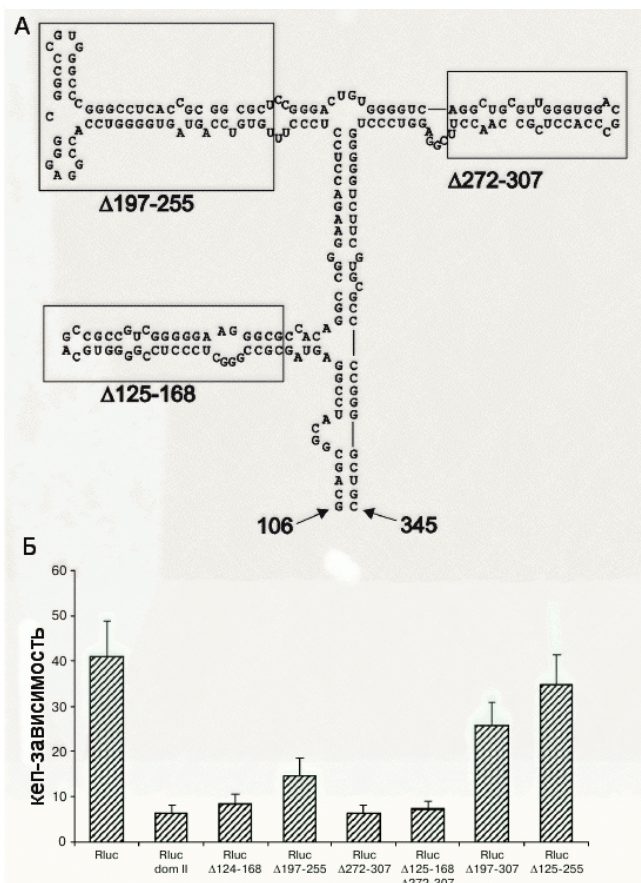


Рис. 51. Структурная организация домена II из 5'НТО АРАФ-1 (А), и кеп-зависимость репортерных конструкций с делециями структурных элементов в домене II (Б).

Мы провели более детальный анализ элементов в домене II, которые отвечают за низкую кеп-зависимость. В домене II можно выделить три шпилечные структуры, расположенные в области нуклеотидов 125-168, 197- 255, и 272-307 (рис. 51 А), отходящие от центральной шпилечной структуры (нуклеотиды считаются от 5'конца НТО АРАФ-1). Интересно, что делеция каждой из этих шпилечных структур по отдельности не влияет на кеп зависимость (рис. 51 Б).

В то же время, более крупные делеции (нт 197-307 и нт 125-255) повышают кеп зависимость до уровня контрольной репортерной мРНК (рис. 51 Б). По всей видимости, для пониженной кеп зависимости необходимо сохранение структуры центральной шпильки.

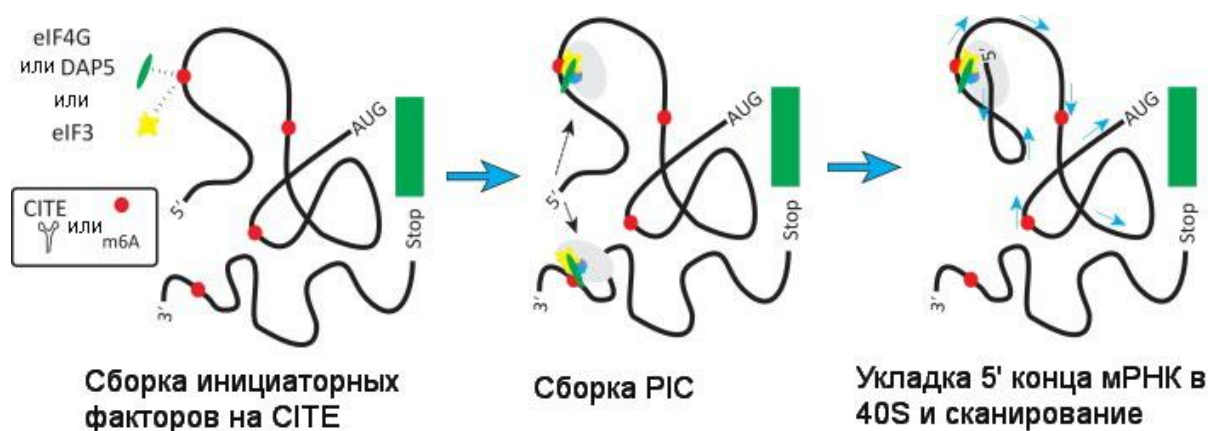
Подводя итог, мы смогли локализовать и картировать элемент, который способен понижать зависимость трансляции от кепы, но при этом не способен промотировать внутреннюю инициацию. Пониженная зависимость от кепы позволяет такой мРНК более эффективно транслироваться при стрессе, при котором происходит ингибирование посадки 43S комплекса на 5'конец мРНК. Мы назвали данный элемент энхансером кеп-независимой трансляции (Cap Independent Translation Enhancers CITE).

### 3.2.1. Концепция о существовании CITE в 5'НТО клеточных мРНК.

Термин CITE сам по себе не нов: мРНК значительного числа вирусов растений, из таких семейств как Potyviridae, Comoviridae, Tombusviridae и Luteoviridae, а также некоторых представителей Sobemovirus и Umbravirus, не имеют m<sup>7</sup>G кепы. Для эффективной трансляции мРНК этих вирусов используются не IRES элементы, а CITE, расположенные в 3'НТО [225-227]. CITE способны связывать компоненты трансляционного аппарата клетки и доставлять их на 5'конец мРНК, обеспечивая кеп-независимую

трансляцию. Приведем несколько примеров специфического взаимодействия вирусных CITE с компонентами трансляционного аппарата. Так, CITE из Satellite Tobacco Necrosis Virus (STNV) связывает eIF4F и eIF(iso)4F через взаимодействия и с eIF4E, и с eIF4G субъединицами [228]. CITE из Barley Yellow Dwarf Virus (BYDV) RNA связывает eIF4F в основном через взаимодействие с eIF4G [122, 229]. CITE из Pea Enation Mosaic Virus (PEMV) RNA 2 взаимодействует с eIF4E [127]. Наконец, CITE из Turnip crinkle virus (TCV) связывает не инициаторные факторы, а 60S рибосомную субъединицу [131].

Хотя все известные на данный момент вирусные CITE находятся в 3'НТО, как минимум некоторые из CITE могут промотировать кеп-независимую трансляцию при их переносе в 5'НТО [229-231]. При этом как минимум один CITE из BYDV RNA, будучи активным и в 3'НТО, и в 5'НТО, не способен промотировать внутреннюю инициацию [226]. Учитывая то, что трансляционный аппарат растений не сильно отличается от животных, мы и предположили, что в клеточных мРНК в 5'НТО могут находиться CITE. Если примеры внутренней инициации на вирусных мРНК породили теорию “клеточных IRES элементов”, то примеры 3'CITE в вирусах растений вдохновили нас предложить альтернативную модель “клеточных CITE”.

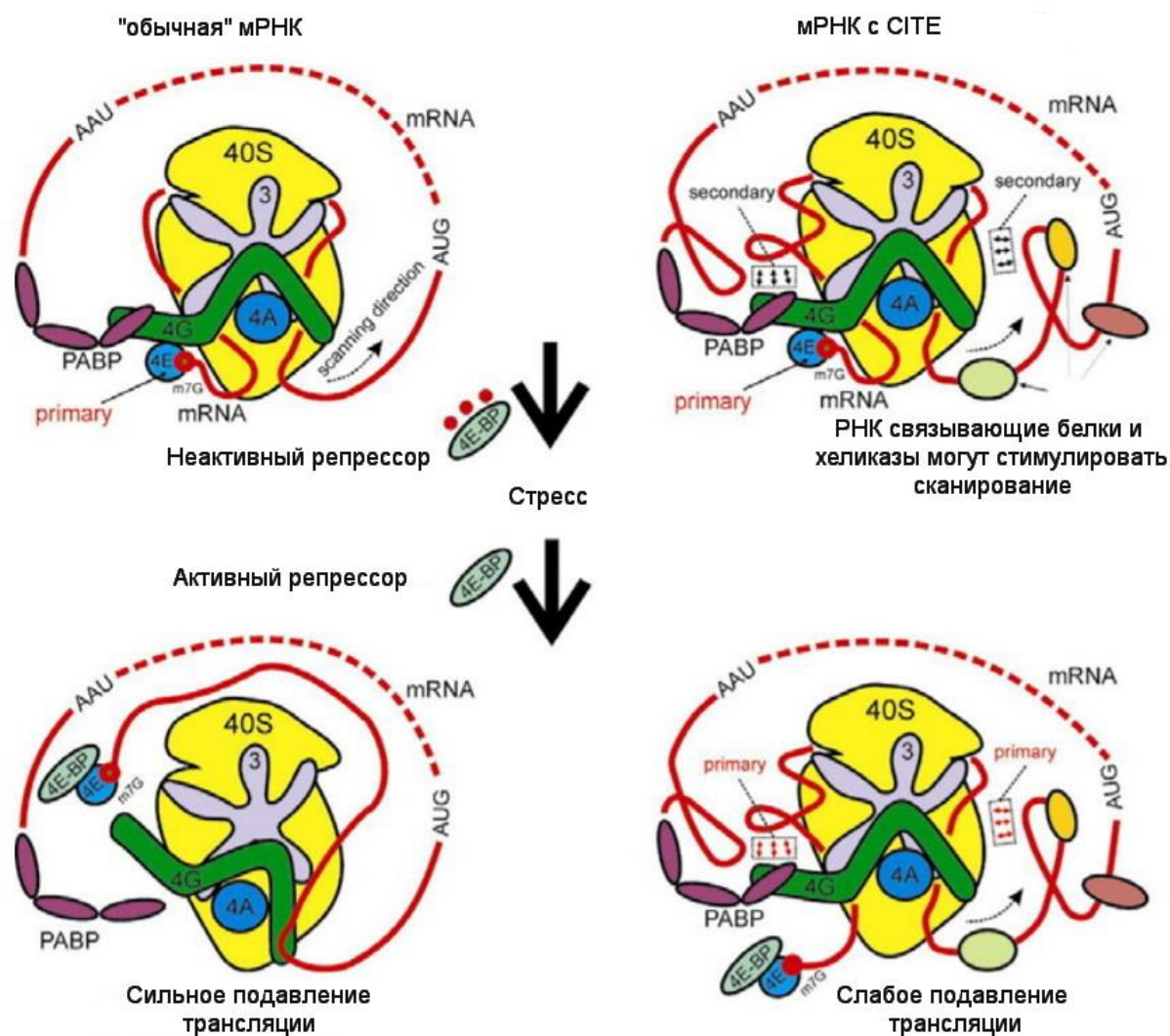


**Рис. 52.** Механизм функционирования CITE в 5'НТО клеточных мРНК.

Как работают CITE, и в чем их принципиальное отличие от IRES элементов? CITE – это элемент в 5'НТО, который способен связывать один или несколько компонентов трансляционного аппарата (рис. 52). Это может быть сложный структурный элемент (как в случае с АРАФ-1 доменом II), или модифицированное основание в РНК ( $m^6A$  способен связывать eIF3 и промотировать кеп-независимую трансляцию). Возможно, что некоторые CITE могут использовать неканонические факторы инициации, такие как DAP5 (это гомолог eIF4G, у которого нет участка связывания eIF4E). За счет связывания компонентов трансляционного аппарата с CITE, на мРНК привлекается 43S комплекс. Однако в отличие от внутренней инициации, 43S начинает сканирование с самого 5' конца мРНК. Сам же процесс сканирования протекает так же, как и при стандартной кеп-зависимой инициации: вся 5'НТО инспектируется в поисках инициаторного кодона, вторичные структуры в мРНК расплетаются с помощью РНК хеликаз, и т.д.

Основные особенности мРНК с CITE проявляются в стрессовых условиях, когда нарушается узнавание  $m^7G$  кеп-а и eIF4E – тогда трансляция мРНК, имеющих CITE, получает преимущество за счет дополнительных контактов, привлекающих инициаторный аппарат на мРНК (рис. 53). Однако при тех стрессах, когда инактивируется eIF2 или другие факторы инициации, необходимые для продуктивного сканирования, трансляция CITE будет также подавлена. В этом основное отличие CITE и IRES зависимой трансляции при стрессе, поскольку IRES элементы III и IV группы могут работать без eIF2. Данное предположение подтверждается тем фактом, что при полногеномном изучении трансляции при стрессе, приводящем к инактивации eIF2, IRES-подобных клеточных мРНК не было обнаружено - все клеточные мРНК, устойчивые к такому стрессу, содержат транслируемые uORF (более подробно об этом написано далее) Мы считаем, что наша концепция CITE, которая объясняет

избирательную трансляцию клеточных мРНК по кеп-независимому, но 5'конец зависимому механизму инициации трансляции, в скором времени станет общепринятой, и, возможно, даже вытеснит теорию клеточных IRES элементов.



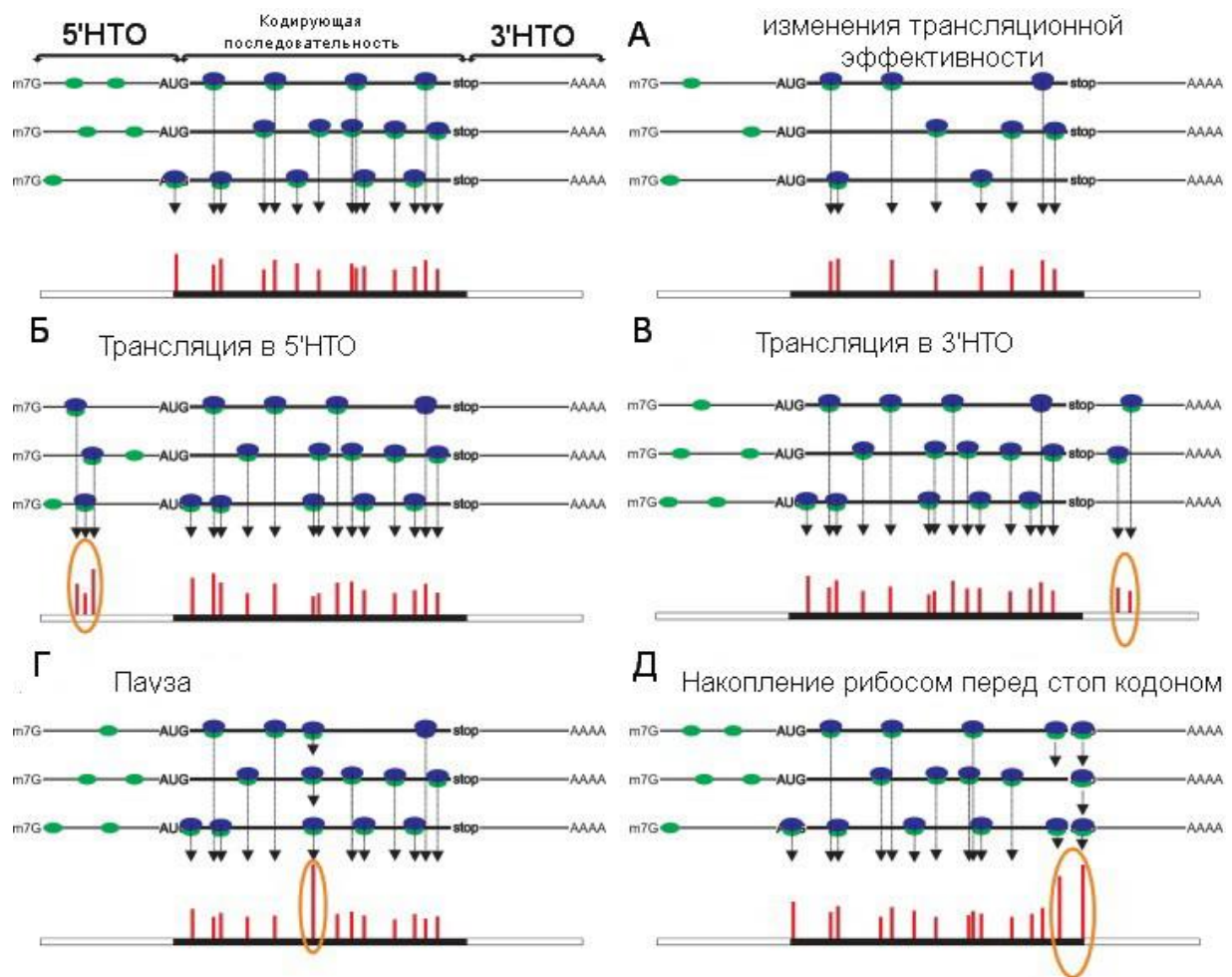
**Рис. 53.** Модель, объясняющая устойчивость трансляции мРНК с CITE к стрессовым условиям, при которых нарушается взаимодействие eIF4E с m<sup>7</sup>G кепом.

3.3. Стартовые кодоны в 5'НТО клеточных мРНК: роль в регуляции трансляции при стрессе и в экспрессии альтернативных белков.

### 3.3.1. Использование рибосомного профайлинга для изучения трансляции в 5'НТО, и инициация трансляции на не-AUG кодонах

43S комплекс, сканирующий 5'НТО, может узнать стартовый кодон, а может пропустить его и продолжить сканирование. Этот процесс получил название проскальзывающего сканирования (leaky scanning). Кроме того, после узнавания стартового кодона и трансляции короткой рамки считывания, рибосома может после терминации синтеза полипептида возобновить сканирование и узнать следующий стартовый кодон (это процесс называется реинициация). За счет проскальзывающего сканирования и реинициации, одна эукариотическая мРНК может кодировать более одного полипептида.

До недавнего времени у исследователей не было инструментов, которые помогли бы изучать такие события на полногеномном уровне. Однако, ситуация изменилась с появлением метода, получившего название рибосомный профайлинг. Этот метод, разработанный в лаборатории Джонатана Вайсмана, основан на глубоком секвенировании фрагментов мРНК, защищаемых рибосомой от разрезания рибонуклеазами [189-191]. Особенность этого метода заключается в том, что можно определить не только относительное количество рибосом, которые транслируют определенную мРНК в заданный момент времени, но также и положение этих рибосом на мРНК. Так, с помощью рибосомного профайлинга можно детектировать паузы рибосом, возникающие при элонгации или терминации трансляции (рис. 54 Г и Д), трансляцию в 3'НТО (рис. 54 В), а также трансляцию в 5'НТО (рис. 54 Б).



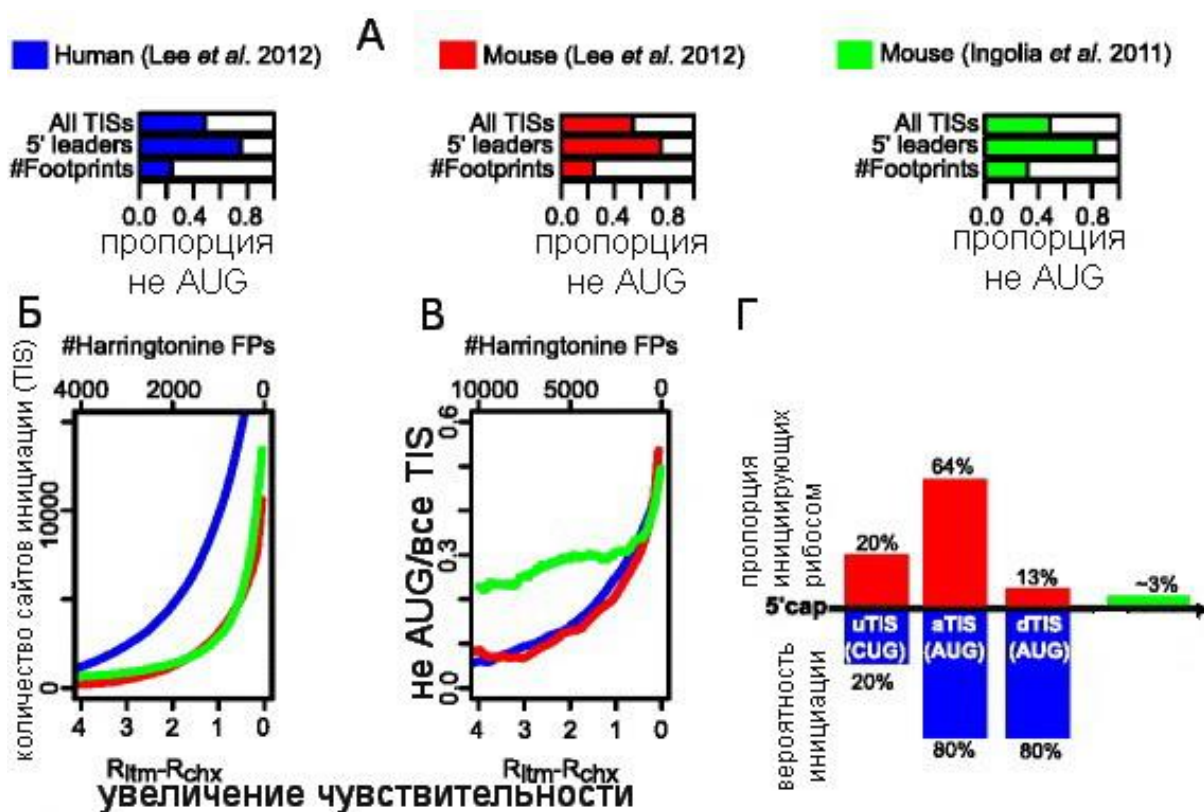
**Рис. 54.** Рибосомный профайлинг и информация о положении рибосом на мРНК, которую можно получить с помощью данного метода.

С помощью рибосомного профайлинга появилась возможность получить ответ на следующий вопрос: сколько существует альтернативных сайтов инициации трансляции в клеточных мРНК, и какая пропорция AUG и не-AUG кодонов узнается сканирующими рибосомами?

Для картирования стартов инициации трансляции можно использовать антибиотики, которые избирательно ингибируют образование первой пептидной связи и не воздействуют на рибосомы, уже вовлеченные в элонгацию - лактимидомицин и харрингтонин. Результаты нескольких работ с использованием этих ингибиторов трансляции привели к одинаковому выводу: альтернативные стартовые кодоны, узнаваемые рибосомами в живых клетках, чрезвычайно распространены. При этом,

доля не-AUG кодонов по отношению ко всем стартовым кодоном, крайне высока

Так, доля не-AUG кодонов по отношению ко всем стартовым кодоном в 5'лидерах, по данным работы [232] составляла 83%, по данным работы [233] - 74%, и по данным работы [234] - 78%. Несмотря на то, что примеры инициации на не-AUG кодонах мРНК были известны и ранее, такое активное использование не-AUG кодонов на полногеномном уровне кажется весьма необычным. Мы решили попытаться понять причину такой большой распространенности инициации на не-AUG кодонах, учитывая возможность проскальзывающего сканирования при анализе данных рибосомного профайлинга.



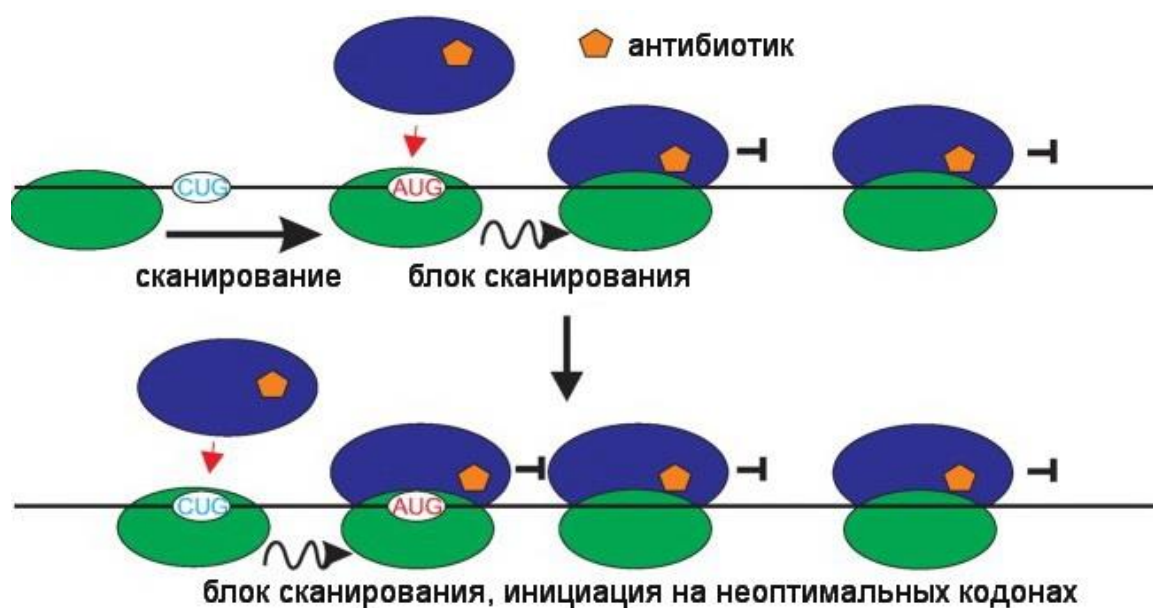
**Рис. 55.** Анализ данных рибосомного профайлинга, полученных при обработке клеток лактимидомицином и харрингтонином для картирования стартовых кодонов. А) пропорция инициации на не-AUG кодонах, обнаруженная в трех независимых исследованиях. Верхний столбик показывает отношение числа детектированных сайтов

инициации на не-AUG кодонах к общему числу детектированных сайтов инициации трансляции. Средний столбик – ту же долю, но картированную в 5'НТО, нижний столбик – доля количества футпринтов. Б и В) Зависимость количества детектируемых сайтов инициации (ось Y) от порога детекции (ось X) Г) Модель, учитывающая проскальзывающее сканирование, которая описывает отношение “силы” инициаторных кодонов (синие столбики), и количества иницирующих на этих колонах рибосом (красные столбики).

Как видно из рис. 55 А, с одной стороны, во всех трех наборах данных наблюдается большая пропорция картированных не-AUG стартовых кодонов в 5'НТО мРНК (средний столбик), но с другой стороны – доля рибосомных футпринтов, произошедших с этих не-AUG кодонов, довольно мала. Другими словами, обнаруживается множество сайтов инициации на не-AUG, но с низкой интенсивностью. Стоит учесть, что не все футпринты происходят от транслирующих рибосом, в данных рибосомного профайлинга всегда есть некоторый шум. Если увеличивать специфичность анализа, снижая порог детекции стартов инициации трансляции, то количество определяемых сайтов инициации трансляции снижается (рис. 55 Б). Однако доля не-AUG стартов при этом снижается непропорционально быстро (рис. 55 В). Другими словами, при увеличении специфичности детекции стартов инициации, доля не-AUG стартов падает до 10-20%. Из проведенного анализа мы можем сделать вывод о том, что инициация на не-AUG кодонах происходит гораздо реже и менее эффективно по сравнению с AUG, чем кажется на первый взгляд при анализе данных с использованием ингибиторов инициации. Это хорошо соотносится с текущими представлениями о сканировании и выборе стартового кодона у эукариот.

Однако, стоит отметить, что и наша оценка (10-20% инициация на не-AUG кодонах) скорее всего сильно завышена из-за артефакта, связанного с применением лактимидомина и харрингтомина (рис. 56). При добавлении этих ингибиторов в клетку, происходит образование

инициаторного комплекса на стартовом кодоне, который не может уйти в элонгацию. Однако при этом посадка 43S на 5'конец мРНК не ингибируется, сканирующая рибосома натывается на препятствие – рибосому на стартовом кодоне, и из-за этого инициирует на неоптимальном кодоне, который в норме не был бы узнан. Данный процесс может привести к искусственной инициации на не-AUG кодонах. Хороший пример, который иллюстрирует данную проблему – инициация на AUU кодоне мРНК AZIN1, которая происходит за счет паузы элонгирующей рибосомы [59] (рис. 6).



**Рис. 56.** Модель, иллюстрирующая искусственно созданные условия для инициации на неоптимальных кодонах при предварительной обработке клеток антибиотиками, блокирующими иницирующие рибосомы

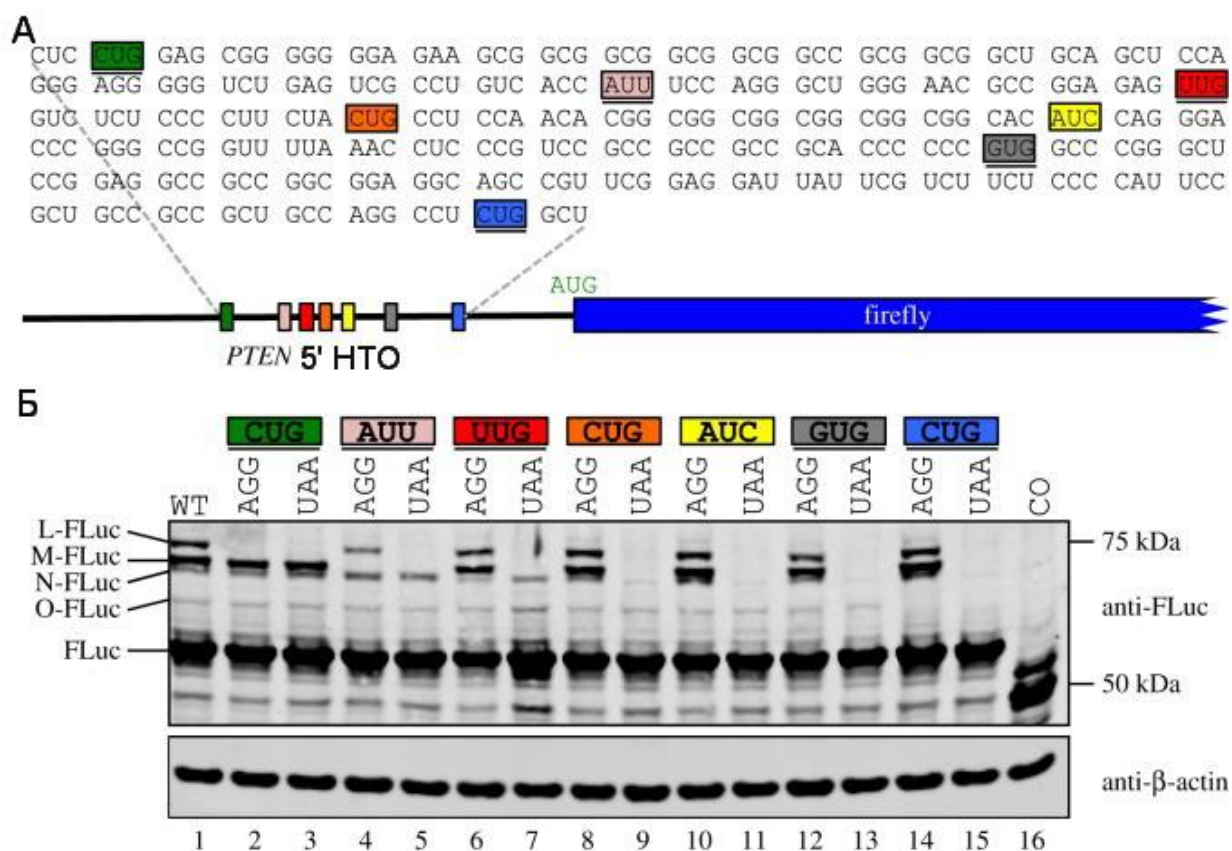
Таким образом, можно сделать вывод о том, что инициация на не-AUG кодонах действительно происходит, но не так часто, и менее эффективно, чем считалось ранее. Кроме того, для изучения инициации на неоптимальных кодонах не стоит применять метод, при котором клетки обрабатываются трансляционными ингибиторами.

Несмотря на то, что вклад не-AUG кодонов в инициацию трансляции может быть переоценен на количественном уровне, нет никаких сомнений в том, что некоторые неканонические сайты инициации трансляции действительно используются, и соответствующие полипептиды имеют важное физиологическое значение. В качестве примера можно рассмотреть некоторые случаи, когда инициация на не-AUG кодонах в 5'НТО приводит к продукции удлинённой с N-конца версии белка. Такие белки за счет дополнительных N-концевых аминокислотных последовательностей могут обладать новыми свойствами – например, могут приобретать сигнал внутриклеточной локализации [235-238].

Один из наиболее ярких примеров был обнаружен в мРНК PTEN. PTEN является фосфатазой с двойной специфичностью, которая подавляет PI3K сигналинг за счет дефосфорилирования PIP3. Мутации, инактивирующие PTEN, очень часто детектируются в раковых опухолях. Недавно было обнаружено, что за счет инициации на CUG кодоне в 5'НТО образуется удлинённая на 173 аминокислоты версия PTEN (PTEN-Long). Было показано, что PTEN-Long за счет дополнительных аминокислот получает новое свойство: она секретируется из клетки, может проникать в другие клетки и там подавлять PI3K сигналинг.

Мы заинтересовались этим случаем. Для того, чтобы изучить, как именно регулируется трансляция на CUG кодоне мРНК PTEN, мы создали набор репортерных конструкций с 5'НТО PTEN (рис. 57). Оказалось, что инициация трансляции с заявленного CUG кодона действительно происходит (рис. 57 Б, L-Fluc), однако гораздо эффективнее она идет с другого стартового кодона – с AUU кодона, расположенного после CUG в 5'НТО (рис. 57 Б, M-Fluc). Такая протеоформа была названа нами PTEN-M. Поскольку PTEN-M отличается от PTEN-Long и от PTEN по последовательности, мы предположили, что эта изоформа может

функционально отличаться. Однако, мы не нашли разницы между протеоформами PTEN.



**Рис. 57.** Анализ трансляционной эффективности различных не-AUG кодонов, расположенных в 5'НТО мРНК PTEN. А) последовательность 5'НТО мРНК PTEN человека. Не-AUG кодоны, находящиеся в рамке считывания PTEN, отмечены цветом. Б) вестерн блот лизатов, полученных при трансфекции репортерных конструкций с последовательными мутациями всех отмеченных не-AUG в клетки Hek293T. Короткий продукт FLuc соответствует инициации трансляции на AUG кодоне PTEN. Более длинные продукты получаются за счет добавления дополнительных N-концевых аминокислот к репортеру.

Более того, нам не удалось воспроизвести ранее заявленную секрецию PTEN-Long. По нашим данным, ни PTEN, ни PTEN-Long, ни PTEN-M не секретируются из клетки. Причины расхождения наших данных с результатами, опубликованными в журнале Science [239], остались не ясны.

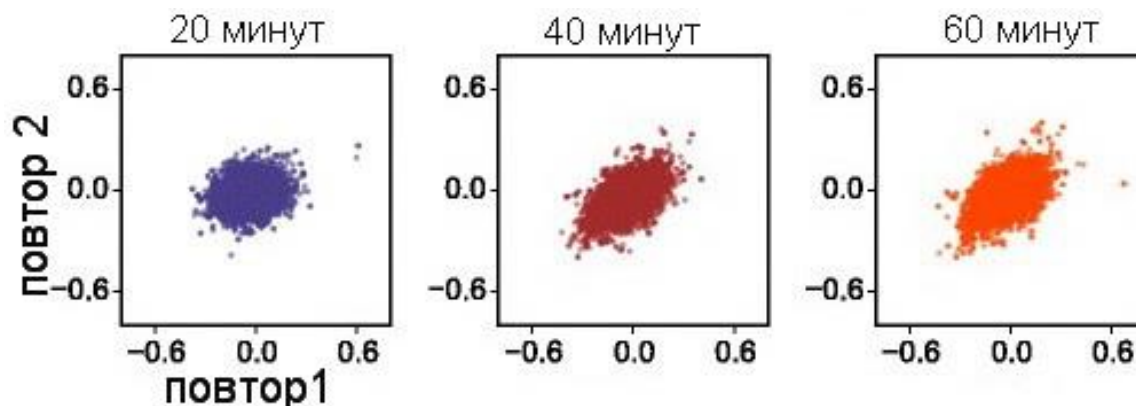
### 3.3.2 Изучение клеточного ответа на удаление кислорода и глюкозы с помощью рибосомного профайлинга выявило изменения в выборе стартовых кодонов

Можно ожидать, что при изменении условий, например, при каком-либо стрессовом воздействии на клетку, может меняться относительная эффективность узнавания стартовых кодонов в 5'НТО. Именно это мы и обнаружили, когда изучали ранний ответ на удаление кислорода и глюкозы (Oxygen and Glucose Deprivation, OGD) на регуляцию экспрессии генов.

При ишемической болезни, происходит резкое прекращение доступа кислорода и глюкозы к клеткам, что приводит к тяжелым повреждениям органов и тканей. Ишемический стресс характеризуется метаболическим стрессом, ацидозом, энергетическим кризисом, избыточной продукцией активных форм кислорода и нарушением функции митохондрий. Известно, что ответ клетки на OGD запускает множество сигнальных каскадов (например – через транскрипционный фактор HIF, или через киназу AMPK). Однако до сих пор никто не изучал изменения в экспрессии генов на транскрипционном и трансляционном уровне, происходящие в самые первые моменты после начала стресса. Мы использовали рибосомный профайлинг для изучения регуляции экспрессии генов в клетках PC12 через 20, 40 и 60 минут после OGD.

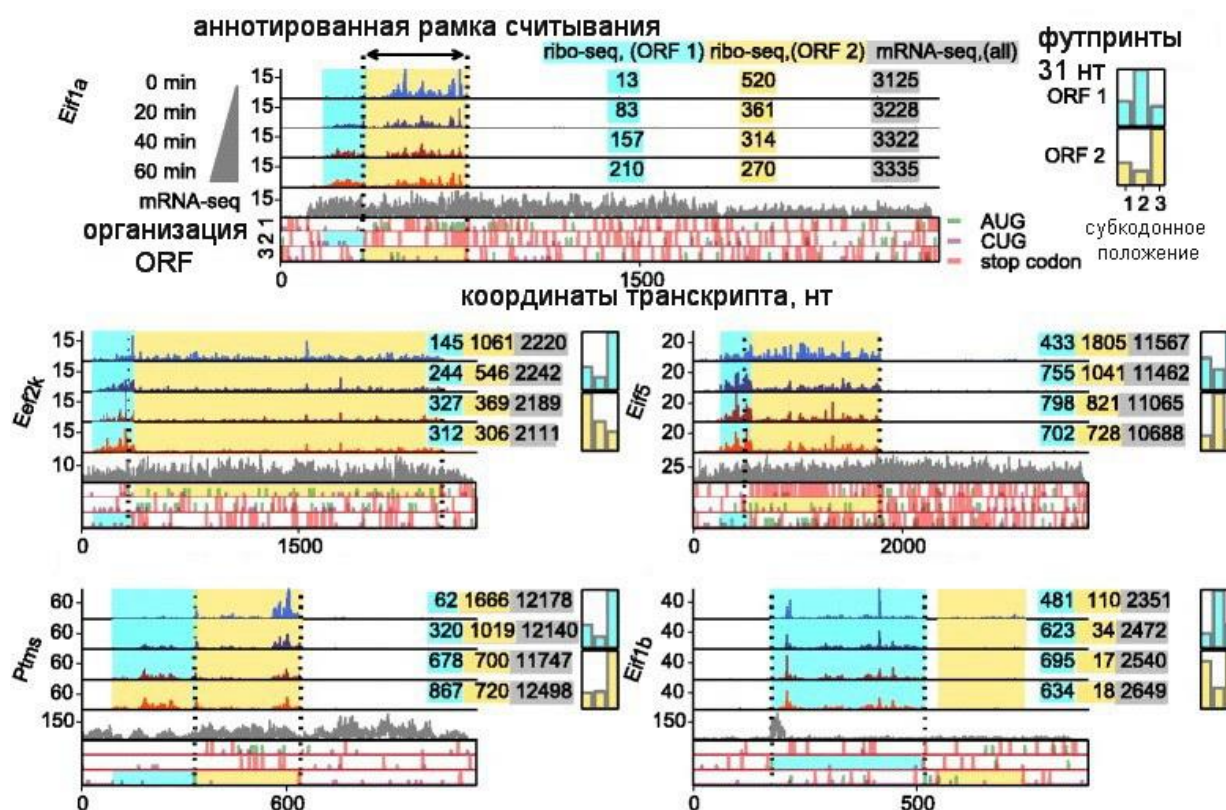
По нашим данным, в процессе развития стресса происходит значительное изменение уровня транскрипции порядка 100 мРНК, однако на уровне трансляции эффект гораздо больше – изменяется трансляция около 3000 мРНК, что говорит об определяющей роли трансляционного контроля при ответе клетки на OGD. Интересно отметить тот факт, что

основные изменения в трансляции можно детектировать уже через 20 минут после начала стресса, а затем эффект только усиливается.



**Рис. 58.** Сдвиг центра масс рибосомных футпринтов в процессе развития OGD. Каждая точка на графике соответствует индивидуальной мРНК. Смещение точек по диагонали относительно центра говорит об изменении распределения рибосомных футпринов при стрессе.

Для того, чтобы детектировать мРНК, для которых изменился выбор стартовых кодонов, использовали следующий подход. Для каждой мРНК рассчитывали положение в мРНК, где сумма рибосомных футпринтов слева равнялась сумме рибосомных футпринов справа, другими словами - определяли центр масс рибосомных футпринтов. Затем, рассчитывали изменение центра масс через 20, 40 и 60 минут после стресса. Если рибосомы начинают инициировать в 5'НТО, или, наоборот, пропускать основной инициаторный кодон, то должно наблюдаться смещение центра массы. Как видно из данных, представленных на рис. 58, через 40 минут после стресса уже наблюдается ярко выраженная тенденция смещения центра масс, что может говорить об изменении паттерна инициации трансляции. Некоторые мРНК, для которых наблюдался наиболее яркий эффект, были выбраны и детально проанализированы.



**Рис. 59.** Рибосомные профили индивидуальных мРНК, для которых происходит изменение трансляции в 5'НТО при OGD. Первые четыре панели показывают распределение рибосомных футпринтов на мРНК в нормальных условиях (синий), через 20 (фиолетовый), 40 (красный) и 60 (оранжевый) минут после OGD. Пятая панель – картирование фрагментов РНК (RNAseq). Основная рамка считывания выделена желтой областью. Транслируемая рамка считывания в 5'НТО выделена синей областью. Под набором диаграмм расположена панель, показывающая распределение стартовых кодонов (зеленые линии) и стоп кодонов (красные линии) в трех рамках считывания мРНК. Числовые значения слева от каждой панели показывают абсолютное число футпринтов, картирующихся на мРНК.

Из приведенных на рисунке 59 примеров видно, что при стрессе происходит активация трансляции в 5'НТО. Необходимо отметить, что в нашем модифицированном протоколе рибосомного профайлинга мы не использовали предварительную обработку клеток каким-либо трансляционным ингибитором, поэтому в наших условиях не должно происходить искусственное накопление инициаторных комплексов на неоптимальных кодонах.

За счет чего меняется выбор стартовых кодонов при OGD, пока остается неизвестным. Вполне вероятно, что существует некий пока неизвестный сигнальный механизм, который воздействует на активность факторов инициации, влияющих на выбор стартового кодона. Однако, мы обратили внимание на тот факт, что среди мРНК, которые регулируются на трансляционном уровне, очень много мРНК факторов инициации трансляции, причем как раз тех факторов, которые сами отвечают за выбор стартового кодона. Как видно из рис. 59, трансляция мРНК eIF1A значительно подавляется при OGD, при этом происходит активация трансляции в 5' НТО с не-AUG кодона. Трансляция мРНК, кодирующей фактор инициации eIF5, также сильно подавляется при стрессе, при этом в 5'НТО происходит активация трансляции с AUG в неоптимальном нуклеотидном контексте (рис. 59). Наконец, происходит значительная активация трансляции мРНК eIF1. Стартовый кодон eIF1 находится в плохом нуклеотидном контексте, и известно, что этот контекст опосредует авторегуляцию трансляции на этой мРНК за счет ее продукта [60]. Подводя итог, регуляция трансляции на уровне выбора стартового кодона при OGD может опосредоваться за счет дифференциальной регуляции трансляции мРНК инициаторных факторов.

### 3.3.3 Анализ 5'НТО мРНК факторов инициации трансляции у млекопитающих

Данное наблюдение заставило нас исследовать особенности мРНК инициаторных факторов у млекопитающих. Мы провели масштабный анализ литературных данных, а также проанализировали 5'НТО мРНК инициаторных факторов в поисках возможных регуляторных элементов. В результате, кроме известных ранее регуляторных элементов, нам удалось обнаружить и предсказать несколько других особенностей 5'НТО

инициаторных факторов, которые могут быть вовлечены в регуляцию трансляции инициаторного аппарата.

Первый мотив, который мы искали в 5'НТО мРНК факторов инициации – это 5'TOP мотив. Как уже упоминалось ранее, 5'TOP мотивы по не до конца понятному механизму опосредуют регуляцию трансляции при изменении активности киназы mTOR. Почти все мРНК рибосомных белков и факторов элонгации трансляции имеют 5'TOP, что по всей видимости позволяет скоординировано регулировать продукцию абсолютно необходимых для трансляции компонентов. Интересно, что в случае факторов инициации, ситуация отличается – 5'TOP мотивы имеют далеко не все инициаторные факторы.

Анализируя данные 5'CAGE, которые позволяют определять 5'концы мРНК с точностью до нуклеотида на полногеномном уровне, мы пришли к следующему выводу: из всех факторов инициации однозначно определяемые 5'TOP мотивы имеют только одна из трех субъединиц eIF2 - EIF2S3, и две субъединицы фактора инициации eIF3 (EIF3H и EIF3D). Вероятно, что еще несколько мРНК других инициаторных факторов могут содержать 5'TOP мотив в специфических клетках и тканях. О чем говорит это наблюдение? В отличие от абсолютно необходимых компонентов трансляции, которые нужны для трансляции любой мРНК (элонгационные факторы и рибосомы), компоненты инициаторного аппарата в целом не находятся под контролем mTOR. Однако, интересно отметить, что изменение активности mTOR может приводить к диспропорциональному синтезу субъединиц факторов инициации eIF2 и eIF3. Возможно, что такие “недособранные” факторы могут служить для специфической регуляции трансляции определенных мРНК в условиях хронического подавления активности mTOR, например – при длительном голодании клетки.

Кроме того, мы обнаружили еще несколько консервативных элементов, которые потенциально могут участвовать в регуляции

трансляции самих инициаторных факторов. Так, у мРНК EIF2S3, кодирующей субъединицу eIF2, была обнаружена консервативная uORF в 5'НТО. Интересной особенностью данной uORF является то, что длина закодированного в ней полипептида сильно варьируется у различных животных, но во всех случаях, стартовый кодон находится в плохом нуклеотидном контексте (цитозины в -3 и +4 положении, рис. 60). Несмотря на плохой контекст AUG, этот стартовый кодон узнается рибосомами по данным рибосомного профайлинга (рис. 60). Можно предположить, что трансляция мРНК EIF2S3 может регулироваться в условиях, при которых изменяется эффективность выбора стартового кодона.

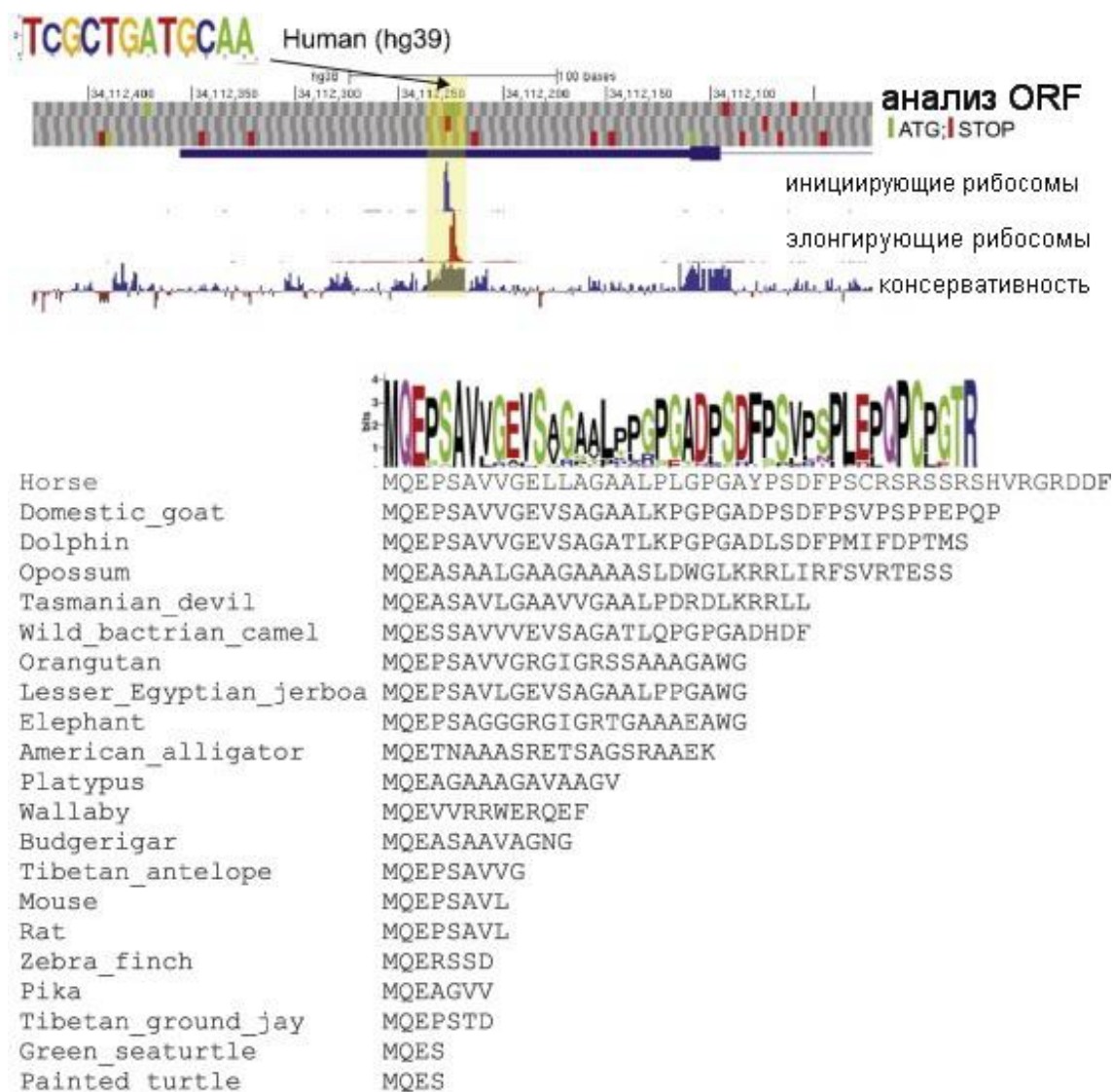


Рис. 60. мРНК EIF2S3 имеет консервативную uORF в 5'НТО.

Еще два фактора инициации имеют “особенные” 5’НТО. Так, мРНК eIF4E1 по данным CAGE имеет 5’НТО длиной всего 8 нуклеотидов (рис. 61 А). Почему такая короткая 5’НТО может играть роль в регуляции трансляции? По данным, полученным *in vitro* в системе из очищенных компонентов, на мРНК с короткими 5’НТО (меньше 20 нт) за счет действия eIF1 может происходить проскальзывающее сканирование. По всей видимости это происходит из-за того, что не весь мРНК-связывающий канал рибосомы занят мРНК из-за короткой длины лидера, и инициаторный комплекс на AUG получается нестабильным, даже если контекст инициаторного кодона подходящий. Таким образом, избыток eIF1 вполне вероятно подавляет трансляцию eIF4E, ключевого компонента в кеп зависимой инициации трансляции.

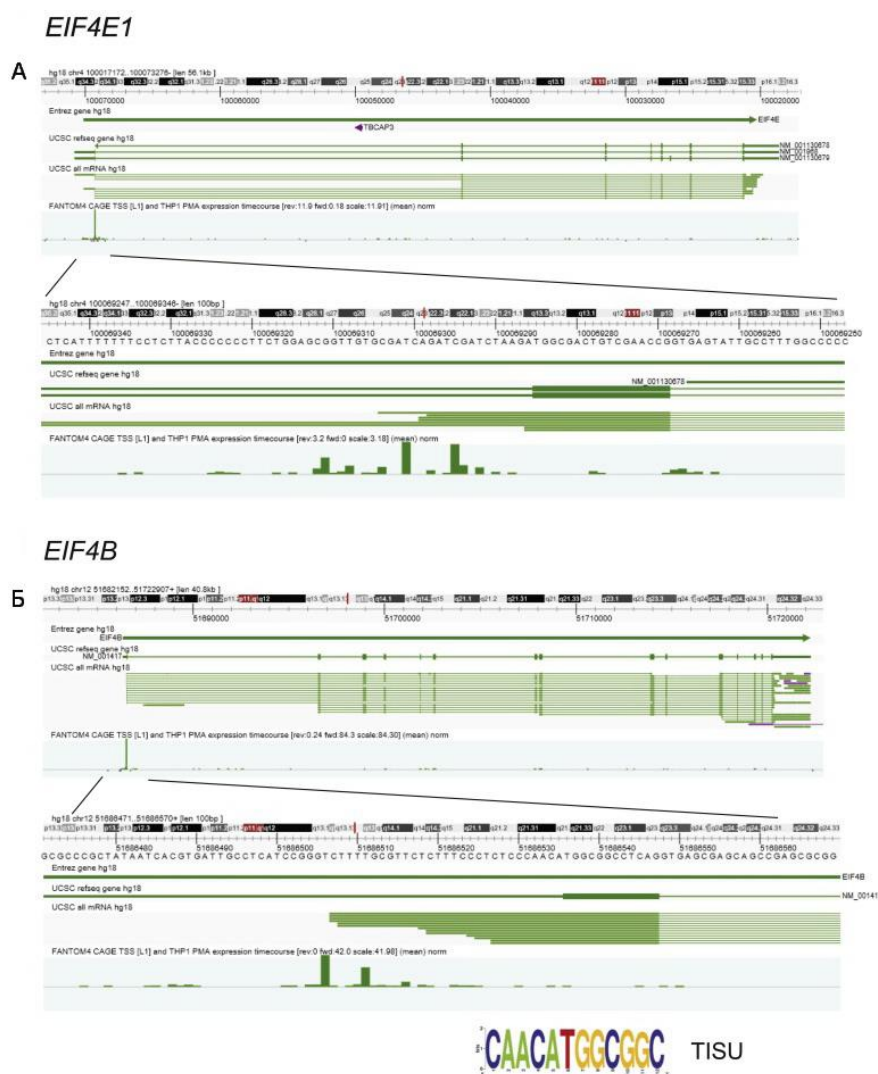


Рис. 61. Организация 5’НТО мРНК eIF4E1 (А) и eIF4B (В).

Наконец, мРНК eIF4B имеет ярко выраженный консервативный TISU мотив (рис. 61 Б). Как уже упоминалось в обзоре литературы, мРНК с TISU критически зависят от eIF1, но устойчивы к подавлению хеликазной активности eIF4A. Ранее было показано, что трансляция TISU мРНК достаточно эффективно происходит при энергетическом стрессе, когда обычная кеп-зависимая трансляция подавлена [240]. Можно предположить, что при таком стрессе, продолжающаяся за счет TISU продукция eIF4B, помощника “главной” трансляционной хеликазы eIF4A, может способствовать восстановлению белкового синтеза.

#### 3.3.4 Изучение роли 5'НТО в регуляции трансляции при фосфорилировании eIF2.

eIF2 является одним из ключевых компонентов инициаторного аппарата эукариот. Именно этот фактор приносит инициаторную met-tRNA<sub>i</sub> в Р-сайт рибосомы. При различных стрессовых условиях, когда клетке требуется “выключить” глобальную трансляцию, запускается так называемый интегрированный стрессовый ответ – ISR [241-243]. Он заключается в том, что одна из четырех специализированных киназ - HRI, PERK, PKR или GCN2 - фосфорилируют Ser51 в альфа субъединице eIF2 [244-246]. Фосфорилированный eIF2 связывается со своим обменным фактором eIF2B в неактивный комплекс, что приводит к быстрому истощению активного тройного комплекса и к глобальному падению белкового синтеза [68, 69].

Возможна ли инициация трансляции без eIF2? В некоторых случаях возможна: IRES элементы III и IV группы могут инициировать трансляцию без участия eIF2. В случае IRES элементов IV группы это совсем неудивительно, ведь они не требуют даже met-tRNA<sub>i</sub>. В случае с IRES элементами III группы, ситуация более сложная, поскольку met-tRNA<sub>i</sub>

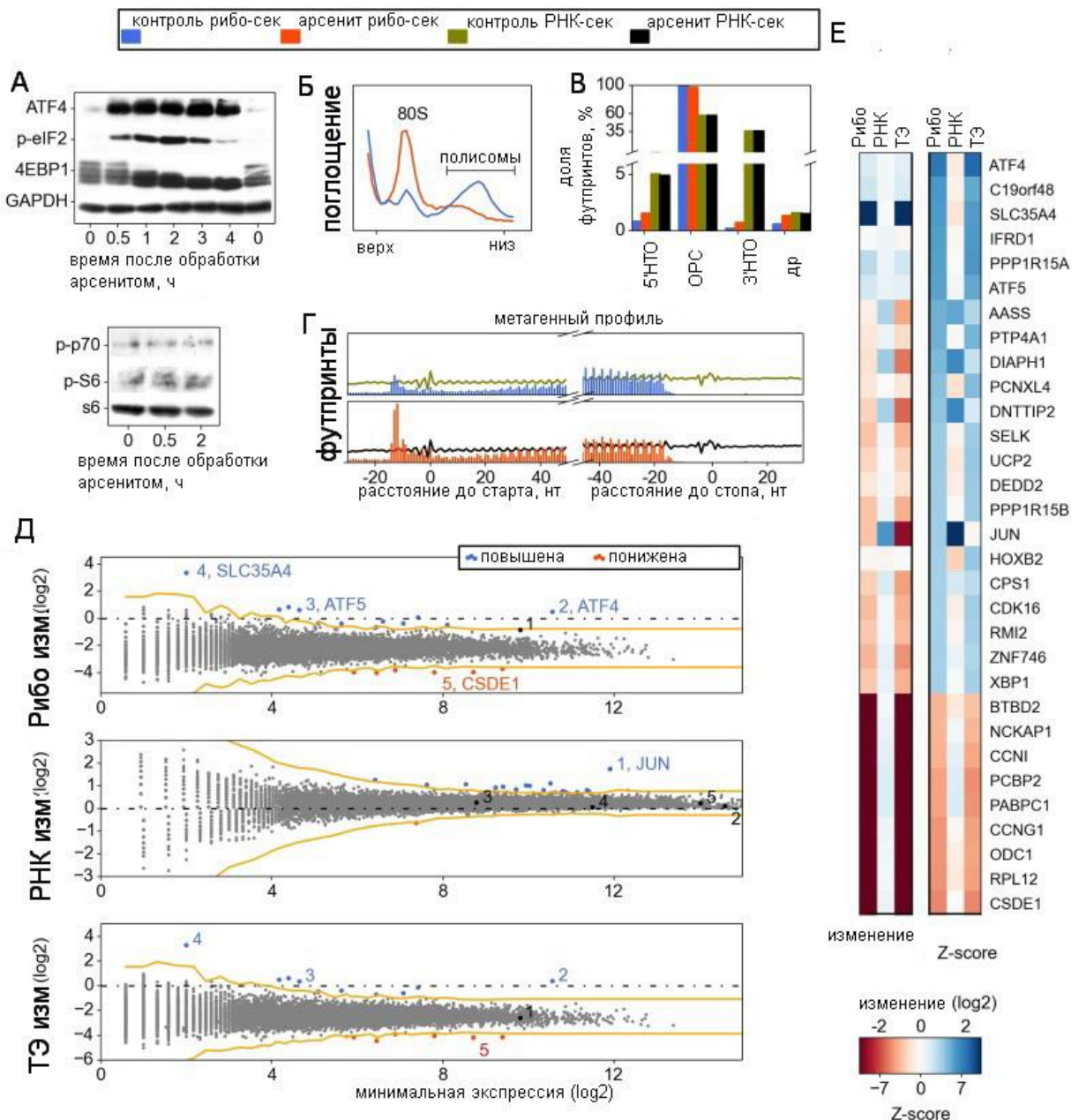
может доставляться на рибосому как eIF2 зависимым, так и eIF2-независимым способом. В случае с клеточными мРНК, ответ на данный вопрос скорее всего отрицательный. Однако известно, что некоторые мРНК могут избирательно транслироваться при снижении количества активного eIF2 (ТС). Избирательная трансляция таких мРНК, как мРНК ATF4, основана на согласованной работе системы uORF в их 5'НТО. Однако регуляция трансляции при интегрированном стрессовом ответе не изучалась на полногеномном уровне.

Мы решили использовать рибосомный профайлинг для изучения влияния фосфорилирования eIF2 на глобальную трансляцию в клетке. Первой задачей было подобрать такое стрессовое воздействие, которое бы вызывало быстрое фосфорилирование eIF2, но при этом не затрагивало бы другой сигнальный путь, подавляющий кеп-зависимую трансляцию через активацию репрессора 4E-ВР. Пользуясь нашим опытом в изучении стрессовых воздействий на трансляцию, мы выбрали следующие условия: обработка клеток HEK293T 40  $\mu$ M арсенитом натрия в течение 30 минут.

В этих условиях, наблюдается значительное увеличение уровня фосфорилирования eIF2, но при этом еще не происходит активации репрессора 4E-ВР (она происходит позже во времени). (рис. 62 А). Уже через 30 мин после обработки клеток арсенитом, мы действительно наблюдали драматическое увеличение уровня ATF4. В этих условиях наблюдается значительное, но не полное исчезновение полисом, и повышение 80S (рис. 62 Б), что говорит о глобальном подавлении трансляции в клетке. В этих условиях и решили сделать рибосомный профайлинг.

Рибосомные футпринты, как и ожидалось, картировались в основном на кодирующие последовательности транскриптов и имели триплетную периодичность (рис. 62 В и Г). Далее, мы анализировали дифференциальную экспрессию генов при стрессе. Используя столь

короткое воздействие, мы ожидали, что основной ответ на уровне изменения экспрессии генов будет на уровне трансляции, а не на уровне транскрипции. Действительно, оказалось, что статистически значимые изменения в уровне мРНК наблюдались только для 24 случаев.



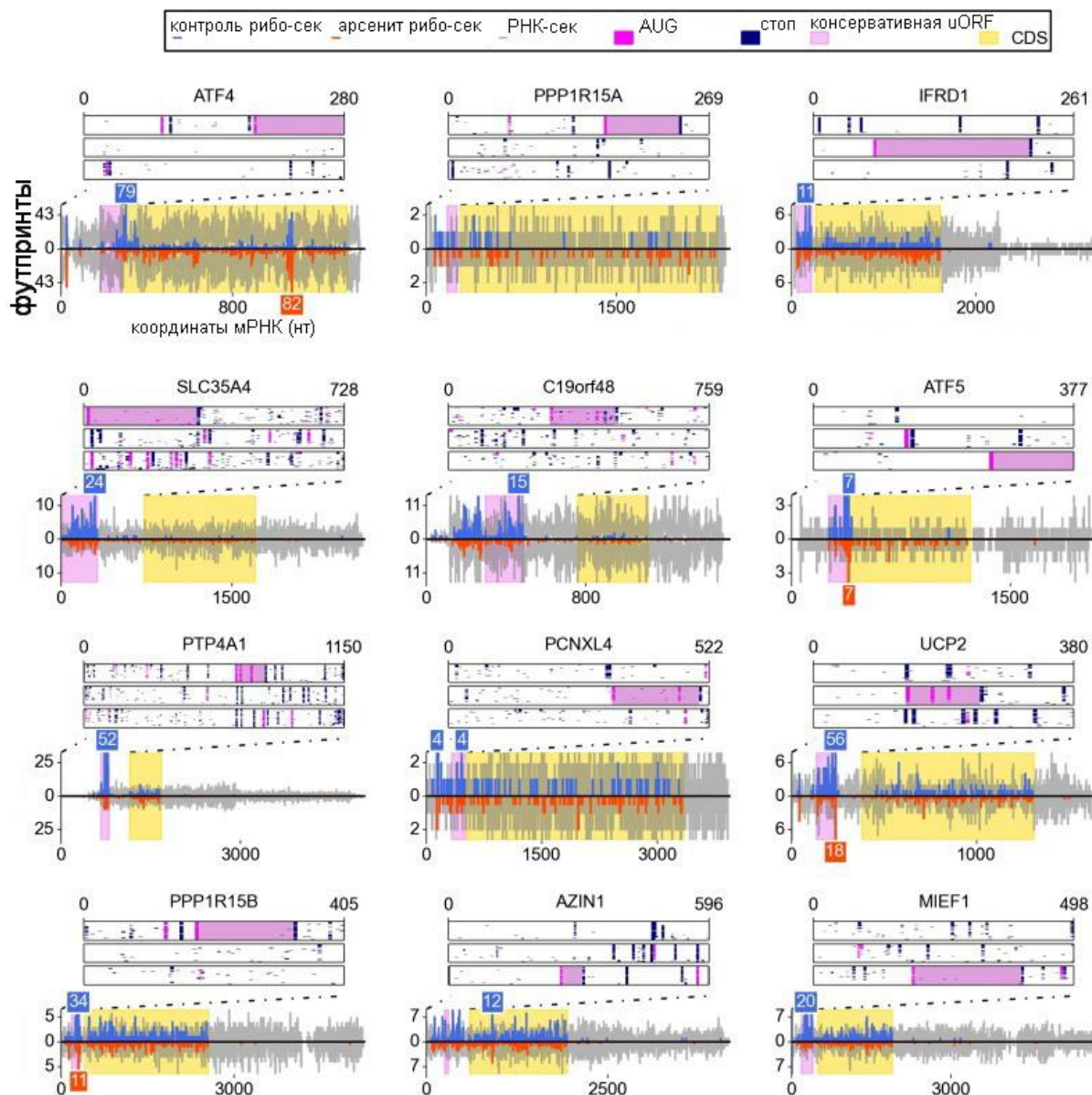
**Рис. 62.** Изучение трансляционной регуляции при фосфорилировании eIF2 с помощью рибосомного профайлинга. А) Вестерн блот, показывающий изменение фосфорилирования eIF2, 4E-BP, а также накопление ATF4 в течение указанного времени после обработки клеток Нек293Т арсенитом, Б) Изменение полисомного профиля через 30 минут после обработки арсенитом, В) Доля рибосомных футпринтов (Riboseq) и фрагментов РНК (RNAseq), картируемых на разные участки мРНК при

нормальных условиях и при стрессе, Г) метагенный профиль в нормальных условиях и при стрессе Д) Статистически достоверное изменение рибосомных футпринов (Riboseq, верхняя панель), фрагментов РНК (RNAseq, средняя панель), и трансляционной эффективности (Riboseq/RNAseq) для мРНК при стрессе. Е) Наиболее значимые случаи для индивидуальных мРНК, для которых наблюдается статистически значимое изменение экспрессии при стрессе. Цветовая шкала отражает уровень изменения при стрессе по сравнению с контролем. Трансляционная эффективность (ТЭ) рассчитывалась как соотношение рибосомных футпринов к фрагментам мРНК (RNAseq), картирующихся на заданный участок мРНК.

На трансляционном уровне, мы обнаружили значительное подавление трансляции большинства клеточных мРНК (падение трансляции в 5 раз по сравнению с нормальными условиями). Можно выделить группу мРНК, трансляция которых оказалась гиперчувствительной к инактивации eIF2. Интересно отметить, что 4 из 7 наиболее чувствительных на трансляционном уровне мРНК кодируют РНК-связывающие белки PABPC1, PCBP2, RPL12, и CSDE1.

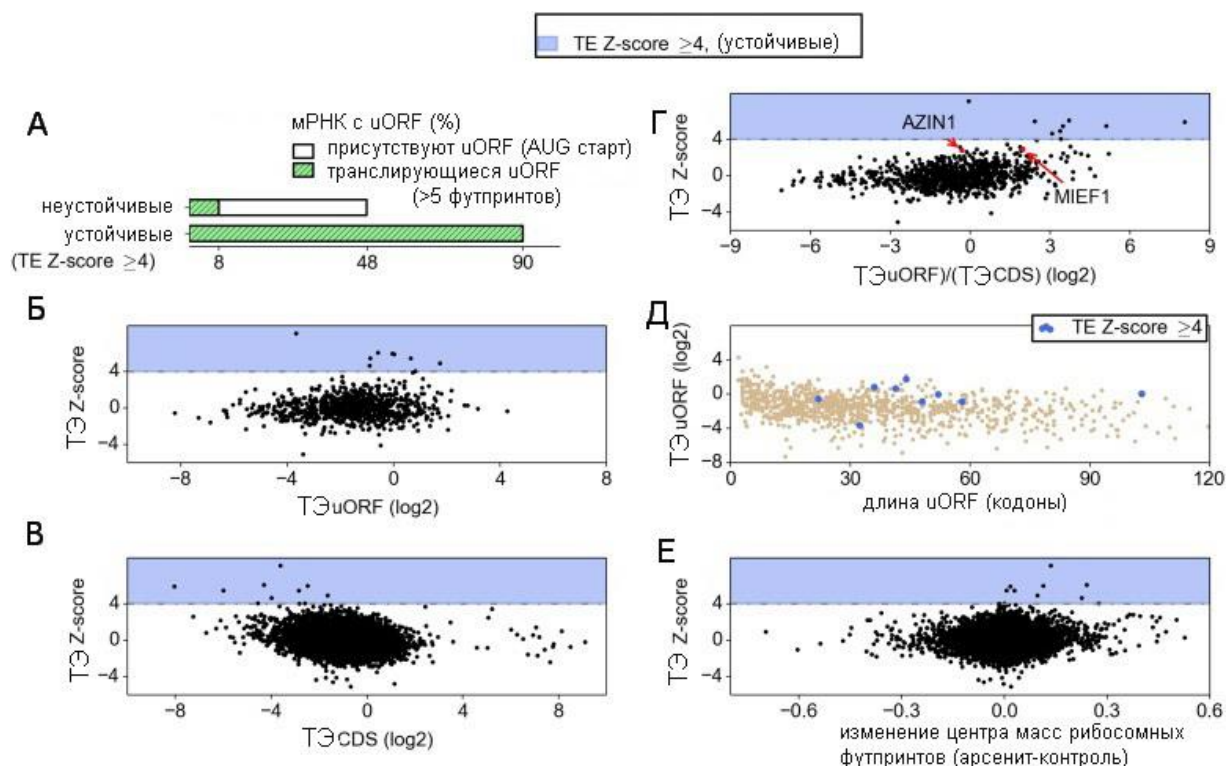
Однако, для нас были более интересны те мРНК, трансляция которых стимулировалась (или не подавлялась) при фосфорилировании eIF2. Применяв довольно строгие статистические критерии (ТЭ, Z-score >4), мы обнаружили всего 10 таких мРНК. Тот факт, что среди этих 10 мРНК присутствует упомянутая ранее мРНК ATF4, говорит о правильно подобранных условиях эксперимента.

Анализ рибосомных профилей этих мРНК показал, что во всех случаях наблюдается трансляция рамок считывания в их 5'НТО, причем и в нормальных, и в стрессовых условиях (рис. 63).



**Рис. 63.** Рибосомный профайлинг индивидуальных мРНК, избирательно транслирующихся при инактивации eIF2. Серым цветом обозначены картированные фрагменты мРНК, полученные при фрагментации очищенной мРНК (RNAseq). Синим цветом – рибосомные футпринты, картируемые на мРНК в нормальных условиях; красным цветом – при стрессе (30 минут, 40uM арсенит). Основная рамка считывания выделена желтой областью. Транслирующаяся uORF обозначена фиолетовой областью. Над каждой диаграммой представлено множественное выравнивание области 5'НТО (100 млекопитающих) в трех рамках считывания. AUG кодоны отмечены фиолетовыми точками, стоп кодоны отмечены синими точками. Консервативные uORF выделены фиолетовой областью

Однако, наличие транслируемых uORF не является достаточным условием для устойчивости трансляции мРНК к инактивации eIF2. Мы проанализировали все мРНК, содержащие uORF. Оказалось, что примерно 8% от всех мРНК также имеют транслируемые uORF, но при этом подавляющее большинство таких мРНК не устойчиво к стрессу (рис. 64 А).

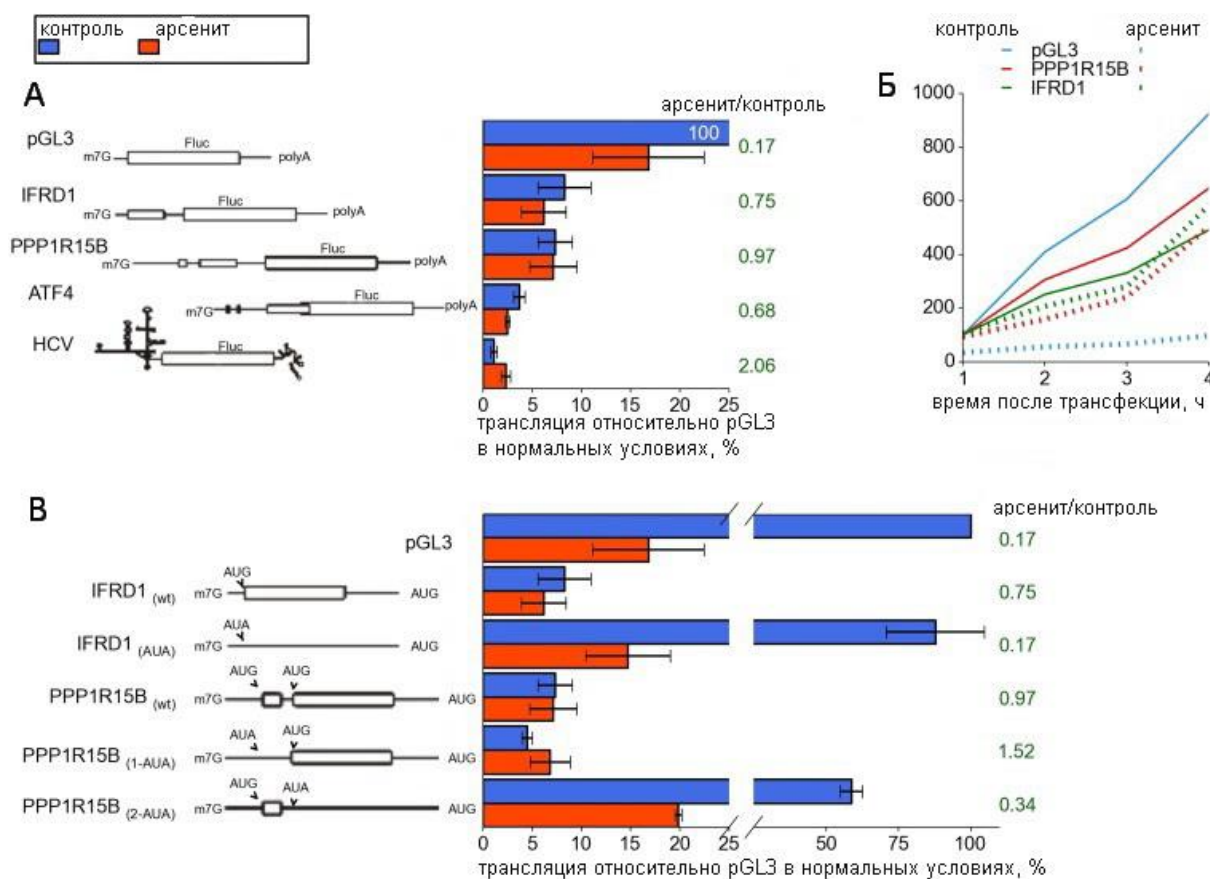


**Рис. 64.** Исследование особенностей 5'НТО мРНК, которые избирательно транслируются при инактивации eIF2. Отсечение статистически значимых случаев "устойчивой" к стрессу трансляции мРНК отмечено синим цветом

Ни трансляционная эффективность uORF (рис. 64 Б), ни трансляционная эффективность основной рамки считывания (рис. 64 В) для не коррелировала с устойчивостью данной мРНК к стрессу. Однако высокое соотношение трансляционных эффективностей для uORF и для кодирующей рамки (ТЭ uORF/ЕЭ CDS) в нормальных условиях оказалось способно эффективно предсказывать устойчивость трансляции мРНК к стрессу (рис. 64 Г). Другими словами, среди устойчивых к стрессу мРНК

преобладают те мРНК, для которых наблюдается эффективная трансляция uORF и сниженная трансляция основной рамки считывания в нормальных условиях. Такие "особенные" регуляторные uORF, вовлеченные в трансляционный контроль при стрессе, имеют длину не меньше 20 кодонов (рис. 64 Д).

Что определяет устойчивость трансляции мРНК к инактивации eIF2? Достаточно ли для этого только 5'НТО, или необходимы еще какие-то элементы мРНК? Для того, чтобы ответить на этот вопрос, были созданы репортерные люциферазные конструкции, содержащие 5'НТО изучаемых мРНК (рис. 65 А).



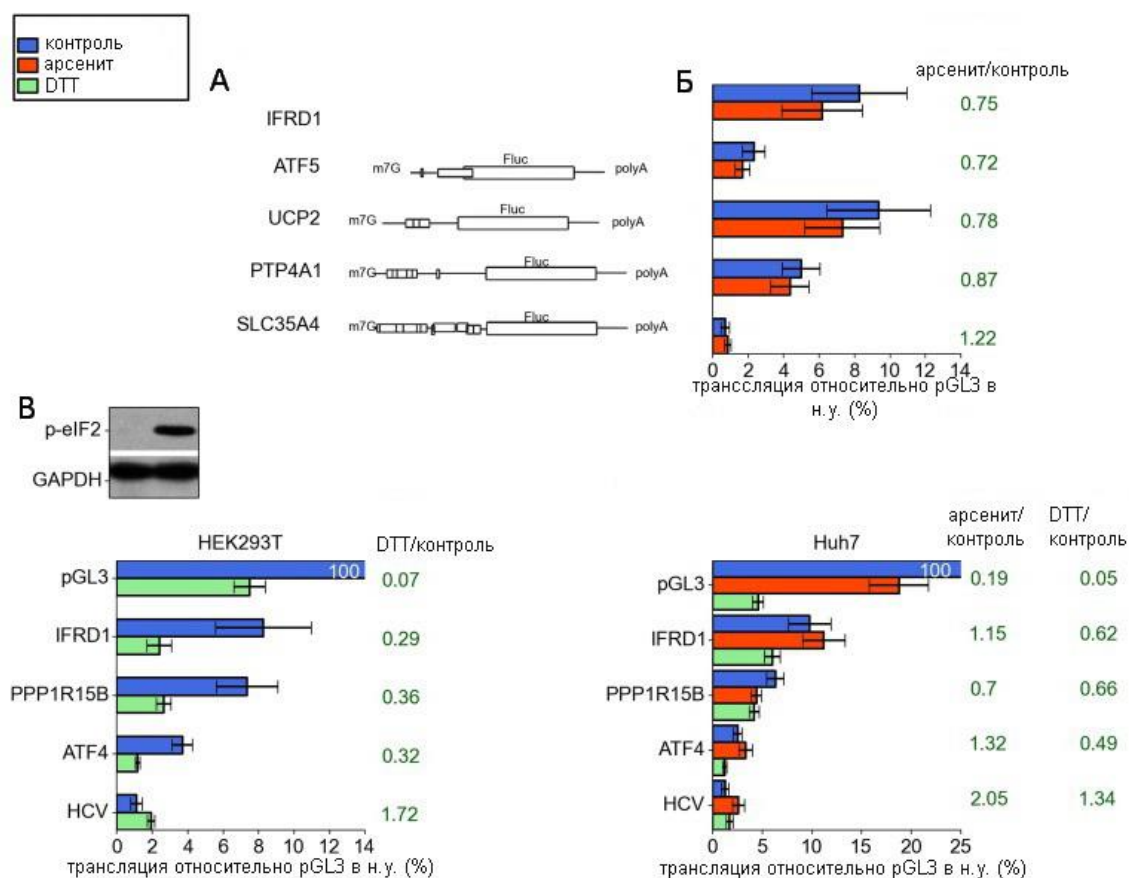
**Рис. 65.** А) анализ трансляции репортерных конструкций в клетках Нек293Т, Б) трансляция репортерных мРНК, измеренная через различные временные промежутки; В) Анализ репортерных конструкций с мутациями в стартовых кодонах uORF. Схематические изображения использованных конструкций представлены слева от графиков.

Соответствующие кепированные и полиаденилированные мРНК трансфецировали в клетки, и через 2 часа после трансфекции измеряли люциферазную активность. В нормальных условиях, репортерные мРНК с 5'НТО IFRD1, PPP1R15B и ATF4 транслируются примерно в семь раз менее эффективно по сравнению с контрольной мРНК с неспецифической короткой 5' НТО (рис. 65 А, синие столбики).

При обработке клеток арсенитом, трансляция контрольной кеп-зависимой мРНК снижалась примерно в 5 раз (чего и стоило ожидать при таком уровне фосфорилирования eIF2 в данных условиях). При этом, трансляция мРНК с 5'НТО IFRD1, PPP1R15B, ATF4 подавлялась крайне незначительно (рис. 65 А). Такая же тенденция наблюдалась при измерении активности репортеров через различные промежутки времени после трансфекции (рис. 65 Б). Эти данные говорят о том, что наличие одной лишь 5'НТО достаточно для того, чтобы обеспечить трансляцию репортерной мРНК в условиях инактивации eIF2.

Какую роль играют uORF в регуляции трансляции? Для более детального анализа, мы выбрали 5'НТО IFRD1 и PPP1R15B. PPP1R15B содержит систему из двух uORF, разделенных 21 нуклеотидом. uORF<sub>1</sub> имеет длину 9 кодонов и находится на расстоянии 127 нуклеотидов от 5'конца мРНК. uORF<sub>2</sub> имеет длину 52 кодона и заканчивается за 75 нуклеотидов до стартового кодона основной рамки считывания. Организация 5'НТО PPP1R15B напоминает организацию 5'НТО мРНК ATF4, для которой был предложен механизм “отложенной реинициации”. В отличие от этих мРНК, 5'НТО IFRD1 имеет всего одну uORF длиной 53 кодона, которая начинается на расстоянии 19 нуклеотидов от 5'конца и заканчивается за 43 нуклеотида до начала основной рамки считывания. Поскольку для реализации механизма “отложенной реинициации” необходимы две uORF, трансляция IFRD1 в принципе не может регулироваться таким способом.

Для проверки эффекта uORF на регуляцию трансляции при инактивации eIF2, все uORF последовательно мутировались (стартовый кодон AUG заменяли на AUA). В случае с IFRD1, удаление uORF привело к дерепрессии трансляции в нормальных условиях и к потере устойчивости трансляции к обработке арсенитом (рис. 65 В). В случае с PPP1R15B, удаление uORF<sub>1</sub> никак не сказалось ни на трансляции, ни на устойчивости к стрессу. Однако удаление второй, длинной uORF<sub>2</sub>, привело к дерепрессии трансляции в нормальных условиях и к потере устойчивости трансляции при стрессе (рис. 65 В). Таким образом, в обоих случаях, для устойчивости к стрессу необходимо наличие только одной длинной uORF в 5'НТО. Механизм “отложенной реинициации”, очевидно, не может объяснить трансляционный контроль данных мРНК при стрессе.



**Рис. 66.** Анализ активности дополнительных репортерных конструкций (А) с 5'НТО мРНК, устойчивых к стрессу. (Б) – репортерная активность при обработке клеток Hek293T арсенитом; (В) – вестерн блот, показывающий активацию фосфорилирования

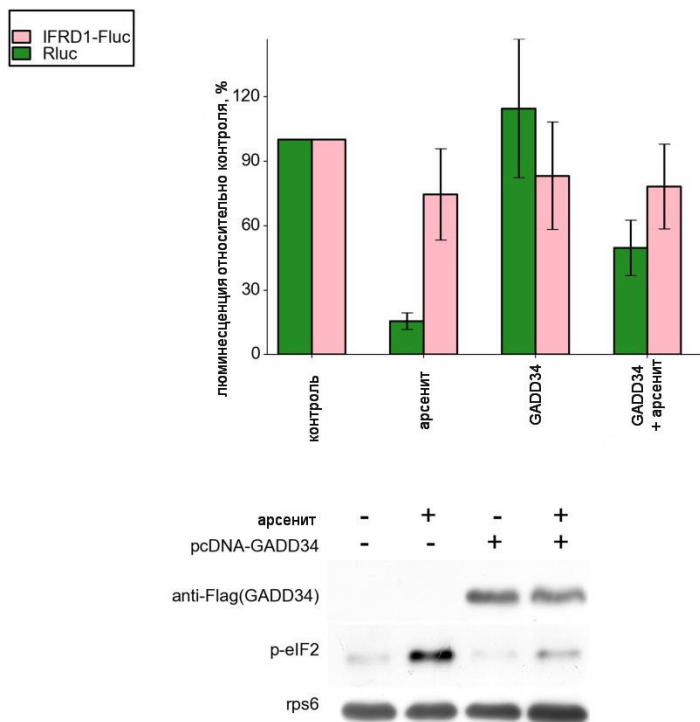
eIF2 при обработке клеток Hek293T при помощи DTT, и активность репортерных конструкций в данных условиях; (Г) репортерная активность при обработке клеток Huh7 арсенитом и DTT

Далее, были проанализированы дополнительный набор репортерных мРНК с 5'НТО, взятых из “устойчивых” к стрессу мРНК (рис. 66 А). Все дополнительные 5'НТО также оказались способны придавать устойчивость трансляции к стрессу (рис. 66 Б). Стоит отметить, что 5'НТО мРНК UCP2 также имеет всего лишь одну uORF.

Учитывая то, что арсенит неспецифичен и вызывает нарушения множества процессов в клетках, мы также использовали другое стрессовое воздействие – обработку клеток дитиотреитолом (DTT). Известно, что DTT вызывает стресс несвернутых белков, который приводит к активации одной из eIF2 киназ – PERK. DTT, так же, как и арсенит, вызывает значительное фосфорилирование eIF2 (рис. 66 Б). Эксперимент с обработкой клеток DTT показал, что 5'НТО мРНК IFRD1, PPP1R15B, ATF4 также способны снижать чувствительность трансляции к данному стрессу (рис. 66 В). Данный эффект наблюдался и в клетках Huh7 (рис. 66 Г).

Тем не менее, даже эти эксперименты не позволяли однозначно ответить на вопрос, какую именно роль фосфорилирование eIF2 играет трансляции мРНК. Необходимо было создать такие условия, когда обработка арсенитом не приводила бы к фосфорилированию eIF2, и в этих условиях посмотреть на изменение трансляции репортеров. Для этого, была использована конструкция для оверэкспрессии в клетках GADD34 – это субъединица фосфатазы, которая дефосфорилирует eIF2 [247]. Клетки сначала трансфецировали “пустым” вектором или плазмидой, кодирующей

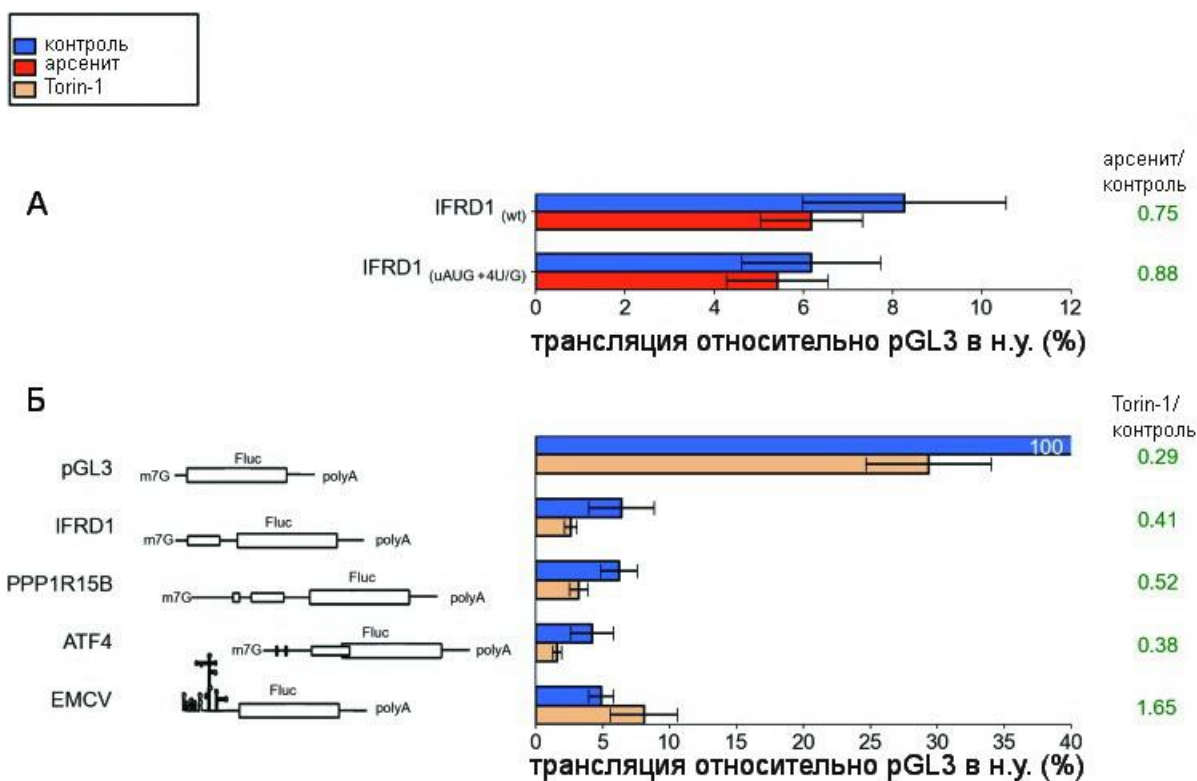
GADD34. Через сутки после трансфекции, клетки трансфецировали репортерными мРНК и обрабатывали арсенитом, как и раньше.



**Рис. 67** Изучение активности репортерных конструкций в клетках с гиперэкспрессией GADD34 при действии арсенита. Значения активности репортера для контрольной мРНК отмечены зеленым цветом, значения активности репортера с 5'НТО IFRD1 отмечены розовым цветом. Под графиком приведен результат вестерн блота лизатов клеток с гиперэкспрессией фосфатазы GADD34-Flag

Из данных, представленных на рис. 67 видно, что гиперэкспрессия GADD34 действительно значительно снижает уровень фосфорилирования eIF2 при обработке клеток арсенитом. При этом, арсенит практически перестает действовать на трансляцию репортерных мРНК. Таким образом, нам удалось показать, что эффект арсенита на трансляцию в подобранных нами условиях действительно в основном связан именно с инактивацией eIF2.

Можно ли ожидать, что мРНК, устойчивые к инактивации eIF2, могут также быть устойчивыми к инактивации кеп-зависимой трансляции? Для того чтобы проверить ответить на этот вопрос, мы обрабатывали клетки Torin-1, специфическим ингибитором mTOR, и проводили трансфекцию репортерных мРНК.

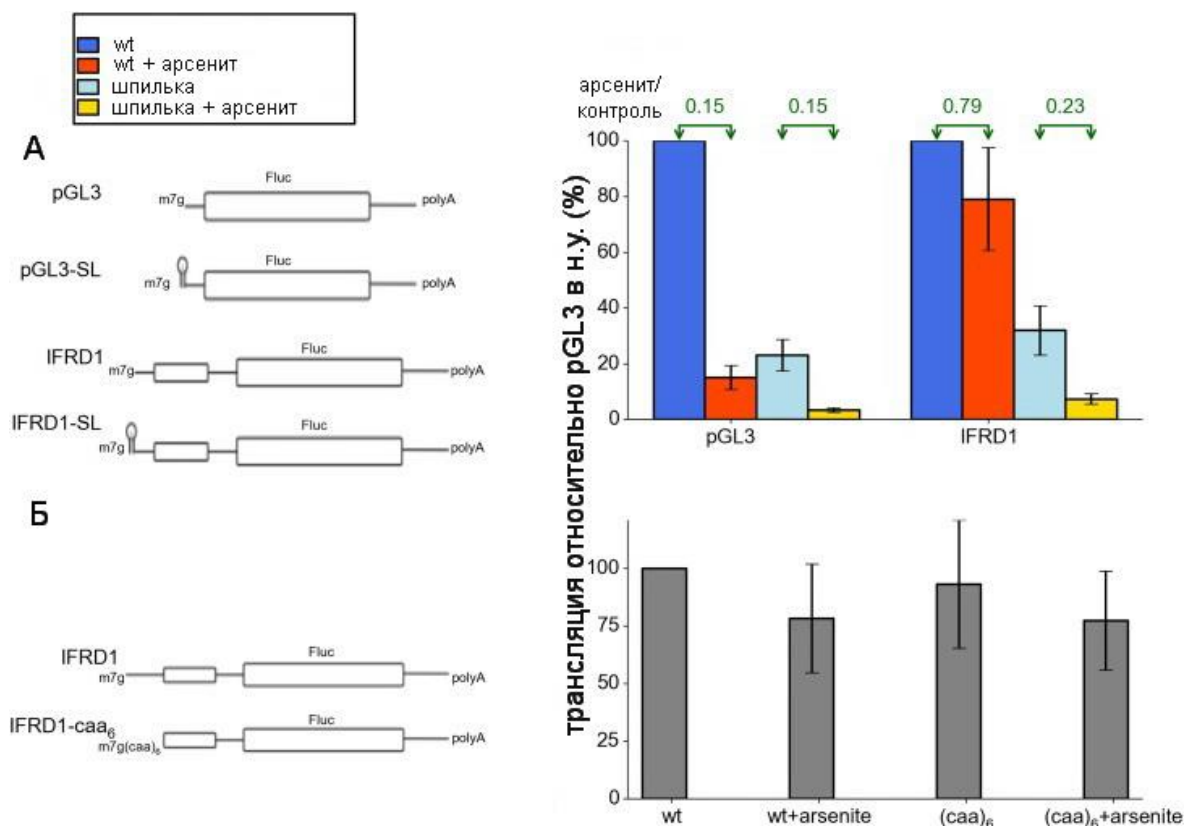


**Рис. 68.** Измерение активности репортерных конструкций: (А) эффект улучшения контекста uAUG в 5'НТО IFRD1, (Б) эффект от обработки клеток ингибитором Torin-1 на трансляцию репортеров

Как видно из результатов эксперимента, представленного на рис. 68, трансляция репортерных мРНК, устойчивых к инактивации eIF2, подавляется при воздействии Torin-1. Таким образом, можно сделать вывод о том, что трансляционный контроль, опосредованный данными 5'НТО, зависит не от подавления трансляции как таковой, а именно от инактивации eIF2. Наши соображения по этому поводу будут рассмотрены ниже.

Какие именно черты 5'НТО, кроме наличия uORF, определяют устойчивость трансляции к фосфорилированию eIF2? Можно предположить, что не только одна лишь uORF необходима для устойчивой трансляции, ведь по данным рибосомного профайлинга множество мРНК с uORF неустойчивы к стрессу. Для более детального изучения этого

вопроса мы выбрали мРНК IFRD1, поскольку в ее 5'НТО находится всего одна uORF.



**Рис. 69** Измерение активности репортерных конструкций с различными вариантами 5'НТО IFRD1 при обработке клеток арсенитом (А) - эффект от введения шпильчатой структуры в 5'НТО IFRD1, (Б) – эффект от введения неспецифической неструктурированной последовательности перед uORF IFRD1

Мы обратили внимание на то, что инициаторный кодон uORF находится в неоптимальном контексте (в положении +4 относительно AUG находится уридин). Можно было предположить, что при стрессе, вызываемом обработкой арсенитом, происходит изменение эффективности инициации на неоптимальных стартовых кодонах. Однако, мутация +4U/G не привела к изменению устойчивости к стрессу (рис. 69 А). Более того, введение дополнительного AUG внутри uORF также не сказалось на устойчивости к стрессу (данные не показаны). Таким образом, мы сделали

вывод, что устойчивая к стрессу трансляция не связана с изменением эффективности проскальзывающего сканирования.

Далее, мы решили проверить, как скажется на трансляции при стрессе введение в репортерную мРНК шпилечной структуры на 5'конец мРНК. Для этого, мы создали репортерные мРНК с шпилькой, которая в нормальных условиях подавляет трансляцию в несколько раз. Оказалось, что для контрольной мРНК без всяких uORF, шпилька ингибирует трансляцию одинаковым образом и в нормальных условиях, и при обработке клеток арсенитом. Однако, для репортерной мРНК с 5'НТО IFRD1, введение шпильки на 5'конец мРНК привело к потере устойчивости к стрессу (рис. 69 А).

Это очень важный результат: поскольку шпилька на 5'конце мРНК снижает эффективность посадки 43S комплекса, мы сделали вывод, что скорость посадки 43S и наличие подходящей uORF являются определяющими факторами для избирательной трансляции мРНК при инактивации eIF2. Однако, можно также предположить, что в коротком участке 5'НТО IFRD1, который предшествует uORF, может присутствовать какой-либо цис-действующий элемент, необходимый для трансляционного контроля, и введение шпильки разрушает его. Мы заменили участок 5'НТО IFRD1 перед стартовым кодоном на неспецифическую последовательность САА<sub>6</sub>, которая не способна образовывать какие либо вторичные структуры. Данная замена никак не повлияла на трансляцию репортерной мРНК при стрессе (рис. 69 Б). Таким образом, мы предположили, что для регуляции трансляции при инактивации eIF2 необходимо не только наличие uORF, но и наличие определенной “оптимальной” области мРНК перед uORF, которая не препятствует эффективной посадке 43S на мРНК.

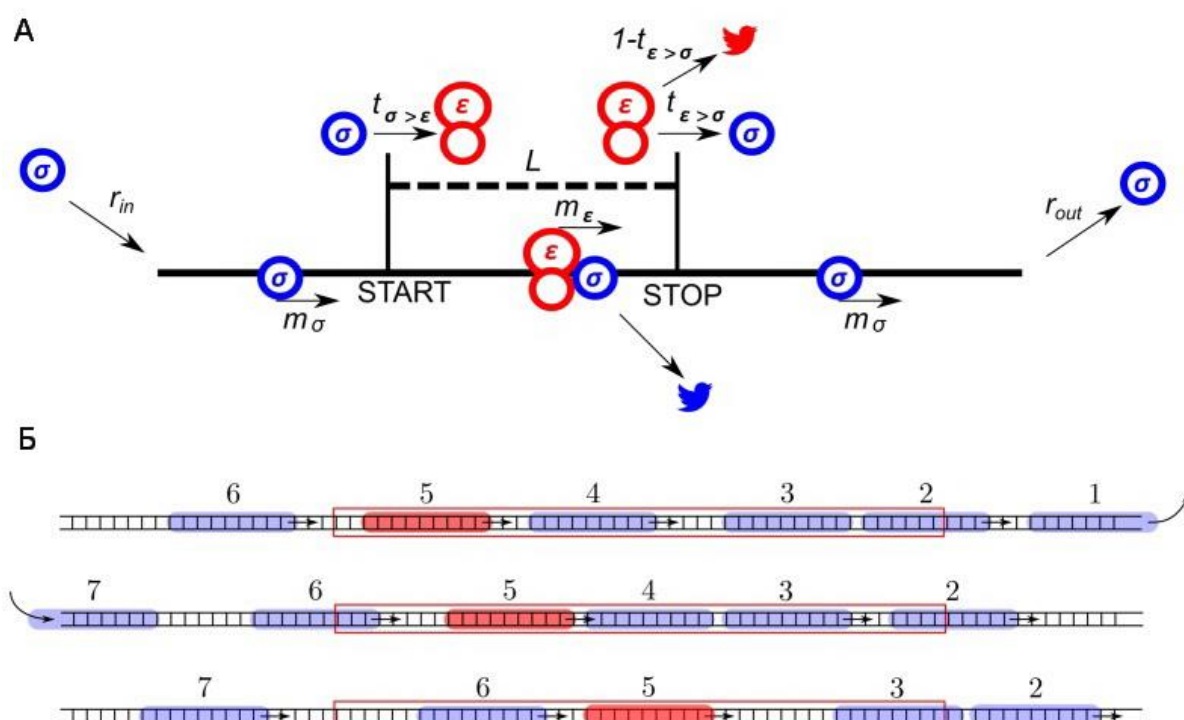
Каким образом единственная uORF в 5'НТО может обеспечить избирательную трансляцию при инактивации eIF2? И почему в случае

большинства мРНК uORF недостаточно для того, чтобы обеспечить устойчивость к стрессу? Мы предположили, что трансляционная регуляция при стрессе может быть связана с диссоциацией сканирующих рибосом при столкновении с рибосомами, транслирующими uORF. В нормальных условиях, скорость посадки 43S на мРНК высока, значительная часть 43S узнает стартовый кодон uORF и начинает ее транслировать. Те 43S комплексы, которые не узнали uAUG кодон, с большой вероятностью столкнутся с элонгирующими рибосомами и диссоциируют с мРНК, и инициация трансляции на основном AUG будет подавлена. При стрессе, гораздо меньше 43S комплексов связываются с мРНК, меньше 43S узнают uAUG, и соответственно – меньше вероятность столкновения “редких” сканирующих и элонгирующих рибосом. За счет этого, больше 43S могут беспрепятственно преодолеть uORF и иницировать на основном стартовом кодоне, что приводит к устойчивости или даже к стимуляции трансляции при стрессе.

Очевидно, что данная модель являлась довольно умозрительной. Во-первых, не было доказательств того факта, что сканирующие рибосомы действительно диссоциируют при столкновении с элонгирующими рибосомами. Во-вторых, было непонятно, существуют ли такие осмысленные трансляционные параметры, при которых снижение скорости посадки 43S на мРНК действительно может приводить к повышению инициации на основной рамке считывания при наличии uORF в 5'НТО.

Однако, недавно был разработан метод, который позволил детектировать сканирующие рибосомы *in vivo*. Данный метод, получивший название TCP-seq, основан на анализе фрагментов мРНК, защищаемых 43S комплексом на мРНК в дрожжах [248]. Результаты TCP-seq говорят о том, что действительно сканирующие рибосомы диссоциируют при столкновении с элонгирующими рибосомами,

поскольку они не детектируются после стартовых кодонов рамки считывания. Учитывая эти результаты, мы решили провести моделирование процесса инициации трансляции на мРНК с одной uORF с помощью подхода, известного как TASEP (Totally Asymmetric Simple Exclusion Process). TASEP – это моделирование динамической системы, в которой частицы движутся в одном направлении по одномерной решетке, на которой каждый сайт может быть оккупирован только одной частицей, а вероятность перехода частицы из одного сайта в другой задается извне.



**Рис. 70.** Параметры модели TASEP, которые применялись при моделировании инициации трансляции при стрессе

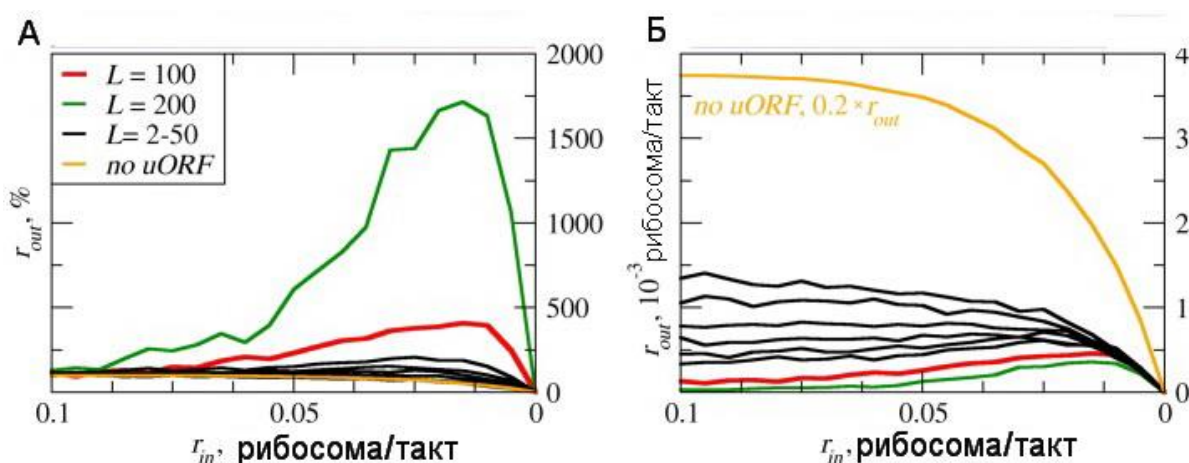
Рассмотрим модель более подробно. Каждый сайт на одномерной решетке представляет собой кодон. Все сайты имеют одинаковые свойства, кроме двух сайтов, которые представляют собой старт и стоп кодон uORF. Есть два типа частиц – сканирующие рибосомы ( $\sigma$ ) и элонгирующие рибосомы ( $\epsilon$ ). Каждая частица занимает 10 кодонов. Каждая частица может

двигаться вперед на один кодон, если он не занят, с вероятностью  $m_\sigma$  и  $m_\varepsilon$ . Кроме того, сканирующие рибосомы могут превратиться в элонгирующие рибосомы с вероятностью  $t_{\sigma>\varepsilon}$ , которая может варьировать от 0 (нет инициации на старте uORF) до 1 (все рибосомы иницируют на старте uORF). На стоп кодоне, элонгирующие рибосомы могут превратиться в сканирующие рибосомы с вероятностью  $t_{\varepsilon>\sigma}$  (реинициация), остальные рибосомы исчезают с мРНК с вероятностью  $1-t_{\varepsilon>\sigma}$  (терминация трансляции)

При этом, сканирующие рибосомы диссоциируют при столкновении с элонгирующими рибосомами. Используя данный подход, мы изучали, как частота сканирующих рибосом, достигающих конца одномерной решетки ( $r_{out}$ ) зависит от частоты посадки сканирующих рибосом на 5'конец мРНК ( $r_{in}$ ).  $r_{in}$  соответствует частоте посадки 43S PIC на 5'конец мРНК, и зависит от доступности тройного комплекса eIF2\*тРНКи\*ГТФ (ТК). При стрессе, приводящем к фосфорилированию eIF2, количество ТК снижается, соответственно – уровень стресса можно моделировать снижением  $r_{in}$ .  $r_{out}$  соответствует частоте “прибытия” сканирующих рибосом на стартовый кодон основной рамки считывания, то есть – эффективности трансляции основной рамки считывания. Другими словами, мы смотрели, может ли снижение  $r_{in}$  привести к повышению  $r_{out}$ , и, если может, то какие параметры системы на это влияют.

Для того, чтобы применить моделирование, необходимо задать несколько параметров таким образом, чтобы они имели смысл исходя из наших знаний о кинетике трансляции. Для первичного моделирования, эффективность узнавания стартового кодона uORF была задана как  $t_{\sigma>\varepsilon}=0.8$  (80% сканирующих рибосом узнают стартовый кодон uORF и начинают транслировать, 20% продолжают сканирование). Скорость элонгации была задана как вероятность  $m_\sigma=0.3$  (рибосома передвинется в течение одного такта с вероятностью 0,3). Оценка скорости элонгации *in vivo*, сделанная с

помощью рибосомного профайлинга, дает приблизительную оценку скорости элонгации как 5 триплетов в секунду [232], соответственно один такт в симуляции равен 0,06 секунд ( $0.3/5$ ). Скорость сканирования по литературным примерам примерно равна скорости элонгации [249, 250]. Соответственно, мы задали скорость сканирования как  $m_e=0.3$ . Наконец, необходимо оценить возможный диапазон  $r_{in}$ . Было показано, что у дрожжей рибосомы связываются с мРНК примерно раз за 0.8 секунды [251], что соответствует 0.075 в такт в нашей модели. Исходя от этой оценки, мы изменяли  $r_{in}$  от 0.1 (нормальные условия, много ТК) до 0 (стрессовые условия, ТК нет, соответственно нет инициации).



**Рис. 71.** Зависимость  $r_{out}$  и  $r_{in}$  от длины uORF. А) относительная, Б)– абсолютная зависимость

В данных условиях, снижение  $r_{in}$  на мРНК без uORF приводит, как и ожидается, к монотонному снижению  $r_{out}$  (рис. 71 Б, желтая линия). Введение короткой uORF приводит к снижению  $r_{out}$ , и дальнейшее увеличение длины uORF приводит к пропорциональному снижению  $r_{out}$ . Это происходит за счет повышения вероятности столкновения сканирующих и элонгирующих рибосом. Однако, что достигнута определенной длины uORF (порядка 20-30 триплетов) функция зависимости  $r_{out}$  от  $r_{in}$  перестает вести себя монотонно:  $r_{out}$  начинает

увеличиваться при снижении  $r_{in}$  в определенном интервале. Это именно то, что мы надеялись увидеть: при снижении уровня посадки рибосом на мРНК при стрессе (снижение  $r_{in}$ ), происходит увеличение трансляции со старта основного кодона основной рамки (увеличение  $r_{out}$ ) (рис. 71 А, нормированные значения). Интересно, что чем длиннее uORF, тем больше относительная стимуляция трансляции при стрессе (рис. 71 А, нормированные значения). Однако, чем длиннее uORF, тем хуже в принципе идет трансляция (рис. 71 Б, красная и зеленая линия, соответствующая наиболее длинным uORF). Другими словами, чем длиннее uORF, тем больше повышение трансляции при стрессе (рис. 71 А, максимальные нормированные значения  $r_{out}$ ), и тем меньше трансляция в нормальных условиях (рис. 71 Б, абсолютные значения  $r_{out}$  при  $r_{in}=0.1$ ). Интересен тот факт, что в данных нашего рибосомного профайлинга мы как раз наблюдали именно такую картину – устойчивые к стрессу мРНК имеют очень низкую трансляционную эффективность в нормальных условиях без стресса.

Мы также исследовали взаимосвязь таких параметров, как соотношение скоростей сканирующих и элонгирующих рибосом, эффективность узнавания стартового кодона uORF, вероятность реинициации, и относительные размеры частиц сканирующих и элонгирующих рибосом с помощью моделирования. Не вдаваясь в детали, результаты моделирования позволяют сделать следующие предположения: а) медленная элонгация на uORF приводит к большей стимуляции трансляции при стрессе б) снижение “силы” uAUG снижает стимуляцию трансляции при стрессе в) реинициация снижает стимуляцию трансляции при стрессе. Эти результаты моделирования требуют дальнейшего экспериментального подтверждения.

Подводя итог, в данном разделе работы показано, что небольшое количество клеточных мРНК способно эффективно транслироваться при

фосфорилировании eIF2 в клетках, и все эти мРНК имеют короткие рамки считывания в 5'НТО. С помощью экспериментов с репортерными мРНК показано, что наличие одной относительно длинной uORF и нуклеотидной последовательности перед uORF, способствующей эффективной посадке 43S на мРНК, может быть достаточно для избирательной трансляции мРНК при стрессе. Для объяснения механизма устойчивости, предложена модель регуляции трансляции за счет столкновений сканирующих и элонгирующих рибосом. В то же время, устойчивые к фосфорилированию eIF2 мРНК неустойчивы к ингибиторам mTOR. Согласно нашей модели, мы можем предложить следующее объяснение этому факту. Для сборки 43S на 5'конце мРНК необходимо рекрутирование 43S с помощью eIF4F. При инактивации mTOR, репрессор 4E-BP связывает eIF4E и разрушает взаимодействие eIF4E с eIF4G. При этом, часть мРНК теряют eIF4G и перестают транслироваться вообще, те же мРНК, на которых остался eIF4F, продолжают сканироваться также, как и в нормальных условиях (в терминах нашей модели, не происходит изменение  $\tau_{in}$ ). Соответственно, для оставшихся активных мРНК с eIF4F, uORF ингибируют трансляцию таким же образом, как и в нормальных условиях

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные результаты данной работы связаны с изучением внутренней инициации на некоторых мРНК вирусов, с разработкой новой модели кеп-независимой инициации трансляции на основе кеп-независимых энхансеров трансляции, и с изучением роли инициации на стартовых кодонах в 5'НТО мРНК млекопитающих.

Первая часть работы посвящена изучению трансляции на IRES элементах I и II группы. Актуальность работы связана не только с фундаментальными аспектами инициации трансляции, но также и с тем

фактом, что многие патогенные вирусы животных и человека используют данные IRES элементы для трансляции вирусных белков. Понимание молекулярных механизмов функционирования IRES элементов пикорнавирусов может иметь прикладное значение для разработки противовирусных лекарственных препаратов. Разработка лекарственных препаратов, действующих на IRES элементы, вполне реальна – например, были разработаны низкомолекулярные ингибиторы, которые связываются с доменом II HCV и ингибируют IRES зависимую трансляцию [252-255]. В связи с этим, стоит упомянуть обнаруженный нами новый транс-действующий фактор, который необходим для трансляции многих, если не всех, IRES элементов I группы – глицил тРНК синтетазу. Вполне вероятно, что ингибитор, способный разрушать взаимодействие GARS-IRES, не ингибируя аминокислотилирующую активность GARS, будет работать как универсальный ингибитор вирусной трансляции.

Анализ консервативности антикодоновой петли в домене V различных пикорнавирусов позволяет предположить, что только эта тРНК синтетаза, и никакие другие тРНК синтетазы, работает на данных IRES элементах. Почему это так? Почему вирусы приспособились использовать только эту тРНК синтетазу для регуляции трансляции? Ответ на этот вопрос очень сложно получить, однако следует обратить внимание на тот факт, что GARS в клетке обладает уникальными функциями, не связанными с аминокислотилированием (Такие альтернативные функции в литературе получили название moonlighting functions).

О том, что GARS обладает альтернативными функциями, исследователи стали догадываться довольно давно – дело в том, что мутации в GARS приводят к синдрому Charcot-Marie-Tooth (CMT) – одному из самых распространенных нейродегенеративных заболеваний у человека [256-258]. При этом часть мутаций, связанных с CMT, никак не сказывается на аминокислотилирующей активности GARS. Изучение GARS и

взаимосвязи этого фермента с заболеваниями привело к открытию нескольких удивительных функций белка внутри и вне клетки. Например, GARS регулирует путь, отвечающий за посттрансляционную модификацию недиллирование. Так, GARS взаимодействует с многими компонентами пути недиллирования, включая NEDD8, E1, and E2 (Ubc12), и регулирует их активность [259]. Кроме того, GARS имеет и внеклеточные функции: недавно было показано, что GARS может секретироваться из макрофагов в ответ на активацию FAS лигандом. Затем, GARS связывается с рецептором CDH6, и за счет этого подавляет активность киназы ERK [260]. Также, связывание GARS с CDH6 на поверхности мезенхимальных стволовых клеток активирует сигнальные пути, связанные пролиферацией, миграцией и дифференцировкой [261]. Считается, что мутации в GARS, связанные с синдромом CMT, по всей видимости изменяют внеклеточную функцию тРНК синтазы: некоторые мутантные формы GARS, обнаруживаемые при заболевании CMT, получают способность связываться с рецептором neuropilin 1, и при этом конкурируют за связывание с фактором роста эпителия сосудов (VEGF) [262].

Мы предполагаем, что связывание GARS с IRES элементами I типа приводит к конформационным изменениям в РНК, способствующим рекрутированию факторов инициации и рибосомы для эффективной инициации трансляции. В то же время, учитывая описанные неканонические функции GARS, нельзя исключить и тот факт, что, секвестрируя GARS за счет взаимодействия со своей мРНК, вирусы получают дополнительные преимущества, блокируя какую-то неканоническую функцию белка внутри или вне клетки, таким образом подавляя иммунный ответ хозяина на инфекцию. Продолжение этого проекта обещает быть плодотворным и сулит новые открытия.

Вторая часть работы посвящена разработке новой теории энхансеров кеп-независимой трансляции. Мы считаем, что эта теория должна

кардинально изменить представления о механизмах инициации трансляции у эукариот. Необходимо еще раз вкратце рассказать о том, что сподвигло нас выдвинуть данную теорию, и в чем недостаток предыдущей теории внутренней инициации на клеточных мРНК.

С начала 80х годов сформировалось понимание того, как происходит инициация трансляции у эукариот. Благодаря пионерским работам М. Козак была предложена так называемая теория кеп-зависимого сканирования, подробно описанная в обзоре литературы. Однако, через некоторое время была открыта внутренняя инициация трансляции на мРНК вирусов, реплицирующихся в цитоплазме. С самого начала было очевидно, что эти вирусы не могут использовать механизм сканирования – просто потому, что у них нет m<sup>7</sup>G кепы на 5'конце. Выяснилось, что вирусы используют так называемые сайты внутренней инициации трансляции – IRES элементы. Эти IRES элементы могут работать без многих ключевых факторов инициации, что активно используется вирусами при инфекции для подавления трансляции клеточных мРНК и переключении трансляционного аппарата на синтез вирусных белков. Например, полиовирус разрезает субъединицу eIF4G ключевого фактора инициации eIF4F, который оказывается более не способен поддерживать трансляцию кепированных мРНК, но способен работать на IRES элементе. Открытие вирусных IRES элементов неизбежно повлекло за собой поиск IRES элементов в клеточных мРНК. Действительно, ведь было известно, что многие стрессовые условия приводят к инактивации инициаторных факторов и к подавлению глобальной трансляции. Но ведь в этих условиях должны продолжать транслироваться мРНК, кодирующие важные регуляторные белки (которые, например, участвуют в устранении повреждений в клетке или, наоборот, в инициации апоптоза). 5'НТО многих таких мРНК очень длинные, и в них можно смоделировать развитую вторичную структуру, напоминающую таковую у вирусных IRES

элементов. Как сканирующая рибосома может преодолеть такую длинную НТО и найти стартовый кодон? Так почему бы таким мРНК не транслироваться по пути внутренней инициации, обходя классический путь кеп зависимой инициации?

И действительно, вскоре после открытия внутренней инициации, были предложены первые клеточные IRESы. При этом использовался следующий подход – метод ДНК-бицистронных конструкций. Между двумя цистронами помещался предполагаемый IRES, соответствующая плазмидная ДНК трансфецировалась в клетки, и, если наблюдалась трансляция второго цистрона, то считалось, что это действительно IRES. В результате, IRES элементы в клеточных мРНК стали открываться как грибы после дождя. Вот только некоторые из IRES элементов, обнаруженные в ключевых регуляторах клеточного цикла, дифференциации, апоптоза, и ответа на стресс: *P53* [263-265], *c-Myc* [219, 220, 266, 267], *HIF1-α* [268, 269], *VEGF* [270-273], *APAF1* [218, 223, 274], *XIAP* [275-277], и многие другие мРНК. На данный момент список клеточных IRES элементов насчитывает сотни мРНК [278].

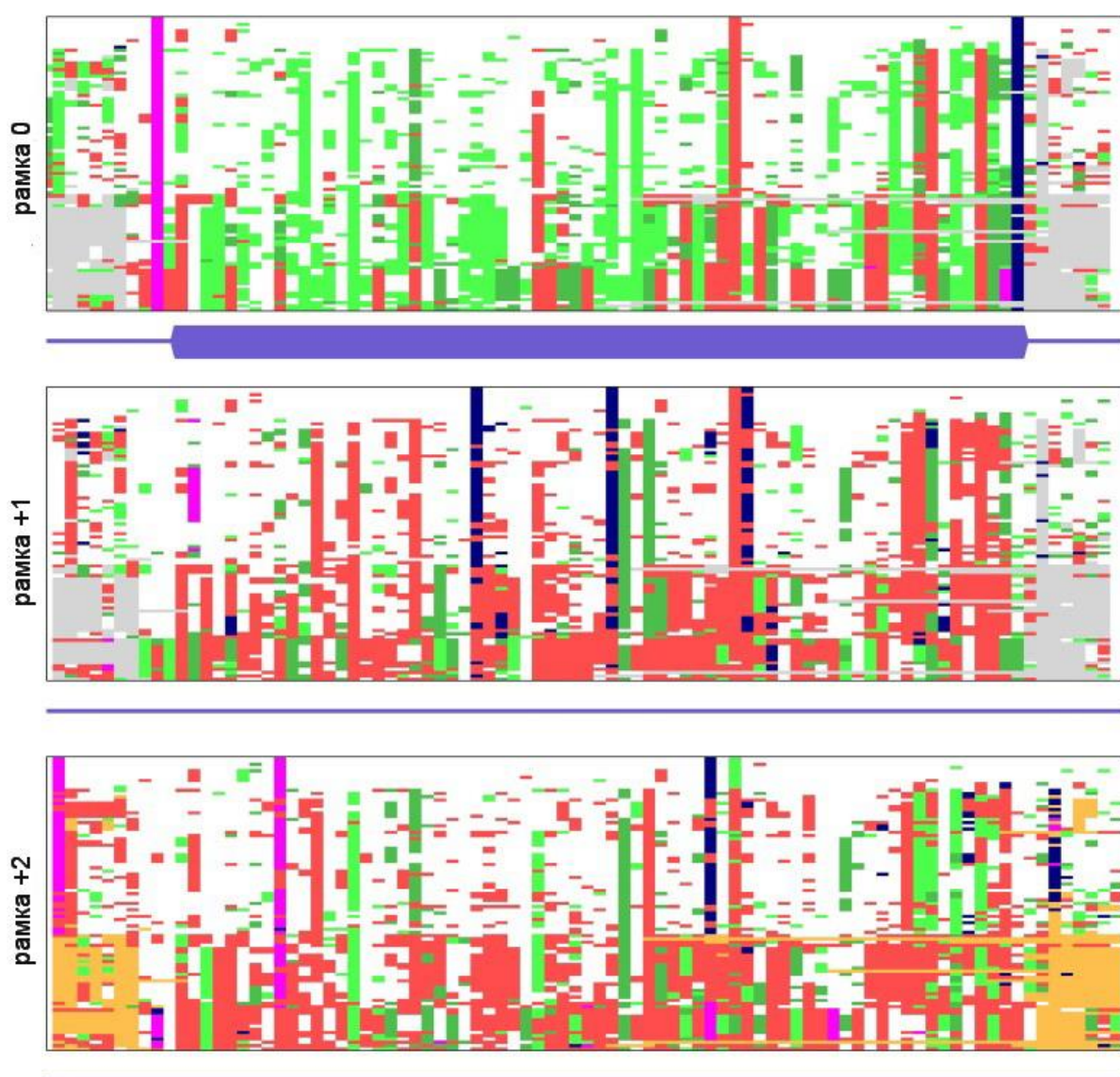
Однако, со временем начало появляться все больше сомнений в том, что клеточные IRES элементы хоть в чем-то похожи на вирусные IRES элементы. Если для инактивации вирусных IRESов порой достаточно внесения точечной мутации, то ничего подобного не наблюдалось для клеточных IRESов. Ни для одного клеточного IRES элемента, не был установлен механизм его работы – не найдены сайты связывания ключевых факторов инициации, не определены требования к факторам инициации и транс-действующим белкам, не реконструированы инициаторные комплексы из очищенных компонентов. Ряд работ, в том числе и из нашей лаборатории, породил сомнения о самом существовании клеточных IRES элементов. Так, стало понятно, что метод бицистронных конструкций сам по себе приводит к появлению огромного количества

артефактов, особенно если использовать ДНК трансфекцию. Оказалось, что если использовать трансфекцию мРНК, более современный и надежный метод, то многие клеточные IRESы обладают фоновой активностью, другими словами – не способны промотировать внутреннюю инициацию трансляции.

В то же время остается вопрос, как мРНК могут избирательно транслироваться в стрессовых условиях, когда не хватает инициаторных факторов? Проведя ряд исследований, а также проанализировав литературные данные, мы пришли к выводу, что у многих клеточных мРНК может реализовываться третий механизм трансляции – кеп-независимое сканирование, направляемое энхансерами кеп-независимой инициации CITE (подробно цепь рассуждений описана в разделе результатов). Принципиальное отличие от механизма внутренней инициации заключается в следующем – CITE связывают инициаторные факторы, но не приводят к внутренней инициации, а промотируют посадку 43S PIC на 5'конец мРНК, после чего происходит сканирование, как при классической кеп-зависимой инициации трансляции. Результатом наших исследований является финальная теория, опубликованная в престижном журнале Trends in Biochemical Sciences. Мы рассчитываем, что наша теория изменит представление о механизмах кеп-независимой инициации.

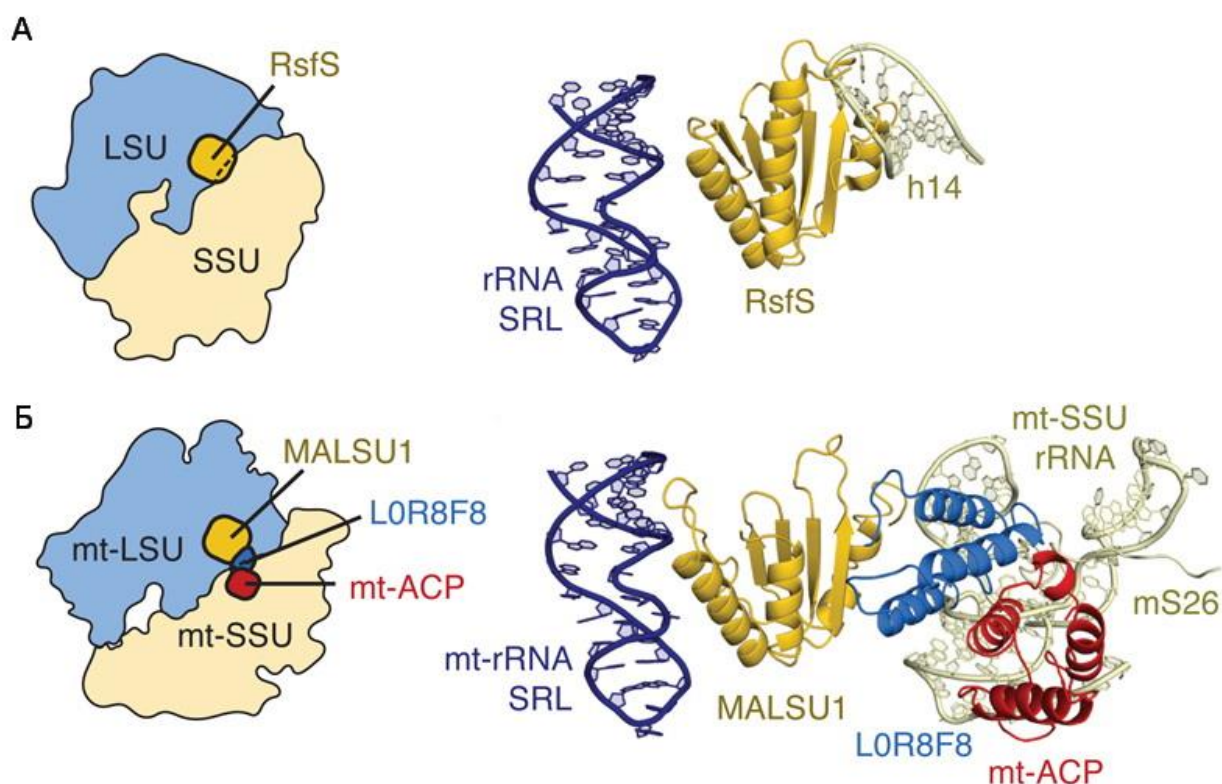
Третья часть работы посвящена изучению альтернативных сайтов инициации трансляции в 5'НТО мРНК млекопитающих. Используя рибосомный профайлинг – революционный метод, позволяющий “видеть” трансляцию всех мРНК в клетке с разрешением в один нуклеотид, мы изучили трансляционный ответ на окислительный стресс и на удаление кислорода и глюкозы. Оказалось, что множество мРНК регулируются на трансляционном уровне за счет трансляции с альтернативных сайтов инициации трансляции (необязательно AUG кодонов). Системы регуляторных uORF, или даже единичные uORF в 5'НТО, способны

обеспечивать эффективную трансляцию мРНК при недостатке eIF2, но количество таких мРНК мало. В результате, мы предложили модель, по которой трансляция мРНК с uORF при стрессе регулируется за счет столкновений сканирующих и элонгирующих рибосом. Большая часть мРНК с uORF не работает при подавлении eIF2 – это говорит об огромном разнообразии функций uORF, способных реагировать на большой набор различных воздействий. uORF – это самые сложные и самые распространенные регуляторы экспрессии мРНК у млекопитающих, и их дальнейшее изучение принесет множество открытий.



**Рис. 72.** Анализ консервативности последовательности uORF в мРНК MIEF1 в трех рамках считывания [279]. Зеленым цветом обозначены синонимичные замены, красным – несинонимичные замены, темно синим – стоп кодоны.

Важно отметить, что uORF могут иметь не только регуляторные функции: появляется все больше доказательств того, что небольшие пептиды, закодированные в uORF, обладают функцией в клетке. В качестве примера приведем мРНК *MIEF1*, которая кодирует белок, регулирующий деление митохондрий [280, 281]. мРНК *MIEF1* имеет консервативную uORF. В нашей работе [279], анализируя эту uORF, мы предсказали, что пептид uORF может иметь собственную функцию (рис. 72). Через два года, для продукта uORF была найдена функция – оказалось, что этот белок принимает участие в созревании митохондриальной рибосомы (рис. 73) [282].



**Рис. 73.** Структурная модель пре-рибосомных субчастиц митохондрии. Продукт трансляции uORF *MIEF1* обозначен как LOR8F8 [282].

Интересно отметить, что оба полипептида, закодированные в *MIEF1*, имеют прямое отношение к биогенезу митохондрий [282, 283].

Этот, а также ряд других похожих случаев, показывает то, что необходимо забыть догму о том, что одна мРНК у эукариот кодирует один белок. Без понимания кодирующего потенциала всех мРНК человека, мы не можем в полной мере использовать генетическую информацию.

## ВЫВОДЫ

Исследованы факторы, влияющие на выбор стартового кодона мРНК FMDV. Показано, что инициация трансляции на двух стартовых кодонах в мРНК FMDV по-разному зависит от eIF1. Инициация трансляции, направляемая IRES элементом FMDV, протекает значительно медленнее инициации на кеп-зависимой мРНК

Открыт новый белок, регулирующий IRES элементы I типа. Глицил-тРНК синтетаза связывается с IRES элементом полиовируса и стимулирует инициацию трансляции. Связывание происходит за счет наличия в IRES консервативного структурного элемента, мимикрирующего под глициловую тРНК

Предложена теория энхансеров кеп-независимой трансляции в 5'НТО мРНК млекопитающих. Трансляция, направляемая 5'НТО клеточных мРНК, по-разному зависит от наличия кеп. 5'НТО мРНК с низкой кеп-зависимостью, тем не менее, не способны промотировать внутреннюю инициацию. На основании полученных данных предложена теория о кеп-независимых энхансерах трансляции, которые способны стимулировать кеп-независимое сканирование.

Исследована инициация трансляции на не-AUG кодонах в 5'НТО. Инициация трансляции на не-AUG кодонах протекает гораздо реже, и менее эффективно, чем предполагалось ранее при анализе данных рибосомного профайлинга. Тем не менее, определенные 5'НТО способны довольно эффективно промотировать инициацию трансляции с не-AUG кодонов. Так, 5'НТО мРНК опухолевого супрессора PTEN содержит AUU кодон, с которого синтезируется удлиненная с N-конца протеоформа.

Изучен трансляционный ответ на ранних этапах стресса удаления кислорода и глюкозы. При стрессе удаления кислорода и глюкозы (OGD) уже через 20 минут после начала стресса наблюдаются значительные изменения на трансляционном уровне, при этом активируется трансляция с неоптимальных кодонов, расположенных в 5'НТО.

Показана определяющая роль uORF в регуляции трансляции при фосфорилировании eIF2. При фосфорилировании фактора инициации трансляции eIF2 происходит глобальное подавление белкового синтеза, однако трансляция около 10 мРНК не подавляется, или даже стимулируется. Все эти мРНК имеют регуляторные uORF. В ряде случаев, единственной uORF в 5'НТО достаточно для устойчивости трансляции к стрессу.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Erickson, F.L. and E.M. Hannig, Ligand interactions with eukaryotic translation initiation factor 2: role of the gamma-subunit. *EMBO J*, 1996. 15(22): p. 6311-20.
2. Kapp, L.D. and J.R. Lorsch, GTP-dependent recognition of the methionine moiety on initiator tRNA by translation factor eIF2. *J Mol Biol*, 2004. 335(4): p. 923-36.
3. Hinnebusch, A.G., The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annu Rev Biochem*, 2014. 83: p. 779-812.
4. Feoktistova, K., et al., Human eIF4E promotes mRNA restructuring by stimulating eIF4A helicase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(33): p. 13339-44.
5. LeFebvre, A.K., et al., Translation initiation factor eIF4G-1 binds to eIF3 through the eIF3e subunit. *J Biol Chem*, 2006. 281(32): p. 22917-32.
6. Asano, K., et al., Multiple roles for the C-terminal domain of eIF5 in translation initiation complex assembly and GTPase activation. *EMBO J*, 2001. 20(9): p. 2326-37.
7. Nanda, J.S., et al., Coordinated movements of eukaryotic translation initiation factors eIF1, eIF1A, and eIF5 trigger phosphate release from eIF2 in response to start codon recognition by the ribosomal preinitiation complex. *J Biol Chem*, 2013. 288(8): p. 5316-29.
8. Methot, N., M.S. Song, and N. Sonenberg, A region rich in aspartic acid, arginine, tyrosine, and glycine (DRYG) mediates eukaryotic initiation factor 4B

(eIF4B) self-association and interaction with eIF3. *Mol Cell Biol*, 1996. 16(10): p. 5328-34.

9. Methot, N., et al., In vitro RNA selection identifies RNA ligands that specifically bind to eukaryotic translation initiation factor 4B: the role of the RNA motif. *RNA*, 1996. 2(1): p. 38-50.

10. Siridechadilok, B., et al., Structural roles for human translation factor eIF3 in initiation of protein synthesis. *Science*, 2005. 310(5753): p. 1513-5.

11. Marintchev, A., et al., Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation. *Cell*, 2009. 136(3): p. 447-60.

12. Pisareva, V.P., et al., Translation initiation on mammalian mRNAs with structured 5'UTRs requires DExH-box protein DHX29. *Cell*, 2008. 135(7): p. 1237-50.

13. Lai, M.C., Y.H. Lee, and W.Y. Tarn, The DEAD-box RNA helicase DDX3 associates with export messenger ribonucleoproteins as well as tip-associated protein and participates in translational control. *Mol Biol Cell*, 2008. 19(9): p. 3847-58.

14. Weisser, M., et al., The crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with eIF1 and eIF1A. *Nat Struct Mol Biol*, 2013. 20(8): p. 1015-7.

15. Aylett, C.H. and N. Ban, Eukaryotic aspects of translation initiation brought into focus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2017. 372(1716).

16. Acker, M.G., et al., Interaction between eukaryotic initiation factors 1A and 5B is required for efficient ribosomal subunit joining. *J Biol Chem*, 2006. 281(13): p. 8469-75.

17. Marintchev, A., et al., Mapping the binding interface between human eukaryotic initiation factors 1A and 5B: a new interaction between old partners. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(4): p. 1535-40.
18. Acker, M.G., et al., Kinetic analysis of late steps of eukaryotic translation initiation. *J Mol Biol*, 2009. 385(2): p. 491-506.
19. Soto-Rifo, R., et al., DEAD-box protein DDX3 associates with eIF4F to promote translation of selected mRNAs. *EMBO J*, 2012. 31(18): p. 3745-56.
20. Pestova, T.V. and V.G. Kolupaeva, The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev*, 2002. 16(22): p. 2906-22.
21. Elfakess, R., et al., Unique translation initiation of mRNAs-containing TISU element. *Nucleic Acids Res*, 2011. 39(17): p. 7598-609.
22. Haimov, O., H. Sinvani, and R. Dikstein, Cap-dependent, scanning-free translation initiation mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 2015. 1849(11): p. 1313-8.
23. Hentze, M.W., et al., Identification of the iron-responsive element for the translational regulation of human ferritin mRNA. *Science*, 1987. 238(4833): p. 1570-3.
24. Aziz, N. and H.N. Munro, Iron regulates ferritin mRNA translation through a segment of its 5' untranslated region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. 84(23): p. 8478-82.
25. Muckenthaler, M., N.K. Gray, and M.W. Hentze, IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F. *Mol Cell*, 1998. 2(3): p. 383-8.
26. Muckenthaler, M.U., B. Galy, and M.W. Hentze, Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annu Rev Nutr*, 2008. 28: p. 197-213.

27. Meyuhas, O. and T. Kahan, The race to decipher the top secrets of TOP mRNAs. *Biochim Biophys Acta*, 2015. 1849(7): p. 801-11.
28. Haghighat, A., et al., Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *EMBO J*, 1995. 14(22): p. 5701-9.
29. Beretta, L., et al., Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *EMBO J*, 1996. 15(3): p. 658-64.
30. Tahmasebi, S., et al., Translation deregulation in human disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018. 19(12): p. 791-807.
31. Thoreen, C.C., et al., A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature*, 2012. 485(7396): p. 109-13.
32. Patursky-Polischuk, I., et al., The TSC-mTOR pathway mediates translational activation of TOP mRNAs by insulin largely in a raptor- or rictor-independent manner. *Mol Cell Biol*, 2009. 29(3): p. 640-9.
33. Cardinali, B., et al., La protein is associated with terminal oligopyrimidine mRNAs in actively translating polysomes. *J Biol Chem*, 2003. 278(37): p. 35145-51.
34. Crosio, C., et al., La protein has a positive effect on the translation of TOP mRNAs in vivo. *Nucleic Acids Res*, 2000. 28(15): p. 2927-34.
35. Zhu, J., et al., Binding of the La autoantigen to the 5' untranslated region of a chimeric human translation elongation factor 1A reporter mRNA inhibits translation in vitro. *Biochim Biophys Acta*, 2001. 1521(1-3): p. 19-29.
36. Markert, A., et al., The La-related protein LARP7 is a component of the 7SK ribonucleoprotein and affects transcription of cellular and viral polymerase II genes. *EMBO Rep*, 2008. 9(6): p. 569-75.

37. Pellizzoni, L., et al., Cellular nucleic acid binding protein binds a conserved region of the 5' UTR of *Xenopus laevis* ribosomal protein mRNAs. *J Mol Biol*, 1997. 267(2): p. 264-75.
38. Damgaard, C.K. and J. Lykke-Andersen, Translational coregulation of 5'TOP mRNAs by TIA-1 and TIAR. *Genes Dev*, 2011. 25(19): p. 2057-68.
39. Tcherkezian, J., et al., Proteomic analysis of cap-dependent translation identifies LARP1 as a key regulator of 5'TOP mRNA translation. *Genes Dev*, 2014. 28(4): p. 357-71.
40. Hong, S., et al., LARP1 functions as a molecular switch for mTORC1-mediated translation of an essential class of mRNAs. *Elife*, 2017. 6.
41. Hsu, P.P., et al., The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science*, 2011. 332(6035): p. 1317-22.
42. Kang, S.A., et al., mTORC1 phosphorylation sites encode their sensitivity to starvation and rapamycin. *Science*, 2013. 341(6144): p. 1236566.
43. Wu, J. and J. Bag, Negative control of the poly(A)-binding protein mRNA translation is mediated by the adenine-rich region of its 5'-untranslated region. *J Biol Chem*, 1998. 273(51): p. 34535-42.
44. Tamarkin-Ben-Harush, A., et al., Cap-proximal nucleotides via differential eIF4E binding and alternative promoter usage mediate translational response to energy stress. *Elife*, 2017. 6.
45. Lee, A.S., P.J. Kranzusch, and J.H. Cate, eIF3 targets cell-proliferation messenger RNAs for translational activation or repression. *Nature*, 2015. 522(7554): p. 111-4.
46. Lee, A.S., et al., eIF3d is an mRNA cap-binding protein that is required for specialized translation initiation. *Nature*, 2016. 536(7614): p. 96-9.

47. Kumar, P., C.U. Hellen, and T.V. Pestova, Toward the mechanism of eIF4F-mediated ribosomal attachment to mammalian capped mRNAs. *Genes Dev*, 2016. 30(13): p. 1573-88.
48. Hentze, M.W. and T. Preiss, The REM phase of gene regulation. *Trends Biochem Sci*, 2010. 35(8): p. 423-6.
49. Nagy, E. and W.F. Rigby, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase selectively binds AU-rich RNA in the NAD(+)-binding region (Rossmann fold). *J Biol Chem*, 1995. 270(6): p. 2755-63.
50. Preiss, T., A.G. Hall, and R.N. Lightowlers, Identification of bovine glutamate dehydrogenase as an RNA-binding protein. *J Biol Chem*, 1993. 268(33): p. 24523-6.
51. Chu, E., et al., Autoregulation of human thymidylate synthase messenger RNA translation by thymidylate synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(20): p. 8977-81.
52. Chu, E., et al., Specific binding of human dihydrofolate reductase protein to dihydrofolate reductase messenger RNA in vitro. *Biochemistry*, 1993. 32(18): p. 4756-60.
53. Kozak, M., Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 1986. 44(2): p. 283-92.
54. Kozak, M., At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol*, 1987. 196(4): p. 947-50.
55. Kozak, M., An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res*, 1987. 15(20): p. 8125-48.
56. Noderer, W.L., et al., Quantitative analysis of mammalian translation initiation sites by FACS-seq. *Mol Syst Biol*, 2014. 10: p. 748.

57. Diaz de Arce, A.J., W.L. Noderer, and C.L. Wang, Complete motif analysis of sequence requirements for translation initiation at non-AUG start codons. *Nucleic Acids Res*, 2018. 46(2): p. 985-994.
58. Kozak, M., Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. 87(21): p. 8301-5.
59. Ivanov, I.P., et al., Polyamine Control of Translation Elongation Regulates Start Site Selection on Antizyme Inhibitor mRNA via Ribosome Queuing. *Mol Cell*, 2018. 70(2): p. 254-264 e6.
60. Ivanov, I.P., et al., Initiation context modulates autoregulation of eukaryotic translation initiation factor 1 (eIF1). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(42): p. 18056-60.
61. Churbanov, A., et al., Evolutionary conservation suggests a regulatory function of AUG triplets in 5'-UTRs of eukaryotic genes. *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(17): p. 5512-20.
62. Somers, J., T. Poyry, and A.E. Willis, A perspective on mammalian upstream open reading frame function. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013. 45(8): p. 1690-700.
63. Barbosa, C., I. Peixeiro, and L. Romao, Gene expression regulation by upstream open reading frames and human disease. *PLoS Genet*, 2013. 9(8): p. e1003529.
64. Wethmar, K., The regulatory potential of upstream open reading frames in eukaryotic gene expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2014. 5(6): p. 765-78.
65. Alonso-Fernandez, F., [Diagnosis of alcoholism. A challenge for physicians]. *Rev Clin Esp*, 1986. 179(1): p. 1-2.
66. Hellen, C.U.T., Translation Termination and Ribosome Recycling in Eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018. 10(10).

67. Luttermann, C. and G. Meyers, The importance of inter- and intramolecular base pairing for translation reinitiation on a eukaryotic bicistronic mRNA. *Genes Dev*, 2009. 23(3): p. 331-44.
68. Sonenberg, N. and A.G. Hinnebusch, Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, 2009. 136(4): p. 731-45.
69. Baird, T.D. and R.C. Wek, Eukaryotic initiation factor 2 phosphorylation and translational control in metabolism. *Adv Nutr*, 2012. 3(3): p. 307-21.
70. Thireos, G., M.D. Penn, and H. Greer, 5' untranslated sequences are required for the translational control of a yeast regulatory gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. 81(16): p. 5096-100.
71. Hinnebusch, A.G., Evidence for translational regulation of the activator of general amino acid control in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. 81(20): p. 6442-6.
72. Hinnebusch, A.G., Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol*, 2005. 59: p. 407-50.
73. Harding, H.P., et al., Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell*, 2000. 6(5): p. 1099-108.
74. Vattem, K.M. and R.C. Wek, Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(31): p. 11269-74.
75. Palam, L.R., T.D. Baird, and R.C. Wek, Phosphorylation of eIF2 facilitates ribosomal bypass of an inhibitory upstream ORF to enhance CHOP translation. *J Biol Chem*, 2011. 286(13): p. 10939-49.
76. Matoulikova, E., et al., The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *RNA Biol*, 2012. 9(5): p. 563-76.

77. Berkovits, B.D. and C. Mayr, Alternative 3' UTRs act as scaffolds to regulate membrane protein localization. *Nature*, 2015. 522(7556): p. 363-7.
78. Chen, C.Y. and A.B. Shyu, AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci*, 1995. 20(11): p. 465-70.
79. Gingerich, T.J., J.J. Feige, and J. LaMarre, AU-rich elements and the control of gene expression through regulated mRNA stability. *Anim Health Res Rev*, 2004. 5(1): p. 49-63.
80. Barreau, C., L. Paillard, and H.B. Osborne, AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(22): p. 7138-50.
81. White, E.J., A.E. Matsangos, and G.M. Wilson, AUF1 regulation of coding and noncoding RNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2017. 8(2).
82. Briata, P., et al., Functional and molecular insights into KSRP function in mRNA decay. *Biochim Biophys Acta*, 2013. 1829(6-7): p. 689-94.
83. Grammatikakis, I., K. Abdelmohsen, and M. Gorospe, Posttranslational control of HuR function. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2017. 8(1).
84. Castella, S., et al., Ilf3 and NF90 functions in RNA biology. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2015. 6(2): p. 243-56.
85. Forch, P. and J. Valcarcel, Molecular mechanisms of gene expression regulation by the apoptosis-promoting protein TIA-1. *Apoptosis*, 2001. 6(6): p. 463-8.
86. Waris, S., M.C. Wilce, and J.A. Wilce, RNA recognition and stress granule formation by TIA proteins. *Int J Mol Sci*, 2014. 15(12): p. 23377-88.

87. Vlasova, I.A. and P.R. Bohjanen, Posttranscriptional regulation of gene networks by GU-rich elements and CELF proteins. *RNA Biol*, 2008. 5(4): p. 201-7.
88. Vlasova-St Louis, I. and P.R. Bohjanen, Coordinate regulation of mRNA decay networks by GU-rich elements and CELF1. *Curr Opin Genet Dev*, 2011. 21(4): p. 444-51.
89. Arif, A., et al., The GAIT translational control system. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2018. 9(2).
90. Kapasi, P., et al., L13a blocks 48S assembly: role of a general initiation factor in mRNA-specific translational control. *Mol Cell*, 2007. 25(1): p. 113-26.
91. Kelley, R.L., et al., Expression of msl-2 causes assembly of dosage compensation regulators on the X chromosomes and female lethality in *Drosophila*. *Cell*, 1995. 81(6): p. 867-77.
92. Yao, P. and P.L. Fox, Sex lethal and upstream ORFs: a bait-and-trap system for ribosomes. *Genome Biol*, 2011. 12(7): p. 121.
93. Duncan, K., et al., Sex-lethal imparts a sex-specific function to UNR by recruiting it to the msl-2 mRNA 3' UTR: translational repression for dosage compensation. *Genes Dev*, 2006. 20(3): p. 368-79.
94. Abaza, I., et al., *Drosophila* UNR is required for translational repression of male-specific lethal 2 mRNA during regulation of X-chromosome dosage compensation. *Genes Dev*, 2006. 20(3): p. 380-9.
95. Abaza, I. and F. Gebauer, Functional domains of *Drosophila* UNR in translational control. *RNA*, 2008. 14(3): p. 482-90.
96. Hennig, J., et al., Structural basis for the assembly of the Sxl-Unr translation regulatory complex. *Nature*, 2014. 515(7526): p. 287-90.

97. Duncan, K.E., C. Strein, and M.W. Hentze, The SXL-UNR corepressor complex uses a PABP-mediated mechanism to inhibit ribosome recruitment to msl-2 mRNA. *Mol Cell*, 2009. 36(4): p. 571-82.
98. Medenbach, J., M. Seiler, and M.W. Hentze, Translational control via protein-regulated upstream open reading frames. *Cell*, 2011. 145(6): p. 902-13.
99. Cho, P.F., et al., A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. *Cell*, 2005. 121(3): p. 411-23.
100. Sonoda, J. and R.P. Wharton, *Drosophila* Brain Tumor is a translational repressor. *Genes Dev*, 2001. 15(6): p. 762-73.
101. Stebbins-Boaz, B., et al., Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with eIF-4E. *Mol Cell*, 1999. 4(6): p. 1017-27.
102. Cao, Q. and J.D. Richter, Dissolution of the maskin-eIF4E complex by cytoplasmic polyadenylation and poly(A)-binding protein controls cyclin B1 mRNA translation and oocyte maturation. *EMBO J*, 2002. 21(14): p. 3852-62.
103. Cao, Q., J.H. Kim, and J.D. Richter, CDK1 and calcineurin regulate Maskin association with eIF4E and translational control of cell cycle progression. *Nat Struct Mol Biol*, 2006. 13(12): p. 1128-34.
104. Kang, M.K. and S.J. Han, Post-transcriptional and post-translational regulation during mouse oocyte maturation. *BMB Rep*, 2011. 44(3): p. 147-57.
105. Hernandez, G., et al., Mextli is a novel eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein that promotes translation in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*, 2013. 33(15): p. 2854-64.
106. Peter, D., et al., Mextli proteins use both canonical bipartite and novel tripartite binding modes to form eIF4E complexes that display differential sensitivity to 4E-BP regulation. *Genes Dev*, 2015. 29(17): p. 1835-49.

107. Cakmakci, N.G., et al., SLIP1, a factor required for activation of histone mRNA translation by the stem-loop binding protein. *Mol Cell Biol*, 2008. 28(3): p. 1182-94.
108. Neusiedler, J., et al., INT6 interacts with MIF4GD/SLIP1 and is necessary for efficient histone mRNA translation. *RNA*, 2012. 18(6): p. 1163-77.
109. Imataka, H., H.S. Olsen, and N. Sonenberg, A new translational regulator with homology to eukaryotic translation initiation factor 4G. *EMBO J*, 1997. 16(4): p. 817-25.
110. Levy-Strumpf, N., et al., DAP-5, a novel homolog of eukaryotic translation initiation factor 4G isolated as a putative modulator of gamma interferon-induced programmed cell death. *Mol Cell Biol*, 1997. 17(3): p. 1615-25.
111. Bukhari, S.I.A., et al., A Specialized Mechanism of Translation Mediated by FXR1a-Associated MicroRNP in Cellular Quiescence. *Mol Cell*, 2016. 61(5): p. 760-773.
112. Mortensen, R.D., et al., Posttranscriptional activation of gene expression in *Xenopus laevis* oocytes by microRNA-protein complexes (microRNPs). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(20): p. 8281-6.
113. Vasudevan, S., Y. Tong, and J.A. Steitz, Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 2007. 318(5858): p. 1931-4.
114. Bukhari, S.I. and S. Vasudevan, FXR1a-associated microRNP: A driver of specialized non-canonical translation in quiescent conditions. *RNA Biol*, 2017. 14(2): p. 137-145.
115. Nousch, M., et al., The eIF4G-homolog p97 can activate translation independent of caspase cleavage. *RNA*, 2007. 13(3): p. 374-84.

116. Marash, L., et al., DAP5 promotes cap-independent translation of Bcl-2 and CDK1 to facilitate cell survival during mitosis. *Mol Cell*, 2008. 30(4): p. 447-59.
117. Yamanaka, S., et al., Essential role of NAT1/p97/DAP5 in embryonic differentiation and the retinoic acid pathway. *EMBO J*, 2000. 19(20): p. 5533-41.
118. Sugiyama, H., et al., Nat1 promotes translation of specific proteins that induce differentiation of mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017. 114(2): p. 340-345.
119. Yoffe, Y., et al., Cap-independent translation by DAP5 controls cell fate decisions in human embryonic stem cells. *Genes Dev*, 2016. 30(17): p. 1991-2004.
120. de la Parra, C., et al., A widespread alternate form of cap-dependent mRNA translation initiation. *Nat Commun*, 2018. 9(1): p. 3068.
121. Truniger, V., M. Miras, and M.A. Aranda, Structural and Functional Diversity of Plant Virus 3'-Cap-Independent Translation Enhancers (3'-CITEs). *Front Plant Sci*, 2017. 8: p. 2047.
122. Treder, K., et al., The 3' cap-independent translation element of Barley yellow dwarf virus binds eIF4F via the eIF4G subunit to initiate translation. *RNA*, 2008. 14(1): p. 134-47.
123. Kraft, J.J., et al., Cation-dependent folding of 3' cap-independent translation elements facilitates interaction of a 17-nucleotide conserved sequence with eIF4G. *Nucleic Acids Res*, 2013. 41(5): p. 3398-413.
124. Yuan, X., et al., The terminal loop of a 3' proximal hairpin plays a critical role in replication and the structure of the 3' region of Turnip crinkle virus. *Virology*, 2010. 402(2): p. 271-80.

125. Sharma, S.D., et al., Recruitment of the 40S ribosome subunit to the 3'-untranslated region (UTR) of a viral mRNA, via the eIF4 complex, facilitates cap-independent translation. *J Biol Chem*, 2015. 290(18): p. 11268-81.
126. Batten, J.S., et al., A translational enhancer element on the 3'-proximal end of the Panicum mosaic virus genome. *FEBS Lett*, 2006. 580(11): p. 2591-7.
127. Wang, Z., K. Treder, and W.A. Miller, Structure of a viral cap-independent translation element that functions via high affinity binding to the eIF4E subunit of eIF4F. *J Biol Chem*, 2009. 284(21): p. 14189-202.
128. Wang, Z., et al., The cap-binding translation initiation factor, eIF4E, binds a pseudoknot in a viral cap-independent translation element. *Structure*, 2011. 19(6): p. 868-80.
129. McCormack, J.C., et al., Structural domains within the 3' untranslated region of Turnip crinkle virus. *J Virol*, 2008. 82(17): p. 8706-20.
130. Simon, A.E. and W.A. Miller, 3' cap-independent translation enhancers of plant viruses. *Annu Rev Microbiol*, 2013. 67: p. 21-42.
131. Stupina, V.A., et al., The 3' proximal translational enhancer of Turnip crinkle virus binds to 60S ribosomal subunits. *RNA*, 2008. 14(11): p. 2379-93.
132. Machnicka, M.A., et al., MODOMICS: a database of RNA modification pathways--2013 update. *Nucleic Acids Res*, 2013. 41(Database issue): p. D262-7.
133. Desrosiers, R., K. Friderici, and F. Rottman, Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1974. 71(10): p. 3971-5.
134. Zhao, B.S., I.A. Roundtree, and C. He, Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017. 18(1): p. 31-42.

135. Dominissini, D., et al., Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature*, 2012. 485(7397): p. 201-6.
136. Luo, G.Z., et al., Unique features of the m6A methylome in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Commun*, 2014. 5: p. 5630.
137. Zhou, J., et al., Dynamic m(6)A mRNA methylation directs translational control of heat shock response. *Nature*, 2015. 526(7574): p. 591-4.
138. Heilman, K.L., R.A. Leach, and M.T. Tuck, Internal 6-methyladenine residues increase the in vitro translation efficiency of dihydrofolate reductase messenger RNA. *Int J Biochem Cell Biol*, 1996. 28(7): p. 823-9.
139. Tuck, M.T., P.E. Wiehl, and T. Pan, Inhibition of 6-methyladenine formation decreases the translation efficiency of dihydrofolate reductase transcripts. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999. 31(8): p. 837-51.
140. Wang, X., et al., N(6)-methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency. *Cell*, 2015. 161(6): p. 1388-99.
141. Meyer, K.D., et al., 5' UTR m(6)A Promotes Cap-Independent Translation. *Cell*, 2015. 163(4): p. 999-1010.
142. Pelletier, J. and N. Sonenberg, Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*, 1988. 334(6180): p. 320-5.
143. Trono, D., et al., Translation in mammalian cells of a gene linked to the poliovirus 5' noncoding region. *Science*, 1988. 241(4864): p. 445-8.
144. Jang, S.K., et al., A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol*, 1988. 62(8): p. 2636-43.
145. Mailliot, J. and F. Martin, Viral internal ribosomal entry sites: four classes for one goal. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2018. 9(2).

146. Andino, R., G.E. Rieckhof, and D. Baltimore, A functional ribonucleoprotein complex forms around the 5' end of poliovirus RNA. *Cell*, 1990. 63(2): p. 369-80.
147. Andino, R., et al., Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNP complex formed around the 5'-end of viral RNA. *EMBO J*, 1993. 12(9): p. 3587-98.
148. Haller, A.A., J.H. Nguyen, and B.L. Semler, Minimum internal ribosome entry site required for poliovirus infectivity. *J Virol*, 1993. 67(12): p. 7461-71.
149. Dildine, S.L. and B.L. Semler, The deletion of 41 proximal nucleotides reverts a poliovirus mutant containing a temperature-sensitive lesion in the 5' noncoding region of genomic RNA. *J Virol*, 1989. 63(2): p. 847-62.
150. Kaminski, A., et al., Mechanism of initiation site selection promoted by the human rhinovirus 2 internal ribosome entry site. *J Virol*, 2010. 84(13): p. 6578-89.
151. Gradi, A., et al., Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(19): p. 11089-94.
152. Sweeney, T.R., et al., The mechanism of translation initiation on Type 1 picornavirus IRESs. *EMBO J*, 2014. 33(1): p. 76-92.
153. Meerovitch, K., et al., La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *J Virol*, 1993. 67(7): p. 3798-807.
154. Borman, A., et al., The involvement of a spliceosome component in internal initiation of human rhinovirus RNA translation. *J Gen Virol*, 1993. 74 (Pt 9): p. 1775-88.
155. Hellen, C.U., et al., A cytoplasmic 57-kDa protein that is required for translation of picornavirus RNA by internal ribosomal entry is identical to the

- nuclear pyrimidine tract-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(16): p. 7642-6.
156. Choi, K., et al., Identification of cellular proteins enhancing activities of internal ribosomal entry sites by competition with oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res*, 2004. 32(4): p. 1308-17.
157. Bedard, K.M., S. Daijogo, and B.L. Semler, A nucleo-cytoplasmic SR protein functions in viral IRES-mediated translation initiation. *EMBO J*, 2007. 26(2): p. 459-67.
158. Hunt, S.L., et al., unr, a cellular cytoplasmic RNA-binding protein with five cold-shock domains, is required for internal initiation of translation of human rhinovirus RNA. *Genes Dev*, 1999. 13(4): p. 437-48.
159. Anderson, E.C., S.L. Hunt, and R.J. Jackson, Internal initiation of translation from the human rhinovirus-2 internal ribosome entry site requires the binding of Unr to two distinct sites on the 5' untranslated region. *J Gen Virol*, 2007. 88(Pt 11): p. 3043-52.
160. Borovjagin, A., T. Pestova, and I. Shatsky, Pyrimidine tract binding protein strongly stimulates in vitro encephalomyocarditis virus RNA translation at the level of preinitiation complex formation. *FEBS Lett*, 1994. 351(3): p. 299-302.
161. Jang, S.K. and E. Wimmer, Cap-independent translation of encephalomyocarditis virus RNA: structural elements of the internal ribosomal entry site and involvement of a cellular 57-kD RNA-binding protein. *Genes Dev*, 1990. 4(9): p. 1560-72.
162. Luz, N. and E. Beck, Interaction of a cellular 57-kilodalton protein with the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 1991. 65(12): p. 6486-94.

163. Martinez-Salas, E., M.P. Regalado, and E. Domingo, Identification of an essential region for internal initiation of translation in the aphthovirus internal ribosome entry site and implications for viral evolution. *J Virol*, 1996. 70(2): p. 992-8.
164. Lopez de Quinto, S. and E. Martinez-Salas, Interaction of the eIF4G initiation factor with the aphthovirus IRES is essential for internal translation initiation in vivo. *RNA*, 2000. 6(10): p. 1380-92.
165. Kolupaeva, V.G., et al., Translation eukaryotic initiation factor 4G recognizes a specific structural element within the internal ribosome entry site of encephalomyocarditis virus RNA. *J Biol Chem*, 1998. 273(29): p. 18599-604.
166. Lomakin, I.B., C.U. Hellen, and T.V. Pestova, Physical association of eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) with eIF4A strongly enhances binding of eIF4G to the internal ribosomal entry site of encephalomyocarditis virus and is required for internal initiation of translation. *Mol Cell Biol*, 2000. 20(16): p. 6019-29.
167. Kafasla, P., et al., Polypyrimidine tract binding protein stabilizes the encephalomyocarditis virus IRES structure via binding multiple sites in a unique orientation. *Mol Cell*, 2009. 34(5): p. 556-68.
168. Pilipenko, E.V., et al., A cell cycle-dependent protein serves as a template-specific translation initiation factor. *Genes Dev*, 2000. 14(16): p. 2028-45.
169. Pestova, T.V., et al., A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev*, 1998. 12(1): p. 67-83.

170. Sizova, D.V., et al., Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs. *J Virol*, 1998. 72(6): p. 4775-82.
171. Jopling, C.L., et al., Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*, 2005. 309(5740): p. 1577-81.
172. Henke, J.I., et al., microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J*, 2008. 27(24): p. 3300-10.
173. Sedano, C.D. and P. Sarnow, Hepatitis C virus subverts liver-specific miR-122 to protect the viral genome from exoribonuclease Xrn2. *Cell Host Microbe*, 2014. 16(2): p. 257-264.
174. Hashem, Y., et al., Hepatitis-C-virus-like internal ribosome entry sites displace eIF3 to gain access to the 40S subunit. *Nature*, 2013. 503(7477): p. 539-43.
175. Terenin, I.M., et al., Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2. *Nat Struct Mol Biol*, 2008. 15(8): p. 836-41.
176. Pestova, T.V., et al., eIF2-dependent and eIF2-independent modes of initiation on the CSFV IRES: a common role of domain II. *EMBO J*, 2008. 27(7): p. 1060-72.
177. Dmitriev, S.E., et al., GTP-independent tRNA delivery to the ribosomal P-site by a novel eukaryotic translation factor. *J Biol Chem*, 2010. 285(35): p. 26779-87.
178. Otto, G.A. and J.D. Puglisi, The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell*, 2004. 119(3): p. 369-80.
179. Quade, N., et al., Cryo-EM structure of Hepatitis C virus IRES bound to the human ribosome at 3.9-A resolution. *Nat Commun*, 2015. 6: p. 7646.

180. Jan, E. and P. Sarnow, Factorless ribosome assembly on the internal ribosome entry site of cricket paralysis virus. *J Mol Biol*, 2002. 324(5): p. 889-902.
181. Jang, C.J., M.C. Lo, and E. Jan, Conserved element of the dicistrovirus IGR IRES that mimics an E-site tRNA/ribosome interaction mediates multiple functions. *J Mol Biol*, 2009. 387(1): p. 42-58.
182. Au, H.H., et al., Global shape mimicry of tRNA within a viral internal ribosome entry site mediates translational reading frame selection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. 112(47): p. E6446-55.
183. Wilson, J.E., et al., Initiation of protein synthesis from the A site of the ribosome. *Cell*, 2000. 102(4): p. 511-20.
184. Fernandez, I.S., et al., Initiation of translation by cricket paralysis virus IRES requires its translocation in the ribosome. *Cell*, 2014. 157(4): p. 823-31.
185. Ali, I.K., et al., Activity of the hepatitis A virus IRES requires association between the cap-binding translation initiation factor (eIF4E) and eIF4G. *J Virol*, 2001. 75(17): p. 7854-63.
186. Borman, A.M., Y.M. Michel, and K.M. Kean, Detailed analysis of the requirements of hepatitis A virus internal ribosome entry segment for the eukaryotic initiation factor complex eIF4F. *J Virol*, 2001. 75(17): p. 7864-71.
187. Avanzino, B.C., G. Fuchs, and C.S. Fraser, Cellular cap-binding protein, eIF4E, promotes picornavirus genome restructuring and translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017. 114(36): p. 9611-9616.
188. Macejak, D.G. and P. Sarnow, Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature*, 1991. 353(6339): p. 90-4.
189. Ingolia, N.T., et al., Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science*, 2009. 324(5924): p. 218-23.

190. Ingolia, N.T., Ribosome profiling: new views of translation, from single codons to genome scale. *Nat Rev Genet*, 2014. 15(3): p. 205-13.
191. Brar, G.A. and J.S. Weissman, Ribosome profiling reveals the what, when, where and how of protein synthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015. 16(11): p. 651-64.
192. Merrick, W.C., Purification of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *Methods Enzymol*, 1979. 60: p. 101-8.
193. Pestova, T.V., S.I. Borukhov, and C.U. Hellen, Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature*, 1998. 394(6696): p. 854-9.
194. Pestova, T.V., C.U. Hellen, and I.N. Shatsky, Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry. *Mol Cell Biol*, 1996. 16(12): p. 6859-69.
195. Lopez de Quinto, S. and E. Martinez-Salas, Involvement of the aphthovirus RNA region located between the two functional AUGs in start codon selection. *Virology*, 1999. 255(2): p. 324-36.
196. Dmitriev, S.E., et al., Conversion of 48S translation preinitiation complexes into 80S initiation complexes as revealed by toeprinting. *FEBS Lett*, 2003. 533(1-3): p. 99-104.
197. Pedersen, K., et al., The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell*, 2003. 112(1): p. 131-40.
198. Leonhardt, C., et al., Single-cell mRNA transfection studies: delivery, kinetics and statistics by numbers. *Nanomedicine*, 2014. 10(4): p. 679-88.
199. Wilke, M., et al., Efficacy of a peptide-based gene delivery system depends on mitotic activity. *Gene Ther*, 1996. 3(12): p. 1133-42.

200. Mortimer, I., et al., Cationic lipid-mediated transfection of cells in culture requires mitotic activity. *Gene Ther*, 1999. 6(3): p. 403-11.
201. James, M.B. and T.D. Giorgio, Nuclear-associated plasmid, but not cell-associated plasmid, is correlated with transgene expression in cultured mammalian cells. *Mol Ther*, 2000. 1(4): p. 339-46.
202. Akita, H., et al., Cell cycle dependent transcription, a determinant factor of heterogeneity in cationic lipid-mediated transgene expression. *J Gene Med*, 2007. 9(3): p. 197-207.
203. Thirunavukkarasu, K., et al., Cryptic enhancer elements in luciferase reporter vectors respond to the osteoblast-specific transcription factor *Osf2/Cbfa1*. *Biotechniques*, 2000. 28(3): p. 506-10.
204. Jiang, H.Y., et al., Phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF-kappaB in response to diverse cellular stresses. *Mol Cell Biol*, 2003. 23(16): p. 5651-63.
205. Dai, R.Y., et al., Implication of transcriptional repression in compound C-induced apoptosis in cancer cells. *Cell Death Dis*, 2013. 4: p. e883.
206. Vopalensky, V., et al., Firefly luciferase gene contains a cryptic promoter. *RNA*, 2008. 14(9): p. 1720-9.
207. Lemp, N.A., et al., Cryptic transcripts from a ubiquitous plasmid origin of replication confound tests for cis-regulatory function. *Nucleic Acids Res*, 2012. 40(15): p. 7280-90.
208. Chauhan, S.S., P. Seth, and R. Katara, Expression of cloned cDNAs in mammalian cells from a cryptic promoter upstream to T7 in pGEM-4Z cloning vector. *Mol Cell Biochem*, 2009. 322(1-2): p. 119-25.
209. Nejepinska, J., et al., Deep sequencing reveals complex spurious transcription from transiently transfected plasmids. *PLoS One*, 2012. 7(8): p. e43283.

210. Garcia, M.A., E.F. Meurs, and M. Esteban, The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie*, 2007. 89(6-7): p. 799-811.
211. Sadler, A.J. and B.R. Williams, Structure and function of the protein kinase R. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2007. 316: p. 253-92.
212. Van Eden, M.E., et al., Demonstrating internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNAs using stringent RNA test procedures. *RNA*, 2004. 10(4): p. 720-30.
213. Kozak, M., A second look at cellular mRNA sequences said to function as internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(20): p. 6593-602.
214. Kozak, M., Rethinking some mechanisms invoked to explain translational regulation in eukaryotes. *Gene*, 2006. 382: p. 1-11.
215. Gendra, E., et al., A sequence motif in the simian virus 40 (SV40) early core promoter affects alternative splicing of transcribed mRNA. *J Biol Chem*, 2007. 282(16): p. 11648-57.
216. Belancio, V.P., Importance of RNA analysis in interpretation of reporter gene expression data. *Anal Biochem*, 2011. 417(1): p. 159-61.
217. Malone, R.W., P.L. Felgner, and I.M. Verma, Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. 86(16): p. 6077-81.
218. Coldwell, M.J., et al., Initiation of Apaf-1 translation by internal ribosome entry. *Oncogene*, 2000. 19(7): p. 899-905.
219. Stoneley, M., et al., C-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene*, 1998. 16(3): p. 423-8.
220. Nanbru, C., et al., Alternative translation of the proto-oncogene c-myc by an internal ribosome entry site. *J Biol Chem*, 1997. 272(51): p. 32061-6.
221. Rubtsova, M.P., et al., Distinctive properties of the 5'-untranslated region of human hsp70 mRNA. *J Biol Chem*, 2003. 278(25): p. 22350-6.

222. Dehlin, E., et al., Cap-dependent deadenylation of mRNA. *EMBO J*, 2000. 19(5): p. 1079-86.
223. Mitchell, S.A., et al., The Apaf-1 internal ribosome entry segment attains the correct structural conformation for function via interactions with PTB and unr. *Mol Cell*, 2003. 11(3): p. 757-71.
224. Morley, S.J., M.J. Coldwell, and M.J. Clemens, Initiation factor modifications in the preapoptotic phase. *Cell Death Differ*, 2005. 12(6): p. 571-84.
225. Dreher, T.W. and W.A. Miller, Translational control in positive strand RNA plant viruses. *Virology*, 2006. 344(1): p. 185-97.
226. Kneller, E.L., A.M. Rakotondrafara, and W.A. Miller, Cap-independent translation of plant viral RNAs. *Virus Res*, 2006. 119(1): p. 63-75.
227. Miller, W.A., Z. Wang, and K. Treder, The amazing diversity of cap-independent translation elements in the 3'-untranslated regions of plant viral RNAs. *Biochem Soc Trans*, 2007. 35(Pt 6): p. 1629-33.
228. Gazo, B.M., et al., A novel interaction of Cap-binding protein complexes eukaryotic initiation factor (eIF) 4F and eIF(iso)4F with a region in the 3'-untranslated region of satellite tobacco necrosis virus. *J Biol Chem*, 2004. 279(14): p. 13584-92.
229. Wang, S., K.S. Browning, and W.A. Miller, A viral sequence in the 3'-untranslated region mimics a 5' cap in facilitating translation of uncapped mRNA. *EMBO J*, 1997. 16(13): p. 4107-16.
230. Meulewaeter, F., M. Van Montagu, and M. Cornelissen, Features of the autonomous function of the translational enhancer domain of satellite tobacco necrosis virus. *RNA*, 1998. 4(11): p. 1347-56.

231. Shen, R. and W.A. Miller, The 3' untranslated region of tobacco necrosis virus RNA contains a barley yellow dwarf virus-like cap-independent translation element. *J Virol*, 2004. 78(9): p. 4655-64.
232. Ingolia, N.T., L.F. Lareau, and J.S. Weissman, Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell*, 2011. 147(4): p. 789-802.
233. Lee, S., et al., Global mapping of translation initiation sites in mammalian cells at single-nucleotide resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(37): p. E2424-32.
234. Fritsch, C., et al., Genome-wide search for novel human uORFs and N-terminal protein extensions using ribosomal footprinting. *Genome Res*, 2012. 22(11): p. 2208-18.
235. Arnaud, E., et al., A new 34-kilodalton isoform of human fibroblast growth factor 2 is cap dependently synthesized by using a non-AUG start codon and behaves as a survival factor. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(1): p. 505-14.
236. Tee, M.K. and R.B. Jaffe, A precursor form of vascular endothelial growth factor arises by initiation from an upstream in-frame CUG codon. *Biochem J*, 2001. 359(Pt 1): p. 219-26.
237. Packham, G., M. Brimmell, and J.L. Cleveland, Mammalian cells express two differently localized Bag-1 isoforms generated by alternative translation initiation. *Biochem J*, 1997. 328 ( Pt 3): p. 807-13.
238. Hann, S.R., et al., A non-AUG translational initiation in c-myc exon 1 generates an N-terminally distinct protein whose synthesis is disrupted in Burkitt's lymphomas. *Cell*, 1988. 52(2): p. 185-95.
239. Hopkins, B.D., et al., A secreted PTEN phosphatase that enters cells to alter signaling and survival. *Science*, 2013. 341(6144): p. 399-402.

240. Sinvani, H., et al., Translational tolerance of mitochondrial genes to metabolic energy stress involves TISU and eIF1-eIF4GI cooperation in start codon selection. *Cell Metab*, 2015. 21(3): p. 479-92.
241. Pavitt, G.D., Regulation of translation initiation factor eIF2B at the hub of the integrated stress response. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2018. 9(6): p. e1491.
242. Ryoo, H.D. and D. Vasudevan, Two distinct nodes of translational inhibition in the Integrated Stress Response. *BMB Rep*, 2017. 50(11): p. 539-545.
243. Pakos-Zebrucka, K., et al., The integrated stress response. *EMBO Rep*, 2016. 17(10): p. 1374-1395.
244. Donnelly, N., et al., The eIF2alpha kinases: their structures and functions. *Cell Mol Life Sci*, 2013. 70(19): p. 3493-511.
245. Wek, R.C., eIF-2 kinases: regulators of general and gene-specific translation initiation. *Trends Biochem Sci*, 1994. 19(11): p. 491-6.
246. Wek, R.C., Role of eIF2alpha Kinases in Translational Control and Adaptation to Cellular Stress. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018. 10(7).
247. Brush, M.H., D.C. Weiser, and S. Shenolikar, Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol*, 2003. 23(4): p. 1292-303.
248. Archer, S.K., et al., Dynamics of ribosome scanning and recycling revealed by translation complex profiling. *Nature*, 2016. 535(7613): p. 570-4.
249. Vassilenko, K.S., et al., Unidirectional constant rate motion of the ribosomal scanning particle during eukaryotic translation initiation. *Nucleic Acids Res*, 2011. 39(13): p. 5555-67.

250. Berthelot, K., et al., Dynamics and processivity of 40S ribosome scanning on mRNA in yeast. *Mol Microbiol*, 2004. 51(4): p. 987-1001.
251. Chu, D., et al., Translation elongation can control translation initiation on eukaryotic mRNAs. *EMBO J*, 2014. 33(1): p. 21-34.
252. Dibrov, S.M., et al., Structure of a hepatitis C virus RNA domain in complex with a translation inhibitor reveals a binding mode reminiscent of riboswitches. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(14): p. 5223-8.
253. Paulsen, R.B., et al., Inhibitor-induced structural change in the HCV IRES domain IIa RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(16): p. 7263-8.
254. Ding, K., et al., Aryl-substituted aminobenzimidazoles targeting the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014. 24(14): p. 3113-7.
255. Dibrov, S.M. and T. Hermann, Structure of the HCV Internal Ribosome Entry Site Subdomain IIa RNA in Complex with a Viral Translation Inhibitor. *Methods Mol Biol*, 2016. 1320: p. 329-35.
256. Boczonadi, V., M.J. Jennings, and R. Horvath, The role of tRNA synthetases in neurological and neuromuscular disorders. *FEBS Lett*, 2018. 592(5): p. 703-717.
257. Drew, A.P., I.P. Blair, and G.A. Nicholson, Molecular genetics and mechanisms of disease in distal hereditary motor neuropathies: insights directing future genetic studies. *Curr Mol Med*, 2011. 11(8): p. 650-65.
258. Wei, N., Q. Zhang, and X.L. Yang, Neurodegenerative Charcot-Marie-Tooth disease as a case study to decipher novel functions of aminoacyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem*, 2019.
259. Mo, Z., et al., Neddylation requires glycyl-tRNA synthetase to protect activated E2. *Nat Struct Mol Biol*, 2016. 23(8): p. 730-7.

260. Park, M.C., et al., Secreted human glycyl-tRNA synthetase implicated in defense against ERK-activated tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(11): p. E640-7.
261. Park, S.R., et al., A novel endogenous damage signal, glycyl tRNA synthetase, activates multiple beneficial functions of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ*, 2018. 25(11): p. 2023-2036.
262. He, W., et al., CMT2D neuropathy is linked to the neomorphic binding activity of glycyl-tRNA synthetase. *Nature*, 2015. 526(7575): p. 710-4.
263. Ray, P.S., R. Grover, and S. Das, Two internal ribosome entry sites mediate the translation of p53 isoforms. *EMBO Rep*, 2006. 7(4): p. 404-10.
264. Yang, D.Q., M.J. Halaby, and Y. Zhang, The identification of an internal ribosomal entry site in the 5'-untranslated region of p53 mRNA provides a novel mechanism for the regulation of its translation following DNA damage. *Oncogene*, 2006. 25(33): p. 4613-9.
265. Grover, R., et al., p53 and little brother p53/47: linking IRES activities with protein functions. *Oncogene*, 2009. 28(30): p. 2766-72.
266. Carter, P.S., M. Jarquin-Pardo, and A. De Benedetti, Differential expression of Myc1 and Myc2 isoforms in cells transformed by eIF4E: evidence for internal ribosome repositioning in the human c-myc 5'UTR. *Oncogene*, 1999. 18(30): p. 4326-35.
267. Stoneley, M., et al., Analysis of the c-myc IRES; a potential role for cell-type specific trans-acting factors and the nuclear compartment. *Nucleic Acids Res*, 2000. 28(3): p. 687-94.
268. Lang, K.J., A. Kappel, and G.J. Goodall, Hypoxia-inducible factor-1alpha mRNA contains an internal ribosome entry site that allows efficient translation during normoxia and hypoxia. *Mol Biol Cell*, 2002. 13(5): p. 1792-801.

269. Schepens, B., et al., The polypyrimidine tract-binding protein stimulates HIF-1 $\alpha$  IRES-mediated translation during hypoxia. *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(21): p. 6884-94.
270. Stein, I., et al., Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. *Mol Cell Biol*, 1998. 18(6): p. 3112-9.
271. Akiri, G., et al., Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. *Oncogene*, 1998. 17(2): p. 227-36.
272. Miller, D.L., et al., The vascular endothelial growth factor mRNA contains an internal ribosome entry site. *FEBS Lett*, 1998. 434(3): p. 417-20.
273. Huez, I., et al., Two independent internal ribosome entry sites are involved in translation initiation of vascular endothelial growth factor mRNA. *Mol Cell Biol*, 1998. 18(11): p. 6178-90.
274. Mitchell, S.A., et al., Protein factor requirements of the Apaf-1 internal ribosome entry segment: roles of polypyrimidine tract binding protein and upstream of N-ras. *Mol Cell Biol*, 2001. 21(10): p. 3364-74.
275. Holcik, M. and R.G. Korneluk, Functional characterization of the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) internal ribosome entry site element: role of La autoantigen in XIAP translation. *Mol Cell Biol*, 2000. 20(13): p. 4648-57.
276. Holcik, M., et al., Translational upregulation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) increases resistance to radiation induced cell death. *Oncogene*, 2000. 19(36): p. 4174-7.
277. Holcik, M., Translational upregulation of the X-linked inhibitor of apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*, 2003. 1010: p. 249-58.
278. Bonnal, S., et al., IRESdb: the Internal Ribosome Entry Site database. *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(1): p. 427-8.

279. Andreev, D.E., et al., Translation of 5' leaders is pervasive in genes resistant to eIF2 repression. *Elife*, 2015. 4: p. e03971.
280. Palmer, C.S., et al., MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep*, 2011. 12(6): p. 565-73.
281. Zhao, J., et al., Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission. *EMBO J*, 2011. 30(14): p. 2762-78.
282. Brown, A., et al., Structures of the human mitochondrial ribosome in native states of assembly. *Nat Struct Mol Biol*, 2017. 24(10): p. 866-869.
283. Delcourt, V., et al., The Protein Coded by a Short Open Reading Frame, Not by the Annotated Coding Sequence, Is the Main Gene Product of the Dual-Coding Gene MIEF1. *Mol Cell Proteomics*, 2018. 17(12): p. 2402-2411.

## БЛАГОДАРНОСТИ

В первую очередь я, конечно, благодарю Ивана Николаевича Шатского. С самой первой встречи его безудержный энтузиазм произвел на меня неизгладимое впечатление. И до сих пор продолжает производить! Я почти уверен в том, что без знакомства с Иваном Николаевичем я был бы совсем другим, навряд ли я бы увлекся наукой.

Долгие годы в нашей лаборатории царила удивительная творческая атмосфера, и за это я прежде всего благодарен Сергею Дмитриеву и Илье Теренину. Без их вклада не было бы многих работ. Как не было бы и многих других активностей, не связанных с работой – вспомнить хотя бы то самое путешествие на Камчатку.

Также я хотел бы поблагодарить своих зарубежных коллабораторов и друзей, в первую очередь – Павла Баранова. Поездки поработать в Ирландию очень многое изменили для меня. Большое спасибо и другим коллегам из Ирландии – Саше, Ане, Руслану, Патрику, Гарри, Мартине, Алине и Вале. Отдельное спасибо Михаэлю Нипману из Германии.

Отдельное спасибо моим родителям Валентине и Евгению, и моей сестре Ольге. Без их поддержки в трудные моменты я мог бы и не справиться.

Ну и конечно, спасибо жене Динаре и дочери Ренате. Спасибо за то, что продолжаете меня вдохновлять.