Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН

На правах рукописи

Шарифулин Дмитрий Евгеньевич

Пептиды рибосомных белков eS26, uS7 и uS3, участвующие в инициации трансляции у млекопитающих

02.00.10 – биоорганическая химия

Диссертация на соискание учёной степени кандидата химических наук

> Научный руководитель: д.х.н., доцент Д. М. Грайфер

Новосибирск – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ	5
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ИНИЦИАЦИИ	
ТРАНСЛЯЦИИ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	14
	и
ТРАНСТЯНИИ	r1 1Λ
1.2 ФАКТОРЫ ПРИНИМАЮШИЕ УЧАСТИЕ В ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ	15
1.2.1. Роль eIF1 и eIF1A	16
1.2.2. Роль eIF2	18
1.2.3. Роль eIF3	19
1.2.4. Роль eIF4	21
1.2.5. Роль eIF5	22
1.2.6. Роль eIF5B	22
1.3. НЕКАНОНИЧЕСКИЕ ПУТИ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ	24
1.3.1. Энхансер-зависимая инициация трансляции	24
1.3.2. IRES-зависимая инициация трансляции	30
1.3.2.1. Структура IRES-элементов геномных РНК вирусов	31
1.3.2.2. Особенности инициации трансляции мРНК, содержащих HCV-подобны	e
IRES-элементы	34
1.3.2.2.1. Рибосомные белки, контактирующие с HCV IRES	34
1.3.2.2.2. Роль 18S рРНК в механизме HCV IRES-зависимой инициации	
трансляции	36
1.3.2.2.3. Молекулярные механизмы взаимодействий, происходящих при	
образовании бинарного комплекса HCV IRES с 40S субчастицами	37
1.3.2.2.4. Факторы, участвующие в инициации трансляции мРНК, содержащих	
HCV- подобные IRES –элементы	39
1.3.2.2.5. Факторы инициации, участвующие в HCV IRES-зависимой инициаци	И
трансляции по eIF2-независимому пути	40
1.3.2.3. Механизм инициации трансляции РНК, содержащих CrPV-подобные	4.1
IRES-элементы	41
1.5.2.4. Механизм инициации трансляции РНК, содержащих РV-подооные	12
1.3.2.5 Мохонизм иниционни траналании DHV содоржаниих EMCV подобщие	43
1.5.2.5. Механизм инициации трансляции гтпс, содержащих ЕМС V-подооные IRES-элементы	16
1326 Механизм инициации транствиии РНК солержащих Aichi-полобные	
IRES-элементы	47
1.4. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КОМПЛЕКСОВ	
ОБРАЗУЮЩИХСЯ В ПРОЦЕССЕ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ	49
1.4.1. Участки связывания факторов инициации на 40S субчастице рибосомы	49
1.4.1.1. Участки связывания eIF1 и eIF1A	49
1.4.1.2. Участок связывания тройного комплекса eIF2•GTP•Met-тPHK _i	49
1.4.1.3. Участок связывания eIF3	50

1.4.1.4. Участки связывания eIF5B и eIF5	52
1.4.2. Конформационные перестройки рибосом, происходящие в процессе	
канонической инициации трансляции	54
1.4.2.1. Перестройки, происходящие на стадии образования 43S и 48S PIC	55
1.4.2.2. Перестройки, непосредственно вызванные узнаванием старт-кодона	
1.4.2.3. Перестройки, сопровождающие присоединение 60S субчастицы	61
1.4.3. Структурные особенности рибосомных комплексов, образующихся при	
IRES-зависимой инициации трансляции	62
Заключение	64
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	66
2.1. МАТЕРИАЛЫ	66
2.2. МЕТОЛИКИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ	68
2.2.1. Выделение рибосомных 40S и 60S субчастиц из плаценты человека.	68
2.2.2. Получение РНК. используемых в качестве молельных мРНК	70
2.2.3. Получение олигонуклеотидов и их производных, меченных по 5'-концу	71
2.2.4. Получение фотоактивируемого произволного олигонуклеотила	71
2.2.5. Получение реакционноспособных производных РНК, содержащих	
радиоактивную метку и диальдегидную группу на 3'-конце.	72
2.2.6. Получение комплексов рибосом с тРНК и мечеными аналогами мРНК в	
отсутствие факторов трансляции	73
2.2.7. Определение степени связывания меченых аналогов мРНК с рибосомами	73
2.2.8. Аффинная модификация 80S рибосом аналогами мРНК	74
2.2.9. Получение 48S PIC и 80S рибосомных комплексов с использованием	
реакционоспособных аналогов мРНК и ЛРК	75
2.2.10. Проверка функционального состояния рибосомных комплексов, полученных	x c
использованием ЛРК, с помощью тоу-принтинга	.76
2.2.11. Выделение суммарной РНК из комплексов рибосом, полученных с	
использованием ЛРК, и её постмечение	77
2.2.12. Получение белок-белковых сшивок, индуцированных формальдегидом	77
2.2.13. Анализ белков одномерным SDS-ПААГ по методу Лэммли	78
2.2.14. Идентификация белков иммуноблотингом с помощью специфичных	
антител	78
2.2.15. Приготовление рабочих растворов эндопептидаз	79
2.2.16. Подбор условий расщепления белков протеазами	80
2.2.17. Разделение фрагментов, полученных при расщеплении белков	
протеолитическими агентами	80
2.2.18. Расщепление модифицированных белков эндопротеиназами	80
2.2.19. Расщепление модифицированных белков по остаткам цистеина с помощью	
NTCB	81
2.2.20. Расщепление белков, вырезанных из полиакриламидного геля, трипсином	
для идентификации продуктов масс-спектрометрией	81
2.2.21. Обессоливание продуктов трипсинолиза белков и подготовка проб для масс	-
спектрометрического анализа	82
2.2.22. Масс-спектрометрический анализ продуктов трипсинолиза белков	82

2.2.23. Моделирование структуры рибосомных комплексов	83
бензоилцианида	83
ГЛАВА 3. РОЛЬ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ В ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ У	
МЛЕКОПИТАЮЩИХ (РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ)	85
3.1 ΡΕΞΥΠΑΤΑΙ	85
3.1.1 Определение фрагментов гр е\$26 соседствующих с мРНК на рибосоме	
человека	86
3.1.1.1. Аналоги мРНК, использованные для модификации гр eS26, и их сшивка	
с этим белком в составе рибосомных комплексов	86
3.1.1.2. Определение участка модификации гр eS26	88
3.1.2. Определение контактов гр uS7 с факторами инициации трансляции в	
составе 48S PIC млекопитающих с помощью метода сшивок	93
3.1.2.1. Сборка 48S PIC с использованием ЛРК и образование белок-белковых	
сшивок	93
3.1.2.2. Идентификация сшитых белков с помощью имунноблотинга и масс-	
спектрометрии	96
$3.1.2.3.$ Идентификация сшитых пептидов rp uS7 и eIF2 α	98
3.1.3. Определение участка rp uS3, ответственного за его взаимодействие с	100
короткими одноцепочечными РНК – производными олигориоонуклеотидов	100
3.1.3.1. Аналоги менк, использованные для модификации гр usb, и сшивка	100
3.1.4 Исследование конформационных перестроек в 40S субнастице	100
происхолящие с участием гр и \$3 и h16 188 рРНК при инициации транспяции	106
3.1.4.1. Определение степени экспонированности гр uS3 на различных стадиях	100
трансляции	106
3.1.4.2. Химический пробинг структуры 18S рРНК в районе участка входа мРНК	113
3.2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	116
3.2.1. Структурно-функциональная роль эукариот-специфичного фрагмента	
rp eS26 в процессе трансляции	116
3.2.2. Взаимодействие eIF2α с rp uS7 в 48S PIC	118
3.2.3. Взаимодействие одноцепечечных РНК с rp uS3 в участке входа в мРНК-	
связывающий канал.	121
3.2.4. Участок входа мРНК в рибосому и факторы инициации	122
3.2.4.1. Взаимодействие между uS3 и eIF3j	124
3.2.4.2. Перестроики в спирали n16 185 рРНК, вызванные связыванием eIF3J и	125
D11747	123
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	126
ВЫВОДЫ	129
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	130

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

- 40S и 60S малая и большая субчастицы эукариотической рибосомы
- 80S эукариотическая рибосома
- 80S EC 80S рибосома на стадии элонгации трансляции
- 80S IC 80S инициаторный комплекс

Å – ангстрем

- ArgC эндопротеиназа, расщепляющая после остатков Arg
- AspN эндопротеиназа, расщепляющая перед остатками Asp
- АТР, GTP и т.д. общепринятые обозначения 5'-трифосфатов нуклеозидов
- Az *n*-азидотетрафторбензоил
- BzCN бензоилцианид
- СІТЕ кэп-независимые трансляционные усилители
- CrPV вирус паралича сверчка
- DMSO диметилсульфоксид

DTT – дитиотреитол

- EDTА этилендиаминтетрауксусная кислота
- eIF эукариотический фактор инициации трансляции
- FMDV вирус ящура
- GDP гуанозин-5'-дифосфат
- GluC эндопротеиназа, расщепляющая после остатков Glu
- GMPPNP –гуанозин 5'-(β, γ)-метилен-трифосфат, негидролизуемый аналог GTP
- HCV вирус гепатита С
- HEPES N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота
- НТН домен "спираль-поворот-спираль"
- ITAF транс-активирующий фактор трансляции
- IRES участок внутренней посадки мРНК на рибосому
- КН-домен К-гомологичный РНК-связывающий домен
- MALDI TOF времяпролетная матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация
- Met-тРНК_i^{Met} аминоацилированная инициаторная тРНК
- NaOAc ацетат натрия
- NSu N-гидроксисукцинимидный эфир
- NTCB нитро-5-тиоцианобензойная кислота
- РАВР поли(А)-связывающий белок
- РСВР2 поли(С)-связывающий белок

РЕМV – вирус деформирующей мозаики гороха

PV – полиовирус

- Phe-тРНК^{Phe} фенилаланил-тРНК^{Phe}
- РІС предынициаторный комплекс

РК – псевдоузел, структурный элемент вирусной РНК

РОРОР – 1,4-ди-(5-фенил-2-оксазолилбензол)

- РРО 2,5-дифенилоксазол
- РТВ белок, связывающий полипиримидиновый тракт
- rp рибосомный белок
- SDS додецилсульфат натрия
- ТС тройной комплекс eIF2•GTP•Met-тPHK_i
- ТЕМЕD N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин
- ТFА трифторуксусная кислота

λ – длина волны

аа-тРНК – аминоацил-тРНК

- А-участок аминоацильный или акцепторный участок связывания тРНК на рибосоме
- Р-участок пептидильный или донорный участок связывания тРНК на рибосоме
- Е-участок участок связывания деацилированной тРНК перед её выходом из рибосомы
- ИХБФМ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
- крио-ЭМ крио-электронная микроскопия
- кумасси R-250 краситель для белков Coomassie Brilliant Blue R-250
- ЛРК ретикулоцитный лизат кролика
- ЛСФР Лаборатория структуры и функции рибосом
- мРНК матричная РНК
- МФК мультифакторный комплекс
- НТО нетранслируемая область
- ОЕ оптические единицы
- офВЭЖХ обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

ПААГ – полиакриламидный гель

поли(U) – полиуридиловая кислота

- ПЦР полимеразная цепная реакция
- ПТЦ пептидилтрансферазный центр
- рРНК рибосомная РНК
- РСА рентгеноструктурный анализ
- Трис трис(гидроксиметил)аминометан

Трицин – N-[2-гидрокси-1,1-бис(гидроксиметил)этил]глицин

тРНК – транспортная РНК

тРНК^{Рhe} – деацилированная фенилаланиновая тРНК

ТЭА – триэтиламин

УФ-свет – ультрафиолетовый свет

В тексте используется новая номенклатура рибосомных белков, принятая с 2014 г. [1]; в скобках указаны названия белков, использованные в оригинальных работах, опубликованых до появления новой номенклатуры.

введение

В организмах всех царств заключительный этап реализации генетической информации происходит на рибосомах, где генетическая информация, закодированная в виде тринуклеотидов – кодонов мРНК, скопированная с ДНК, переводится в аминокислотные последовательности синтезируемых белков. Синтез белков на рибосоме является одним из ключевых процессов жизнедеятельности клетки, поэтому установление структурных аспектов молекулярных механизмов этого процесса является одной из важнейших проблем молекулярной биологии. Первым этапом трансляции является инициация, которая начинается на изолированной малой субчастице рибосомы с участием факторов инициации трансляции, инициаторной Met-тРНК_і и мРНК, и заканчивается образованием комплекса 80S рибосомы с мРНК и инициаторной тРНК, взаимодействующей со старткодоном мРНК в Р-участке. Процесс инициации трансляции у эукариот значительно усложнен по сравнению с таковым у прокариот и вовлекает во много раз большее число факторов инициации. При канонической инициации малая (40S) субчастица в комплексе с факторами инициации и Met-тРНК_і связывается с 5'-концом мРНК и сканирует её до достижения старт-кодона. В результате узнавания инициаторной тРНК^{Меt} старт-кодоном формирование 48S предынициаторного комплекса, который происходит затем ассоциирует с большой (60S) субчастицей рибосомы с образованием 80S комплекса, свободного от факторов инициации и готового к началу первого цикла элонгации, а именно связыванию аминоацил-тРНК (аа-тРНК), узнающей кодон мРНК в А-участке. Геномные РНК некоторых вирусов содержат в 5'-нетранслируемой области (НТО) особые структурные элементы, так называемые IRES (от англ. Internal Ribosomal Entry Site), которые позволяют им направлять старт-кодон в Р-участок либо без сканирования, либо по упрощенному механизму сканирования, вовлекающему меньшее число факторов, чем при канонической инициации трансляции. Последовательность событий, происходящих при канонической и IRES-зависимой инициации трансляции у эукариот, хорошо известна (см., например, [2-4]).

Корректное функционирование рибосомы в процессе инициации трансляции обеспечивается высокоспецифичным и скоординированным взаимодействием её компонентов с другими участниками этого процесса. К началу выполнения настоящей работы экспериментальных данных о взаимодействиях рибосом с факторами инициации и 5'-НТО мРНК практически не было. Значительный прогресс в изучении строения инициаторных комплексов эукариотических рибосом достигнут в последние годы благодаря успехам крио-электронной микроскопии (крио-ЭМ) и рентгеноструктурного анализа (РСА) (см., например, [5, 6]). Однако структурные модели комплексов,

полученные с помощью этих методов, дают информацию лишь о взаимном расположении компонентов и лигандов рибосом в различных инициаторных комплексах, но не позволяют идентифицировать непосредственные молекулярные контакты между ними изза недостаточного разрешения. В большинстве работ по изучению строения инициаторных комплексов рибосом эукариот разрешение было в пределах от 5 до 11 Å (см., например [7]), тогда как для выявления молекулярных контактов необходимо разрешение 2-3 Å.

Адекватными подходами для получения информации о рибосомных компонентах, взаимодействующих с участниками процесса инициации трансляции, являются химические подходы, в том числе сайт-направленное сшивание, основанные на образовании ковалентных связей между рибосомой и её лигандами. Эти подходы были ранее успешно применены для изучения структурно-функциональной организации трансляционных комплексов рибосом человека. Так, с помощью аффинной модификации рибосом человека аналогами мРНК, несущими реакционноспособные группы в определенных положениях, на уровне рибосомных белков и нуклеотидов рРНК была изучена структурная организация их мРНК-связывающего центра (для обзора см. [8]) и участка связывания IRES-элемента геномной РНК вируса гепатита С (HCV, от англ. hepatitis C virus) [9, 10]. Более того, с помощью этого подхода удалось определить фрагмент рибосомного белка (rp, от англ. ribosomal protein) uS19 (S15 согласно старой номенклатуре рибосомных белков), взаимодействующий с мРНК в декодирующем центре рибосомы [11], и установить на уровне пептидов строение участка фактора терминации eRF1, ответственного за распознавание стоп-кодона при завершении трансляции [12, 13].

Результаты по аффинной модификации рибосом млекопитающих фотоактивируемыми аналогами мРНК показали, что одним из основных структурных элементов участка связывания фрагмента мРНК с 5'-стороны от кодона в Е-участке является rp eS26 (S26) [14, 15], хотя сам кодон взаимодействует непосредственно с rp uS7 (S5) [15]. Кроме того, были обнаружены сшивки аналогов мРНК с гр uS3 (S3), которые происходили независимо от того, присутствовала ли при получении рибосомных комплексов тРНК, узнающая один из триплетов аналога мРНК в качестве кодона, направляемого в Р-участок, и, таким образом, стабилизирующая его связывание с рибосомами [14, 16]. Эти наблюдения свидетельствовали о том, что аналоги мРНК сшивались с гр uS3 вне мРНК-связывающего центра, и указывали на повышенное сродство этого белка к неструктурированным РНК. Согласно данным крио-ЭМ гр uS3 расположен в 40S субчастице вблизи участка входа в мРНК-связывающий канал, где ранее наблюдали конформационные перестройки, индуцируемые связыванием с 40S

субчастицей HCV IRES [17] или факторов eIF1 и eIF1A [18]. На основании этих данных было сделано предположение, что благодаря этим перестройкам устанавливается связь между гр uS3 и спиралью h16 18S pPHK, также расположенной вблизи участка входа мPHK. Однако эта гипотеза не получила дальнейшего подтверждения, хотя позже появилась крио-ЭМ модель структуры 43S PIC, из которой следовало, что у млекопитающих за образование такой связи может отвечать геликаза DHX29, а не факторы eIF1 и eIF1A [19].

Таким образом, информация об устройстве конкретных лигандов в инициаторных комплексах рибосом эукариот и о конформационных изменениях в 40S субчастицах, сопровождающих их связывание, до последнего времени оставалась неполной и противоречивой.

Цель работы - установление пептидов рибосомных белков eS26, uS7 и uS3, ответственных за их взаимодействие с ключевыми лигандами рибосомы - мРНК и белковыми факторами в процессе инициации трансляции у млекопитающих, а также выяснение вопроса об участии гр uS3 в конформационных перестройках 40S субчастицы в участке входа в мРНК-связывающий канал.

В ходе работы планировалось решить следующие задачи:

1) идентифицировать пептиды гр eS26, взаимодействующие с частью мРНК с 5'стороны от кодона в E-участке 80S рибосомы, соответствующей её 5'-НТО при инициации трансляции, с использованием подхода, основанного на аффинной модификации рибосом аналогами мРНК, несущими фотоактивируемую группу на определенном нуклеотидном остатке;

2) определить контакты между гр uS7 и факторами инициации трансляции в 48S PIC, собранных на модельных канонических мPHK и на PHK, соответствующей HCV IRES, с помощью метода белок-белковых сшивок, индуцируемых формальдегидом;

идентифицировать пептид гр uS3, способный в составе 40S субчастиц и 80S
 рибосом сшиваться с диальдегидными производными олигорибонуклеотидов, не
 фиксированными в мРНК-связывающем центре рибосомы;

4) установить, как меняется доступность структурных элементов 40S субчастицы, расположенных вблизи участка входа в мРНК-связывающий канал, – гр uS3 и спирали h16 18S pPHK для различных химических зондов в процессе трансляции.

Научная новизна полученных результатов

Таким образом, в настоящей работе на пептидно-нуклеотидном уровне разрешения установлен ряд структурно-функциональных аспектов молекулярных механизмов, лежащих в основе инициации трансляции у высших эукариот. С помощью аффинной модификации рибосом аналогами мРНК, несущими перфторарилазидогруппу в заданном положении, показано, что эукариот-специфичный мотив 62-УххРКхУхК-70 rp S26e, участвует в поддержании пути мРНК от области кодон-антикодоновых взаимодействий до места её выхода из рибосомы, соседствуя с частью мРНК, соответствующей её 5'-НТО при инициации трансляции. С помощью метода сшивок с использованием формальдегида установлено, что в 48S PIC, образующемся после узнавания старт-кодона мРНК тройным комплексом eIF2•Met-тPHK_i^{Met}•GTP, субъединица α фактора eIF2 взаимодействует с гр uS7 благодаря крупным конформационным перестройкам в eIF2α, сопровождающим eIF2 40S субчастицей. связывание с С использованием производных олигорибонуклеотидов с окисленной З'-концевой рибозой идентифицирован РНКсвязывающий пептид 55-TQNVLGEKGR-64 в консервативном домене КН гр uS3, ответственный за способность рибосом взаимодействовать с короткими одноцепочечными мРНК-связывающего центра, который оказался экспонированным РНК вне на поверхности 40S субчастицы вблизи участка входа мРНК. Показано, что в 48S PIC этот пептид теряет способность взаимодействовать с одноцепочечными РНК, когда субъединица ј фактора eIF3 связана в мРНК-связывающем центре 40S субчастицы, но после диссоцииации eIF3 гр uS3 становится снова доступным. С помощью химического футпринтинга удалось выявить роль eIF3 в реструктурировании региона 40S субчастицы вблизи участка входа в мРНК-связывающий канал. Оказалось, что в присутствии eIF3j резко уменьшается конформационная гибкость спирали h16 18S pPHK, расположенной в этом регионе вместе с гр uS3. После диссоциации eIF3 измененная конформация спирали h16 поддерживается фактором DHX29, а после его диссоциации эта же конформация h16 сохраняется в 80S рибосомных комплексах, по крайней мере, до начала элонгации. Результаты по исследованию доступности гр uS3 и h16 18S pPHK в 48S PIC показали, что конформационные изменения 40S субчастицы вблизи участка входа мРНК происходят без участия гр uS3. Установлено, что взаимодействия между eIF2α и гр uS7, а также eIF3jзависимое реструктурирование 40S субчастицы, приводящее к экранированию rp uS3, являются универсальными чертами канонической и HCV IRES-зависимой инициации трансляции у млекопитающих, обеспечивающими правильное расположение кодирующей части мРНК в соответствующих 48S PIC. Таким образом, в настоящей работе получена новая информация о конкретных пептидах рибосомных белков eS26, uS7 и uS3, обеспечивающих взаимодействие малой субчастицы рибосомы с мРНК и факторами eIF2α и eIF3j при инициации трансляции у высших эукариот. Эта информация является принципиально важной для понимания молекулярных механизмов инициации трансляции

у эукариот и тех регуляторных процессов, которые обеспечивают эффективность и точность белкового синтеза.

Практическая значимость

Подход, основанный на образовании белок-белковых сшивок, индуцированных формальдегидом, и их последующей идентификации с применением специфических антител и масс-спектрометрии, может быть использован для определения на пептидном уровне контактов между белками, находящимися в клетке в составе различных сложных нуклеопротеидов.

Реакционноспособные производные РНК, несущие сшивающую группу в заданном положении, и подходы, использованные в настоящей работе для изучения структурнофункциональной топографии рибосомных комплексов с помощью этих производных, могут быть применены для изучения тонкой структуры других многокомпонентных нуклеопротеидных комплексов и конформационных перестроек, происходящих в процессе их функционирования.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Фрагмент 60-71 в центральной части белка гр eS26 контактирует с частью мРНК с 5'стороны от кодона в Р-участке, которая соответствует 5'-НТО в процессе инициации трансляции у млекопитающих.

2. N-концевые фрагменты rp uS7 и субъединицы α фактора инициации eIF2 взаимодействуют между собой в 48S PIC благодаря крупным перестройкам в eIF2α, которые сопровождают связывание тройного комплекса eIF2•Met-тPHK_i^{Met}•GTP с 40S рибосомной субчастицей.

3. Пептид 55-64 в КН-домене гр uS3, расположенный вне мРНК-связывающего центра рибосомы, обеспечивает уникальную способность гр uS3 взаимодействовать с короткими одноцепочечными РНК.

4. Субъединица ј фактора инициации eIF3 экранирует пептид 55-64 гр uS3 от взаимодействия с одноцепочечными PHK в 48S PIC, а после диссоциации eIF3j, происходящей в результате фиксации мPHK в мPHK-связывающем канале, этот пептид становится вновь доступным.

5. При формировании предынициаторных комплексов, содержащих eIF3j или геликазу DHX29, рибосомный белок uS3 не образует новых связей со спиралью h16 18S pPHK, но их присутствие проводит к изменению конформации данной спирали, делающему её

более жесткой, что сохраняется после диссоциации этих факторов, по крайней мере, до начала первого цикла элонгации.

6. Канонический и HCV IRES-зависимый механизмы инициации трансляции у млекопитающих имеют общие черты, связанные с взаимодействием rp uS7 с eIF2α и с индуцированным eIF3j реструктурированием 40S субчастицы, приводящим к экранированию PHK-связывающего пептида rp uS3.

Личный вклад автора.

Наработку и очистку рекомбинантного белка S26C проводил А. В. Иванов. Антитела против гр uS7 очищены Е. С. Бабайловой. Синтез ДНК-матрицы для наработки T7транскрипцией 80-звенной РНК, служившей в качестве модельной канонической мРНК, и проверка функционального состояния инициаторных рибосомных комплексов, полученных в бесклеточной белоксинтезирующей системе на основе лизата ретикулоцитов кролика (ЛРК), методом тоу-принтинга выполнены О. А. Косиновой. Аффинную модификацию рибосом производными олигорибонуклеотидов с окисленной З'-концевой рибозой автор проводил совместно с А. С. Грошевой. Эксперименты по определению доступности нуклеотидов рРНК в составе рибосомных комплексов методом химического футпринтинга автор проводил совместно с Ю. С Бартули. Остальные эксперименты проведены лично автором.

Глава 1. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).

Процесс трансляции включает три стадии: инициацию, элонгацию и терминацию. Инициация представляет собой последовательность событий, приводящих к образованию комплекса рибосом с мРНК и инициаторной Met-тРНК_і^{Met}, взаимодействующей со старткодоном в пептидильном (Р) участке, где следующий за старт-кодоном триплет мРНК оказывается в аминоацильном (А) участке, готовом принять соответствующую молекулу аа-тРНК. При элонгации происходит удлинение синтезируемой полипептидной цепи, начиная с первого остатка метионина, которое происходит до тех пор, пока в А-участке (декодирующем центре) не окажется один из трёх терминирующих (стоп) кодонов. В этом наступает терминация трансляции, приводящая высвобождению случае к синтезированного полипептида из рибосомы. В то время как процессы элонгации и терминации во всех царствах в значительной степени схожи, процесс инициации в царстве эукариот значительно сложнее, чем у бактерий. Более того, механизмы инициации у прокариот и эукариот принципиально различны.

В настоящее время накоплено значительное количество информации о структурных элементах рибосомы, принимающих участие в её функционировании на различных стадиях процесса трансляции, и есть значительный прогресс в понимании молекулярных механизмов, лежащих в основе этого процесса. Из всех стадий белкового синтеза инициация трансляции на сегодняшний день остается наименее изученной. Это связано, в частности, с тем, что в процессе инициации у высших эукариот принимают участие свыше 25 полипептидов, являющихся факторами инициации или их субъединицами, необходимыми для протекания инициации или повышения её эффективности, и что нет полного понимания молекулярных основ их функционирования.

Настоящий обзор посвящен детальному рассмотрению молекулярных механизмов, лежащих в основе инициации трансляции у эукариот, причем особое внимание уделено структурным аспектам формирования инициаторных комплексов и сопутствующих этому конформационных перестроек в рибосоме. В качестве объекта для рассмотрения выбран трансляционнный аппарат млекопитающих, у которых инициация трансляции имеет специфические черты, связанные с вовлечением дополнительных полипептидов.

1.1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ СОБЫТИЙ ПРИ КАНОНИЧЕСКОЙ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ

Большинство клеточных мРНК содержат на 5'-конце так называемый кэп, представляющий собой 7-метилгуанин, присоединенный через 5'-5' связь к концевому

нуклеотиду мРНК. Перед началом инициации происходит процесс так называемой активации мРНК, необходимой для того, чтобы она могла связаться с малой рибосомной субчастицей (см., например [3]). В ходе этого процесса на 5'-концевом 7-метилгуанине собирается комплекс факторов семейства eIF4 (здесь и далее по этому разделу см. рис. 1). Параллельно в результате взаимодействия тройного комплекса (TC, от англ. ternary complex) eIF2•GTP•Met-тPHK_i с факторами eIF3, eIF1 и eIF5 формируется так называемый мультифакторый комплекс (МФК). Этот комплекс вместе с фактором eIF1A связывается со свободной 40S субчастицей, что приводит к образованию 43S предынициаторного комплекса (PIC, от англ. pre-initiation complex). 43S PIC связывается с активированной мРНК в районе её 5'-конца и сканирует мРНК до тех пор, пока старт-кодон не окажется в P-участке рибосомы, где он узнает антикодон Met-тPHK_i и образует с ним дуплекс; это сопровождается диссоциацией eIF1 от рибосомы и образованием 48S PIC. Следует отметить, что сразу же после связывания активированной мРНК с 43S PIC происходит eIF2-зависимый гидролиз GTP. Образующийся в результате этого гидролиза фосфат остается связанным с eIF2 до тех пор, пока eIF1 не диссоциирует из комплекса.

Последним этапом инициации является присоединение 60S субчастицы к 48S PIC, которое происходит с участием фактора eIF5B и GTP. Этот процесс сопровождается гидролизом GTP и завершается диссоциацией с рибосомы всех факторов инициации, в результате чего образуется 80S инициаторный комплекс (80S IC), в котором инициаторный кодон мРНК зафиксирован в Р-участке, образуя кодон-антикодоновый дуплекс с Met-тPHK_i, а следующий за ним триплет мРНК оказывается в декодирующем центре рибосомы и готов к взаимодействию с вновь поступающей аа-тPHK.

Наиболее часто встречающимся старт-кодоном является триплет AUG, в редких случаях им могут быть триплеты CUG или GUG. Однако такие триплеты могут встречаться в 5'-НТО и до «правильного» старт-кодона, задающего рамку считывания в мРНК. Как рибосома узнает, какой триплет является инициаторным кодоном? Существует точка зрения [20], что в качестве опознавательного знака служит специфическое окружение старт-кодона с 3'- и 5'- сторон. Позже было показано, что контекст старт-кодона может отличаться в организмах разных типов, но наиболее важными для распознавания старт-кодона во всех случаях являются пурины в положении -3 и +4 относительно первого нуклеотида старт-кодона [21].

1.2. ФАКТОРЫ, ПРИНИМАЮЩИЕ УЧАСТИЕ В ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ

У эукариот в процессе инициации трансляции принимает участие более 12 белковых факторов, многие из которых являются многосубъединичными.



Рис. 1. Схема инициации трансляции у эукариот по каноническому пути согласно [22].

1.2.1. Роль eIF1 и eIF1A

Факторы eIF1 и eIF1A являются небольшими (мол. масса 15-20 кДа) мономерными белками. eIF1 содержит центральный α-β кор и неструктурированный N-концевой домен, важный для формирования вышеупомянутого МФК [23]. eIF1A содержит

неструктурированные N- и C-концы и центральный олигонуклеотид-связывающий домен, включающий α-спирали и β-бочонок [24]. Факторы eIF1 и eIF1A отвечают за точность узнавания старт-кодона, препятствуя преждевременному завершению процесса сканирования до того, как правильный старт-кодон в оптимальном контексте попадет в Р участок рибосомы.

Ещё в 2007 году с помощью крио-ЭМ было выявлено, что связывание eIF1 и eIF1A с 40S субчастицей вызывает конформационное изменение в районе участка входа мРНК, благодаря которому открывается мРНК-связывающий канал, что, как предположили авторы, промотирует образование РІС, способного к сканированию мРНК [18]. Подобные гипотезы о конформационных перестройках рибосомы, связанных с процессом сканирования, были высказаны в работе [25], где было сделано предположение, что конформации рибосомы в процессе сканирования и после узнавания старт-кодона стабилизируются благодаря взаимодействиям определённых доменов eIF1 и eIF1A с компонентами предынициаторных комплексов. Конформация 40S субчастицы. благоприятная для сканирования, была названа Pout ("out" подразумевает то, что старт кодон находится вне P-участка), а конформация, принимаемая 40S субчастицей после установления кодон-антикодонового взаимодействия, - P_{in} ("in" означает, что старт-кодон расположен в Р-участке). В пользу этого предположения свидетельствовал, в частности, факт, что делеции в С-концевом домене eIF1A приводили к уменьшению точности инициации, а именно к распознаванию UUG кодона в качестве инициаторного.

Дальнейшие структурные исследования подтвердили предположение 0 конформационных перестройках, происходящих в предынициаторных комплексах при узнавании старт-кодона [5]. Оказалось, что конформацию Pout стабилизируют N-концевой домен фактора eIF1 и С-концевой домен eIF1A, которые стерически препятствуют связыванию антикодоновой петли Met-тРНК_і в Р-участке 40S субчастицы при сканировании. Благодаря этому в состоянии Pout Met-тРНК_і лишь частично находится в участке, соответствующему Р-участку на рибосоме, а мРНК образует минимальное число контактов с рибосомой [26], что позволяет ей скользить в мРНК-связывающем канале в процессе сканирования. В состоянии P_{in} тРНК полностью связывается в Р-участке, что сопряжено с диссоциацией eIF1 (участок связывания которого сильно перекрывается с Ручастком) и с изменением расположения С-концевого домена eIF1A, который в состоянии Роит находился в области Р-участка [6]. Данные, указывающие на участие С-концевого домена eIF1A в сканировании, были подтверждены также биохимическими методами [27]. В этой работе с помощью мутантных форм eIF1A, несущих гидроксил-радикалгенерирующую группу на остатках цистеина в С-концевом домене eIF1A, были найдены

подвергающиеся расщеплению нуклеотиды в h34 18S pPHK в районе участка входа мPHK. На основании зависимости набора расщепленных нуклеотидов от типа мутаций в комплексах, моделирующих состояние сканирования и состояние 48S комплекса после узнавания старт-кодона, авторы подтвердили, что С-концевой домен eIF1A удаляется от своего положения в P-участке при узнавании старт-кодона и определили аминокислотные остатки фактора, вовлечённые во взаимодействия с pPHK.

1.2.2. Роль eIF2

Доставку инициаторной Met-тРНКі^{Met} на 40S субчастицу осуществляет фактор инициации eIF2 в комплексе с GTP. Этот фактор массой ~120 кДа состоит из 3 субъединиц (α , β и γ): α субъединица состоит из трёх доменов α D1-D3; β субъединица содержит в С-конце Zn-связывающий домен и мотив "спираль-поворот-спираль" (HTH), необходимый для поддержания пространственной структуры субъединицы; наконец, у субъединица отвечает за GTP-азную активность фактора и связывает субъединицы α и β . Субъединица у состоит из N-концевого GTP-связывающего домена и доменов II и III, имеющих структуру β-складок; её GTP-азная активность индуцируется рибосомой и eIF5. Субъединица у способна связывать GTP; для образования прочного комплекса необходимо взаимодействие её домена II с доменом D3 eIF2α. Кроме того, eIF2γ играет наиболее важную роль в связывании Met-тРНК; остальные две субъединицы фактора в разных организмах вносят различный вклад в это связывание: например, в *Encephalitozoon cuniculi* их вклад равный [28], а у дрожжей β субчастица имеет более существенное значение [29]. Фактор eIF2 специфически узнает инициаторную тРНК^{Меt} благодаря её структурным отличиям от элонгаторных тРНК. Детерминантами узнавания инициаторной тРНК являются нуклеотидные пары А1:U72 в акцепторном стебле, три последовательные консервативные G:C пары в антикодоновой петле, а также пары A50:U64 и U51:A63 и консервативные остатки А54 и А60 в Т-петле (рис. 2) (соответствующие данные суммированы в [30]).

После гидролиза GTP образующийся GDP остаётся прочно связанным с eIF2, и такой комплекс eIF2•GDP имеет низкое сродство к инициаторной тPHK^{Met} [31]. Для того чтобы восстановить активность eIF2, находящегося в комплексе с GDP, в связывании тPHK, существует фактор eIF2B, который осуществляет обмен связанного GDP на GTP (рис. 1). Взаимодействие eIF2B с eIF2 осуществляется через субъединицу eIF2 β , которая также необходима для связывания фактора eIF5 [32].



Рис. 2. Вторичные структуры инициаторной тРНК_i^{Met} и элонгаторной тРНК^{Met}. Отмечены нуклеотиды, уникальные для инициаторной тРНК [30].

1.2.3. Роль eIF3

Структура МФК до его связывания с 40S субчастицей поддерживается в основном благодаря большому мультисубъединичному фактору eIF3, олигомерный состав которого зависит от класса организма. Например, у дрожжей eIF3 состоит из 6 консервативных субъединиц (a, b, c, i, g и j). У млекопитающих их число достигает 13 (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l и m) [33]. Этот фактор формирует на рибосоме "посадочную площадку" для других факторов и препятствует преждевременной ассоциации субчастиц [34]. Кроме того, eIF3 существенно увеличивает уровень связывания 43S PIC с мРНК, содержащими длинную 5'-НТО [35]. Субъединицы a, c, e, k, l и m содержат домен, имеющий структурное сходство со сплайсеосомой 26S и сигналосомой СОР9 и называемый PCI-доменом (аббревиатура от Proteasome, CSN, eIF3). Этот домен представляет собой N-концевые спиральные повторы и С-концевую "крылатую спираль" (winged helix) [36]. Эти 6 субъединиц вместе с субъединицами f и h образуют сердцевину, или кор, eIF3, в котором субъединицы, содержащие РСІ домен, соединены последовательно через β-складки "крылатого" домена, образуя дугу (рис. 3А). Субъединицы f и h содержат так называемый MPN домен, который имеет структурное сходство с N-концевым доменом белков металлопротеазы Mpr1 и фермента Pad1 [37], ответственного за образование цитруллина. Субъединица f взаимодействует с субъединицами m и h, а C-концевые спирали субъединиц с, е, f, h, k и 1 образуют семиспиральный узел (рис. 3А и Б). Наконец, eIF3a образует множественные контакты с eIF3c, вовлекающие N-концевой домен, центральную часть и С-концевой домен eIF3a, а центральная часть и С-концевой домен eIF3c, в свою очередь, связаны с N-концевым доменом eIF3e [38] (рис. 3А).



Рис. 3. Пространственная структура eIF3 кролика согласно данным крио-ЭМ [38]. А, общий вид кора eIF3. Цветами выделены различные субъединицы фактора. Б, увеличенная часть eIF3, включающая С-концевые спирали субъединиц с e, f, h, k и 1, которые образуют семиспиральный узел. В, структура семиспирального узла, вид сбоку.

Что касается субъединиц, не относящихся к кору eIF3, то к настоящему времени известно, что часть из них (g, i и j) (см. рис. 3А) соединена с кором через субъединицу b, связанную с ним через С-концевой домен eIF3a [39]. Стоит отметить, что взаимодействия eIF3a-eIF3c-eIF3b сохраняются у всех эукариот [40]. Эти взаимодействия являются важными для эффективной инициации, поскольку, как было показано методом мутагенеза у дрожжей, замена 10 аминокислотных остатков в С-концевом домене eIF3a (361-370) на аланины приводит к уменьшению скорости инициации и подавлению роста клеток [40]. Имеются данные о том, что некоторые субъединицы eIF3 играют важную роль в точности селекции старт-кодона [41]. В частности, замены N-концевых аминокислотных остатков в eIF3j дрожжей, нарушающие взаимодействие eIF3j-eIF3b, приводили к ухудшению распознавания старт-кодона; такой же эффект наблюдали при заменах в N-концевом домене eIF3c, нарушающих взаимодействие этой субъединицы с eIF1 и eIF5 [41].

В некоторых работах показано, что eIF3 способствует рекрутированию мРНК к 43S PIC (см., например, [42, 43]). В работе [43] на основании данных по связыванию изолированных субъединиц дрожжевого eIF3 с модельными мРНК *in vitro* сделано предположение о том, что мРНК-рекрутирующая функция eIF3 связана со способностью N-концевого домена eIF3a и PCI-доменов eIF3a и eIF3c связывать мРНК. Однако эти данные получены в слишком упрощённой системе, поэтому вопрос о том, каким образом eIF3 способствует рекрутированию мРНК в 43S PIC, остаётся открытым. На значение eIF3

для рекрутирования мРНК при инициации трансляции у млекопитающих указывает тот факт, что eIF4G, участвующий в доставке мРНК на рибосому (см. следующий подраздел 1.2.4) взаимодействует с eIF3 [44]. У низших эукариот eIF4G прямо не взаимодействует с eIF3, но он связывается с eIF5 [35], поэтому можно полагать, что взаимодействие eIF4G с рибосомой опосредованно фактором eIF5, который, в свою очередь, связывается с eIF3c [40, 45].

Поскольку С-концевой домен eIF3a взаимодействует с eIF2 [46], a С-концевой домен eIF5 – с β субъединицей eIF2 и N-концевым доменом eIF3c [47] в составе МФК, было высказано предположение, что eIF3 может увеличивать скорость связывания TC с 40S субчастицами [46]. Однако данные об этих взаимодействиях получены в упрощённых модельных системах in vitro с использованием мутантных форм дрожжевых факторов инициации трансляции, и прямых свидетельств того, что такие взаимодействия действительно реализуются при образовании PIC в процессе инициации, до сих пор нет.

1.2.4. Роль eIF4

Основной функцией факторов инициации семейства 4 является активация мРНК и её рекрутирование 43S PIC, где также поли(А)-связывающий белок PABP принимает участие. В семейство 4 входят eIF4B и eIF4F, причем последний представляет собой комплекс факторов eIF4G, eIF4E и eIF4A. Активация мРНК осуществляется следующим образом. Кэп взаимодействует с фактором eIF4E (кэп-связывающим белком, CBP), тем самым связывая мРНК с комплексом факторов eIF4F. В этом комплексе ATP-зависимая геликаза eIF4A (относящаяся к семейству DEAD-мотив-содержащих геликаз, т.е. имеющих в своём составе тетрапептид Asp-Glu-Ala-Asp) при участии eIF4B расплетает небольшие шпильки мРНК в районе кэпа [48], что необходимо для её последующего сканирования. РАВР связывается с поли(А)-хвостом на 3'-конце мРНК, а N-концевой фактора eIF4G, ассоциированного с 5'-концевым домен фрагментом мРНК, взаимодействует с РАВР и тем самым придает активированной мРНК кольцеобразную структуру, что облегчает процесс реинициации трансляции мРНК [49] (см. рис. 1). Рекрутирование мРНК 43S PIC происходит благодаря его взаимодействию с eIF4G, входящим в состав активированной мРНК. По данным гидроксил-радикального пробинга, eIF4G взаимодействует с сегментом экспансии ES6 18S pPHK [50].

Активность eIF4A регулируется кэп-связывающим белком eIF4E, который ингибирует её вне комплекса eIF4F, поскольку один и тот же домен eIF4E отвечает за взаимодействие с eIF4G и ингибирование геликазы eIF4A [51]. Кроме того, эффективность расплетания мРНК геликазой eIF4A увеличивается в присутствии eIF4B.

Точный механизм стимулирующего действия eIF4B неизвестен, хотя есть данные, что этот фактор связывается с мРНК своими двумя фрагментами - С-концевым доменом и, так называемым, РНК-узнающим мотивом (RRM), который у дрожжей не является необходимым для выживания клетки. Кроме того, eIF4B имеет и другую функцию. В частности, этот фактор повышает уровень связывания активированной мРНК с 43S PIC благодаря своей способности димеризоваться и в виде димера взаимодействовать с субъединицей eIF3a посредством мотива Asp-Arg-Tyr-Gly [52].

1.2.5. Роль eIF5

eIF5 – небольшой односубъединичный белок, выполняющий в процессе инициации несколько функций: он стимулирует GTPазную активность eIF2 [3, 53], играет важную роль в поддержании структуры МФК, взаимодействуя с eIF1A, eIF1, eIF2b и eIF3c [54, 55], а также повышает точность распознавания старт-кодона, препятствуя переходу рибосомы в P_{in} состояние до достижения правильного старт-кодона [56]. Стабилизация PIC в состоянии P_{out} осуществляется благодаря тому, что eIF5 взаимодействует с eIF1 [57] и eIF2•GDP, предотвращая их диссоциацию от рибосомы до узнавания старт-кодона. Взаимодействие eIF5 с eIF2, опосредованное eIF2 β [58], индуцирует переход 48S PIC в состояние P_{in} . Переход 48S PIC в состояние P_{in} после узнавания корректного старт-кодона происходит благодаря тому, что Met-тPHK_i вытесняет C-концевой домен eIF1A из P-участка [5], что приводит к образованию контакта между этим доменом и eIF5 [59, 60], и разрушению контакта между eIF5 и eIF2 β [32].

Фактор eIF5 осуществляет функцию поддержания структуры МФК благодаря его множественным взаимодействиям с компонентами этого комплекса, среди которых можно отметить контакт С-концевого домена eIF5 с N-концевым доменом eIF3c. Этот контакт оказался важным для удержания TC в составе МФК, поскольку было обнаружено, что мутации в eIF3c, нарушающие этот контакт, приводят к уменьшению уровня связывания TC [43]. Что касается способности eIF5 индуцировать конформационный переход в eIF2, придающий ему GTP-азную активность, то молекулярные механизмы, лежащие в основе такого перехода, остаются неизвестными.

1.2.6. Роль eIF5B

Присоединение 60S субчастицы к 48S PIC, которое происходит после узнавания старт-кодона, осуществляется с помощью односубъединичной GTPaзы eIF5B [3]. Этот фактор связывается с 48S PIC после того, как eIF1 и фосфат, образовавшийся после гидролиза GTP в составе TC, покидают рибосому. Последнее приводит к диссоциации

факторов eIF5 и eIF2, находящихся на межсубъединичной поверхности, после чего становится возможным присоединение большой субчастицы, которая индуцирует GTPазную активность eIF5B. Изменение конформации eIF5B, вызванное гидролизом GTP [61], приводит к его диссоциации, а также к диссоциации eIF1A, что завершает процесс инициации трансляции и приводит к образованию 80S инициаторного комплекса, готового к элонгации [3]. При этом субъединицы eIF3, связанные на внешней стороне 40S субчастицы, противоположной межсубъединичной поверхности, могут оставаться на 80S рибосоме в течение нескольких циклов элонгации [62].

Фактор eIF5B млекопитающих имеет массу 140 кДа и содержит вариабельную Nконцевую часть, центральную часть, или G домен, общий для всех GTPa3, и консервативный у эукариот и архей C-концевой домен (домен IV) [63], связанный с Gдоменом через гибкую α -спираль длиной 40 Å [64] (рис. 4). При связывании eIF5B с 48S PIC C-концевой домен eIF1A и Met-тPHK_i одновременно взаимодействуют с C-концевым доменом eIF5B [61]. О важности упомянутой α -спирали eIF5B свидетельствуют результаты экспериментов по мутагенезу в дрожжах [65]. Эти результаты показали, что замены в ней приводят к уменьшению скорости ассоциации субчастиц и количества инициаторной тPHK^{Met}, связанной в 80S IC. Перестройки в G-домене, вызванные гидролизом GTP, аллостерически изменяют конформацию C-концевого домена eIF5B, что приводит к нарушению его связи с Met-тPHK_i, после чего связанные между собой eIF5B и eIF1A покидают рибосому [66].



Рис. 4. Структурная
организация фактора eIF5B
согласно данным крио-ЭМ
[67]. Цветами выделены
различные домены
фактора.

Кроме перечисленных выше «классических» факторов инициации, существует несколько других белков, которые также могут принимать участие в процессе инициации трансляции у эукариот. К этим белкам относятся eIF6, который связывается с 66S большой прерибосомной субчастицей в ядре и со зрелой 60S субчастицей в цитоплазме и препятствует преждевременной ассоциации субчастиц. Сродство eIF6 к 60S субчастице уменьшается при фосфорилировании его аминокислотных остатков Ser145 и Ser146 RACK1-зависимой протеинкиназой С [68]. Таким образом, фосфорилирование eIF6 оказывает стимулирующее влияние на инициацию трансляции, поскольку оно способствует диссоциации eIF6 от 60S субчастиц, что делает их способными участвовать в этом процессе. Кроме eIF6, в инициации трансляции в некоторых случаях принимают участие геликазы разных семейств, роль которых заключается в расплетании вторичной структуры мРНК в 5'-НТО, препятствующей процессу сканирования в случаях, когда эта структура имеет высокую прочность и не расплетается эффективно фактором eIF4A. У млекопитающих такими геликазами являются DHX29 и DDX3/ded1, содержащие мотивы DExH [69, 70] и DEAD соответственно. Установлено, что DHX29 связывается возле участка входа мРНК на рибосому [19], тогда как DDX3 взаимодействует с eIF4G и, будучи связанной с этим фактором, расплетает прочные шпильки вблизи кэпа, увеличивая скорость инициации [71].

1.3. НЕКАНОНИЧЕСКИЕ ПУТИ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ

5'-3'-HTO Некоторые мРНК содержат В своих или специфические последовательности, позволяющие этим мРНК осуществлять инициацию трансляции по путям, отличающимся от канонического механизма, описанного в предыдущем разделе, причём в определённых случаях отличия могут быть кардинальными. Такие последовательности подразделяют на «внутренние участки посадки мРНК на рибосому», больше известные как IRES-элементы, и на так называемые энхансерные элементы или кэп-независимые трансляционные усилители (CITE, от Cap Independent Translation Enhancers), расположенные обычно в 3'-НТО. Последние в отсутствие кэп-структуры могут связываться с факторами инициации 4-й группы, или с рибосомой.

1.3.1. Энхансер-зависимая инициация трансляции

Впервые СІТЕ-элементы были обнаружены в некэпированных мРНК некоторых вирусов растений [72]. По сходству вторичной структуры выделяют более 6 типов СІТЕэлементов [73, 74] (см. рис. 5). Процесс инициации трансляции мРНК, содержащих СІТЕэлементы в 3'-НТО, можно разделить на три стадии: связывание факторов инициации и рибосомных субчастиц с элементами в 3'-НТО мРНК, образование кольцевой структуры мРНК за счёт комплементарных взаимодействий между 3'-НТО и 5'-НТО, и посадка 40S субчастиц на 5'-НТО мРНК (см., например, [2]).

К первому типу относятся СІТЕ, сходные с элементом в РНК сателлитного вируса некроза табака STNV (от. англ. satellite tobacco necrosis virus). Этот СІТЕ длиной 93 нуклеотида имеет структуру, представляющую собой длинный стебель с петлевыми участками [74]. Для инициации РНК, содержащих СІТЕ этого типа, требуется eIF4F, причём фактор не заменяют его изолированные компоненты [75].

Ко второму типу относится СІТЕ вируса жёлтой карликовости ячменя (англ. Barley yellow dwarf virus). Вторичная структура элементов этого типа содержит различное число петель, радиально исходящих их общего центра [74, 76-78] (см. рис 5). Эти элементы содержат 17-нуклеотидную последовательность, имеющую комплементарные друг другу участки [79], что придаёт этому участку специфичную пространственную структуру, впервые найденную в [80]. С СІТЕ-элементами этого типа может связываться eIF4G [81], который является посадочной площадкой для других факторов инициации и PABP, который взаимодействует с поли-А богатой последовательностью в 5'- концевой части таких СІТЕ [82]. Кроме того, эти СІТЕ связывают 40S субчастицы, и их сродство к субчастицам увеличивается в присутствии eIF4F, eIF4A, eIF4B и ATP [83].

СІТЕ-элемент, относящийся к третьему типу, впервые был найден в РНК вируса мозаики проса (PMV, от Panicum mosaic virus) [84], поэтому такие элементы обозначаются РТЕ (от англ. Panicum mosaic virus translational enhancer). Такие СІТЕ имеют Т-образную структуру, образованную стеблем, содержащим однобокую G-богатую петлю, за которой следует семь пар консервативных нуклеотидов и три петли на конце стебля [74, 85]. Эти элементы формируют псевдоузел благодаря образованию комплементарных взаимодействий между G-богатой петлёй и триплетом ССС на конце стебля [86]. Комплементарные между собой G- и C-богатые последовательности в РТЕ-элементах важны для их связывания с eIF4E [85].

Четвёртый тип СІТЕ-элементов представляет собой группу структур, сходных с соответствующим элементом вируса морщинистости репы (TCV, от англ. Turnip crinkle virus). Этот элемент имеет Т-подобную форму, образованную тремя шпильками и двумя псевдоузлами, формирующую тРНК-подобную третичную структуру [87]. В отличие от остальных СІТЕ, элементы этого типа не содержат в 5'-НТО участков, комплементарных З'-НТО. Увеличение эффективности инициации трансляции содержащих их мРНК происходит за счёт того, что 40S субчастица связывается с пиримидин-богатой

последовательностью в 5'-НТО мРНК, а 60S – с тРНК-подобной структурой в 3'-НТО [88].

СІТЕ-элементы пятого типа, найденные в РНК итальянского вируса кольцевой пятнистости гвоздики (англ. Carnation Italian ringspot virus) и вируса кустистой карликовости томатов (англ. Tomato bushy stunt virus), имеют Y-подобную форму [74]. Эти элементы не имеют выраженного сродства к отдельным полипептидам семейства eIF4 и связывают только eIF4F (следует отметить, что eIF4A не является компонентом eIF4F у растений) [89].

СІТЕ-элементы шестого типа содержатся в вирусах точечного некроза дыни (MNSV, от Melon necrotic spot virus), а также вирусах Maize necrotic streak и Cucumber Bulgarian, которые содержат I-подобные структуры длиной 64 нуклеотида, представляющие собой центральный двухцепочечный домен с консервативными петлями, причём апикальная петля отвечает за связывание СІТЕ с 5'-НТО вирусной РНК [74]. Для эффективной трансляции мРНК MNSV важен eIF4E, и критическую роль при этом играет его аминокислотный остаток His 228 [85], причём MNSV связывает eIF4E не в свободном состоянии, а только вместе с eIF4G или его С-концевым доменом [90]. Интересно, что CITE внесение мутации В определённое положение MNSV восстанавливает эффективность трансляции мРНК, содержащей этот элемент, в системе с мутированным eIF4E, устойчивой к данным вирусам [91].



Рис. 5. Вторичные структуры СІТЕ-элементов и участники процесса трансляции, с которыми они связываются в процессе инициации (использованы материалы из [74]).

Одним из наиболее хорошо изученных трансляционных энхансеров является СІТЕ вируса деформирующей мозаики гороха (PEMV, от pea enation mosaic virus) который включает РТЕ-элемент (см. выше), связывающий eIF4E, однако не содержит участков комплементарности с 5'-НТО. Вместо этого участок, комплементарный 5'-НТО (см. рис. 6А), входит в домен, расположенный с 5'-стороны от РТЕ-элемента [92]. Этот домен по

вторичной и третичной структуре сходен СІТЕ четвёртого типа (см. выше), однако он связывается с 60S субчастицами с меньшей эффективностью, и, в отличие от энхансеров этого типа, способен связываться с 40S субчастицами [92] (см. рис. 6Б). В 3'- конце мРНК РЕМV содержится второй домен с сходной структурой, также способный связываться с 60S субчастицами. Этому домену предшествует петля, содержащая последовательность, идентичную участку комплементарности 5'-НТО в первой тРНК-подобной структуре. Наличие этой последовательности увеличивает эффективность трансляции вирусной РНК, но он, по-видимому, не конкурирует с первой тРНК-подобной структурой за взаимодействие с 5'-НТО. Авторы [93] предположили, что наличие в 3'-НТО мРНК домена, способного связывать субчастицы, и участка, комплементарного 5'-НТО, может увеличивать скорость её реинициации, поскольку придаёт мРНК кольцевую структуру, характерную для инициации трансляции по каноническому пути.



Рис. 6. Структура СІТЕ-элемента РНК РЕМV. А, вторичная структура. Шпилька 5'H1 содержит последовательность, комплементарную участку 1253-5'-CUUGAUUCUA 18S рРНК *Arabidopsis*, а также AUG кодон, выделенный прямоугольником. Комплементарные взаимодействия между шпильками 5'H2 и 3'H1, благодаря которым РНК РЕМV может принимать кольцеобразную структуру, показаны линиями. Домен, содержащий шпильки 3'H1 и 3'H2, способен связывать 40S и 60S субчастицы, а также 80S рибосому [92]. Последняя справа шпилька связывается с eIF4E. Б, Третичная структура части СІТЕ-элемента РНК РЕМV, ответственной за связывание 40S субчастицы (3'H1 и 3'H2) (обозначенная красным), наложенная на структуру тРНК^{Phe} (серая) [94].

Один из механизмов стимулирования трансляцию специфическими участками мРНК, может быть основан на их связывании с 40S субчастицами посредством

комплементарных взаимодействий с экспонированными участками 18S рРНК [95]. Анализ последовательностей клеточных и вирусных мРНК показал, что многие из них содержат участки, комплементарные 18S рРНК или близкие по структуре и последовательности элементам 18S рРНК. Было сделано предположение, что эти мРНК могут связываться с 40S субчастицами благодаря комплементарным взаимодействиям с 18S рРНК или взаимодействием с рибосомными белками фрагментов мРНК, сходных с участками 18S реализации комплементарных рРНК [95]. Возможность взаимодействий между экспонированными последовательностями 18S рРНК в составе 40S субчастиц и нерибосомной РНК впервые была показана в [96] с использованием модельной РНК, содержащей участок мышиного гомеодомена GTx, комплементарный фрагменту 18S рРНК, включающему ES6A и h26. В этой работе было обнаружено, что модельная РНК, содержащая статистически распределённые по всей молекуле остатки 4-тиоуридина, h26 18S pPHK. сшивается с участком включающим последовательность, комплементарную модельной РНК. Было также установлено, что эффективность трансляции мРНК в бесклеточной белоксинтезирующей системе существенно выше, если эта мРНК содержит в 5'-НТО участок комплементарности 18S рРНК [96]. Подобный эффект наблюдали также в трансляционных системах растений. В частности, модельные мРНК, содержащие в 5'-НТО 10-нуклеотидные последовательности, комплементарные фрагментам в центральной части 18S рРНК, транслировались эффективнее контрольных мРНК, не содержащих вставок, и эффективность трансляции была тем выше, чем больше было сродство соответствующих 10-нуклеотидных олигомеров к 40S субчастицам [97]. В этой же работе было установлено, что наибольшее увеличение эффективности трансляции оказывают последовательности, комплементарные фрагменту 1155-1174, включающему h27 18S pPHK [97]. Кроме того, было обнаружено стимулирующее влияние на трансляцию последовательностей, комплементарных фрагментам в 3'-концевой части 18S рРНК растений, присутствующих в СІТЕ многих вирусов растений, например, в вирусе желтой карликовости ячменя [79], Ү-вирусе картофеля [98], а также в 5'-НТО мРНК гр uS13 (rpS18C), Arabidopsis (в последнем случае 3'-концевой фрагмент 18S рРНК включал верхнюю часть h44 и прилегающий к ней одноцепочечный участок между h44 и h45 [99]). Доступность соответствующих участков 18S рРНК в 40S субчастицах для взаимодействия с модельными олигомерами была показана с помощью различных подходов. В частности, в случае участка в спирали h27 и 3'-концевого фрагмента 18S pPHK, включающего h45 и прилегающий к нему одноцепочечный участок - с помощью сайт-направленного сшивания производных одноцепочечных ДНК, содержащих участки комплементарности соответствующим фрагментам 18S рРНК [100, 101]. В пользу предположения о

стимулирующем влиянии обсуждаемых последовательностей в мРНК на трансляцию за счет комплементарных взаимодействий с 18S рРНК свидетельствовали данные по ингибированию трансляции модельных мРНК в присутствии избытка ДНК-олигомеров, комплементарных соответствующим участкам 18S рРНК [100, 101]. С этим согласуются данные о том, что увеличение в 5'-НТО мРНК числа копий последовательностей, комплементарных фрагментам 18S рРНК, приводит к увеличению эффективности трансляции соответствующих модельных мРНК [97, 102].

Определённые последовательности мРНК, комплементарные участкам 18S рРНК, могут проявлять энхансерные свойства, даже если эти последовательности находятся не в НТО мРНК, а в кодирующей части [103]. Так, было показано, что модельная мРНК, старт-кодона последовательность, комплементарную содержащая после экспонированному участку 1634-1650 в районе декодирующего центра 18S рРНК пшеницы, включающем спирали h28 и 5'-концевую часть h44, транслировалась с большей эффективностью, чем мРНК, не содержащая комплементарных 18S рРНК участков. Оказалось, что стимулирующий эффект такой вставки на трансляцию был меньшим, чем эффекты, наблюдавшиеся для мРНК, содержащих последовательности, комплементарные участкам 18S рРНК, в 5'-НТО (см выше). Авторы предположили, что при образовании комплементарного дуплекса кодирующей части мРНК с этим регионом 18S рРНК старткодон оказывается в 40S субчастицах в менее благоприятном для инициации трансляции положении, чем в случае мРНК, содержащей энхансерную последовательность в НТО.

Другим примером энхансерной последовательности, расположенной в кодирующей части мРНК, является последовательность в гистоновой Н4 мРНК млекопитающих, комплементарная триплету UUC в апикальной части h16 18S pPHK [104]. Как было показано методом тоу-принта, внесение замен в эту последовательность мРНК приводит к нарушению позиционирования старт-кодона в Р-участке рибосомы при трансляции в бесклеточной белоксинтезирующей системе на основе ЛРК в присутствии Н4 мРНК [104]. Комплементарный h16 триплет H4 мРНК находится с 5'-стороны от специфической структуры, представляющей собой узел трёх стеблей с петлями. Как предположили авторы, эта структура необходима для того чтобы задерживать Н4 мРНК в мРНКнеобходимо связывающем канале при сканировании, что ДЛЯ установления взаимодействия h16 с комплементарным участком этой мРНК, что, в свою очередь, необходимо для правильного позиционирования старт-кодона Н4 мРНК. С помощью крио-ЭМ в этой же работе [104] было показано, что в комплексе 80S рибосом с H4 мРНК узел трёх петель располагается между h16 18S pPHK, белками uS2, uS3 и eS10, что является благоприятным для образования контакта триплета UUC в h16 с H4 мPHK. Было

29

также обнаружено, что старт-кодон мутантной формы H4 мPHK, в которой соответствующий участок перед узлом трёх петель комплементарен триплету h16 18S рPHK не млекопитающих, а дрожжей, не направляется в P-участок при связывании с этими рибосомами. Авторы предположили, что h16 18S pPHK рибосом низших эукариот имеет конформацию, отличную от таковой в рибосомах млекопитающих, в результате чего апикальная часть h16 оказывается неспособной взаимодействовать с мPHK.

Ряд данных, полученных с использованием модельных дицистронных мРНК, в которых две кодирующих последовательности соединены участком, комплементарным фрагменту 18S рРНК, позволили авторам соответствующих работ сделать вывод, что инициация трансляции на второй последовательности происходит без сканирования [99, 102]. В частности, снижение эффективности трансляции первой кодирующей последовательности в результате включения в её 5'-НТО участков, формирующих стабильные шпильки, не влияло на уровень трансляции второй кодирующей последовательности [99, 102]. На основании этих данных авторы упомянутых работ называли комплементарные 18S рРНК последовательности мРНК IRES-элементами.

Однако, как было отмечено в работе [2], рассматривать такие последовательности в качестве IRES-элементов в клетке не вполне корректно. Так, их стимулирующий эффект в модельных системах с дицистронными мРНК достигался, скорее всего, благодаря большому числу копий ДНК-конструкций, кодирующих мРНК с энхансерными последовательностями, тогда как *in vivo* влияние таких последовательностей на трансляцию в клетке может быть незначительным. Таким образом, несмотря на многочисленные данные о способности комплементарных определённым фрагментам 18S рРНК участков в мРНК усиливать трансляцию, механизмы, благодаря которым эти участки стимулируют инициацию трансляции, до сих пор остаются не вполне понятными. Одним возможных объяснений энхансерных свойств мРНК, ИЗ участков комплементарных фрагментам 18S рРНК, может быть то, что взаимодействия этих участков мРНК с рРНК просто приводят к увеличению локальной концентрации 40S субчастиц и связанных с ними факторов инициации вблизи данных участков [103, 105].

1.3.2. IRES-зависимая инициация трансляции

При инициации трансляции геномных РНК некоторых вирусов инициаторный кодон может быть направлен в Р участок 40S субчастицы без сканирования или путём сканирования лишь части 5'-НТО благодаря содержащемуся в них особому участку длиной несколько сотен нуклеотидов - IRES-элементу. Третичная структура IRES-элементов имеет ярко выраженные особенности, специфические для отдельных типов

вирусов. Инициация трансляции IRES-содержащих вирусных РНК начинается с 3'-конца IRES-элемента, который в зависимости от своей структуры образует специфический набор молекулярных контактов с рибосомой; известны также типы IRES, не образующие прямых контактов с рибосомой.

1.3.2.1. Структура IRES-элементов геномных РНК вирусов

По сходству вторичных структур и механизму инициации IRES-элементы подразделяют на несколько классов. IRES-элементы семейства пикорнавирусов родов энтеровирусов и риновирусов относятся к первому (I) классу, а родов кардио- и aphthoвирусов – ко второму (II) классу. В IRES-элементах этих классов содержатся А/С богатые последовательности, а также участки, взаимодействующие с eIF4G, за которыми следует полипиримидиновый тракт, отделённый от AUG вариабельной колона последовательностью. Эти IRES-элементы различаются между собой по расположению AUG кодона, длине пиримидинового тракта, а также по способности транслироваться в бесклеточной белоксинтезирующей системе на основе ЛРК. В РНК вирусов с IRESэлементом I класса первый AUG кодон, входящий в состав IRES, не является стартовым, и их инициация трансляции начинается с кодона, находящегося на удалении 30-160 нуклеотидов от него [106, 107]. IRES-элементы этого класса не способны транслироваться в ЛРК без добавления особых белков, одним из таких белков является поли(С)связывающий белок 2 (PCBP2) [108]. В РНК вирусов с IRES-элементом II класса первый триплет AUG, находящийся непосредственно в 3'-конце IRES-элемента, служит инициаторным кодоном, и такие IRES-элементы, могут транслироваться в ЛРК без дополнительных факторов. IRES-элементы III класса имеют структуру, сходную с таковой у IRES-элементов HCV, свиного тесковируса (PTV-1) и вируса классической свиной лихорадки (CSFV). Эти вирусы, соответственно, относятся к семействам флавивирусов (HCV) и пикорнавирусов (PTV-1). IRES-элементы III класса непосредственно связываются с 40S субчастицей, помещая старт-кодон вблизи Р-участка без сканирования. Инициация трансляции с этих IRES-элементов происходит без участия факторов семейства 1 и 4. IRES-элементы IV класса характерны для дицистровирусов беспозвоночных. Представителями IRES-элементы этого класса являются дицистровирусов паралича сверчка (CrPV) и синдрома Таура (TSV). IRES-элементы IV класса обеспечивают инициацию трансляции в отсутствие факторов инициации и MetтРНК_і [109]. Недавно в отдельный класс V выделены IRES-элементы вирусов семейства пикорнавирусов, относящихся к родам Kobuvirus, Salivirus и Paraturdiviru. Например, вирус Aichi (AV) рода Kobuvirus встречается у собак и человека (вид AVA), у быка, овцы и

хорька (вид AVB), а также у свиньи (вид AVC) (см. работу [110] и соответствующие ссылки в ней). К роду *Salivirus* относится вирус Sali человека и шимпанзе (SV-A), а к роду *Paraturdivirus* принадлежат вирусы turdi птиц (TV2 и TV3) [111]. Для инициации мРНК, содержащих IRES-элементы V класса, кроме факторов инициации и специфичных белков клетки-хозяина, участвующих также при инициации трансляции с IRES-элементов I и II классов, обычно требуется геликаза DHX29 [112].

IRES-элементы I и II классов имеют многопетлевую вторичную структуру. IRESэлементы I класса содержат 5 шпилек, обозначаемых от II до VI, в последнюю часто входит старт-кодон, например, в случае риновируса (RV), хотя он может находиться в одноцепочечном участке, например, в случае энтеровируса быка и полиовируса (PV). Число доменов IRES-элементов II класса (обозначаемых буквами A-L) в некоторых из них достигает 12. IRES-элементы пикорнавирусов ящура (FMDV) и энцефаломиокардита (EMCV), относящиеся к II классу, имеют 9 доменов, обозначаемых как D, E, F, I, G, H, J, K и L; эти IRES активны в инициации даже, если они содержат только домены H, J, K и L [113]. Что касается IRES-элемента вируса гепатита A, относящегося к энтеровирусам, он имеет низкое структурное сходство с IRES-элементами I и II классов, за исключением того, что в нём также присутствует полипиримидиновый тракт на 3'-конце и, кроме того, для инициации трансляции на этом IRES требуются все компоненты фактора eIF4F, что позволяет выделить его в отдельный класс [114].

IRES-элементы III класса отличаются по своей структуре. Например, вторичная структура IRES HCV подразделяется на четыре домена (I-IV), три из которых (II-IV) необходимы для функционирования IRES (рис. 7). Домен III, подразделяемый на 6 петель (IIIa-IIIf), обеспечивает связывание IRES с 40S субчастицей и eIF3. Домен IV содержит старт-кодон AUG и начало кодирующей последовательности. Петля Шf и часть домена IV имеют комплементарные участки, благодаря которым они образуют псевдоузел, направляющий старт-кодон при связывании IRES с 40S субчастицей в район Р-участка [115, 116]. Домен II не вносит вклада в сродство IRES HCV к 40S субчастице [117], но играет критическую роль в его функционировании на последующих стадиях инициации трансляции [118-121]. Вторичные структруры IRES-элементов HCV и пестивирусов, таких как CSFV, вируса пограничной болезни овец и других, имеют высокую степень сходства [122]. При этом домен II у HCV длиннее, чем у CSFV, а петля домена III, формирующая псевдоузел, у CSFV длиннее, чем у HCV, и сформирована не одним, а двумя стеблями. Субдомену IIId HCV IRES у пестивирусов соответствует два субдомена – $IIId_1$ и IIId₂; при этом субдомен IIId₁ пестивирусов и IIId HCV IRES имеют элементы, консервативные у IRES III класса [123]. Субдомен IIId важен для поддержания третичной структуры HCV

IRES и его активности при трансляции [124]. Субдомены IRES IIIa, IIIc и IIIe, а также концевая часть домена II у HCV и пестивирусов имеют не только одинаковую вторичную структуру, но и последовательность регионов, формирующих петли [116].

Вторичная структура IRES-элементов IV класса представляет собой 4 псевдоузла, которые придают им структуру, напоминающую таковую антикодоновой петли тРНК, вовлеченной в комплементарные взаимодействия [125].

IRES-элементы V класса содержат до 11 доменов, A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K и L, представляющие собой как уникальные элементы, так и петли, консервативные или имеющие структурное сходство с элементами IRES I и II классов. Например, домен J имеет крестообразную структуру, сходную со структурой домена IV IRES I класса, но в отличие от домена IV, он не содержит концевой C-богатый участок, способный связывать PCBP2. Общим для IRES I, II и V классов является наличие мотива GNRA, имеющего структуру тетрапетли, которую поддерживает универсальное G-A взаимодействие первого и четвертого нуклеотидов петли, а также присутствие пиримидинового тракта, который отделен от старт-кодона вариабельной последовательностью [112, 126]. Мотив GNRA, где N является любым нуклеотидом, а R - пурином, поддерживает специфичную третичную структуру IRES-элементов, важную для их активности [127]. Консервативными элементами вторичной структуры среди IRES V класса являются домены I, J и K. Домены H и L консервативны у вирусов AV, SV-A, CKoV и MKoV, тогда как у вирусов BKV и TV2/3 домен H вариабелен, а домен L отсутствует.



Рис. 7. Вторичная структура HCV IRES согласно [118]. На структуре обозначены домены IRES; инициаторный триплет AUG подчеркнут.

В настоящем обзоре будут рассмотрены механизмы IRES-зависимой инициации трансляции для наиболее изученных представителей вышеописанных классов.

1.3.2.2. Особенности инициации трансляции мРНК, содержащих HCVподобные IRES-элементы

Наиболее полные данные о взаимодействии IRES-элементов III класса с 40S субчастицей рибосомы и о последовательности событий, приводящих к формированию функционального 80S IC, получены для HCV IRES и сходного с ним CSFV IRES. Эти IRES-элементы связываются с 40S субчастицей без участия факторов инициации по одностадийному механизму [128].

С помощью биохимических подходов, таких как изучение влияния изменений в последовательности IRES на его сродство с 40S субчастице и футпринтинга, были выявлены структурные элементы HCV IRES, обеспечивающие его связывание с 40S субчастицей (данные суммированы в [129]). Было показано, что минимальным элементом IRES, сохраняющим способность связываться с 40S субчастицей является его фрагмент, содержащий псевдоузел и субдомены IIIa, с, d, е и f, при этом нуклеотиды в петле субдомена IIId являются наиболее важными для связывания IRES с 40S субчастицей [130-133]. Мутации в субдоменах IIId и IIIe [117], или сшивание HCV IRES с производными дезоксиолигомеров, комплементарных определённым последовательностям в этих доменах [134], практически полностью лишали IRES способности связываться с 40S субчастицами.

1.3.2.2.1. Рибосомные белки, контактирующие с HCV IRES

Рибосомные белки, соседствующие с HCV IRES в составе его бинарого комплекса с 40S субчастицей, были выявлены вначале с помощью аффинной модификации 40S субчастиц производными HCV IRES, несущими фотоактивируемые группы, либо статистически распределённые по молекуле IRES [135, 136], либо введённые в заданные положения с использованием метода комплементарно-адресованной модификации [9, 10]. Согласно данным аффинной модификации, петля субдомена IIIe (нуклеотид A296) соседствует с белками uS2 (p40), uS7 (S5), eS1 (S3a), и uS9 (S16) [9]; последние два белка – eS1 и uS9, сближены также с субдоменом IIId IRES (с нуклеотидами A275 и G263), который, кроме того, соседствует с uS11 (S14) [10]. Наконец, апикальная часть домена II (C83) находится вблизи белков uS11 и uS9 [10] (таблица 1). Позже данные о белковом окружении HCV IRES на 40S субчастице были расширены с использованием подхода, основанного на исследовании зависимости доступности рибосомных белков для модификации флуоресцентным красителем от связывания 40S субчастицы с HCV IRES IRES или его мутантными формами, лишёнными либо домена II, либо кодирующей последовательности после старт-кодона [137]. Оказалось, что гр eS27 экранирован от модификации красителем в бинарных комплексах со всеми формами IRES, что указывает на вовлечение этого белка во взаимодействие с доменом III IRES [137]. С другой стороны, защиту eS10 (S10) от модификации наблюдали только в случае полноразмерного IRES, и, кроме того, экранированию подвергался белок uS5 (S2)/eS1 (S3a)/RACK1 (или, возможно, все три белка), причём более интенсивно для формы IRES, лишённой кодирующей части. На основании сопоставления полученных результатов с данными о расположении IRES на 40S субчастице, полученные с помощью крио-ЭМ и аффинной модификации, авторы

Контактирующий домен IRES, (конкретный нуклеотид указан в скобках)	Метод, с помощью которого установлен контакт	Контактирующий компонент 40S субчастицы	Ссылка
IIb	аффинная модификация	uS7	[9]
IIb	дрожжевой мутагенез	0525	[138]
IIb (между С67 и G100)	Молекулярное моделирование	es23	[139]
IIId	аффинная модификация	uS11, uS9	[10]
IIIa (G163)	крио-ЭМ	eS27	[140]
IIIc (G233)	крио-ЭМ	eS27	[140]
IIId (G263, A275)	аффинная модификация	eS1, uS11, uS9	[10]
IIId (G266-G268)	Футпринтинг	ES7 18S pPHK	[137, 141]
IIId (G266-G268)	крио-ЭМ		[140]
IIIe (A296)	аффинная модификация	eS1, uS2, uS7, uS9	[9]
IIIe (A295, A296)	крио-ЭМ	ES7 18S pPHK	[140]
IIIf (324-334)	крио-ЭМ	eS28	[140, 142]
IV	Молекулярное моделирование	eS28	[139]
IV	Молекулярное моделирование	uS7	[139]
IV	Молекулярное моделирование	eS26	[139]
	Крио-ЭМ		[142]
IV	Крио-ЭМ	uS11	[142]

Таблица 1. Контакты HCV IRES с 40S субчастицей рибосомы

заключили, что белками, взаимодействующими с доменом III IRES, являлись eS1 и eS27, а с кодирующей частью PHK HCV, входящей в состав IRES – гр eS10 (см. таблицу 1).

Данные крио-ЭМ высокого разрешения, полученные в последние годы, хорошо согласуются с рассмотренными выше биохимическими данными, и кроме того, они позволили выявить новые компоненты рибосомы, контактирующие с каждым из доменов HCV IRES. Анализ этой информации показал, что контакты HCV IRES с рибосомными белками можно подразделить на две группы: контакты, специфичные для IRES, и контакты, характерные как для IRES, так и канонических мPHK. В первую группу входят контакты IRES с белками eS1 (S3a), eS25, eS27, uS2 (S5), uS9 (S16) и uS11 (S14) (см. таблицу 1). Ко второй группе принадлежат контакты белков eS26 и eS28 с доменом IV [139, 142] а гр uS7 - с доменом II IRES, тогда как взаимодействие этого белка с псевдоузлом [142] вблизи старт-кодона (см. таблицу 1) можно отнести к универсальным, поскольку он взаимодействует с нуклеотидом в положении -3 мPHK, соответствующем первому нуклеотиду кодона в Е-участке [15].

Кроме гр uS7, домен II IRES взаимодействует с гр uS11 и S25. Интересно отметить, что гр S25, не вовлечённый в каноническую инициацию, является необходимым для инициации мPHK, содержащих разные типы IRES. Так, было показано, что уровни трансляции мPHK, содержащих IRES HCV и CrPV, заметно падают при пониженном содержании гр S25 в клетке [138]. Аналогичный эффект наблюдали на клетках HeLa с мPHK, содержащими IRES-элемент HCV, CrPV, CSFV или PV [143]. На основании этих данных было сделано предположение о сходстве в механизмах инициации трансляции мPHK, содержащих эти типы IRES [138].

1.3.2.2.2. Роль 18S рРНК в механизме HCV IRES-зависимой инициации трансляции

Поскольку аффинная модификация 40S субчастиц производными HCV IRES выявила только модификацию рибосомных белков [9, 10, 135, 136], была распространена точка зрения, что основную роль при IRES-зависимой инициации трансляции, по крайней мере, на стадии образования его бинарного комплекса с 40S субчастицами, играют рибосомные белки [9, 136]. Однако последующие исследования показали, что 18S pPHK также вовлечена в связывание IRES. Так, с помощью химического футпринтинга было показано, что связывание HCV IRES с 40S субчастицей рибосом вызывает изменения в структуре 18S pPHK [144], а именно, было обнаружено, что IRES защищает от модификации химическими агентами нуклеотиды в триплете CCC ES7 18S pPHK и увеличивает доступность нуклеотида G1639. Оказалось, что для индуцирования изменения доступности G1639 18S pPHK при связывании HCV IRES с 40S субчастицей
важны домен II IRES и старт-кодон, поскольку мутантные формы IRES, лишённые домена II или содержащие триплет UUU вместо старт-кодона, были неспособны вызывать конформационное изменение 18S pPHK в области этого нуклеотида.

Что касается компонентов IRES, защищающих консервативный [145] тринуклеотид ССС в ES7 18S pPHK, то с учётом данных о защите триплета GGG в домене IIId IRES от расщепления РНКазой T1 при связывании 40S субчастицы [117, 130], было сделано предположение о том, что этот триплет образует комплементарные взаимодействия с тринуклеотидом CCC [144]. Ранее было гидроксил-радикалы, показано, что генерированные специально введенными N и C-концевые участки eIF1A, вызывают сильное расщепление региона 18S рРНК в рибосоме кролика, который перекрывается с областью G1639 [59]. Нуклеотид G1639 рРНК 18S рРНК человека инвариантен в рРНК малых субчастиц рибосом всех царств [145] и соответствует G1338 в 16S рРНК E. coli., где он вместе с A1339 взаимодействует с последовательными консервативными G:C парами в антикодоновой петле инициаторных тРНК^{Меt} [146], которые являются характеристической чертой, отличающей их от элонгаторных тРНК. На основании модели РСА бактериальных рибосомных комплексов было сделано предположение, что эти нуклеотиды препятствуют преждевременному перемещению тРНК из Р-участка в Еучасток при инициации и элонгации [147]. Следует отметить, что контакт ES7 18S pPHK с субдоменом IIId IRES в бинарном комплексе был в дальнейшем подтверждён с помощью крио-ЭМ, причём оказалось, что этот сегмент экспансии также взаимодействует с субдоменом IIIе [140]. Авторы упомянутой работы рассматривают ES7 как структурный компонент 40S субчастицы, связывающийся с IRES в первую очередь и критически важный для образования бинарного комплекса. Критическая роль триплета GGG в домене IIId IRES, комплементарного фрагменту ES7 была недавно подтверждена В экспериментах, показавших, что замены в этом триплете лишают HCV IRES способности связываться с 40S субчастицей [141].

1.3.2.2.3 Молекулярные механизмы взаимодействий, происходящих при образовании бинарного комплекса HCV IRES с 40S субчастицами

В работе [144] не только получены данные об участии 18S рРНК в связывании IRES, но и впервые предложено описание на молекулярном уровне событий, происходящих при связывании HCV IRES с 40S субчастицами. Согласно предложенной схеме, вначале IRES связывается с 40S субчастицей благодаря взаимодействию его домена III с рибосомными белками в районе участка выхода мРНК из рибосомы, затем домен IV расплетается, и образуется связь между субдоменом IIId и ES7 18S рРНК, при этом кодирующая часть IRES направляется в мРНК-связывающий канал. При попадании старт-кодона в область рибосомы, которая ответственна за кодон-антикодоновые взаимодействия, он образует контакты с апикальной частью домена II, которые стабилизируются взаимодействием с rp uS7. Все это вызывает перестройки 18S рРНК в области нуклеотида G1639, которые позволяют инициаторной тРНК^{Меt} (в составе TC или в свободной форме в условиях недостатка eIF2) установиться в Р-участке и образовать комплементарные взаимодействия co старт-кодоном IRES. Предположение 0 взаимодействии апикальной части домена II с AUG-кодоном IRES и участии в нем rp uS7, было основано на данных о том, что rp uS7 взаимодействует с доменом II IRES [148], а при канонической инициации трансляции этот белок контактирует с областью мРНК вблизи старт-кодона [15, 149], который в IRES находится в составе домена IV.

Полученные впоследствии данные крио-ЭМ высокого разрешения (3.9 Å) [140, 142] (таблица 1.) позволили более детально представить последовательность событий, сопровождающих образование бинарного комплекса IRES с 40S субчастицами. Было сделано заключение, что принципиально важными для установления кодирующей последовательности РНК НСУ в составе домена IV IRES в мРНК-связывающем канале 40S субчастицы являются комплементарные взаимодействия сегмента экспансии ES7 18S рРНК не только с субдоменом IIId [144], но и с субдоменом IIIе HCV IRES [140]. Другими взаимодействиями, способствующими правильному позиционированию кодирующей последовательности IRES, являются взаимодействия домена IV с белками eS26, uS11 (S14) и eS28 [142], а субдомена IIIf - с гр eS28 [140]. Кроме того, крио-ЭМ модели бинарных комплексов 40S субчастиц и 80S рибосом с HCV IRES [140] позволили понять, каким именно образом домен II IRES осуществляет конформационные перестройки в 40S субчастице, происходящие на первом этапе IRES-зависимой инициации трансляции HCV РНК. Оказалось, что апикальная часть домена II стерически вытесняет rp uS7 из положения, в котором он обычно находится в 80S рибосоме в посттранслокационном состоянии. Сравнение крио-ЭМ моделей 48S PIC дрожжей [26] и комплекса 80S рибосом человека с HCV IRES показало, что eIF2 и апикальная часть домена II IRES взаимодействуют с одним и тем же доменом в центральной части гр uS7, имеющим структуру β-складки [140]. Благодаря этому домен II IRES через взаимодействие с гр uS7 способствует вытеснению eIF2 из комплекса [121].

1.3.2.2.4. Факторы, участвующие в инициации трансляции мРНК, содержащих HCVподобные IRES –элементы

Принято считать, что, в инициации трансляции IRES-элементов III класса участвуют, как правило, всего четыре фактора инициации: eIF2, eIF3, eIF5 и eIF5B [120, 121]. Первым в процесс инициации включается eIF3, служащий посадочной площадкой остальных факторов инициации. Поскольку существуют указания на то, что этот фактор может присутствовать на рибосоме на завершающей стадии элонгации [150] и оставаться связанным с 40S субчастицами после диссоциации рибосом и далее при реинициации, то на первой стадии HCV IRES-зависимой инициации трансляции IRES, по-видимому, образует тройной комплекс 40S•eIF3•IRES. Сопоставление модели тройного комплекса 40S•eIF3•CSFV IRES с моделями комплексов 40S•CSFV IRES и 40S•eIF3 показало, что участки связывания псевдоузла IRES и eIF3 на субчастице в значительной степени перекрываются. В результате этого в таком тройном комплексе eIF3 образует гораздо меньшее число контактов с 40S субчастицей, чем в 43S PIC, формируемом при канонической инициации трансляции [151], и остаётся связанным в комплексе благодаря контактам с IRES, при этом наибольший вклад в связывание этого фактора вносит домен ШЬ IRES [152]. С использованием мутантных форм eIF3, несущих делеции в PHКсвязывающих доменах его субъединиц, было показано, что eIF3a вносит вклад в eIF2зависимое связывание тРНК_і^{Met} в РІС, в то время как eIF3с важна для ассоциации eIF5B с PIC [152]. Следует отметить, что механизмы, посредством которых eIF3a и eIF3c способствуют IRES-зависимой инициации, не являются специфичными для неё, поскольку мутации в этих субъединицах уменьшают эффективность также и канонической инициации трансляции [40].

Несмотря на то, что инициация трансляции HCV-подобных IRES-элементов происходит без сканирования, недавно было обнаружено, что фактор eIF1A влияет на эффективность трансляции мPHK, содержащих такие IRES [153]. Так, в клетках человека снижение уровня eIF1A приводило к уменьшению количества белка, закодированного в мPHK, содержащих в 5'-HTO IRES-элементы HCV или CSFV. При этом эффективность трансляции мPHK, содержащей IRES с мутированным старт-кодоном, увеличивалась при снижении количества eIF1A. Поэтому был сделан вывод, что при инициации трансляции по IRES-зависимому пути этот фактор повышает точность отбора старт-кодона, то есть, выполняет те же функции, что и при инициации трансляции по каноническому пути. При этом оказалось, что вклад в эффективность связывания eIF1A в PIC вносит домен II IRES, поскольку его делеция значительно снижала уровень связывания фактора. Кроме того, в обсуждаемой работе было показано, что для инициации трансляции по IRES-зависимому

и каноническому путям важны разные домены eIF1A. Так, оказалось, что для трансляции в ЛРК канонической мРНК достаточно только С-домена eIF1A, тогда как стимулирующее влияние на IRES-зависимую трансляцию оказывает только полноразмерная форма этого фактора. Авторы работы [153] предположили, что влияние этого фактора на IRESзависимую инициацию трансляции связано с его функциями, не относящимися к сканированию, такими как стабилизация тРНК_i^{Met} в Р-участке и стимулирование связывания eIF5B [154].

В заключение стоит отметить, что ассоциация субчастиц, индуцированная eIF5B, при IRES-зависимой и канонической инициации трансляции, по-видимому, происходит по одному и тому же механизму.

1.3.2.2.5. Факторы инициации, участвующие в HCV IRES-зависимой инициации трансляции по eIF2-независимому пути

Падение скорости трансляции большинства клеточных мРНК в условиях стресса, например, нехватки аминокислот, окислительного стресса и теплового шока, вызвано активацией протеинкиназ, фосфорилирующих eIF2 α [155], в результате чего фосфорилированный фактор теряет способность участвовать в обмене GDP на GTP и тем самым повторно участвовать в инициации. В этих условиях инициация трансляции вирусных мРНК, содержащих IRES элемент типа HCV, происходит по eIF2-независимому пути, при котором тРНК^{Met} доставляется в P-участок с помощью eIF5B и eIF3 [156], либо специальными белками: eIF2D [157] или eIF2A [158]. Понижение уровня активного eIF2 приводит к повышению количества свободной тРНК^{Met}, что приводит к увеличению эффективности трансляции мутантной формы IRES с удалённым триплетом GCC в домене II, который неактивен в обычных клетках вследствие того, что не способен вытеснить eIF2 из PIC [121].

В первом случае eIF5B в комплексе с GTP доставляет Met-тPHK^{Met} в P-участок комплекса 40S•IRES. GTP необходим для обеспечения правильной конформации eIF5B, но его гидролиз не является обязательным для дальнейшего образования функционального 80S IC [159]. Тот факт, что eIF3 стимулирует процесс eIF2-независимой инициации трансляции, авторы данной работы объясняют его способностью связывать PHK (в данном случае, фрагменты IRES) и рибосому [160].

Во втором случае белок eIF2D непосредственно доставляет Met-тPHK_i^{Met} в Pучасток рибосомы [161]. Следует отметить, что eIF2D может направлять в P-участок даже деацилированную тPHK_i^{Met}. Этот белок содержит два домена, один из которых гомологичен участку в eIF1, отвечающему за стабилизацию состояния P_{out} в предынициаторных комплексах, а второй содержит РНК-связывающий мотив, относящийся к семейству ферментов, которые пост-транскрипционно модифицируют тРНК [159, 162].

Фактор eIF2A, белок массой 65 кДа, присутствует как в низших, так и в высших эукариотах. Этот белок в условиях недостатка eIF2 специфически стимулирует инициацию трансляции только с тех IRES, которые относятся к типу IRES HCV [158]. Однако данные о механизмах его стимулирующего действия на инициацию, а именно, на тРНК^{Меt} рибосому инициаторную остаются его способность доставлять на противоречивыми. Согласно данным работы [161] eIF2A не способен связывать тРНК, но в последующей работе [158] показано, что eIF2A может специфически взаимодействовать как с аминоацилированной, так и деацилированной тРНК^{Met}, а также с IRES. Наиболее эффективно eIF2A связывается с фрагментом 229-280 HCV IRES, в который входят домены IIIс-IIId. Мутантная форма IRES, лишённого домена IIId, теряла способность связывать eIF2A и, соответственно, осуществлять трансляцию в условиях недостатка eIF2, сохраняя при этом сродство к eIF3 [158]. Причина противоречий в данных о тРНКсвязывающей способности eIF2A остается неясной. Недавно появились данные, показывающие, что снижение уровня eIF2A и eIF2D в клетках человека не влияет на эффективность трансляции HCV IRES [153]. Авторы сделали предположение, согласно которому IRES способен доставлять тРНК;^{Меt} в РІС без помощи факторов инициации eIF2A, eIF2D и eIF3. Так, для SPV9 IRES, относящегося к III классу, ранее было показано, что Met-тРНКі может доставляться в Р-участок РІС в отсутствии eIF2 и eIF3, причём её связывание стабилизируется в присутствии eIF1A [163].

1.3.2.3. Механизм инициации трансляции РНК, содержащих CrPV-подобные IRES-элементы

IRES-элементы IV класса, характерные для дицистровирусов беспозвоночных, осуществляют сборку функционально активных 80S рибосом без участия факторов инициации. Эти IRES способны связывать как 40S субчастицу, так и 80S рибосому, и направлять первый кодон кодирующей части мРНК в А-участок благодаря тРНКобразному структурному элементу, связывающемуся в этом участке [164]. Наиболее изученным представителем этого класса является IRES CrPV. Канонические факторы инициации ингибируют CrPV IRES-зависимую инициацию: так, было показано, что в белоксинтезирующей системе из экстракта дрожжей эффективность трансляции мРНК, содержащих CrPV IRES, увеличивается при снижении уровня функционально активного eIF2 [165], а присутствие eIF1, eIF1A и eIF3 препятствует ассоциации субчастиц при инициации трансляции таких мРНК [166].

К настоящему времени накоплено большое количество данных о контактах CrPV IRES с рибосомой, необходимых для его функционирования. Поскольку в процессе функционирования IRES этого типа его тРНК-образный структурный элемент, псевдоузел I (PK I) (рис. 8А), связывается в А-участке рибосомы, следует ожидать, что он взаимодействует с компонентами рибосомы, ответственными за декодирование. Соответствующие контакты недавно были установлены с помощью крио-ЭМ [167].



Рис. 8 Строение IRES CrPV и схема инициации трансляции РНК дицистовирусов. А, вторичная структура CrPV IRES. Дугами обозначены участки CrPV IRES, взаимодействующие с компонентами рибосомы. Цветом обозначены домены IRES, псевдоузлы выделены жёлтым [168]. Б, третичная структура CrPV IRES, на которой стрелками указано направление сдвига доменов IRES при транслокации PK I CrPV IRES из А-участка в Р-участок [167]. Сиреневый цвет соответствует состоянию после транслокации, синий цвет – до транслокации. В, схема инициации трансляции PHK дицистовирусов, на которой отмечены участки рибосомы, связывающие CrPV IRES [168].

В частности, было показано, что PKI CrPV IRES в составе его бинарного комплекса с рибосомой контактирует с нуклеотидами A1824, A1825 и G626 (A1492, A 1493 и G530 по нумерации 16S pPHK *E.coli*) спирали h44 18S pPHK и с rp uS12, играющими ключевую роль в организации декодирующего центра. Образование этих контактов приводит к тому, что часть CrPV IRES, предшествующая PKI, располагается между Р- и Е-участками [164, 167]. При этом первый нуклеотид инициаторного аланинового триплета CrPV IRES в Аучастке контактирует с нуклеотидом C1331 (C1054 по нумерации 16S pPHK E.coli) h34, который при каноническом декодировании взаимодействует с первым нуклеотидом антикодона тРНК в кодон-антикодоновом дуплексе. В случае CrPV IRES C1331 повернут вокруг гликозидной связи, что и позволяет ему контактировать с первым нуклеотидом старт-кодона, а не антикодона тРНК. После присоединения большой субчастицы к комплексу CrPV IRES•40S элонгационный фактор eEF2 дестабилизирует взаимодействия двух консервативных аденозинов в основании h44 18S pPHK с PKI, вызывая транслокацию, в результате которой PKI перемещается в Р-участок (рис. 8Б). А-участок при этом освобождается для связывания аланил-тРНК, соответствующей кодону Ala CrPV IRES, оказавшемуся в А-участке (рис. 8В). Транслокация CrPV IRES является обратимой [169] и может с низкой эффективностью происходить самопроизвольно без eEF2, а связывание аланил-тРНК в А-участке сдвигает равновесие в сторону транслоцированного состояния. После связывания аминоацил-тРНК в А-участке переместившийся в Р-участок РКІ оказывается неспособным полностью заменить контакты, которые образует тРНК в этом участке [169], поэтому происходит дальнейшая транслокация, в результате которой в А-участке оказывается второй кодон CrPV мРНК, следующий за аланиновым кодоном (рис. 8В).

1.3.2.4. Механизм инициации трансляции РНК, содержащих PV-подобные IRES-элементы

Для инициации трансляции мРНК, содержащих IRES-элементы I класса, необходимы факторы инициации eIF2, eIF3, eIF4A и eIF4G, а также транс-активирующие факторы трансляции (ITAFs), содержащие PHK-связывающие домены, – PCBP2 (от англ. poly(C) binding protein 2), PTB (от англ. polypyrimidine binding protein) и глицил-тPHKсинтетаза [170-175]. Эффективность инициации трансляции на таких IRES-элементах увеличивается в присутствии eIF1A и eIF4B [176, 177]. Различные субдомены концевой части петли домена IV IRES-элементы I класса (см. рис. 9) связывают К-гомологичные PHK-связывающие домены (КН-домены) PCBP2 [178-180], что придает этой петле стабильную конформацию, необходимую для функциональной активности IRES [177]. В первичной структуре PV IRES участок связывания PCBP2 расположен рядом с местом связывания eIF3, как показали данные химического футпринтинга IRES с использованием гидроксил-радикал-генерирующих групп, введённых по определённым положениям в PCBP2 eIF3 [177]. Было сделано предположение, или ЧТО PCBP2 может взаимодействовать с eIF3 и способствовать его связыванию с IRES. У PV-подобных IRES полипиримидиновый тракт, с которым связывается РТВ, расположен в одноцепочечном участке, примыкающем к домену V, и частично в самом этом домене, с которым также взаимодействует центральный домен eIF4G [181]. В частности, с помощью гидроксилрадикального футпринтинга PV-1 IRES показано, что места связывания PTB и eIF4G в его домене V (см. рис. 9) частично перекрываются, что приводит к взаимному влиянию этих белков на их связывание с IRES [181]. На основании этих данных сделано предположение, что РТВ стимулирует функциональную активность IRES путём индуцирования его связывания с eIF4G в положении и ориентации, оптимальных для последующей эффективной доставки к старт-кодону 43S PIC [181]. Присоединение eIF4G к домену V IRES-элемента является принципиально важной стадией инициации, поскольку связанный



Рис. 9. Вторичная структура PV IRES согласно [177]. На структуре обозначены домены IRES. В рамке, обведённой пунктирной линией, представлена увеличенная структура домена VI, содержащего первый триплет AUG (выделен рамкой).

с этим фактором eIF4A расплетает петлю домена VI, где расположен старт-кодон; при этом инициация трансляции не начинается с первого AUG-кодона, находящегося в петле этого домена, возможно, из-за того что содержащий его участок не расплетается

полностью. Тем не менее, этот первый AUG-кодон важен для инициации трансляции на PV-подобных IRES-элементах, потому что мутация в нём существенно снижает эффективность трансляции содержащей такой IRES мPHK [107]. Как предположили авторы [107], этот AUG-кодон способствует увеличению эффективности связывания 43S комплекса с IRES-содержащей мPHK с последующим её сканированием до достижения следующего старт-кодона. Полное расплетание петли домена VI в процессе инициации трансляции, по-видимому, не требуется, о чем свидетельствует тот факт, что функциональная активность мутантных форм IRES-элемента риновируса HRV-2, у которых вышеупомянутая шпилька менее стабильна, чем у IRES-элемента дикого типа, и должна расплетаться полностью, не отличается от таковой IRES-элемента дикого типа [107]. Стимулирующая роль eIF1 при инициации трансляции на PV-подобных IRES-элементах заключается в том, что он предотвращает инициацию на первом старт-кодоне, находящемся в «плохом» контексте; при этом в отсутствие eIF1 эффективность инициации трансляции с первого AUG-кодона выше на IRES-элементах с менее стабильной шпилькой домена VI [177].

Специфичным ITAF для PV является глицил-тРНК-синтетаза, в отсутствие которой, как было показано методом тоу-принта, не образуется 48S PIC ни на одном AUG-кодоне PV IRES [175]. Глицил-тРНК-синтетаза связывается с частью домена V PV IRES с 5'-стороны от участка связывания eIF4G. Этот участок домена V имеет вторичную структуру, сходную со структурой антикодонового стебля тРНК^{Gly} и содержит в концевой петле триплет ACC, соответствующий глициновому кодону. PV IRES, в котором ACC триплет заменен, не способен связывать глицил-тРНК-синтетазу [175]. Для связывания с глицил-тРНК-синтетазой достаточно фрагмента PV IRES длиной 35 нуклеотидов, содержащего петлю с триплетом АСС. Этот фрагмент связывается с антикодонсвязывающим доменом глицил-тРНК-синтетазы [182]. Как было показано с помощью выравнивания нуклеотидных последовательностей IRES-элементов вирусов 1 класса, в домене V всех IRES-элементов содержится петля, образованная 6 нуклеотидами и включающая последовательность СС [175]. Два остатка цитидина в антикодоновой петле тРНК^{Gly} важны для её распознавания глицил-тРНК-синтетазой, поэтому их наличие в петле IRES-элементов вирусов 1 класса является указанием на то, что их IRES-элементы способны связывать глицил-тРНК-синтетазу. Так, например, глицил-тРНК-синтетаза была найдена среди белков, способных связываться с 5' НТО РНК энтеровируса EV7 [183], хотя сами авторы упомянутой работы не обратили никакого внимания на этот факт. Хотя к настоящему времени не удалось установить, каким образом глицил-тРНК-синтетаза способствует инициации трансляции РНК, содержащих IRES-элементы 1 класса, сделано предположение, что в результате её взаимодействия с другими ITAF в составе комплекса с IRES и 40S субчастицами первый AUG кодон направляется в мРНК-связывающий канал, после чего происходит сканирование этой РНК [175].

1.3.2.5. Механизм инициации трансляции РНК, содержащих EMCV-подобные IRES-элементы

Для трансляции мРНК, содержащих IRES-элементы II типа (EMCV-подобные IRES), кроме большинства факторов инициации, требуются также ITAFs, которые стабилизируют «правильную» конформацию IRES и образуют дополнительные связи между рибосомой и IRES [184]. К ITAFs, активирующим трансляцию IRES элементов пикорнавирусов, относятся PHK-связывающий белок La и полипиримидин-трактсвязывающий белок PTB, которые участвует в активации IRES-элементов полиовирусов [185]. PTB также необходим для активации IRES-элементов риновирусов [186]. Для инициации трансляции IRES-элементов II типа не обязательно наличие eIF1 и eIF1A, а из факторов инициации 4 группы требуются только eIF4A и eIF4G. Эти факторы связываются с доменами J, K и L EMCV-подобных IRES (рис. 10). PHK-связывающие домены 1 и 2 PTB взаимодействуют с доменом K IRES, а домены 3 и 4 - с доменом H и прилегающей к нему частью домена I с 5'-стороны центрального участка IRES [187].

Недавно были получены данные, указывающие на то, что EMCV IRES способен связываться также с 40S субчастицами [188]. С помощью метода химического футпринтинга были найдены нуклеотиды EMCV IRES в петле G стебля, домене H и центральной части домена I, экранированные от действия алкилирующих агентов в присутствии 40S субчастиц [188] (рис. 10). Данные о защите этих нуклеотидов рРНК от модификации свидетельствуют об их вовлечении в связывание с 40S субчастицами, однако эти данные не являются прямым доказательством их контактов с рибосомой, поскольку экранирование этих нуклеотидов могло быть следствием конформационных перестроек в субчастице, вызванных её взаимодействием с другими районами IRES. В обсуждаемой работе также получены данные, указывающие на способность EMCV IRES позиционировать старт-кодон вирусной мРНК вблизи Р-участка рибосомы в бинарном комплексе, однако оказалось, что расположение старт-кодона на рибосоме менялось при изменении кодирующей последовательности, следующей за IRES [188]. Поэтому был сделан вывод о том, что EMCV-подобные IRES элементы не способны сами корректно позиционировать старт-кодон в Р-участке, и для инициации трансляции содержащих их мРНК требуется eIF4G. Этот фактор, связываясь с IRES и с 40S субчастицей, направляет кодирующую часть, следующую за IRES-элементом II типа, в мРНК-связывающий канал,

и располагает eIF4A в непосредственной близости от старт-кодона IRES, в результате чего этот фактор расплетает окружающие старт-кодон элементы вторичной структуры мРНК [50].



Рис. 10. Вторичная структура IRES EMCV; домены, ответственные за связывание 40S субчастиц и eIF4G, обозначены соответственно синим и зеленым цветом [168].

Следует отметить, что некоторые вирусы, содержащие IRES-элементы I и II класса, могут продуцировать протеазы, специфически расщепляющие eIF4G [189] например, протеазу L, которую кодируют многие вирусы, содержащие IRES-элементы II класса, в том числе FMDV [190]. Расщепление eIF4G такими протезами приводит к удалению N-концевого домена, ответственного за связывание eIF4E, при этом сохраняется способность фактора связывать eIF4A и eIF3. Кроме того, инициация трансляции мPHK вирусов, содержащих IRES-элементы II класса, может проходить по пути, отличному от вышеописанного механизма, при котором требуется фактор eIF2. В условиях, вызывающих фосфорилирование eIF2 и соответственно ингибирование трансляции мPHK, содержащих IRES-элементы II класса. Это указывает на способность данной протеазы выполнять функции eIF2 при инициации трансляции мPHK, содержащих такие IRES-элементы [191].

1.3.2.6. Механизм инициации трансляции РНК, содержащих Aichi-подобные IRES-элементы

Для инициации трансляции мРНК, содержащих IRES-элементы V класса, требуются факторы eIF2, eIF3, eIF4A и eIF4G, а также PTB. Домен K в IRES V класса

содержит в концевых участках мотив, присутствующий также в концевой части домена Ј в IRES II класса, который отвечает за связывание eIF4G [192] (см. рис 10). Центральный регион домена К является уникальным для IRES V класса; в этом регионе, а также в домене I расположены фрагменты полипиримидинового тракта, с которым связывается РТВ [192]. Как и у IRES I класса, участки связывания РТВ и eIF4G в первичной структуре IRES V класса расположены рядом [112], поэтому роль РТВ при инициации трансляции на IRES этого класса может также сводиться к индуцированию связывания eIF4G с IRES в конформации, благоприятной для доставки 43S PIC к старт-кодону [112]. На это указывает тот факт, что связывание РТВ с комплексом IRES•eIF4A•eIF4G приводит к конформационным изменениям IRES, проявляющимся в увеличении доступности нуклеотидов возле старт-кодона для модификации производным карбодиимида [112]. Высокая консервативность домена L, представляющего собой шпильку (см. рис. 11), среди IRES V класса указывает на её функциональную значимость в процессе инициации трансляции на этих IRES. Однако внесение мутаций, нарушающих стабильность петли этой шпильки, не снижает, а увеличивает эффективность трансляции соответствующих мРНК в ЛРК и делает её независимой от присутствия DHX29 [192]. Таким образом, назначение шпильки L в IRES V класса остаётся неизвестным.



Рис. 11. Вторичная структура Aichivirus IRES согласно [112]. На структуре обозначены домены IRES; инициаторный триплет AUG выделен рамкой

1.4. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КОМПЛЕКСОВ, ОБРАЗУЮЩИХСЯ В ПРОЦЕССЕ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ

1.4.1. Участки связывания факторов инициации на 408 субчастице рибосомы1.4.1.1. Участки связывания eIF1 и eIF1A

Первые данные о расположении участка связывания eIF1 на 40S субчастице были получены с помощью метода футпринтинга [193]. Эти данные показали, что eIF1 защищает от атаки гидроксил-радикалами спираль h24 18S рРНК вблизи Р-участка. В дальнейшем взаимодействия этих факторов с 40S субчастицами были изучены как с помощью РСА [5, 194], так и с помощью крио-ЭМ [6, 26, 195]. Рентгеноструктурная модель комплексов 40S субчастиц рибосом высших эукариот (кролика) с очищенными рекомбинантными факторами eIF1 и eIF1A (разрешение 7-9 Å), описанная в работе [5], дала детальную информацию об участке связывания этих факторов на 40S субчастице, которая позже была подтверждена соответствующими крио-ЭМ исследованиями [6, 26]. модели, участок связывания eIF1 действительно Согласно этой значительно перекрывается с Р-участком рибосомы; в частности, eIF1 взаимодействует с основанием спирали h44, а также со спиралями h24 и h45 18S pPHK, расположенными в P-участке или в непосредственной близости от него. Следует отметить, что участок связывания eIF1 перекрывается с районами 40S субчастицы, участвующими в формировании двух межсубъединичных мостов, поскольку основание спирали h44 и спираль h24 вовлечены, соответственно, в образование мостов B2a и B2b [196]. Таким образом, вышеизложенные данные позволили понять, почему eIF1 препятствует преждевременной ассоциации рибосомных субчастиц и переходу инициаторной тРНК в состояние Pin, в котором вся молекула тРНК оказывается в Р-участке.

Фактор eIF1A, как и eIF1, взаимодействует с основанием h44 18S pPHK, но при этом участки связывания двух факторов не перекрываются. В этом взаимодействии участвует N-концевой домен eIF1A, который вовлекается также в связывание с гр eS30 (S30e) и гр uS12 (S23) - компонентами участка декодирования [5], что объясняет, почему eIF1A препятствует связыванию аминоацил-тРНК в А-участке рибосомы. Этот же домен eIF1A взаимодействует с антикодоновой петлей инициаторной тРНК и с нуклеотидом мРНК в положении +4 относительно аденина старт-кодона [6].

1.4.1.2. Участок связывания тройного комплекса eIF2•GTP•Met-тPHK_i

Крио-ЭМ модель 48S PIC рибосом дрожжей [6] показала, что при связывании TC с 40S субчастицей у eIF2α образуется большее число контактов с Met-тPHK_i, чем у

соответствующей субъединицы eIF2 в TC архей, рентгеноструктурная модель которого была получена ранее [197]. В частности, домен D1 eIF2α взаимодействует с Т-стеблем Met-тРНК^{Met}, домен D2 взаимодействует с Т- и D-петлями инициаторной тРНК, а домен D3 взаимодействует с её акцепторным стеблем. Субъединица eIF2α на 40S субчастице располагается так, что её домен D1 сближен с нуклеотидом в положении -3 мРНК, и занимает место, в котором находится антикодоновая петля тРНК в Е-сайте после транслокации [6]. Этот домен взаимодействует также с центральным доменом гр uS7, имеющим структуру β-складки, и с гр uS14 [198]. Серин 51 eIF2a, фосфорилирование которого приводит к инактивации фактора (см. раздел 1.3.2.2.5), также расположен вблизи мРНК [6]. Это объясняет механизм активации трансляции мРНК определенных белков при фосфорилировании eIF2α [199], поскольку эта модификация приводит к отдалению соответствующего участка eIF2a от мРНК и, вследствие этого, к уменьшению специфичности распознавания контекста старт-кодона [6], что, в свою очередь, должно повышать вероятность инициации трансляции мРНК белков с неоптимальным контекстом. Домен D2 eIF2a контактирует участком Lys134-Ala141 в a-спирали с Nконцевым доменом rp eS1, находящегося вблизи участка выхода мРНК [198]. Авторам [6] не удалость достоверно картировать eIF2 γ и eIF2 β на 40S субчастице рибосомы из-за их конформационной подвижности. Положения этих субъединиц eIF2 на 40S субчастице были определены путём наложения структуры свободного археального ТС [200, 201] на модель 48S PIC. Оказалось, что положение eIF2 ие согласуется с данными футпринтинга, показывающими, что домен III eIF2 γ защищает h44 в дрожжевом комплексе 40S•TC•eIF1A от атаки гидроксил-радикалами [202]. Данное противоречие авторы работы [6] объяснили что расщепление h44 гидроксил-радикалами, генерированными специально тем. введенной в eIF2 у химической группой, наблюдавшееся в [202], могло происходить в результате того, что гидроксил-радикалы вначале попадали в раствор, а затем атаковали доступную часть h44 из него. Следует отметить, что в появившейся недавно работе [26] удалось картировать большую часть eIF2β и показать, что в состоянии Pout наличие контактов Phe217 и Gln221 eIF2^β с Phe108 eIF1 является важным для стабилизации сканирующего состояния, поскольку нарушающие его аминокислотные замены приводят к уменьшению точности отбора старт-кодона [203].

1.4.1.3. Участок связывания eIF3

Структуру 48S PIC рибосом млекопитающих, содержащего все субъединицы eIF3, до сих пор не удалось расшифровать ни с помощью крио-ЭМ, ни с помощью PCA. Однако

недавно была получена крио-ЭМ модель комплекса 40S субчастиц рибосом кролика с eIF3 (не содержащим субъединицу eIF3j) и с DHX29, в которой были разрешены на уровне полипептидных цепей большинство субъединиц eIF3 и определены их контакты с компонентами 40S субчастицы [38]. Согласно этой модели (рис. 12A), субъединицы a, c, d и b фактора eIF3 имеют прямые контакты с 40S субчастицей, список этих контактов приведён в таблице 2.

Вышеупомянутая модель имеет множество отличий от структурной модели рибосомного комплекса дрожжей 40S•eIF1A•eIF1•eIF3 [204] (рис. 12Б), что может быть связано с отсутствием некоторых субъединиц eIF3 у дрожжей и наличием в этом комплексе eIF1, который поддерживает сканирующее состояние (P_{out}) рибосомы. В частности, в данном комплексе C-концевой домен eIF3a образует контакт с гр uS2, которого не обнаружили в бинарном комплексе eIF3 с 40S субчастицей рибосомы кролика. Следует отметить, что по данным сайт-направленного мутагенеза с гр uS2 (S0A) связывается регион 200-400 в N-концевом домене eIF3a [47, 205]. Несоответствие этих результатов данным крио-ЭМ [204], возможно, связано с тем, что мутантная форма eIF3a, использованная в [205], из-за делеции 200 N-концевых аминокислотных остатков могла иметь изменённую конформацию и вследствие этого оказаться не способной к связываению с 40S субчастицами.

Субъединица eIF3	Компоненты 40S субчастицы	
	Рибосомные белки	Структурные элементы и нуклеотиды 18S рРНК
eIF3a	eS1, eS26	U1114, U1115 (ES7)
eIF3c	eS27, uS15	G1121, U1120, A1119 (ES7) C930, G929, G928 (h22)
eIF3b	eS4	верхняя часть ES6A
eIF3d	uS7, uS9, eS28 RACK1	

Таблица 2. Контакты между субъединицами eIF3 и 40S субчастицей рибосомы [38, 198].

Кроме того, в комплексе с 40S субчастицей рибосомы дрожжей димер eIF3a•eIF3c смещен в сторону её внешней поверхности по сравнению с положением соответствующего димера в модели комплекса eIF3 с 40S субчастицей рибосомы кролика, так что PCI домен eIF3a оказывается расположенным на рибосоме вблизи участка выхода мPHK (рис. 12). Контакты eIF3b с гр uS4 и сегментом экспансии ES6A 18S pPHK обнаружены в обеих моделях [38, 204], тогда как взаимодействия двух спиралей «крылатого домена» eIF3b с h16 - только в модели с 40S субчастицей рибосомы дрожжей

51

[204]. Эта субъединица eIF3 расположена вблизи участка входа мРНК и взаимодействует с DHX29, присутствующим в модели комплекса 40S субчастиц рибосом кролика с eIF3, который также контактирует с uS4 [38]. В модели дрожжевого комплекса 40S•eIF1A•eIF1•eIF3 удалось определить контакты субъединицы eIF3j [204], которая отсутствовала в бинарном комплексе eIF3 с 40S субчастицей рибосомы кролика [38]. Оказалось, что eIF3j взаимодействует с PHК-связывающим доменом eIF3b и компонентами 40S субчастицы, расположенными в области мРНК-связывающего центра, - гр uS30 и гр uS12; участие гр uS12 в связывании eIF3j было выявлено ранее с помощью сайт-направленного мутагенеза [206]. Расположение eIF3j на 40S субчастице дрожжей частично перекрывается с участком связывания DHX29 в модели рибосом кролика, что позволило авторам [204] сделать предположение об антикооперативности связывания eIF3 и DHX29 в 48S PIC. Эффект антикооперативности наблюдали также для связвывания eIF3j и eIF1A с 40S субчастицами кролика [207], однако, эти данные не вполне согласуются с более поздними данными крио-ЭМ модели дрожжевого комплекса [204], поскольку в этой модели эти факторы контактируют друг с другом, но их участки связывания не перекрываются.



Рис. 12. Расположение eIF3 (не содержащего eIF3j) на 40S рибосомной субчастице по данным крио-ЭМ. (А), бинарный комплекс eIF3 с 40S субчастицей рибосомы кролика [38]. (Б), комплекс eIF1, eIF1A и eIF3 с 40S субчастицей рибосомы дрожжей [204].

1.4.1.4. Участки связывания eIF5B и eIF5

К настоящему времени благодаря крио-ЭМ получено детальное представление о структуре участка связывания eIF5B в комплексах типа 80S IC, образованных в присутствии негидролизуемого аналога GTP на модельных канонических мPHK [208, 209] или на HCV IRES [210]. Данные вышеупомянутых работ позволили понять, каким образом взаимодействия eIF5B с Met-тPHK_i^{Met} и рибосомой позволяют ему осуществлять свои функции (см. раздел 1.2.6). Оказалось, что домен III eIF5B, который связан через αспираль с доменом IV фактора, (спираль α12, см. рис. 4) взаимодействует с гр uS12. Вместе с доменом IV домен III располагается на межсубъединичной поверхности 40S субчастицы, а G-домен, отвечающий за GTРазную активность eIF5B, взаимодействует с P стеблем 60S субчастицы (эквивалент L7/L12-стебля бактериальной 50S субчастицы) и сарцин-рициновой петлей 28S рРНК в районе GTPаза-активирующего центра [208]. При этом Met-тРНК^{, Met} образует множественные контакты с eIF5B, а именно, A76 в CCA-конце Met-тРНК^{Met}, фосфаты в акцепторном стебле и сложноэфирная связь остатка метионина, а также специфичная для тРНК;^{Меt} комплементарная пара А1-U72 взаимодействуют с доменом IV eIF5B [209]. Обнаружение контактов между комплементарной парой A1-U72 и eIF5B впервые позволило объяснить функциональную роль этой пары, являющейся одной из характерных черт инициаторных тРНК, отличающих их от элонгаторных тРНК. Показано, что Met-тРНКі^{Met} взаимодействует с eIF5B только до тех пор, пока она находится в конформации, соответствующей стадии инициации (состояние P/I), а после ассоциации субчастиц акцепторный конец тРНК перемещается в пептидилтрансферазный центр (ПТЦ), что соответствует его сдвигу на 20 Å.

Наконец, было обнаружено, что при взаимодействии с рибосомой регуляторных регионов G-домена eIF5B, а именно районов switch 1 (положения 432-443 в нумерации eIF5B дрожжей) и switch 2 (положения 476-494) (рис. 4), происходит глобальная конформационная перестройка фактора [67], приводящая к активации его GTP-азной активности. Наиболее ярким проявлением этой перестройки является резкое смещение домена IV – его поворот на 65°, необходимый для достижения контактов eIF5B с CCA-концом инициаторной тPHK (рис. 13).

Дополнительные данные о контактах компонентов рибосомы млекопитающих с eIF5B были получены из крио-ЭМ модели комплекса 80S IC рибосом кролика, собранного на HCV IRES в отсутствие eIF2 [210]. Оказалось, что этот комплекс существует в двух конформациях, отличающихся поворотом 40S субчастицы на 6° вокруг её главной оси относительно 60S субчастицы. Этот поворот аналогичен тому, что происходят при переходе рибосомы из претранслокационного состояния в посттранслокационное, поэтому соответствующие конформации были названы Pre-like и Post-like. Было обнаружено, что в обоих состояниях домен I eIF5B взаимодействует с h14 и с гр uL23, а также вместе с доменом III контактирует с гр uS12. Наличие контакта между доменом III и гр uS12 согласуется с рассмотренной выше моделью [208]. В Post-like состоянии eIF5B



Рис. 13. Конформационные изменения в eIF5B, индуцируемые взаимодействием регуляторных участков его G-домена с рибосомой при образовании 80S IC согласно данным [67]. Направление смещения домена IV eIF5B вместе с α-спиралью 12 (см. рис. 4), вызванного связыванием eIF5B с рибосомой, указано стрелкой.

образует меньше связей с компонентами 60S субчастицы, чем в Pre-like, в частности, отсутствуют контакты Р стебля (rp uL11) 60S субчастицы с N-концевым доменом eIF5B (доменом I, рис. 4), а также контакт сарцин-рициновой петли (H95) с G-доменом и связанной с ним α-спиралью eIF5B. Однако в этом состоянии домен IV образует новый контакт с H92, что способствует, как предположили авторы, переводу Met-тPHK_i^{Met}, связанной с этим доменом, из состояния Р/І в промежуточное состояние между ним и состоянием Р/Р, которое инициаторная тРНК принимает в начале первого цикла элонгации. Несоответствия между моделями 80S IC рибосом дрожжей и млекопитающих, собранных на модельной канонической матрице [208] и на HCV IRES [210] соответственно, как полагают авторы работы [210], могут быть связаны как с различием между комплексами низших и высших эукариот, так и особенностями инициации трансляции на HCV IRES. На сегодняшний день, участок связывания eIF5 на рибосоме достоверно не установлен. В работе [6] электронная плотность между eIF2 и eIF1 была отнесена к eIF5 на основании данных о взаимодействии между этими факторами в процессе инициации. В этой работе предполагают, что такое расположение eIF5 сохраняется в процессе сканирования, поскольку после его окончания С-концевой домен eIF5 должен принять конформацию, которая позволяла бы ему контактировать с eIF2β (см. раздел 1.2.5).

1.4.2. Конформационные перестройки рибосом, происходящие в процессе канонической инициации трансляции

Во многих случаях переход рибосомы из одного функционального состояния в другое сопровождается структурными перестройками в её субчастицах. В данной главе

будут рассмотрены изменения, затрагивающие рибосомные компоненты на каждом этапе инициации.

1.4.2.1. Перестройки, происходящие на стадии образования 43S и 48S PIC

В работе [5] с помощью РСА были изучены три модельных комплекса 40S субчастиц кролика, имитирующие различные стадии инициации трансляции, что позволило получить представление о роли eIF1 и eIF1A при связывании тPHK_i^{Met} с 40S субчастицей. Один из них представлял собой комплекс 40S субчастиц с eIF1, второй комплекс 40S с eIF1 и eIF1A, моделирующий 43S PIC, а третий – комплекс 40S с eIF1A, тРНКі^{Меt} и мРНК, имитирующий 48S PIC. Было показано, что участок связывания eIF1 на 40S субчастице в отсутствие инициаторной тРНК частично перекрывается с участком связывания антикодоновой петли и D стебля тРНК_і^{Меt} в 48S PIC, что объяснило, почему eIF1 препятствует переходу 43S PIC в P_{in} состояние, в котором тРНК_i^{Met} целиком связывается в Р-участке (см. раздел 1.2.1). Сопоставление взаимного расположения структурных элементов рибосомы, формирующих участки связывания тРНК в модельных 43S и 48S PIC, выявило различия в окружении тРНКі^{Меt} в этих комплексах, вызванные переходом тРНК из состояния Pout в состояние Pin. Кроме того, оказалось, что компоненты 40S субчастицы, формирующие Р-участок, смещаются на 3° относительно главной оси субчастицы при её связывании с eIF1A, а при связывании образующегося комплекса с мРНК и тРНК^{Met} эти компоненты поворачиваются еще на 3° в том же направлении. Следует отметить, что такие конформационные перестройки не затрагивают спирали h28 [5] (рис. 14), которая является важной для связывания ТС с 40S субчастицами, поскольку мутации в ней уменьшают эффективность этого связывания [211]. В работе [6], где 40S наблюдали аналогичные структурные перестройки субчастиц, сделано предположение, что эти перестройки необходимы, в частности, для того, чтобы h31 не препятствовала сближению антикодоновой петли с кодоном мРНК в Р-участке и чтобы h29 не блокировала движение Met-тРНК_i^{Met} в направлении Е-участка. Оказалось, что при переходе от свободной 40S субчастицы к 43S PIC и затем к 48S PIC происходят изменения в конформации h34 18S pPHK в участке входа мPHK [6]. Но во всех комплексах h34 оставалась связанной с h18. Связь между спиралями h34 и h18 называют обычно «защёлкой» в участке входа мРНК в рибосому.



Рис. 14. Изменения положении в структурных элементов Р-участка 40S субчастицы при переходе от комплекса 40S•eIF1 (отмечено светло-коричневым) к комплексу40S•eIF1•eIF1A (отмечено синим), и далее к комплексу, моделирующему 48S РІС (отмечено красным) [5]. Направление вращения спиралей 18S рРНК показано стрелкой. Антикодоновая петля тРНКі отмечена серым, мРНК - желтым, а старткодон и нуклеотиды мРНК, важные для его распознавания, выделены зеленым.

В работе [18] была высказана гипотеза, согласно которой состояние защелки коррелирует со стадией инициации трасляции. Так, в свободной 40S субчастице «защёлка» закрыта, а при связывании eIF1 и eIF1A она открывается, что способствует её ассоциации с мРНК и TC, при этом eIF1 и eIF1А поддерживают «защёлку» открытой при сканировании. Согласно данным [18], открывание «защелки» сопровождается образованием контакта rp uS3 с h16. После узнавания старт-кодона и диссоциации eIF1 и фосфата «защёлка» закрывается, и мРНК оказывается запертой в мРНК-связывающем канале, а комплекс переходит в состояние P_{in} в современной терминологии; вместе с этим разрывается и контакт uS3 и h16 [18]. Однако в работах [5, 6] открытого состояния защёлки не наблюдали ни в 43S PIC, ни в 48S PIC. Это противоречие может быть связано с тем, что упрощённые комплексы, использованные для моделирования 43S комплекса в работе [5], не отражали адекватно состояние рибосомы на стадии образования данного типа комплекса. В этих комплексах отсутствовали TC и фактор eIF3, который, как установлено, увеличивает сродство TC к 40S субчастице рибосомы [55], и может быть необходим для открытия «защёлки» [40]. Кроме того, обсуждаемое несоответствие могло вызвано изменениями в структуре комплекса, происходящими быть при его кристаллизации, которую проводили в условиях, далёких от физиологических [5]. Следует также отметить, что 48S PIC, использованный в работе [6], содержал eIF1, который обычно связан с 40S субчастицей только на стадии сканирования до узнавания старткодона (т.е. в состоянии P_{out}), хотя в P-участке 40S субчастицы находился старт-кодон, взаимодействующий с тРНКі^{Меt}. По-видимому, этот 48S РІС моделировал стадию завершения сканирования до перехода в состояние P_{in}, которую удалось зафиксировать благодаря использованию мутантной формы eIF2α, уменьшающий точность отбора старт-



Рис. 15. Расположение eIF2a (фиолетовая лента) и Меt-тРНК_і в состояниях Р_{іп} зеленым) и Р_{оиt} (показана (показана черным), выявленным в 43S и 48S PIC соответственно (мРНК изображена сиренывым цветом). Стрелками указаны структурные элементы Met-тРНК_і (T-loop, D-loop и антикодоновая петля); D1, D2 и eIF2α. Использованы D3 _ домены материалы [6].

кодона [212]. Согласно данным работы [6], в перестройках, происходящих при переходе от 43S PIC к 48S PIC, участвует N-концевой домен eIF1A, поскольку в 43S PIC он неупорядочен, видимо, из-за отсутствия взаимодействия с 40S субчастицей, а в 48S PIC этот домен eIF1A взаимодействует с нуклеотидом C1637 18S pPHK. Это подтверждает предсказанную ранее роль N-концевого домена eIF1A в стабилизации P_{in} состояния рибосомы (см. раздел 1.2.1). В перестройки, происходящие при переходе из состояния Pout в Pin, вовлекается также eIF2. В частности, домен D1 eIF2α перемещается глубже в Еучасток, что позволяет ему контактировать в 48S PIC с нуклеотидом мРНК в положении -3 в соответствии с данными по сшивкам [15], а домену D2 eIF2α – с антикодоновой петлей Met-тРНК;^{Met} (рис. 15). Сравнение структуры 43S РІС рибосом дрожжей, полученной ранее [195], со структурой 48S PIC рибосом дрожжей [26] и кролика [198] выявило различия в конформациях eIF3b в этих предынициаторных комплексах, что позволило авторам [198] предположить, что при связывании мРНК eIF3b перемещается с внешней поверхности 40S субчастицы на её межсубъединичную поверхность. В результате этой перегруппировки спираль «WD40» eIF3b образует контакт с eIF2y, a его RRM - с eIF1. Интересно отметить: несмотря на то, что у рибосом млекопитающих в 48S PIC субъединицы і и b фактора eIF3 могут контактировать с DHX29 [19, 38], конформации этих субъединиц схожи у дрожжей и у млекопитающих [38, 198], хотя у дрожжей отсутствует DHX29.

Следует отметить, что в крио-ЭМ модели 43S PIC кролика, содержащего DHX29 [19], в которой также, как и в упомянутых выше работах [5, 6] «защёлка» оказалась закрытой несмотря на присутствие eIF1, предложено другое объяснение несоответствию результатов полученным ранее данным об открывании «защёлки» при связывании eIF1

[18]. Авторы [19] предположили, что закрытое состояние «защёлки» вызвано тем, что DHX29 образует контакты с 40S субчастицей и мРНК в области этой «защёлки» (см. рис. 16)



Рис. 16. Расположение DHX29 на модели 40S субчастицы рибосом кролика [19]. Вид со стороны участка входа. Голубой пунктирной линией обозначен «обычный» путь мРНК на 40S субчастице эукариот. Коричневой линией указан предполагаемый путь РНК в присутствии DHX29, рассчитанный на основании модели структуры комплекса одноцепочечной ДНК с геликазой, содержащей тот же DExH-мотив, что и DHX29.

1.4.2.2. Перестройки, непосредственно вызванные узнаванием старт-кодона

С помощью крио-ЭМ 48S PIC рибосом дрожжей, не содержащего eIF5, в работе [26] получена информация о промежуточной стадии инициации после связывания ТС и мРНК, но до узнавания старт-кодона. В данной работе было изучено два типа комплексов; один из них, так называемый 48S-ореп, моделировал 48S PIC в состоянии сканирования, а второй, 48S-closed, – стадию, на которой кодон-антикодоновое взаимодействие уже имеет место, но eIF1 и GTP ещё находятся в комплексе. Состояние 48S-open удалось зафиксировать благодаря использованию мРНК с триплетом AUC на месте инициаторного кодона AUG; в этом случае при завершении сканировании не происходит нормального кодон-антикодонового взаимодействия между старт-кодоном и инициаторной тРНК. Полученные результаты подтвердили высказанное ранее [18] предположение о том, что образование контакта между h18 и h34 18S pPHK приводит к фиксации мPHK в мPHKсвязывающем канале и, соответственно, прекращению сканирования, поскольку этот контакт наблюдали только в состоянии 48S-closed, а в состоянии 48S-open данные спирали были удалены друг от друга [26]. Более того, оказалось, что при переходе от комплекса 48S-open к 48S-closed происходят структурные перестройки компонентов 40S субчастицы, формирующих Р-участок, затрагивающие h28 (рис. 17) и rp uS5 (S2e) [26].

Перестройки в области Р-участка вызывали также изменение конформации МеtтPHK^{Met}, приводящие к её сгибанию, поскольку контакты антикодоновой петли и акцепторного стержня сохранялись в обоих комплексах, тогда как взаимное расположение контактирующих с ними рибосомных компонентов менялось [26]. Так, в состоянии 48Sореп рибосома (а именно, h29 18S pPHK) взаимодействовала со специфичными для инициаторных тPHK тремя последовательными G:С парами в антикодоновом стебле, и эти пары изменяли конформацию вместе с h29.



Рис. 17. Конформационные изменения в 18S рРНК, происходящие в процессе инициации трансляции у эукариот [26]. А, Сопоставление конформации некоторых спиралей 18S рРНК, формирующих Р-участок. Зеленым обозначены спирали 48S PIC [6], синим – комплекса 40S-eIF1eIF1A [6], красным – 48S-open [26]. В мРНК сиреневым показаны основания старт-кодона. Инициаторная тРНК показана серым. Б. Различия в конформации Met-тPHK_i в комплексах, моделирующих 48S PIC: неполный 48S PIC (40S•eIF1A• Met-тPHK_i•мPHK) (оранжевый), 48S open (красный), 48S PIC-closed (зеленый), или 43S PIC (желтый).

Как и следовало ожидать, число контактов Met-тPHK_i^{Met} с рибосомой при переходе от состояния 48S-ореп к состоянию 48S-closed увеличивалось. Кроме того, при этом переходе D и T петли Met-тPHK_i образовывали более прочные контакты с N-концевым доменом eIF2 α , как и при переходе от 43S к 48S PIC [6]. В частности, домен D3 изменял конформацию и образовывал другие контакты с акцепторным стеблем тPHK по сравнению с его контактами в состоянии 48S-ореп. Наконец, изменялись контакты мотива HTH eIF2 β , который в обоих состояниях взаимодействовал с Met-тPHK_i, но в дополнение к этому в состоянии 48S-ореп взаимодействовал также с eIF1 и eIF1A, а в 48Sclosed - только с рибосомой (рис. 18). Авторы [198] предполагают, что наличие контактов eIF2β с eIF1 и eIF1A, а также взаимодействие eIF2γ с eIF3b позволяет предотвращать диссоциацию TC из PIC на ранних стадиях инициации до узнавания старт-кодона.

Переход от состояния 48S-open к 48S-closed приводил также к значительным изменениям в структурной организации мРНК-связывающего канала рибосомы [26]. В состоянии 48S-open этот канал был расширен, и мРНК образовывала меньшее число контактов с рибосомой, чем в состоянии 48S-closed, поэтому в состоянии 48S-open практически не удалось визуализировать мРНК на рибосоме, за исключением пары нуклеотидов A:U, взаимодействующих с антикодоном Met-тPHK_i в P-участке, которые,



Рис. 18. Наложение конформации eIF2β в 48Sclosed (серый) на структуру 48S-ореп, где eIF2β обозначена красным [26].

как оказалось, расположены не в том положении, которое они занимают в состоянии 48Sclosed, из-за того что eIF2β препятствовала связыванию кодон-антикодонового дуплекса в P-участке. Paзрыв связи eIF2β с eIF1 и eIF1A и перемещение eIF2β вдаль от мPHKсвязывающего участка (рис. 19) при узнавании старт-кодона, а также установление связи между спиралями h18 и h34 18S pPHK, так называемое закрытие «защёлки», приводили к образованию большего числа контактов мPHK с рибосомой. Вследствие закрытия «защёлки» происходила фиксация мPHK на рибосоме, необходимая для поддержания рамки считывания в процессе элонгации, что сопровождалось вытеснением из P-участка фрагмента в центральной части eIF1, имеющего структуру β-складки, который в 48S-ореп взаимодействовал с инициаторным кодоном мPHK (рис. 19); при этом N-концевой домен eIF1A вовлекался во взаимодействие с кодон-антикодоновым дуплексом [26].



Рис. 19. Наложение структур eIF1 и тРНК^{Met} (обозначены серым и коричневым соответственно) в конформациях, в которых они находятся в состоянии 48S-open, на их структуры в состоянии 48Sclosed (где тРНК^{Met} обозначена зеленым, eIF1 показан голубым, а мРНК – розовым) [26].

При диссоциации из PIC eIF1, eIF2•GDP и фосфата связь eIF1 с N-концевым доменом eIF3c разрушается [213], в результате чего происходит перегруппировка eIF3 в комплексе [198]. В частности, eIF3b перемещается с межсубъединичной поверхности на внешнюю поверхность [198] (где эта субъединица eIF3 находилась в 43S PIC, см. раздел 1.4.2.1). Одновременно с перемещением eIF3b субъединицы eIF3i и eIF3g оказываются на межсубъединичной поверхности [198], где они экранируют компоненты 40S субчастицы, принимающие участие в образовании моста B8, что объясняет роль этих субъединиц eIF3 в регуляции ассоциации рибосомных субчастиц. Связывание eIF5B и последующий гидролиз GTP приводят к диссоциации eIF3i и eIF3g из комплекса с рибосомами [198].

1.4.2.3. Перестройки, сопровождающие присоединение 60S субчастицы

Как упомяналось ранее, ССА-конец инициаторной тРНК в 80S IC, собранном по каноническому пути и содержащем eIF5B, удалён от ПТЦ благодаря его взаимодействию с доменом IV eIF5B. В этом комплексе акцепторный стебель тРНК^{Met} имеет изогнутую структуру [208], поддержанию которой способствует наличие в нем специфичных для инициаторной тРНК G:С пар, (рис. 2). После диссоциации eIF5B из 80S IC Met-тРНК^{Met} приобретает конформацию, схожую с классической конформацией тРНК в P-участке на стадии элонгации после транслокации [66], как и следовало ожидать при образовании комплекса, готового к началу первого цикла элонгации. Кроме того, диссоциация eIF5B сопровождается поворотом субчастиц друг относительно друга на 3.4°, в результате чего 80S рибосома приобретает конформацию, соответствующую посттранслокационному состоянию [208].

1.4.3. Структурные особенности рибосомных комплексов, образующихся при IRESзависимой инициации трансляции

Данные, полученные в ранней работе по изучению бинарного комплекса HCV IRES с 40S субчастицей с помощью крио-ЭМ низкого разрешения [17], позволили определить морфологию этого комплекса и выявить конформационные изменения 40S субчастицы, индуцированные доменом II IRES, которые, по мнению авторов, происходили вблизи участка входа в мРНК-связывающий канал (в районе «защёлки»). Однако ни одна из последующих работ не подтвердила предположения о реструктурировании этого района 40S субчастицы при HCV IRES-зависимой инициации трансляции.

Полное представление о конформационных перестройках, индуцируемых HCV IRES в 40S субчастице, в результате которых формируется рибосомный комплекс, готовый к началу первого цикла элонгации, удалось получить благодаря недавно доложенной крио-ЭМ модели бинарного комплекса HCV IRES с 80S рибосомой [142], предоставившей структурное подтверждение роли домена II в осуществлении этих перестроек. Оказалось, что рибосома в комплексе с HCV IRES существует в нескольких конформациях, которые могут быть отнесены к трём структурным классам. Один из них соответствует конформации рибосомы в посттранслокационном состоянии; конформация такого рода оказалась наиболее предпочтительной для комплекса HCV IRES с 80S рибосомой. Два других класса включают конформации, напоминающие конфигурации рибосомы в претранслокационном состоянии, различающиеся структурой области 40S субчастицы, формирующей Р-участок. Второй класс конформаций отличается от первого поворотом 40S субчастицы примерно на 6° по направлению к L1 стеблю относительно её главной оси, проходящей через основание h44. Третий класс отличается от второго поворотом 40S субчастицы относительно большой субчастицы вдоль оси, 7°. перпендикулярной межсубъединичной поверхности, примерно на Авторы предполагают, что комплекс существует во множестве конформаций из-за структурной подвижности рибосомы. Домен IV HCV IRES в бинарном комплексе 80S•HCV IRES расплетен, а расположение входящей в его состав кодирующей последовательности в мРНК-связывающем канале отличается от такового для мРНК при классической инициации трансляции (рис. 20). Как и предполагалось, домен II HCV IRES взаимодействует в E-участке рибосомы с доменом IV и β-шпилькой rp uS7, необходимой для точного распознавания старт-кодона при инициации трансляции по каноническому механизму (см. раздел 1.3.2.2.3). Это взаимодействие приводит к смещению β-шпильки гр uS7 относительно её канонического положения в рибосоме в посттранслокационном состоянии. Следует отметить, что все три вышеуказанных конформации рибосомы в 62

бинарном комплексе 80S•HCV IRES отличаются от конформации рибосомы, характерной для стадии завершения канонической инициации трансляции [142]. Авторы обсуждаемой работы показали, что комплекс 80S•HCV IRES приобретает эту конформацию только после связывания Met-тPHK^{Met}, которое индуцирует крупные структурные перестройки, затрагивающие область P-участка, в результате чего голова 40S субчастицы наклоняется к её телу на ~17° относительно оси, перпендикулярной межсубъединичной поверхности. Благодаря этим перестройкам домен II IRES смещается в E-участке от 40S субчастицы к h68 28S рPHK и занимает положение, характерное для акцепторной петли деацилированной тPHK при элонгации.



Рис. 20. Расположение фрагмента мРНК в участке выхода из рибосомы при HCV IRES-зависимой (слева) и канонической (справа) инициации трансляции согласно данным крио-ЭМ [142]. Домен II IRES обозначен розовым, его апикальная часть – сине-фиолетовым, домен IV IRES и мРНК обозначены жёлто-оранжевым цветом.

В целом, результаты, полученные с комплексом HCV IRES•80S•Met-тPHK_i^{Met}, образованным при повышенной концентрации ионов Ca²⁺ в отсутствие факторов инициации [142], согласуются с данными работы [210] для 80S IC, реконструированного на HCV IRES в присутствии eIF5B и негидролизуемого аналога GTP, гуанозин 5'- (β, γ) метилен-трифосфата (GMPPNP). Однако в [210] удалось зарегистрировать конформационный переход, вызванный связыванием инициаторной тРНК, который оказался похожим на переход между pre-like и post-like состояниями (см раздел 1.4.1.4). В состоянии Pre-like домен II HCV IRES контактировал с углом L-структуры Met-тPHK_i, а в состоянии Post-like - с L стеблем 60S субчастицы. Результаты обеих работ [142, 210] свидетельствуют о том, что структурные переходы в 40S субчастице, в результате которых 80S IC принимает конформацию, соответствующую посттранслокационному состоянию, осуществляются благодаря взаимодействию домена II HCV IRES с рибосомой и Met-тPHK_i^{Met}. Можно полагать, что описанные выше конформационные перестройки в комплексах HCV IRES с рибосомами отражают реальные процессы, происходящие при инициации трансляции PHK HCV.

Таким образом, к настоящему времени получено детальное представление о механизмах инициации трансляции у эукариот, протекающих по каноническому пути, либо с участием IRES-элементов или энхансерных последовательностей мРНК. С помощью сайт-направленного мутагенеза в дрожжах были определены фрагменты некоторых рибосомных белков и факторов инициации, непосредственно вовлечённые в процесс инициации трансляции. Однако данный метод не позволил однозначно установить молекулярные контакты выявленных фрагментов с участниками этого процесса (тРНК, мРНК и факторами инициации трансляции) и причастны ли они к конформационным переходам, обеспечивающим функционирование рибосом на стадии инициации. Кроме того, все работы с использованием сайт-направленного мутагенеза были выполнены на низших эукариотах – дрожжах, что не позволяет распространять выявленные закономерности на все царство эукариот.

Особенный прорыв в установлении строения комплексов рибосом с некоторыми лигандами произошёл в последнее время благодаря быстрому развитию технического и программного обеспечения крио-ЭМ, что позволило получать модели комплексов с субатомным разрешением. Однако во многих случаях достигнутого разрешения оказалось недостаточно для однозначной идентификации молекулярных контактов между рибосомой и лигандами, а также для картирования неструктурированных фрагментов белков. Кроме того, не все комплексы, моделирующие различные стадии инициации, удаётся получить в пригодном для структурного анализа состоянии. Следует также отметить, что для интерпретации карты распределения электронной плотности, получаемой в результате крио-ЭМ, используют очень сложное программное обеспечение, в зависимости от алгоритма которого на основании одних и тех же экспериментальных данных могут быть получены совершенно различные модели структурной организации трансляционного комплекса.

Таким образом, очевидно, что для полного понимания структурнофункциональных аспектов молекулярных механизмов инициации трансляции необходимы данные, полученные с помощью биохимических подходов, которые уже дали некоторую ценную информацию о взаимном расположении компонентов трансляционной системы на разных стадиях инициации и конформационных превращениях рибосом, сопровождающих этот процесс.

Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. МАТЕРИАЛЫ

работе использованы следующие реактивы и материалы: В акриламид, 1,4-Дитиотреитол (DTT), HEPES, $LiClO_4$, дезоксихолат натрия, DMSO. N-N'метиленбисакриламид, пуромицин, PIPES, спермин, додецилсульфат натрия (SDS), Трис, бензоилцианид, перйодат натрия, циклогексимид, анизомицин из Streptomyces griseolus и бычий гемин фирмы «Sigma-Aldrich» (США); 2-меркаптоэтанол и сорбент Sephadex G50 suprefine – «Pharmacia» (Швеция); сурфактант «proteaseMAX» фирмы «Promega» (США); йодацетамид, этиленгликоль, креатинфосфата динатриевая соль И 38%-ный формальдегид- «Fluka» (Швейцария); кумасси бриллиантовый голубой R 250 - «Ferak» (Германия); спермидин и поли(U) – «Reanal» (Венгрия); ТЕМЕD – «GERBU» (Германия); 2-нитро-5-тиоцианобензойная кислота (NTCB) – «Biochemia» (США); L-аминокислоты (ч.д.а.) – «Reanal»; таблетки фосфатно-солевого буфера – «Helicon».

В работе использованы также рибо-, дезоксирибо-И дидезоксирибонуклеозидтрифосфаты и антитела против IgG кролика, коньюгированные с пероксидазой хрена, фирмы «Sigma-Aldrich» (США), негидролизуемый аналог GTP – гуанозин 5'-(β, γ)-метилен-трифосфат фирмы «Jena Bioscience» (Германия), плазмида pET-15b фирмы «Novagen» и набор следующих ферменов: креатинфосфокиназа фирмы «Fluka» (Швейцария), AMV-ревертаза фирмы «Life Science» (США), РНКаза А, микрококковая эндонуклеаза, протеиназа К и пепсин фирмы «Sigma-Aldrich», PHКаза T1 – «Boehringer Mannheim» (Германия), рестриктаза Ват НІ фирмы «Thermo Scientific» (США), трипсин sequence grade фирмы «Promega», щелочная фосфатаза из кишок теленка фирмы «NEB» (Великобритания), ДНК-полимераза pfu и T7 PHК-лигаза фирмы «Thermo Scientific», эндопротеиназы GluC, ArgC и Asp-N – «Roche» (Швейцария).

Препараты тРНК^{Рhe} (1300 пмоль/OE₂₆₀) и [¹⁴C]Phe-тРНК^{Phe} (600 имп/(мин/пмоль, 1300 пмоль/OE₂₆₀) *E. coli* были любезно предоставлены Катуниным В. И. (Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт", г. Гатчина). тРНК^{Asp} (1400 пмоль/A260) была предоставлена Dr. C. Hountondji (Sorbonne Universités; Paris, France). Рекомбинантная полинуклеотидкиназа фага Т4 получена в лаборатории биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН (20 ед. акт./мкл); рекомбинантный белок S26C наработан и очищен сотрудником лаборатории структуры и функции рибосом (ЛСФР) Ивановым А. В. (ИХБФМ СО РАН); антисыворотки против рибосомных белков uS5, eS26, uS3 и uS7 (S2, S26, S3 и S5 соответственно) были любезно предоставлены Dr. J. Stahl (Max-Delbruck-

Zentrum, Berlin, Germany), антитела против гр uS7 были очищены Бабайловой Е. С. (ЛСФР) с помощью аффинной хроматографии; в работе использованы также очищенные антитела против rp uS19 (S15) фирмы «Avivasysbio» (США), против eIF3j фирмы «Thermo Scientific» и против DHX29 фирмы «Abcam».

Олигорибонуклеотиды, несущие этилендиаминовый спейсер на атоме С5 остатка уридина, а также мРНК МІ-МІІІ, которые использовали для получения модельных 48S PIC, 80S IC и 80S EC, образующихся в ЛРК в результате канонической инициации трансляции, были синтезированы в лаборатории химии РНК (ИХБФМ СО РАН); [у-³²РІАТР (1000 Ки/ммоль) и 5'-[³²Р]рСр (450 Ки/ммоль) были синтезированы Фоминым А. С. (Лаборатория биотехнологии ИХБФМ СО РАН). Прочие неназванные реактивы были марки х.ч. или о.с.ч. Все использованные в работе растворы приготовлены на бидистиллированной воде. Для фильтрования растворов и анализа связывания меченых лигандов с 80S рибосомами использовали нитроцеллюлозную мембрану фирмы «Millipore» (США) с диаметром пор 0.45 мкм. Перенос на нитроцеллюлозную мембрану белков проводили с помощью прибора для полусухого переноса «Trans-Blot SD» фирмы «Bio-Rad», в качестве подложки между электродами и мембраной применяли фильтровальную бумагу толщиной 2 мм фирмы «Bio-Rad». Для детекции белков вестернблотингом с помощью антител, коньюгированных с пероксидазой хрена, использовали набор для проявления хемилюминисценции «ECL western blotting substrate» фирмы «Thermo Scientific».

Оптическую плотность регистрировали с помощью микроспектрофотометра «Милихром» (A-02) (Эконова). Производные олигорибонуклеотидов длиной менее 20 звеньев выделяли обращённо-фазовой хроматографией (офВЭЖХ) на колонке с фазой C18 с использованием микроспектрофотометра «Милихром». Облучение реакционных смесей для фотоаффинной модификации проводили с использованием УФ-лампы фирмы «SpotCure» (Великобритания) в ячейках, погруженных в лёд, через световоды (интенсивность светового потока лампы по паспорту составляла 40-50 мвт/см² при 254 нм и 150-200 мвт/см² при 310 нм) с использованием стеклянного фильтра, отсекающего коротковолновую составляющую потока (λ >290). Световоды находились на расстоянии 5 мм от реакционной смеси, время облучения составляло 1-2 мин.

Препараты сушили на вакуумном испарителе «UNIVAPO 100H» (Германия). Измерение pH проводили на pH-метре 211 «HANNA instruments» (США). Реакционные смеси перемешивали на горизонтальном термостатируемом шейкере «Biosan» (Латвия). Радиоактивность просчитывали на счётчиках «Rackbeta» и «Minibeta» фирмы «LKB-Pharmacia». Мишени с нанесёнными пробами, меченными ¹⁴C, просчитывали в 5 мл

67

толуольного сцинтиллятора (5 л толуола, 20 г РРО, 1 г РОРОР), меченными ³²Р, – в 1 мл воды по Черенкову. Гели радиоавтографировали с использованием рентгеновской плёнки фирмы «Conica» (США) либо фосфоримиджера Pharos FX фирмы «Bio Rad». В работе использовали ультрацентрифугу «Beckman L8M», а также центрифуги «Beckman J2-21M», «Ерреndorf 5430 R» и «Ерреndorf 5415С» (Германия).

Разделение белков проводили на вертикальном электрофоретическом приборе Z-35-278-0 фирмы «Sigma-Aldrich», используя гель с размерами 16 см × 22 см × 0.75 см, или на приборе «Mini protean tetra cell» фирмы «Bio-Rad» с размером геля 0.7 см × 6.5 см × 8.5 см; РНК анализировали на тех же приборах, что и белки, а также на приборе для секвенирования «Sequi-GEN GT» – «Bio-Rad» с размером стёкол 21 см × 50 см × 0.7 см.

Обессоливание пептидов для подготовки к масс-спектрометрическому анализу проводили с помощью микроколонок «Zip-Tip» с фазой C18 для обращенно-фазовой хроматографии фирмы «Millipore» (Германия).

Плаценту гомогенизовали с помощью гомогенизатора MPW-309 фирмы «Mechanika precyzyjna» (Польша).

Аминокислотные последовательности рибосомных белков человека взяты из базы данных Ribosomal Protein Gene Database (RPG, http://ribosome.miyazaki-med.ac.jp), а последовательности факторов инициации млекопитающих – из базы данных Swiss-Prot (http://www.uniprot.org/). Выравнивание последовательностей рибосомных белков выполняли с помощью программы ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) и представляли, используя программу Jalview (http://www.jalview.org/). Результаты анализа белков с использованием MALDI TOF спектрометрии обрабатывали с помощью программного пакета MMass (http://www.mmass.org/).

2.2. МЕТОДИКИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

2.2.1. Выделение рибосомных 40S и 60S субчастиц из плаценты человека

Рибосомные 40S и 60S субчастицы с интактной рРНК выделяли из нормальной послеродовой плаценты согласно протоколу, описанному в [214]. Промежуток времени между родами и гомогенизацией ткани не превышал 30 мин. Плаценту немедленно после родов погружали в 500 мл буфера I (20 мМ Трис-HCl pH 7.5, 125 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 0.5 мМ EDTA и 4 мМ β -меркаптоэтанол), который предварительно охлаждали до 4°C. Не позже, чем через 30 мин после родов, плаценту резали на кусочки по 25-30 г, освобождаясь при этом от оболочек и соединительной ткани, отмывали от крови в буфере I и гомогенизировали при 4°C в равном по весу количестве этого же буфера, содержащего

250 мМ сахарозу, 1 г/л гепарин и 0.05 г/л циклогексимид. Полученный гомогенат центрифугировали на центрифуге «Весктал J2-21М» (ротор JA-14) при 4°С и 13000 об/мин в течение 30 мин. К постмитохондриальному супернатанту добавляли дезоксихолат натрия до концентрации 1% и перемешивали в течение 30 мин при 0°С. Постмитохондриальный супернатант, обработанный дезоксихолатом, наносили на сахарозную подушку (35%-ный раствор сахарозы в буфере II, содержащем 20 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 100 MM NH₄Cl, 3 MM MgCl₂, 0.15 MM EDTA и 5 MM β-меркаптоэтанол) и центрифугировали при 4°С в течение 20 ч (центрифуга «Beckman L8M», ротор SW-28, 26000 об/мин). По окончании центрифугирования супернатант осторожно сливали. Осадок полисом гомогенизировали при 0°С в 15-20 мл буфера II с 10 мМ βмеркаптоэтанолом; нерастворившийся материал удаляли центрифугированием (центрифуга «Beckman J2-21М», ротор JA-20, 17000 об/мин, 15 мин, 4°С). Раствор полисом инкубировали с 0.5 мМ пуромицином в течение 10 мин при 0°С, затем к раствору добавляли по каплям при постоянном помешивании 3 М КСІ до конечной концентрации 0.5 М и инкубировали 20 мин при 37°С, после чего раствор наносили на линейный градиент концентрации сахарозы (10-30%) в буфере III (20 мМ Трис-HCl pH 7.5, 500 мМ KCl, 3 мМ MgCl₂, 0.15 мМ EDTA и 10 мМ 2-меркаптоэтанол), и центрифугировали в течение 18 ч при 4°С (ультрацентрифуга «Весктап L8М», ротор SW-28, 20000 об/мин). По окончании центрифугирования содержимое пробирок фракционировали пропусканием через проточную кювету милихрома с помощью перистальтического насоса, измеряя оптическую плотность при 260 нм. Фракции градиента, соответствующие пикам оптической плотности 40S и 60S рибосомных субчастиц в полученном профиле, объединяли для каждой субчастицы отдельно. Рибосомные субчастицы осаждали из объединённых фракций центрифугированием (центрифуга «Beckman L8M», ротор SW-28, 24000 об/мин, 22 ч, 4°С), предварительно повысив концентрацию Mg^{2+} до 20 мМ и снизив концентрацию KCl до 120 мМ путем их разбавлением буфером, содержащим 20 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 20 мМ MgCl₂ и 10 мМ 2-меркаптоэтанол. Осадки субчастиц суспендировали в воде до концентрации 70-100 OE₂₆₀/мл для 40S субчастиц и 150-200 OE₂₆₀/мл при 0°С и хранили в жидком азоте порциями по 25 мкл, каждую порцию размораживали не более одного раза.

Перед использованием к 40S и 60S субчастицам добавляли ¹/₄ объема пятикратного буфера A (однократный буфер A: 20 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 120 мМ KCl, 13 мМ MgCl₂ и 0.65 мМ EDTA) реактивировали в течение 10 мин при 37°C, осветляли центрифугированием в течение 1 мин при комнатной температуре при 14000 об/мин и

замеряли оптическую плотность, полагая, что 1 ОЕ₂₆₀ соответствует 50 пмоль 40S или 25 пмоль 60S субчастиц по данным [215].

Для получения 80S рибосом субчастицы смешивали в мольном соотношении 40S:60S = 1:1.5, при этом, как показал анализ 80S рибосом в линейном градиенте плотности сахарозы (10-30%) в буфере А (центрифуга «Beckman L8M», ротор SW-40, 24000 об/мин, 19 ч, 4°C), практически все 40S субчастицы ассоциируют с 60S субчастицами. Конечная концентрация реактивированного препарата 80S рибосом составляла обычно примерно 10^{-6} М. Активность 80S рибосом в поли(U)-зависимом связывании [¹⁴C]Phe-тPHK^{Phe} измеряли по методике, описанной в работе [214], она составляла обычно примерно 70% (т.е. около 1.4 моль [¹⁴C]Phe-тPHK^{Phe} связывалось с 1 моль 80S рибосом).

2.2.2. Получение РНК, используемых в качестве модельных мРНК

Относительно длинные РНК, используемые в качестве аналогов мРНК, синтезировали на соответствующих ДНК-матрицах с помощью РНК-полимеразы Т7. Модельную каноническую мРНК (кмРНК) получали, используя ДНК-матрицу, предоставленную Косиновой О. А. (ЛСФР), а РНК, соответствующую последовательности HCV IRES, - плазмиду pXL40-372.NS', предоставленную Малыгиным А. А. (ЛСФР) и линеаризованную с помощью рестриктазы Ват HI.

Для получения ДНК-матрицы, используемой для наработки кмРНК, проводили ПЦР на ДНК с использованием В качестве прямого праймера олигодезоксирибонуклеотида а В качестве наработки ДНК матрицы, используемой для синтеза полноразмерной формы HCV IRES (IRES_{FL}), проводили ПЦР с линеаризованной плазмидой pXL40-372.NS', используя 5'-AAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACTCCCCTGTGAGGAACTAC-3' в качестве прямого праймера, а в качестве обратного – 5'-GGTTTTTCTTTGAGGTTTAGG-3'. Для того чтобы получить укороченную форму HCV IRES, ограниченную старт-кодоном с 3'конца (IRES_{AUG}), в ходе ПЦР нарабатывали ДНК-продукты, используя в качестве прямого праймера тот же олигодезоксирибонуклеотид, что и при синтезе ДНК-матрицы для получения IRES_{FL}, а в качестве обратного - 5'-CATGGTGCACGGTCTACG-3'.

Стандартная реакционная смесь для ПЦР объемом 50 мкл содержала 75 мМ Трис-HCl (pH 8.8), 20 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.01% Tween 20, 1.5 мМ MgCl₂, дезоксинуклеотидтрифосфаты (A, C, G и T) в 0.2 мМ концентрации каждый, прямой и

70

обратный праймеры (каждый 1 мМ) и 0.02 ед. акт. Рfu ДНК полимеразы. ПЦР проводили по следующей программе: предварительный отжиг праймеров 3 мин при 95°С, затем 30 циклов следующих стадий: отжиг при 95°С 15 с, образование комплементарных дуплексов ДНК матрицы с праймерами при 55°С 20 с и удлинение цепи ДНК матрицы при 72°С 50 с и затем достройка недосинтезированных цепей дополнительной инкубацией реакционной смеси в течение 2 мин при 72°С. Полученную ДНК очищали гельфильтрацией на сорбенте G-50 и использовали в качестве матрицы для T7 транскрипции. Для проведения транскрипции 5 мкг ДНК инкубировали в 100 мкл буфера, содержащего 120 мМ НЕРЕS-КОН (pH 7.6), 4 мМ ATP, 4 мМ UTP, 4 мМ GTP, 4 мМ CTP, 20 мМ MgCl₂, 2 мМ спермидина, 4 мМ DTT, 5 ед. акт. РНКазина и 100 ед. акт. PHK-полимеразы фага T7, в течение 16 ч при 37°С. РНК очищали гель-фильтрацией на сорбенте G50. Для того чтобы контролировать образование рибосомных комплексов на полученных мРНК, T7 транскрипцию вели в присутствии ATP, меченного ³²Р по α -фосфату. Гомогенность полученного продукта подтверждали с помощью анализа в денатурирующем электрофорезе в 10%-ном полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 8 М мочевину.

2.2.3. Получение олигонуклеотидов и их производных, меченных по 5'-концу

Для введения метки ³²Р по 5'-концу олигорибонуклеотида к его раствору в 10 мкл буфера кинирования (20 мМ Трис-HCl pH 7.5, 12 мМ MgCl₂ и 0.2 мМ EDTA) добавляли 0.1 мКи [γ -³²P]ATP и 20 ед. акт. полинуклеотидкиназы T4, и реакционную смесь инкубировали в течение 30 мин при 37°C, затем продукты разделяли офВЭЖХ на колонке «Nucleosil 5C18» объёмом 180 мкл с использованием нелинейного метанольного градиента (10-90%-ный метанол в 50 мМ ТЭА-ОАс (pH 7.5), скорость элюции 100 мкл/мин). Пик, соответствующий меченому олигорибонуклеотиду, собирали, упаривали в вакууме досуха, растворяли в воде и хранили в жидком азоте. Таким же способом вводили метку ³²Р по 5'-концу производных олигорибонуклеотидов, несущих этилендиаминовый спейсер на остатке уридина. Удельная активность меченых олигорибонуклеотидов и их производных была в среднем (30-100) ×10³ имп/мин/пмоль.

2.2.4. Получение фотоактивируемого производного олигонуклеотида

Введение 4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензоильной группы в олигорибонуклеотид по аминогруппе этилендиаминового спейсера, присоединенного к атому C5 остатка уридина, проводили следующим образом. К 5-20 мкл водного раствора 1.5-3 нмоль олигомера, несущего этилендиаминовый спейсер, добавляли 5 мкл 0.5 М HEPES-NaOH (pH 9.0), доводили объем до 50 мкл и обрабатывали, как описано [216]. Для этого отдельно

растворяли 1.0 мг N-гидроксисукцинимидного эфира *n*-азидотетрафторбензойной кислоты (NSu-Az) в 20 мкл DMSO, используя полученный раствор как стоковый. К 50 мкл 2 мМ раствора NSu-Az в DMSO, приготовленного на основе этого стокового раствора, добавляли водный раствор модифицированного олигорибонуклеотида (см. выше). Реакцию вели в темноте в течение 1.5 ч при комнатной температуре. После окончания реакции к смеси в качестве носителя добавляли 1 мкл 0.1 М ATP, нуклеотидный материал осаждали добавлением 10 объёмов 2%-ного LiClO₄ в ацетоне с последующим центрифугированием при 14000 об/мин в течение 15 мин на центрифуге «Eppendorf 5430». Осадок высушивали при комнатной температуре в течение 15 мин, растворяли в 30 мкл бидистилированной воды, и фотоактивируемое производное олигорибонуклеотида выделяли офВЭЖХ, как описано выше. Фотоактивируемые производные легко отделялись от соответствующих непрореагировавших олигомеров, благодаря значительно большему времени удержания из-за введения гидрофобной арилазидогруппы.

2.2.5. Получение реакционноспособных производных РНК, содержащих радиоактивную метку и диальдегидную группу на 3'-конце.

Для введения метки ³²Р по 3'-концу модельной РНК к её раствору в буфере лигирования (50 мМ Трис-HCl pH 7.8, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ DTT и 1 мМ ATP) добавляли 0.1 мКи [³²P]рСр и 2.5 ед. акт. Т4 RNA лигазы, и реакционную смесь объёмом 10 мкл инкубировали при 8°С в течение 14-17 ч. Меченую РНК осаждали при -20°С последовательным добавлением 1/10 объёма 3 М NaOAc (pH 5.0) и 2.5 объёма этанола в случае, если она имела длину более 70 нуклеотидов, или 10 объёмов 2%-ного LiClO₄ в ацетоне, в случае производных олигорибонуклеотидов. Освободившись от сомнений, от страха, от желанья жить, нам остаётся, как и прежде, любых богов благодарить. За то, что жизнь мгновенна, что не восстать из тлена, что рек бурлящих пену поглотит моря гладь. Осадки отделяли центрифугированием, сушили на воздухе, затем растворяли в 20 мкл буфера, содержащего 50 мМ Трис-HCl (рН 8.0), 100 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂ и 1мМ DTT, фосфатазы и добавляли 1 мкл щелочной инкубировали при 37°C 1 Ч. Дефосфорилированную РНК осаждали этанолом или 2%-ным LiClO₄ в ацетоне (см. выше), осадки растворяли в 20 мкл воды. Окисление 3'-концевой рибозы проводили путем инкубации меченой дефосфорилированной РНК в растворе, содержащем 120 мМ NaOAc (pH 5.0) и 20 мМ NaIO₄, при 8°С в течение 1 ч. Окисленную РНК длиной более 40 нуклеотидов очищали гель-фильтрацией на колонке с Сефадексом G50 suprefine объемом 2.5 мл и сушили на вакуумном испарителе, а производные олигорибонуклеотидов выделяли офВЭЖХ, как описано выше.
2.2.6. Получение комплексов рибосом с тРНК и мечеными аналогами мРНК в отсутствие факторов трансляции

Получение 80S рибосом из 40S и 60S субчастиц проводили, как описано в разделе 2.2.1. тРНК^{Рhe} реактивировали инкубацией в буфере А при 37°C в течение 5 мин. Для получения бинарных смесей инкубацию рибосом с аналогами мРНК проводили инкубацию компонентов в в буфере А при комнатной температуре в течение 1 ч. Тройные комплексы 80S рибосом с олигорибонуклеотидами или их реакционоспособными производными (аналогами мРНК) и тРНК^{Phe} в Р-участке получали инкубацией компонентов в условиях, описанных выше. Концентрации 80S рибосом и тРНК^{Phe} составляли соответственно 7.5×10^{-7} М и 7.1×10^{-6} М, а у аналога мРНК концентрация варьировала от 5.0×10^{-6} М до 8.0×10^{-6} М. Для получения четверных комплексов, содержащих тРНК^{Asp} в А-участке, описанный выше тройной комплекс инкубировали с тРНК^{Asp} (7.5×10⁻⁶М) при комнатной температуре в течение 1 ч

Получение бинарных комплексов с HCV IRES с 40S субчастицами рибосом человека проводили в буфере В (20 мМ НЕРЕS-КОН рН 7.5, 2.5 мМ MgCl₂, 100 мМ KCl). Вначале субчастицы и IRES реактивировали. Для реактивации субчастиц к их водному раствору добавляли ¹/₄ объема пятикратного буфера В и инкубировали инкубацией при 37°C в течение 10 мин. Реактивацию HCV IRES проводили, нагревая его водный раствор при 80°C в течение 1 мин, после чего к раствору добавляли ¹/₄ объема пятикратного буфера В. Комплексы получали, инкубируя 40S субчастицы с концентрацией 7.5×10^{-7} M с HCV IRES в концентрации от 7.5×10^{-7} M до 3×10^{-6} M и при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем рибосомы осаждали 0.8 объёмами этанола, доведя предварительно объём до 20 мКл и добавив Mg²⁺ до 20 мМ.

2.2.7. Определение степени связывания меченых аналогов мРНК с рибосомами

Степень связывания меченых аналогов мРНК с рибосомами определяли фильтрованием комплексов на нитроцеллюлозных фильтрах с диаметром пор 0.45 мкм. Для уменьшения неспецифической сорбции аналогов мРНК фильтры предварительно обрабатывали 0.5 М NaOH в течение 20 мин при 25°С, затем промывали не менее 7 раз бидистиллированной водой и вымачивали в буфере A в течение 30 мин. На один эксперимент по фильтрованию из каждой реакционной смеси отбирали аликвоты, соответствующие примерно 1 пмоль рибосом. Комплексы разбавляли буфером A до 0.8 мл непосредственно перед фильтрованием, фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры и промывали фильтры два раза буфером A порциями по 1 мл. Затем измеряли радиоактивность фильтров (по Черенкову) и рассчитывали степень связывания (моль аналога мРНК на моль рибосом), учитывая удельную радиоактивность меченого аналога мРНК.

2.2.8. Аффинная модификация 80S рибосом аналогами мРНК

Аффинную модификацию рибосом мечеными аналогами мРНК, несущими перфторфенилазидогруппы, проводили, облучая соответствующие комплексы (см. раздел 2.2.6.) УФ-светом (см. раздел 2.1.), с последующим добавлением к реакционным смесям 1/50 объёма 5%-ного β -меркаптоэтанола. Модификацию 80S рибосом и 40S субчастиц диальдегидными производными олигорибонуклеотидов и IRES_{AUG}, проводили, инкубируя комплексы при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем к комплексам добавляли NaBH₃CN до концентрации 5 мМ и инкубировали при 37°C в течение 1ч. Рибосомные комплексы осаждали этанолом, как описано в разделе 2.2.6.

При использовании в качестве аналогов мРНК производных олигорибонуклеотидов полученные осадки рибосомых комплексов растворяли в 10 мкл бидистиллированной воды, добавляли MgCl₂ до конечной концентрации 100 мМ и 1/20 объема 5%-ного β -меркаптоэтанола и затем проводили экстракцию белков уксусной кислотой по методу [217]. Для этого порциями по 2 мкл, через каждые 7 мин при постоянном перемешивании, добавляли 20 мкл ледяной уксусной кислоты при 0°С, при этом РНК оставалась в осадке, а белки переходили в раствор. После добавления последней порции пробы выдерживали во льду еще 1 ч при перемешивании. Раствор белков отделяли от выпавшей в осадок рРНК центрифугированием при 4°С. Белки из супернатанта осаждали четырьмя объемами ацетона (1.5 ч, -20°С). Осадки отделяли центрифугированием и сушили в вакуумном эксикаторе в течение 40 мин, затем растворяли в 50 мкл 2%-ной уксусной кислоты, содержащей 0.1% β -меркаптоэтанола, и лиофилизовали.

При использовании производных IRES_{AUG}, а также в отдельных экспериментах с производными олигорибонуклеотидов осадки растворяли в 50 мкл буфера, содержащего 10 мМ EDTA, 10 мМ Трис-HCl pH 7.5, 3 М мочевину и 0.01% SDS, и в раствор добавляли 5 мкг PHКазы A с последующей инкубацией при 37° C в течение 2 ч. По окончании инкубации белки осаждали четырьмя объемами ацетона, выдерживая смесь после добавления ацетона 1.5 ч при -20°C. Осадки отделяли центрифугированием при 4°C и 13000 об/мин на центрифуге «Eppendorf 5415C», сушили на воздухе.

Полученные образцы белков растворяли в 15 мкл буфера нанесения, содержащего 60 мМ Трис-HCl pH 7.5, 20% глицерина, 0.05% бромфенолового синего, 1% βмеркаптоэтанола и 2% SDS, и хранили их при -20°C.

2.2.9. Получение 48S PIC и 80S рибосомных комплексов с использованием реакционоспособных аналогов мРНК и ЛРК

Получение трансляционных комплексов проводили согласно протоколу трансляции экзогенных мРНК в бесклеточной белоксинтезирующей системе на основе ЛРК, как описано в [218]. Перед началом работы готовили 1 мМ раствор гемина. Для этого к 9.75 мг гидрохлорида гемина добавляли 375 мкл 1М КОН, 825 мкл воды, 150 мкл 1M Трис-HCl (рН 7.5), 13.35 мл этиленгликоля и 300 мкл 1M HCl. Объем полученного раствора доводили до 15 мл, и затем раствор титровали 1M HCl до pH 6.8. К 200-1000 мкл ЛРК во льду добавляли 1 мМ гемин и 0.1М CaCl₂ до концентраций 50 мкМ и 2.5 мМ соответственно, затем добавляли микрококковую эндонуклеазу до концентрации 0.05 г/л, и смесь инкубировали 20 мин при комнатной температуре для расщепления эндогенных мРНК. После этого добавляли на льду 1/200 объёма раствора креатинфосфокиназы с концентрацией 40 г/л и 0.2 М раствор EGTA-КОН (рН 7.5) до конечной концентрации 5мМ. В отдельном эксперименте с помощью центрифугирования 500 мкл ЛРК в градиенте плотности сахарозы в условиях диссоциации 80S рибосом на 40S и 60S субчастицы определили, что такое количество ЛРК соответствует примерно 20 пмоль 40S субчастиц. К обработанному ЛРК добавляли 1/20 объема 20-кратного буфера С (однократный буфер С: 0.5 мМ сперимидин, 8 мМ креатинфосфат натрия, 1 мМ АТР, 0.25 мМ СТР, 2 мМ Mg(OAc)₂ и 100 мМ KOAc), раствор смеси 20 аминокислот до конечной концентрацин каждой аминокислоты 250 мкМ, а также 1 М DTT и 1 М HEPES-KOH (pH 7.5) до конечных концентраций 2 мМ и 20 мМ соответственно. К полученной смеси добавляли GMPPNP до конечной концентрации 2 мМ для образования 48S PIC или GTP до конечной концентрации 0.5 мМ для образования 80S комплекса; для остановки трансляции на стадии транспептидации вместе с GTP добавляли также раствор анизомицина в DMSO до конечной концентрации 5 мМ, а для блокирования транслокации – водный раствор эмитина до конечной концентрации 2 мМ. Для формирования рибосомного комплекса соответствующую смесь инкубировали при 30°С 5 мин, затем добавляли в неё раствор ³²Рмеченого аналога мРНК до конечной концентрации от 0.2 до 0.5 мкМ с последующей инкубацией при этой же температуре 10 мин. Раствор мРНК предварительно нагревали при 80°С 2 мин для расплавления её вторичной структуры, после чего помещали на лед на 1 мин. В качестве аналогов мРНК использовали 43-49-звенные олигорибонуклеотиды, IRES_{FL} и IRES_{AUG}, а также диальдегидные производные олигорибонуклеотидов и IRES_{AUG}, или перфторарилазидо-производное олигорибонуклеотида. Для ковалентного сшивания этих производных с белками реакционные смеси обрабатывали, как описано в разделе 2.2.8.

Образовавшиеся таким способом 48S PIC и 80S рибосомные комплексы выделяли центрифугированием в линейном градиенте плотности сахарозы (15%-30%) в буфере, содержащем 2 мМ MgCl₂, 100 мМ KCl, 20 мМ мМ Трис-HCl (pH 7.5) и 4 мМ βмеркаптоэтанол, при 4°C 18 ч (ультрацентрифуга «Весктап L8М», ротор SW-40, 26000 об/мин). По окончании центрифугирования содержимое пробирок фракционировали, как описано выше (раздел 2.2.1.), собирая фракции объемом 0.5 мл и просчитывая в них радиоактивность. Фракции, соответствующие радиоактивным пикам, совпадающим по положению в профиле седиментации с положениями рибосомных пиков, объединяли. Рибосомные комплексы осаждали из объединённых фракций добавлением 2 объемов спирта, доведя предварительно концентрацию Mg^{2+} до 20 мМ и добавив гликоген до концентрации 4 мг/л в качестве носителя, с последующим центрифугированием, и полученные осадки растворяли в буфере нанесения (см. раздел 2.2.8.). Обработку рибосомных комплексов РНКазой A и все последующие процедуры в тех случаях, когда это было необходимо, проводили, как описано в разделе 2.2.8.

2.2.10. Проверка функционального состояния рибосомных комплексов, полученных с использованием ЛРК, с помощью тоу-принтинга

Эксперименты по тоу-принтингу проводили согласно методике [219]. Рибосомные комплексы 48S PIC и 80S собирали на кмРНК, имеющей конечную концентрацию 0.3 мкМ, с использованием 9 мкл трансляционной смеси, полученной с использованием RRL по методике, описанной в разделе 2.2.10. После инкубации для получения соответствующих рибосомных комплексов к смеси добавляли 1 мкл водного раствора 5'-³²Р-меченого праймера GCTTCCTTCGTGTCTTTGTC с удельной активностью 50 кимп/(пмоль*мин) в количестве 5 пмоль. К полученной смеси добавляли 10 мкл буфера Д, содержащего 200 мМ Трис-HCl (рН 8.3), 300 мМ КОАс, 32 мМ Мg(OAc)₂, 40 мМ DTT, дезокситрифосфаты ATP, CTP, GTP и TTP в 1 мМ концентрации каждый. Для получения сиквенсных дорожек к водным растворам кмРНК и праймера в тех же концентрациях, что с ЛРК. добавляли И В опытах растворы соответствующих дидезоксинуклеотидтрифосфатов до конечной концентрации 67 мкМ. Ко всем реакционным смесям добавляли по 1 ед. акт. AMV-ревертазы, и затем инкубировали их при 42°С в течение 30 мин с последующим выделением РНК и продуктов обратной транскрипции фенольной экстракцией и осаждением этанолом в присутствии 4 мкг гликогена в качестве соосадителя. Продукты обратной транскрипции анализировали в 10%-ном денатурирующем ПААГ, содержащем 8 М мочевину (размер геля 22×16 см).

после электрофореза гель радиоавтографировали с помощью фосфоримиджера (см раздел 2.1.).

2.2.11. Выделение суммарной РНК из комплексов рибосом, полученных с использованием ЛРК, и её постмечение

Осадки, полученные после осаждения этанолом рибосомного материала из фракций сахарозного градиента (см. раздел 2.2.9.), растворяли в 50 мкл раствора, содержащего 1% SDS и 10 мМ EDTA, и инкубировали при 37°C в течение 10 мин для диссоциации всех PHK-белковых комплексов. Суммарную PHK очищали от белков фенольной депротеинизацией и осаждали этанолом, как описано в разделе 2.2.5., после чего растворяли в 10 мкл воды. К этому раствору добавили 3M NaOAc pH 5.5 и 0.1M CuSO₄ до конечных концентраций 150 мМ и 11 мМ соответственно, и инкубировали его при 30°C в течение 25 мин. Затем PHK осаждали этанолом, растворяли в 5 мкл воды и вводили радиоактивную метку на 3'-конец с помощью [32 P]pCp и T4 PHK-лигазы, как описано в разделе 2.2.5. Полученную меченую PHK осаждали этанолом, как описано выше, растворяли в 15 мкл формамида, содержащего красители ксиленцианол и бромфеноловый синий, и анализировали электрофорезом в 10%-ном ПААГ в присутствии 8 М мочевины (размер геля 22×16 см). Электрофорез вели до выхода обоих красителей из геля. По окончании электрофореза гель высушивали и радиоавтографировали.

2.2.12. Получение белок-белковых сшивок, индуцированных формальдегидом

Для получения 10%-ного формальдегида, к 52 мкл 38%-ного формальдегида, содержащего параформальдегид в виде взвеси, добавляли 148 мкл фосфатно-солевого буфера (137 мМ NaCl, 2 мМ KCl, 10 мМ К₂HPO₄,) рН 7.5, приготовленного путём растворения соответствующей таблетки (см. раздел 2.1.) в 100 мл воды, с последующей инкубацией смеси в течение 2 ч при 80°С на водяной бане. Получившийся в результате раствор 10%-ного формальдегида хранили при комнатной температуре не более 2 недель.

Оптимальные условия образования белок-белковых сшивок под действием формальдегида подбирали на свободных 40S субчастицах рибосом человека. Для этого к 10-20 пмоль 40S субчастиц в 50 мкл буфера (13 мМ MgCl₂, 120 мМ KCl, 20 мМ HEPES KOH pH 7.5 и 0.65 мМ EDTA-KOH) добавляли 10%-ный формальдегид до конечной концентрации от 0.2 до 1.2% и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. После обработки формальдегидом 40S субчастицы осаждали 0.8 объёмами этанола и осадки сушили. Далее осадки растворяли в 15 мкл буфера нанесения (см. раздел 2.2.8) для последующего анализа электрофорезом в ПААГ по методу Лэммли (SDS-ПААГ) [220]. В

отдельных опытах перед анализом по методу Лэммли индуцированные формальдегидом белок-белковые сшивки разрушали; для этого осадки рибосомного материала растворяли в 15 мкл 25 мМ NH₄HCO₃ и инкубировали в течение 15 мин при 99°С, после чего белки осаждали 4 объёмами ацетона, растворяли в буфере нанесения и анализировали, как описано выше.

В подобранных условиях обрабатывали 48S PIC, полученный на основе ЛРК с использованием кмРНК или IRES_{FL}, как описано в разделе 2.2.8. К реакционной смеси, содержащей 500-1000 мкл ЛРК, добавляли формальдегид до конечной концентрации 0.8%, и после 10-минутной инкубации реакцию останавливали добавлением глицина до концентрации 0.2 М. Обработанный 48S PIC, содержащий сшитые белки, выделяли центрифугированием в градиенте плотности сахарозы с последующим осаждением этанолом, как описано в разделе 2.2.6. Обращение сшивки в тех случаях, когда это было необходимо, проводили, как описано выше. Полученные осадки растворяли в буфере нанесения (см. раздел 2.2.8.).

2.2.13. Анализ белков одномерным SDS-ПААГ по методу Лэммли

Перед анализом пробу прогревали в буфере нанесения в течение 10 мин при 80°С на водяной бане для диссоциации всех РНК-белковых комплексов. Гель для электрофореза состоял из разделяющего (основная часть) и концентрирующего (2-3 см в верхней части геля). Разделяющий гель состоял из 15%-ного ПААГ, содержащего 375 мМ Трис-HCl (pH 8.8) и 0.1% SDS, а концентрирующий – из 4.5%-ного ПААГ, содержащего 125 мМ Трис-HCl (pH 6.8) и 0.1% SDS. Электродный буфер Лэммли содержал 25 мМ Трис-HCl (pH 8.3), 0.1% SDS и 192 мМ глицин. Электрофорез проводили в течение 3 ч при 13 Вт до выхода красителя из рабочего геля. По окончании электрофореза гель окрашивали кумасси бриллиантовым синим.

В отдельных экспериментах по окончании электрофореза гель высушивали на гельдрайере и радиоавтографировали в течение 1-4 ч. Высушенный гель совмещали с радиоавтографом и вырезали основную радиоактивную полосу, соответствующую модифицированному белку. Вырезанный фрагмент геля разделяли при помощи ножниц на мелкие кусочки, помещали каждый из них в отдельную пробирку и хранили при -20°C.

2.2.14. Идентификация белков иммуноблотингом с помощью специфичных антител

Кусок нитроцеллюлозной мембраны и фильтровальную бумагу для переноса, вырезанные по размеру геля, предварительно вымачивали в течение 10 мин в растворе, содержащем 20% этанола и 80% электродного буфера Лэммли. На анод прибора для переноса помещали «сэндвич», состоящий из фильтровальной бумаги, нитроцеллюлозной мембраны, полиакриламидного геля с разделёнными белками и фильтровальной бумаги. При этом следили, чтобы между слоями был плотный контакт. Перенос проводили при 25 В и силе тока от 100 до 300 мА в зависимости от размеров мембраны, в течение 1.5 ч. Для проявления перенесенных белков мембрану окрашивали 0.2%-ным раствором красителя Ponseau S в 0.5%-ной уксусной кислоте. Мембрану с перенесенными белками вымачивали в 5%-ном растворе сухого обезжиренного молока в буфере E (20 мМ Трис-HCl pH 7.5, 150 мМ NaCl и 0.1% Tween 20) для предотвращения неспецифической сорбции антител на поверхности мембраны. Лиофилизованные антисыворотки, либо очищенные антитела против анализируемого белка растворяли в буфере Е до концентрации 5 г/л при тщательном перемешивании, не растворившийся материал отделяли от раствора центрифугированием. Полученный раствор разбавляли буфером Е, содержащим 0.5% молока, в 200-1000 раз в зависимости от используемых антител, добавляли к мембране и инкубировали 1 ч при перемешивании на горизонтальном шейкере. Мембрану промывали от не связавшихся антител несколько раз порциями по 10 мл буфера Е, содержащего 0.5% молока. Затем к мембране добавляли антитела против IgG кролика, разбавленные в 10000 раз по объему буфером Е, содержащим 0.5% молока, и инкубировали 1 ч. После этого мембрану тщательно промывали буфером Е, содержащим 0.5% молока, и пропитывали растворами для проявления хемилюминесценции, вызванной окислением люминола кислородом, который выделяется при расщеплении перекиси водорода пероксидазой хрена, конъюгированной на антителах. Люминесценцию антител детектировали с помощью рентгеновской пленки, время экспозиции составляло от 1 до 12 ч.

2.2.15. Приготовление рабочих растворов эндопептидаз

Название фермента	Объём одной порции	Концентрация фермента в
	(мкл)	стоковом растворе (мкг/мкл)
Asp-N	5	0.04
Arg-C	5	0.1
Glu-C	10	0.2
Пепсин	10	1
Трипсин	10	0.25

Таблица 3. Концентрация ферментов, используемых в работе.

Перед началом работы эндопротеиназы, кроме трипсина, растворяли в бидистиллированной воде, и растворы хранили маленькими порциями по (5-10 мкл) при температуре -70°С. Трипсин растворяли в 50 мМ уксусной кислоте. Каждую порцию размораживали и использовали только один раз. Конечная концентрация фермента в полученном растворе и объём одной порции для каждого фермента представлены в таблице. З

2.2.16. Подбор условий расщепления белков протеазами

Условиями исчерпывающего расщепления белка считали те, при которых дальнейшее увеличение концентрации фермента не приводило к изменению интенсивности полос образующихся в результате пептидов при электрофоретическом анализе расщепленного белка. Для определения количества фермента, необходимого для исчерпывающего гидролиза белка, сшитого с производным олигонуклеотида, проводили обработку протеазами кусочка геля, содержащего радиоактивную полосу, соответствующую этому белку, варьируя либо концентрацию фермента, либо время инкубации. По окончании реакции кусочки геля отделяли центрифугированием (Eppendorf 5415C, 14000 мин⁻¹, 2 мин), и супернатант сушили на вакуумном испарителе. Затем пробы растворяли в 15 мкл буфера нанесения (см. раздел. 3.12.) и анализировали гель-электрофорезом (см. ниже).

2.2.17. Разделение фрагментов, полученных при расщеплении белков протеолитическими агентами

Разделение относительно коротких пептидов массой в несколько кДа проводили с помощью электрофореза в ПААГ в Трис-трициновой системе. Ступенчатый ПААГ состоял из 16.5%-ного разделяющего геля, содержащего 300 мМ Трис-HCl (pH 8.45), 12% глицерина и 0.1% SDS, и 4%-ного концентрирующего геля, содержащего 750 мМ Трис-HCl (pH 8.45) и 0.075% SDS. Катодный буфер для электрофореза содержал 0.1% SDS, 100 мМ Трис и 100 мМ трицин (pH 8.3), анодный буфер – 200 мМ Трис-HCl (pH 8.9).

2.2.18. Расщепление модифицированных белков эндопротеиназами

Glu-C: К кусочкам геля, содержащим модифицированный белок или пептид, добавляли 100 мкл смеси, содержащей 100 мМ Трис-HCl (pH 7.8), 0.01% SDS и 1 мкл фермента. Инкубацию вели в течение 12 ч при комнатной температуре.

Arg-C: К кусочкам геля, содержащим модифицированный белок или олигопептид, добавляли 45 мкл буфера (10 мМ CaCl₂, 100 мМ Трис-HCl pH 8.0), 5 мкл раствора, содержащего 50 мМ DTT и 5 мМ EDTA, и 0.5 мкл рабочего раствора фермента. Инкубацию вели 12 ч при комнатной температуре.

Asp-N: Для расщепления пептида, сшитого с меченым аналогом мРНК, к соответствующему кусочку геля добавляли 100 мкл буфера, содержащего 10 мМ Трис-HCl (pH 7.5) и раствор фермента до конечной концентрации 1 мг/л. Инкубацию вели при 37°C в течение 12 ч.

Пепсин: Для проведения гидролиза кусочек геля, содержащий модифицированный пептид, инкубировали в 100 мкл буфера (1%-ная НСООН, титрованная ТЭА до pH 2.6) в течение 12 ч при 37°С.

По окончании инкубации с ферментами кусочки геля отделяли от растворов центрифугированием (см. раздел 2.2.15), и супернатанты анализировали гельэлектрофорезом в Трис-трициновой системе, как описано выше (раздел 2.2.16).

2.2.19. Расщепление модифицированных белков по остаткам цистеина с помощью NTCB

NTCB растворяли до концентрации 0.2 М в буфере, содержащем 0.2 М Трис-ОАс (pH 8.0) и 6 М гуанидинхлорид. Для восстановления остатков цистеина, по которым происходит расщепление NTCB, к кусочкам геля добавляли 45 мкл вышеуказанного буфера и 5 мкл 50 мМ DTT и инкубировали их 6 ч при 37°C. К этой смеси добавляли 25 мкл 1 М NaOH и 50 мкл 0.2 М NTCB и смесь инкубировали при 37°C 12 ч. По окончании инкубации к смеси добавляли 1/5 объёма 85%-ной муравьиной кислоты, 1 мкл БСА (10 г/л) и 1/2 объёма воды, и пептиды осаждали 6 объёмами ацетона.

2.2.20. Расщепление белков, вырезанных из полиакриламидного геля, трипсином для идентификации продуктов масс-спектрометрией

Полосы, содержащие белки, вырезали из окрашенного кумасси бриллиантовым голубым геля, отмывали от краски в 100 мкл раствора, содержащего 50% CH₃CN и 25 мМ NH₄HCO₃ (раствор I) при перемешивании на горизонтальном шейкере в течение 10-20 мин и высушивали в вакуумном испарителе. После этого к кусочкам геля добавляли 35 мкл раствора, содержащего 10 мМ DTT и 25 мМ NH₄HCO₃, и инкубировали их 1 ч при 56°C, затем эти кусочки отделяли от раствора центрифугированием и добавляли к ним 35 мкл 55 мМ йодацетамида в 25 мМ NH₄HCO₃. Смеси инкубировали в темноте в течение 45

мин при комнатной температуре. Затем кусочки геля промывали 10 мин в 100 мкл раствора I, 5 мин в 100 мкл 25 мМ NH₄HCO₃ и ещё раз 5 мин в 100 мкл раствора I. После этого кусочки геля высушивали в вакуумном испарителе, и добавляли к ним 20 мкл раствора трипсина (12 мг/л) в 50 мМ NH₄HCO₃, содержащего 0.01% сурфактанта для увеличения эффективности элюции белка из геля, инкубировали 10 мин на льду, затем добавляли 30 мкл 0.01%-ного сурфактанта в 50 мМ NH₄HCO₃. Расщепление трипсином проводили 2 ч при 37°C. Раствор, содержащий продукты трипсинолиза, отделяли от кусочков геля центрифугированием и концентрировали в вакуумном испарителе до объема 10-20 мкл, затем добавляли 4 мкл 0.01%-ной трифторуксусной кислоте (TFA).

2.2.21. Обессоливание продуктов трипсинолиза белков и подготовка проб для массспектрометрического анализа

Пептиды, полученные после гидролиза белков трипсином, обессоливали с помощью колонок «ziptip» для подготовки проб к масс-спектрометрии, выполненных в виде наконечников на пипетку и содержащих фазу С18. Колонки перед использованием промывали 10 раз порциями по 10 мкл 50%-ного CH₃CN и 3 раза порциями по 10 мкл 0.01%-ной TFA, набирая раствор в колонку и сливая его в другую пробирку. Затем образец набирали в наконечник «ziptip» и выдавливали обратно в пробирку 15-20 раз, после чего сорбент отмывали от низкомолекулярных компонентов 3 раза порциями по 10 мкл 0.01%-ной TFA. После этого пептиды элюировали, набирая в наконечник «ziptip» 1 мкл раствора, содержащего 80% CH₃CN и 0.01% TFA, и выдавливая его в лунку планшета для MALDI анализа. В качестве матрицы для масс-спектрометрического анализа использовали 2-циано-4-гидроксифенилпропеновую кислоту, насыщенный раствор которой в 50%-ном CH₃CN, содержащем 0.01% TFA, в количестве 1 мкл был предварительно нанесён на ту же лунку. Получившуюся смесь вновь набирали в наконечник и выдавливали обратно в лунку, эту процедуру повторяли 10-15 раз для достижения более полной степени элюции.

2.2.22. Масс-спектрометрический анализ продуктов трипсинолиза белков

Масс-спектры MALDI-TOF были сняты сотрудником центра массспектрометрического анализа Объединенного центра геномных, протеомных И метаболомных исследований ИХБФМ СО РАН Касакиным М. Ф. на масс-спектрометре REFLEX III, оснащенном импульсным N2-лазером (337 нм). Спектры снимали в положительной отраженной моде, при этом ионы имели кинетическую энергию 23 кЭв. Окончательные спектры были получены путем накопления ~ 1500 одиночных измерений.

Калибровку масс-спектрометра выполняли с помощью белкового стандарта (Protein Calibration Standard II, «Bruker Daltonics»). Точность измерения масс достигала ~ 15 ppm. Измерения и накопление сигналов проводили с помощью программы flexAnalysis 2.4 (Bruker Daltonik GmbH, Germany). Интерпретацию MS спектров осуществляли с использованием программы mmass [221], соединенной с лицензированным сервером Mascot (http://www.matrixscience.com) (с допущением отклонения от теоретической массы не более чем 0.2 Да). Масс-спектры анализировали с учетом модификации остатков цистеина йодацетамидом.

2.2.23. Моделирование структуры рибосомных комплексов

Для моделирования комплекса 40S субчастиц рибосом с TC использованы структурные модели (1) комплекса 30S субчастиц *Thermus Thermophilus* с мРНК и тРНК в P-участке (PDB номер 2HGR), (2) 40S субчастицы дрожжей (PDB номер 3U5C) и (3) TC *Sulfolobus solfataricus*, содержащего aIF2•GDPNP•Met-тPHK_i (PDB номер 3V11). Моделирование проводили на основании гомологии между некоторыми компонентами аппарата трансляции у прокариот и эукариот. Сначала первую структуру наладывали на вторую, выравнивая третичные структуры гр uS7 в этих моделях. Затем на полученную модель 40S субчастицы с тРНК в P-участке накладывали модель структуры TC, совмещая при этом третичные структуры тРНК, содержащихся в этих моделях.

Наложение структур гомологичных компонентов аппарата трансляции выполняли с помощью программного пакета PyMol (http://www.pymol.org), при этом оптимальным считали наложение с минимальным среднеквадратичным отклонением положений атомов друг от друга в этих структурах.

2.2.24. Химический пробинг рРНК в составе рибосомных комплексов с помощью бензоилцианида

Для модификации рРНК в составе рибосомных комплексов готовили 4 М раствор бензоилцианида, добавляя к 32 мкл безводного DMSO 20 мкл предварительно расплавленного при 37°C бензоилцианида. Затем к реакционной смеси объемом 150-200 мкл, содержащей рибосомные комплексы, собранные с использованием ЛРК по методике, описанной в разделе 2.2.9, добавляли раствор бензоилцианида до концентрации 60 мМ, и смеси инкубировали 2 мин при комнатной температуре. В контрольных экспериментах к смесям добавляли равное количество DMSO. По окончании инкубации рибосомные комплексы выделяли сахарозным градиентом и осаждали, как описано в разделе 2.2.9., с последующим выделением РНК фенольной депротеинизацией и осаждением этанолом,

как описано в разделе 2.2.10. Суммарную РНК из комплексов растворяли в 1 мкл бидистиллированной воды, добавляли 2 пмоль одного их 5'-[³²P]-меченых праймеров, комплементарного участку 655-674 или 1537-1556 188 рРНК рибосом человека, доводили объём до 5 мкл водой и нагревали смесь 2 мин при 95°С, после чего помещали в лед и добавляли к ней 5 мкл буфера Д. Обратную транскрипцию с последующим выделением РНК и продуктов реакции проводили, как описано в разделе 2.2.10. Продукты обратной транскрипции анализировали в 8%-ном денатурирующем ПААГ, содержащем 8 М мочевину (размер геля 50×21 см), после электрофореза сушили гель И радиоавтографировали (см раздел 2.1.).

Глава 3. РОЛЬ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ В ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ (РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ)

3.1. РЕЗУЛЬТАТЫ

Как уже упоминалось в литературном обзоре, к моменту начала настоящей работы данные о пептидах рибосомных белков, взаимодействующих с участниками процесса трансляции у млекопитающих, были весьма ограниченными; эти данные в основном были получены в ЛСФР СО РАН, возглавляемой проф. Карповой Г. Г. Так, например, в работах были установлены участки rp uS19 (S15) [11] - одного из ключевых компонентов декодирующего центра рибосом человека, и фактора терминации трансляции eRF1, [12, 13] контактирующие с мРНК на рибосоме человека в процессе трансляции. Для этой цели применяли метод аффинной модификации с использованием коротких аналогов мРНК – производных олигорибонуклеотидов, несущих сшивающую группу В заданном положении, сочетании с расщеплением сшитого белка специфическими В протеолитическими агентами и последующем разделении образующихся пептидов гельэлекторофорезом.

В настоящей работе аналогичный подход использован для установления фрагмента rp eS26, соседствующего с мРНК в процессе трансляции. Выбор данного белка в качестве одного из объектов исследования обусловлен тем, что rp eS26 является одним из основных компонентов рибосомного участка связывания мРНК с 5'-стороны от кодона в E-участке [222] на стадии элонгации трансляции, а при инициации трансляции он контактирует с 5'-НТО мРНК [21].

Для определения непосредственного контакта рибосомных белков с факторами инициации трансляции является подходящим метод, основанный на образовании белокбелковых сшивок между различными компонентами системы трансляции с помощью бифункционального сшивающего реагента – формальдегида. Этот реагент способен образовывать с высокой эффективностью сшивки практически нулевой длины с аминокислотными остатками белков [223, 224]. В сшивках участвуют преимущественно остатки лизина; процесс образования сшивок, индуцированных формальдегидом, обратим – сшивки могут быть разрушены при нагревании в условиях, не нарушающих целостности полипептидов. Подход, основанный на применении формальдегида, использован в настоящей работе для установления участка гр uS7, контактирующего с факторами инициации трансляции. Взаимодействие этого белка с факторами инициации можно было ожидать на основании данных по сшивкам 4-тиоуридин-содержащих аналогов мРНК в рибосомных инициаторных комплексах, где остаток 4-тиоуридина из одного и того же положения мог сшиваться как с rp uS7, так и фактором eIF2 α [15, 21]. Эти данные указывают на то, что rp uS7 соседствует или даже взаимодействует с eIF2 α в составе инициаторных комплексов.

Для установления структурных основ РНК-белковых взаимодействий подходящими инструментами являются аналоги РНК с диальдегидной группой на 3'-конце. Эти аналоги образуют с высокой эффективностью сшивки с белками практически нулевой длины; их мишенями являются остатки лизина и аргинина [223]. Такие аналоги мРНК - производные олигорибонуклеотидов, применены в настоящей работе для идентификации участка гр uS3, ответственного за его взаимодействие с короткими одноцепочечными РНК, которое наблюдали ранее в разных рибосомных комплексах независимо от присутствия тРНК [14, 16, 149].

Наконец, ещё одной задачей, поставленной в данной работе, было изучение структурных перестроек 40S субчастицы рибосомы в области участка входа в мРНКсвязывающий канал, где расположены гр uS3 и h16 18S рРНК. К моменту начала настоящей работы было известно, что структурные элементы рибосомы, формирующие этот участок, участвуют в конформационных перестройках на стадии распознавания старт-кодона [17, 18]. Более того, были получены указания на то, что гр uS3 и h16 18S рРНК взаимодействуют друг с другом на стадии сканирования мРНК [18]. В настоящей работе для определения степени экспонированности гр uS3 на разных стадиях процесса инициации в качестве инструментов также были использованы вышеупомянутые аналоги мРНК с диальдегидной группой на 3'-конце. Для выявления структурных перестроек в 40S субчастице, происходящих с участием h16 18S рРНК, применен метод химического футпринтинга, который на сегодняшний день является наиболее адекватным методом для анализа конформационных переходов в рибосоме [226, 227].

3.1.1. Определение фрагментов rp eS26, соседствующих с мРНК на рибосоме человека

3.1.1.1. Аналоги мРНК, использованные для модификации rp eS26, и их сшивка с этим белком в составе рибосомных комплексов

Аналоги мРНК, использованные для модификации гр eS26, содержали метку ³²P на 5'-конце, фенилаланиновый кодон UUU и сшивающую фотоактивируемую группу на остатке уридина с 5'-стороны от фенилаланинового кодона или в его составе (см. таблицу 4 и рис. 21А). Сшивку аналогов мРНК с гр eS26 проводили в составе тройных комплексов с 80S рибосомами человека и тРНК^{Phe}, которая направляла фенилаланиновый кодон в P-

участок рибосомы, а остаток уридина с фотоактивируемой перфторфенилазидогруппой - в положение от +1 до -9 относительно первого нуклеотида кодона в Р-участке (рис. 21Б). Такие комплексы моделируют состояние рибосомы после окончания инициации перед началом первого цикла элонгации - 80S инициаторный комплекс с инициаторной тРНК в Р-участке и свободным А-участком.

Таблица 4. Аналоги мРНК, использованные для модификации гр eS26 в составе комплексов 80S рибосом человека. Звездочкой обозначен модифицированный остаток уридина, изображенный на рис. 21А. Обозначения аналогов отражают положение модифицированного остатка уридина.

Обозначение	Последовательность	Положение	модифицированного
аналога	аналога	нуклеотида	относительно первого
		нуклеотида	кодона, направляемого в Р-
		участок	
+1U	pU*UU GUU	+1	
-3U	pU*CC UUU	-3	
-4U	pU* GUG UUU	-4	
-6U	pU*CU GUG UUU	-6	
-9U	pU*CU CUC GUG UUU	-9	



Рис. 21. Остаток уридина, несущий тетрафторфенилазидогруппу (A), и комплекс 80S рибосомы с аналогом -6U (в качестве примера) (Б). А, Р и Е – тРНК-связывающие участки рибосомы.

Для образования сшивок комплексы облучали мягким УФ-светом с длиной волны >290 нм. Суммарный рибосомный белок, полученный из облученных комплексов, анализировали гель-электрофорезом с последующей радиоавтографией. Как видно из результатов, приведенных на рис. 22, степень модификации гр eS26 зависит от положения модифицирующей группы в аналоге мРНК. Как и следовало ожидать [14, 228], этот белок

является основной мишенью для модификации аналогами мРНК с фотоактивируемой группой в положениях от -4 до -9. Полосы над сшитым гр eS26, наблюдаемые для аналогов мРНК +1U и -3U (рис. 22), соответствуют модифицированным рибосомным белкам uS7 и uS11 [149], а интенсивные полосы в верхней части геля – модифицированной 18S рРНК. Слабые полосы в средней части геля, присутствующие в экспериментах со всеми аналогами, по-видимому, соответствуют рибосомным белкам uS3 и uS5 (S2) [14]. Видно, что модифицированный гр eS26 имеет разную подвижность в зависимости от длины сшитых с ним олигорибонуклеотидов (рис. 22). Для уменьшения их влияния на электрофоретическую подвижность белка в дальнейшем проводили исчерпывающий гидролиз РНКазой А, после чего модифицированный гр eS26 выделяли гель-электрофорезом. Гидролиз РНКазой А не приводил к потере метки в модифицированном белке, поскольку метка ³²P в аналогах была непосредственно связана с остатком уридина, который содержал сшивающую группу. После исчерпывающего гидролиза с белком остаются связанными моно- или динуклеотидные фрагменты массой 0.5 или 0.8 кДа соответственно.



Рис. 22. Анализ белков 40S субчастицы, сшитых с 5'-[³²P]-мечеными аналогами мРНК, одномерным гельэлектрофорезом в присутствии SDS. Радиоавтограф. Отмечены полосы, соответствующие сшитым 18S рРНК и рибосомным белкам. Различия в подвижности модифицированного гр eS26 и других модифицированных белков в дорожках отражают разную длину аналога, сшитого с белками.

3.1.1.2. Определение участка модификации rp eS26

Для специфического расщепления модифицированного гр eS26 использовали такие протеолитические агенты, как 2-нитро-5-тиоцианобензойную кислоту (NTCB), расщепляющую полипептидную цепь после остатков цистеина, и эндопротеиназы GluC, ArgC и AspN, расщепляющие белок, соответственно, после остатков Glu, Arg, и перед 88

Asp. Кроме того, применяли также пепсин, расщепляющий пептидные связи, образованные содержащими ароматические или карбоксильные остатки аминокислотами. Расщепление указанными расщепляющими агентами проводили в параллельных экспериментах со всеми аналогами мРНК, за исключением +1U, поскольку степень сшивки этого аналога с rp eS26 была слишком низкой для проведения анализа. Полученные смеси пептидов rp eS26 разделяли гель-электрофорезом в трис-трициновой системе (рис. 23А), используя в качестве маркеров молекулярной массы продукты расщепления рекомбинантного белка массой 7.4 кДа, включающего N-концевой His-таг длиной 21 аминокислотный остаток и последовательность из 45 С-концевых аминокислотных остатков гр eS26 человека и называемого далее белком S26C. Использование таких маркеров вместо коммерческих вызвано тем, что рибосомные белки имеют аномально низкую электрофоретическую подвижность, и можно было ожидать, что подвижность продуктов их расщепления будет также аномальной. Белок S26C имеет единственный сайт для расщепления GluC и 2 сайта для расщепления пепсином (рис. 23Б), что позволяет однозначно идентифицировать продукты его расщепления на окрашеном кумасси геле. Видно, что набор меченых пептидов, получаемых при eS26 расщеплении модифицированного rp вышеуказанными протеолитическими агентами, не зависит от положения модифицированного остатка уридина в аналоге мРНК, иными словами, сайт сшивки в гр eS26 для всех аналогов мРНК оказался одинаковым (рис. 23А). Для сшитого гр eS26 после обработки пепсином была детектирована лишь одна полоса в самом низу геля, которая соответствует очень коротким (длиной в несколько аминокислотных остатков) продуктам, схожим по электрофоретической подвижности с продуктами неспецифического расщепления такого белка протеиназой К (рис. 23А, дорожки nencuh и npom. К). Анализ карты расщепления rp eS26 пепсином показывает, что очень короткие меченые фрагменты rp eS26 могут образовываться только в том случае, если участок сшивки находится во фрагменте 59-71 (рис. 23В).

Схожие результаты получены при расщеплении модифицированного гр eS26 другими протеолитическими агентами. Так, меченые пептиды, образующиеся при расщеплении этого белка с помощью GluC и ArgC, имеют приблизительно одинаковую электрофоретическую подвижность, соответствующую таковой примерно 30-звенного пептида с массой около 4 кДа (рис. 23А). Учитывая, что при расщеплении модифицированного гр S26 с помощью ArgC может образовываться только единственный



Рис. 23. Определение участков сшивки гр eS26 с аналогами мРНК. А, электрофоретическое разделение фрагментов гр eS26, образующихся после обработки белка, сшитого с 5'-мечеными аналогами мРНК, GluC, ArgC, NTCB, пепсином или протеиназой К. Радиоавтограф (слева) и окрашенная кумасси R-250 электрофореграмма геля после электрофореза белка S26C и продуктов его расщепления пепсином или GluC (справа). Дорожки «*k*» на радиоавтографе - необработанный модифицированный гр eS26, а на окрашенном геле – нерасщепленный белок S26C. Молекулярные массы в кДа указаны справа от панели. Б, последовательность рекомбинантного белка S26C (Histag и спейсер выделены жирным). Положение сайтов расщепления пепсином и GluC указаны стрелками. В, карты расщепления гр eS26 человека с помощью ArgC, GluC, NTCB и пепсина. Черные жирные линии соответствуют фрагментам гр eS26, сшитым с мРНК по данным, приведенным на панели А.

достаточно длинный фрагмент (52-85), можно заключить, что меченым фрагментом, образующийся при использовании GluC, является пептид 56-90 (рис. 23В). Следовательно, по результатам расщепления модифицированного гр S26 данными эндопротеазами, участок сшивки находится во фрагменте 56-85 гр S26, включающем регион 59-71, найденный с помощью расщепления пепсином.

В дорожке, соответствующей расщеплению гр eS26 при помощи NTCB, видны две полосы (рис. 23А). Верхняя полоса соответствует продукту неполного расщепления гр eS26, чья электрофоретическая подвижность значительно меньше, чем у белка S26C, и, следовательно, эта полоса может быть отнесена к фрагменту 29-115 (рис. 23Б, В). Нижняя полоса, очевидно, соответствует продукту полного расщепления гр eS26 – пептиду 29-73, что согласуется с выводом, что в результате расщепления ArgC участок сшивки гр eS26 с аналогами мPHK оказывается во фрагменте 52-85, а при расщеплении GluC - в пептиде, ограниченном аминокислотными остатками 56-90.



Рис. 24. Электрофоретический анализ продуктов последовательного гидролиза модифицированного белка S26 протеазой ArgC (дорожки *k*), а затем AspN (дорожки *AspN*). А, радиоавтограф. Обозначения аналогов мРНК, использованных для сшивки, приведены сверху. На дорожке *прот. К* представлен анализ продуктов расщепления белка S26 протеиназой К. Молекулярные массы маркеров, полученных из белка S26C (см. рис. 23B), приведены справа. Б, схематическое представление фрагмента 52-85 и схема его расщепления эндопротеиназой AspN.

Для того чтобы более точно локализовать участок сшивки внутри пептида 59-71, фрагмент 52-85, полученный при расщеплении модифицированного гр eS26 ArgC

(рис.23Б), обрабатывали эндопептидазой AspN (рис. 24). Видно, что электрофоретическая подвижность образующегося меченого продукта изменяется незначительно по сравнению с подвижностью обрабатываемого фрагмента, указывая на то, что участок сшивки не

		• ••••• 10	20	••30	• • 4	•	50	60	•	70
1	TH saniens/1-115	MTKKRRNNGRAKK	GRGH VOP I RCT		AIKKEV		AAVRDI		YVIPKI	VKIH
	T.tetrahimena/1-119	MPVKRRNAGRSQK	NRGHTRTVPCT	NCGRQVAKD	AVKRYT	VRDMVDP	SSKRDI	QQKLAFENER	QGIPKL	YVKLQ
	D.discoideum/1-112	MTQKRRNHGRSKH	IG <mark>RG</mark> S VPY I RC T	NCARCVPKDK	AVKREY	IRPIVEN	AAVKDI	SDQGVFNVKG	YKFPRT	Y VKSQ
	A.thaliana/1-130	MTFKRRNGGRNK	IN <mark>RGH</mark> VKP I <mark>RC</mark> S	NCGKCCPKD K	AIKRFI	VRNIVEQ	AAIRDV	QEASVYE G	YTLPKL	AKTQ
	M.sativa/1-124	MEAGNKH	IG <mark>RDH</mark> VKF I <mark>RC</mark> S	NCGKCCPKD K	(A I K R F L	VRNIVEQ	AAVRDV	QE <mark>A</mark> CVY <mark>D 0</mark>	VTLHKL	<mark>r v k m</mark> q
	F.graminearum/1-117	MVKKRKNNGRNKK	GRGH VKP I RCS	NCSRCTPKDK	AIKRFT	IRNMVES	AAIRDI	SDASVFA E	YTVPKM	LKLQ
	A.fumigatus/1-119	MVKKRANNGRNKN	IGRGH VKPVRCS	SNCARCTPKD K	AIKRFT	IRNMVES	AAIRDI	SDASVET D	YAVPKM	LKLQ
	0.maydis/1-122	MIKKRRSGGRNKS	CRCHVKEVROS	NCARAVPKD	AIKREI	VENIVEA	AAVRDI	SEASVYQE	YVIDEL	
	R orvzae/1-110	MTCKRRNNGRNKH		NCYRCVPKD	AIKRET	IRNMVKT	AAVRDL	OFASIYE F	YAIPKI	VKIH
Эукариоты	S.pompe/1-120	MTOKRRNCGRNKH	IGRGH TKFVRC I	NCSRAVPKDK	AIKRWN	IRNMVET	AAIRDL	SEASVYS E	YAIPKI	YVKLQ
букариоты	C.elegans/1-117	MTEKRRNHGRNKK	NRGHVAFIRCT	NCGRCCPKDK	AIKKEV	VRNIVEA	AAVRDI	GDASAYT C	YALPKL	THKLH
	O.vilgaris/1-127	MTSKRRNNGRGKK	G <mark>RGH</mark> VKYI <mark>RC</mark> T	NCARCVPKDK	(A IKKEV	IRNIVEA	AAVRDI	SDASVYE V	YALPKL	AKLL
	L.cinera/1-117	- TLKRRNNGRSKK	G <mark>RGH</mark> VFSV <mark>RC</mark> T	NCARCVPKD K	(A I K K F V	IRNIVEA	AAVRDI	TE <mark>A</mark> SVY <mark>E \</mark>	YGLPKL	AKLL
	X.tropicalis/1-115	MTKKRRNNGRAKK	G <mark>RGH</mark> VQP I <mark>RC</mark> T		(A I K K F V	IRNIVEA.	AAVRDI	SE <mark>A</mark> SVF <mark>D</mark> S	YALPKL	<mark>и лк</mark> гн
	M.musculus/1-115	MTKKRRNNGRAKK	GRGH VQP I RCT	NCARCVPKDK	AIKKEV	IRNIVEA	AAVRDI	SEASVFD A	YVLPKL	ТУКЦН
	B.taurus/1-115	MTKKRRNNGRAKK	GRGH VQP I RC 1	NCARCVPKDK	AIKKEV	IRNIVEA	AAVRDI	SEASVED A	YVLPKL	СКЦН
	E.bruneus/1-115	MIKKRRNNGRAKK	CRCH VOP I RCI	NCDRCVPKDK	AIKEV		AAVRDI	IEASVED S	VUPKL	
	A mellifera/1-110	MTCKRRNGGRAKE		NCARCVPKDK			AAVRDI	TEASEVS	VOLPKU	
	A gambiae/1-115	MTKKRRNGGRCKH	INRGH VKAVRCT	NCARCVPKDK	AIKKEV		AAVRDI	SDASVYS S	YVIPKI	YAKIH
	D.melanogaster/1-114	MTKKRRNGGRNKH	INRGHVKPVRCT	NCARCVPKDK	AIKKEV		AAVRDI	TEASIWD S	YVLPKL	YAKUH
	C.cryptofilum/1-113	MTKKRKNRGRKLG	GSGHERTVQCS	QCGRVIPAD	AVKVTR	WISPVGG	SLGKDL	ERQGAY	ISKR	LETRY
	P.islandicum/1-98	MPKKRKNRGRKKG	DK <mark>G</mark> REPYVY <mark>C</mark> D	ONCGKIMPRSK	AVRLTV	PYSP <mark>V</mark> PP	DLAREL	EKQGA	IPRY	LVTKT
	P.aresenaticum/1-98	MPKKRKNRGRKKG	DK <mark>G</mark> REPLVH <mark>C</mark> C	NCGRVMPRSK	(AVRITV	/PYSP <mark>V</mark> PP	DLAREL	EKQGV	ISRYI	LVTKT
Археи	P.aerophilum/1-98	MPKKRKNRGRKKG	DK <mark>G</mark> REPYLH <mark>C</mark> C	ONCGK I MPRSK	(AVRVTV	/PYSP <mark>V</mark> PP	DLAREL	EKQGA	I SRYI	
	S.marinus/1-95	MPKKRESRGRHKG	AKGKVGYVQCD	ONCGRIVPRD	AICITE	RWYSPVSP	QLAQEL	EKKGAI	IMKYI	PVTKC
	S.acidocaldarius/1-95	MPKKRENRGRRKG	DKGHVGSTHCL		AICVIK	PYSPVDP	ALAQEL	EKKGAI	IMRYI	PVIKC
	_ M.sedula/1-95	MPKMENKGKKG		GARVPED	AVCVIR	CITSP <mark>V</mark> DA	SLANEL	EKKGAIL	11811	VINC
		80	•• 90 •	100		110				
	H.sapiens/1-115	YCVSCATHSKVVF	NRSREARKDR	TPPPRF	RP/	AGAAPRPP	PKPM		-	
	T.tetrahimena/1-119	YC I SCATHSRVVF	VRCAEDRRIRF	R <mark>PPIR</mark> N	RKF	PQVVKTDA	TAPKKQ			
	D.discoideum/1-112	YCISCALHSHIVE	V RS VADRK I RI	TRPSRP		GVKKPT	AAK			
	A.thaliana/1-130	YCVSCATHSHVVF	VRSRTNRRVR	TPPPRFARRKE	EDTPKP	AQPGQAPR	PAGGAP	AAPRA	6	
	M.sativa/1-124	YCVSCATHSHVVF	VRSRIDRRKRL		JUAPRPO	JOPGQAPR	PAVALG	APVRI		
	F.graminearum/1-11/	VCVSCALHGKIVE	VRSREGRRNRA		R 11		PPOAAK	AM		
	II mavdis/1-122	YCVSCALHAHIVE	VRSREGRRSRI	PPPRV	RYN	KDGKKIN	PAVAQL	QASRA	1) 	
	C.cinereus/1-123	YCVSCALHSHVVF	VRSREGRRNRA	APPPRI	RW	DGKKVNP	AVAAAE	EAKNKA	-	
	R.oryzae/1-110	YCISCALHARVVF	VRSAVDRRNRI	PPPRF	RFC	KAANKA-				
Эукариоты	S.pompe/1-120	YCVSCAIHARVVF	V RSREGRRIRT	T <mark>PP</mark> P <mark>R</mark> V	RYM	NRDGKRVN	PAAIAK	TAL	•	
	C.elegans/1-117	YCIACAIHSKVVF	NRSREARRDRI	NPPPRF	GQF	RAAAARPG	APGPRP		£	
	O.vilgaris/1-127	YCVSCATHSKIVE	NRSREARKDR	TPP IRF	RPN	ARGEGGQN	ARPGQA	NKLFNMSPRI	(
	L.cinera/1-117	YCVSCATHSKVVF	NRSREARKDR		RPN		IMALKI	S	1) 20	
	X.tropicalis/1-115	YCVSCALHSKVVF	NRSREARKDR		RP/	AGAAPRPP	PKPM.			
	R taurus/1-115	YCVSCALHSKVVF	NRSREARKDR		RP/	AGAAPRPP	PKPM			
	E.bruneus/1-115	YCVSCALHSKVVF	NRSCEARKDR	TPPPRF	RP/	AGAPRAP	PKPM			
	F.rubripes/1-115	YCVSCAIHSKVVF	NRSCEARKDRI	T <mark>PP</mark> PRF	RP/	AAGAPRPP	PKTM		-	
	A.mellifera/1-110	YCVSCAIHSKVVF	NRSKANRRIR	T <mark>PP</mark> VRN	F P F	RVIIKII-			6	
	A.gambiae/1-115	YCVSCATHSKVVF	N <mark>RS</mark> KET <mark>R</mark> RIRT	T <mark>PPQR</mark> S	FPł	CMSRQQN	AQRK		1	
	D.melanogaster/1-114	YCVSCAIHSKVVF	NRSREARRIR	TPPLRS	FPł	CDMARNNQ	NRK		•	
	C.cryptofilum/1-113	YCVSCAVYLGIVE	RPRAEEERKEAL		YTł	KQVSNLP	LKFLKV			
	P.islandicum/1-98	TO INCAVEFOI IN	VEREERKKK		- ·				4) 	
Δηχοιά	Paerophilum/1-98	YCINCAVEEGIL	VRSREERKKK		V				M	
Археи	S marinus/1-95	YCVSCAVHLGIV	VRPEHERKPKE	POPL					-3	
	S.acidocaldarius/1-95	YCVNCAVYLGVI	RPEQERKOK	AKLY						
	M.sedula/1-95	YCVNCAVHFGLI	TRAENERKSRA	ARLF						

Рис. 25. Выравнивание аминокислотных последовательностей белка гр eS26 различных эукариот и архей. Нумерация соответствует последовательности гр S26е человека. Аминокислотные остатки, контактирующие с pPHK в крио-ЭМ модели 40S субчастицы [229] (PDB номер 4ug0), отмечены зелеными точками, а с рибосомными белками - малиновыми. Инвариантные аминокислотные остатки выделены синим цветом, консервативные для эукариот остатки - красным, интенсивность окрашивания соответствует степени консервативности; идентифицированный в настоящей работе пентадекапептид обведен на рисунке рамкой.

может быть расположен во фрагменте 52-59 (см. рис. 24Б). Следовательно, при расщеплении сшитого фрагмента 52-85 гр eS26 эндопептидазой AspN участок сшивки остается в пептиде 60-85. Сопоставляя результаты, полученные с помощью всех использованных протеолитических агентов, можно заключить, что участок сшивки гр eS26 с аналогами мРНК находится в его фрагменте 60-71. Аналоги мРНК -6U и -9U при этом продуцируют сшивки с rp eS26 примерно с одинаковой эффективностью; при смещении нуклеотида со сшивающей группой в 3'-сторону от положения -6 степень сшивки аналогов мРНК с гр eS26 резко падает. Все это позволяет сделать вывод, что нуклеотиды мРНК в положениях от -6 до - 9 непосредственно контактируют с фрагментом 60-71 гр eS26 в процессе трансляции. Этот вывод согласуется с данными по сшивкам гр eS26 с аналогами мРНК, несущими остаток 4-тиоуридина в положении от -7 до -10, в 80S IC и 48S PIC [15]. Модификация гр eS26 из положений от -4 до +1 происходила, скорее всего, из-за того, что эта группа была присоединена к нуклеотиду через подвижный линкер, имеющий длину около 11 Å, что позволяло фотоактивируемой группе модифицировать мишени, не контактирующие непосредственно с данным нуклеотидом. Пептид 60-71 является, по-видимому, единственным участком гр eS26, контактирующим с частью мРНК с 5'-стороны от кодона в Р-участке, поскольку аналоги мРНК со сшивающей группой в положениях от +1 до -9 модифицируют в этом белке только этот участок. Для того чтобы установить, является ли данный пептид консервативным во всех царствах, провели множественное выравнивание последовательностей гр eS26 из разных организмов (рис. 25). Оказалось, что фрагмент 60-71 содержит мотив 62-УххРКхУхК-70, консервативный у эукариот, но не у архей. Таким образом, взаимодействие нуклеотидов мРНК в положениях от -6 до -9 с мотивом 62-УххРКхУхК-70 гр eS26 отражает уникальную черту строения рибосом эукариот.

3.1.2. Определение контактов rp uS7 с факторами инициации трансляции в составе 48S PIC млекопитающих с помощью метода сшивок

3.1.2.1. Сборка 48S PIC с использованием ЛРК и образование белок-белковых сшивок

Для определения концентрации формальдегида, при которой потери комплексов рибосом из-за образования нерастворимых коньюгатов были бы минимальны, а выход сшивок достаточно велик, проводили обработку свободных 40S субчастиц формальдегидом, варьируя его концентрацию в реакционной смеси от 0.2 до 1.2%. Анализ суммарного белка из обработанных 40S субчастиц приведен на рис. 26. Видно, что 0.8%-

ная концентрация формальдегида является оптимальной для образования белок-белковых сшивок.



Рис. 26. Анализ продуктов, образующихся при обработке 40S субчастиц формальдегидом с помощью электрофореза в 15%-ном SDS-ПААГ. Окрашенный кумасси R-250 гель. Дорожка, обозначенная «обращение сшивки», соответствует рибосомным белкам 40S субчастицы, обработанной 0.8%-ным формальдегидом, после их нагревания при 99°С в 15 течение МИН. Стрелки справа указывают положение сшитых белков, соответствующие полосы которых появляются в дорожках 40S субчастиц, обработанных формальдегидом

Для выявления контактов между гр uS7 и факторами инициации трансляции с PIC, использовали 48S собранные В помощью формальдегида бесклеточной белоксинтезирующей системе основе ЛРК, обработанного микрококковой на эндонуклеазой, гидролизующей эндогенную мРНК, в присутствии негидролизуемого аналога GTP - GMPPNP, который останавливает трансляцию на стадии образования 488 РІС. Сборку таких РІС осуществляли с использованием мРНК двух разных типов. Одна из них представляла собой модельную каноническую мРНК (кмРНК) и содержала короткую А-богатую 5'-НТО (для снижения энтальпии образования возможных дуплексов), часть, кодирующую тетрапептид Met-Phe-Phe, терминирующий триплет UAA и 3'-HTO (последовательность кмРНК: 5'-GGGAGA AAAAAG AAAGAA AUGUUC UUCUUC UAAGAA GAAAGA AAAGAA AAAGAA AAAAGA CAAAGA CACGAA GGAAGA-3'). Правильное позиционирование старт-кодона кмРНК в Р-участке 48S PIC было подтверждено с помощью метода тоу-принтинга, который, как известно, позволяет определить положения нуклеотидов мРНК, защищённых рибосомой [219], с помощью обратной транскрипции. При удлинении меченного ³²Р праймера, комплементарного 3'концевому фрагменту мРНК, находящемуся вне рибосомы, синтез кДНК тормозится связанной с мРНК рибосомой, и при анализе продуктов обратной транскрипции гельэлектрофорезом в месте остановки реакции виден стоп-сигнал (тоупринт), положение которого соответствует положению +16 относительно остатка А старт-кодона AUG для 48S PIC. Видно, что, когда в трансляционной смеси присутствовал GMPPNP, остановка обратной транскрипции происходила на нуклеотидах +16/+17 относительно первого нуклеотида страт-кодона (рис. 27А дорожка 48S). Это означает, что данный комплекс действительно является 48S PIC. Если в трансляционную смесь были добавлены GTP и эмитин, то обратная транскриптаза делала паузу на нуклеотидах +17/+18 (рис. 27А, дорожка 80S), что соответствует 80S EC, в котором AUG кодон находится в P-участке [219]. Другая мPHK соответствовала последовательности HCV IRES (рис. 7), в инициации



Рис. 27. Активность кмРНК и HCV IRES в инициации трансляции в бесклеточной белоксинтезирующей системе на основе ЛРК. А, Тоу-принтин-анализ рибосомных комплексов: 48S PIC (дорожка 48S) и 80S EC (дорожка 80S), собранных на кмРНК в присутствии GMPPNP и эмитина соответственно; дорожка К – трансляция в отсутствие антибиотика. Радиоавтограф геля после разделения продуктов обратной транскрипции на рибосомо-связанной кмРНК. А, С, G и U сиквенсные дорожки. Дорожка *RT* соответствует продукту обратной транскрипции на кмРНК без добавления дидезоксинуклеотидтрифосфатов. Б, типичные профили седиментации в градиенте плотности сахарозы рибосомных комплексов, собранных с использованием ЛРК в присутствии GMPPNP (1) или GTP и эмитина (2) на кмРНК и HCV IRES. На профилях отмечены радиоактивные пики, соответствующие 80S EC и 48S PIC; стрелками указаны положения 40S субчастиц и 80S рибосом, установленные с помощью их центрифугирования при тех же условиях, что и комплексы, собранные в ЛРК.

трансляции на котором участвует ограниченный набор факторов инициации, а именно eIF2, eIF3 и eIF5 (см. раздел. 1.3.2.2.), и включала 5'-НТО (40-341) PHK HCV и фрагмент её кодирующей части (342-372). Способность HCV IRES образовывать 48S PIC и 80S IC в бесклеточной белоксинтезирующей системе на основе ЛРК была показана ранее [120]. Анализ профилей седиментации рибосомных комплексов, образующихся на кмРНК и HCV IRES в присутствии ЛРК (рис. 27Б), подтвердил функциональную активность этих мРНК в используемой системе трансляции. Для образования белок-белковых сшивок соответствующие трансляционные смеси обрабатывали формальдегидом с последующим выделением 48S PIC центрифугированием в градиенте плотности сахарозы. Фракции сахарозного градиента, содержащие 48S PIC, определяли по наличию радиоактивности в пиках, соответствующих по положению 40S субчастице, в профилях седиментации рибосомных комплексов, аналогичных профилям, представленным на рис. 27Б.

3.1.2.2. Идентификация сшитых белков с помощью имунноблотинга и массспектрометрии

Суммарный белок из фракций сахарозного градиента, соответствующих 48S PIC, разделяли электрофорезом в системе Лэммли, разделенные белки и белок-белковые сшивки переносили на нитроцеллюлозную мембрану и проводили иммуноблотинг с помощью антител против гр uS7 (S5e). В параллельных экспериментах анализировали белки. вылеленные ИЗ своболных 40S субчастиц человека. обработанных формальдегидом, а также белки из необработанных 48S PIC. С помощью иммуноблотинга удалось выявить полосу, характерную только для обработанных формальдегидом кмРНК-, и HCV IRES-содержащих 48S PIC, которая соответствовала продукту сшивки с молекулярной массой около 60 кДа, образованной с участием гр uS7 (рис. 28). С учетом массы rp uS7, равной 23 кДа, массу сшитого с ним белка можно оценить как 37 кДа. Для идентификации фактора, сшитого с гр uS7, использовали масс-спектрометрию с последующим пептидным картированием. Для этого полосу, соответствующую сшитым белкам, вырезали из геля, и белки гидролизовали с помощью трипсина. Сопоставление полученных в результате масс-спектрометрического анализа масс пептидов с теоретическими массами пептидов, которые могли бы образоваться при гидролизе трипсином всех известных факторов инициации, выполненное с помощью программы MMass, позволило однозначно установить, что продукт с массой 60 кДа соответствует сшивке rp uS7 с субъединицей α фактора eIF2. Оказалось, что пептиды, найденные с помощью масс-спектрометрического анализа, покрывают более 25% последовательности этой субъединицы фактора eIF2 (таблица 5), имеющей массу около 36 кДа, и

несопоставимо меньшие части последовательностей других факторов инициации, что находится ниже уровня случайного совпадения (score). Следует отметить, что для получения теоретических масс триптических пептидов использовали последовательности факторов инициации трансляции человека, поскольку последовательности многих соответствующих факторов кролика отсутствуют в базе данных.



Рис. 28. Анализ сшивки гр uS7 с факторами инициации трансляции с помощью иммуноблотинга с использованием антител против гр uS7. Белки, выделенные из 48S PIC, собранных на кмРНК (А), либо на HCV IRES (Б) после обработки формальдегидом (+), или без обработки (-). Стрелками указаны положения немодифицированного uS7 и его продукта сшивки. Сбоку указаны положения полос, соответствующих маркерам молекулярной массы белков.

Таблица 5. Пептиды eIF2α, соответствующие пики которых найдены с помощью масс-спектрометрического анализа сшитого rp uS7.

Положения в белке	Масса пептида eIF2α, соответствующего наблюдаемому пику, Да	Расчетная масса пептида, образующегося при трипсинолизе eIF2α, Да	Последовательность пептида
13-25	1532.81	1532.78	FPEVEDVVMVNVR
124-133	1264.72	1264.62	DEQLESLFQR
144-154	1244.69	1244.61	RPGYGAYDAFK
155-173	2124.94	2125.00	HAVSDPSILDSLDL NEDER
174-182	1084.72	1084.61	EVLINNINR
227-234	893.70	893.56	INLIAPPR
235-244	1214.71	1214.61	YVMTTTTLER

3.1.2.3. Идентификация сшитых пептидов rp uS7 и eIF2a

Для идентификации сшитых пептидов, образующихся в результате трипсинолиза сшитых белков. использовали свойство обратимости белок-белковых сшивок. индуцированных формальдегидом (см. стр. 73). Сшитые пептиды определяли путем сравнения масс-спектров до и после разрушения сшивки нагреванием, учитывая только пики в области > 2 кДа, поскольку массы всех теоретически возможных сшитых пептидов больше этой величины. В результате выявлены два пика, с массами 2400.06 и 2873.37 Да, которые отсутствовали в спектрах сшитых контрольных 40S субчастиц и которые исчезали в результате разрушения связи между сшитыми пептидами; результаты, полученные в экспериментах с кмРНК и HCV IRES, оказались очень сходными (рис. 29). Для того, чтобы отнести эти пики к сшитым пептидам rp uS7 и eIF2 α , их массы сравнивали с массами, полученными при сложении масс всех возможных триптических пептидов белков eIF2α и rp uS7, с добавлением массы метиленовой группы (14 Да).



Рис. 29. Масс-спектрометрический анализ пептидов, полученных в результате расщепления трипсином сшивки белка uS7 с eIF2α, выделенной из 48S PIC, собранном на кмPHK (слева) или на HCV IRES (справа), до (А) или после (Б) разрушения сшивки нагреванием. Приведена часть массспектра. Массы пиков, присутствующих в спектре сшитых белков, но исчезающих после гидролиза сшивки, приведены над соответствующими пиками.

Наличие возможных посттрансляционных модификаций в белках учитывали согласно базе данных Uniprot, при этом рассматривали также возможность пропуска одного сайта гидролиза трипсином и модификацию остатков цистеинов йодацетамидом (см. раздел 2.2.20.). В результате выявили три комбинации пептидов с суммарной массой,

соответствующей экспериментальным данным с точностью 45 ppm. Оказалось, что продукту с массой около 2400 Да однозначно соответствует сшивка между пептидами 72-85 гр uS7 и 81-87 eIF2 α , а продукту с массой около 2873 Да могут соответствовать две комбинации сшитых пептидов. Одна их них соответствует сшивке пептидов 165-182 гр uS7 и 90-97 eIF2 α , а другая – сшивке пептида 2-18 гр uS7 (в случае если гр uS7 лишён первого метионина и ацетилирован по остатку треонина во втором положении) с фрагментом 68-75 eIF2 α (см. таблицу 6). Для того чтобы однозначно определить, какой

Таблица 6. Кандидатные пептиды $eIF2\alpha$ и rp uS7, которые могли быть сшиты формальдегидом в 48S PIC. Выделены пептиды, которые идентифицированы как контактирующие друг с другом в 48S PIC.

Положен ия в белке uS7	Расчётн ая масса пептида uS7	Последовательность пептида uS7	Положен ия в белке eIF2α	Расчётн ая масса пептида eIF2α	Последовательн ость пептида eIF2α	Суммарна я масса пептидов и метиленов ой группы
2(Ac)-18	1870.91	TEWETAAPAVAET PDIK	68-75	988.52	NECVVVIR	2873.43
165-182	1987.05	NIKTIAECLADELIN AAK	90-97	872.47	VSPEEAIK	2873.52
72-85	1590.73	LTNSMMMHGRNN GK	81-87	795.42	GYIDLSK	2400.15

из сшитых пар пептидов соответствует продукт с массой 2873, необходимо было выяснить, действительно ли гр uS7 в рибосоме лишен первого метионина и ацетилирован ли его остаток треонина во втором положении. Для этой цели проведен массспектрометрический анализ гр uS7, выделенного из свободной 40S субчастицы рибосомы человека. В полученном масс-спектре обнаружен пик, точно соответствующий массе ацетилированного пептида 2-18 гр uS7, равной 1870.89 Да (рис. 30). Следовательно, сшитую пару составляли пептиды 2-18 гр uS7 и 68-75 eIF2 α . В пользу этой пары пептидов свидетельствует также то, что пик, соответствующий пептиду 165-182 гр uS7 (компонент альтернативной кандидатной пары сшитых пептидов), присутствует в масс-спектре сшитых белков до разрушения сшивки. Этот факт подтвердает, что вышеуказанный пептид не участвовал в образовании сшивки с eIF2 α (соответствующая часть спектра не приведена). Таким образом, были идентифицированы две пары контактирующих пептидов гр uS7 и eIF2 α (таблица 6). Следует отметить, что полученные данные не исключают возможных контактов между другими пептидами гр uS7 и eIF2 α , поскольку они могли остаться вне поля зрения из-за отсутствия в сближенных фрагментах белков аминокислотных остатков, подходящих для сшивки посредством формальдегида.



Рис. 30. Масс-спектрометрический анализ пептидов, полученных при расщепления трипсином гр uS7, выделенного их 40S субчастиц. Приведена часть масс-спектра, где отмечен пик, соответствующий ацетилированному пептиду 2-18.

3.1.3. Определение участка rp uS3, ответственного за его взаимодействие с короткими одноцепочечными РНК – производными олигорибонуклеотидов 3.1.3.1. Аналоги мРНК, использованные для модификации rp uS3, и сшивка аналогов с белком в составе рибосомных комплексов

Способность rp uS3 сшиваться с реакционноспособными производными олигорибонуклеотидов, не фиксированными взаимодействием с тРНК в мРНКсвязывающем центре рибосомы, была замечена ранее в работах по фотоаффинной модификации рибосом человека производными олигорибонуклеотидов, несущими тетрафторфенилазидогруппу на остатке гетероциклического основания [14, 16, 149]. Более того, была предпринята попытка определить участки сшивки с помощью расщепления модифицированного rp uS3 CNBr [230]. Было показано, что в комплексах рибосом с этими производными модифицированный нуклеотид из положений от +5 до +7 сшивался с Nконцевой половиной rp uS3 (участок 2-127), тогда как из положения +9 наблюдали сшивку с С-концевым фрагментом 190-236, а из положения +12 – с обоими фрагментами. Можно предположить, что один из этих участков rp uS3 модифицировался аналогами мРНК, находящимися вне комплекса с рибосомой, а второй – в составе комплекса. В настоящей работе для выявления участка гр uS3, способного к модификации аналогами мРНК вне мРНК-связывающего центра, использованы производные олигорибонуклеотидов с 3'концевым остатком рибозы, окисленным до диальдегида. Как уже упоминалось, такие производные способны сшиваться с белками с высокой эффективностью посредством образования оснований Шиффа с остатками лизина или аргинина; чтобы эти сшивки были необратимыми, их восстанавливают с помощью цианоборгидрида натрия. Очевидно, что диальдегидные производные имеют два преимущества по сравнению с перфторарилазидопроизводными олигорибонуклеотидов. Во-первых, они позволяют получать продукты сшивки с известной молекулярной массой, что необходимо для идентификации сшитого пептида с помощью масс-спектрометрии, а во-вторых, они обеспечивают намного больший выход сшивки. Выбранные последовательности олигорибонуклеотидов, использованных для модификации гр uS3, позволяли их диальдегидным производным служить также и аналогами мPHK, положения которых на рибосоме можно фиксировать с помощью тPHK^{Phe}, узнающей соответствующий фенилаланиновый кодон (таблица 7).

Таблица 7. Диальдегидные производные олигорибонуклеотидов, использованные в настоящей работе. Фенилаланиновый кодон подчеркнут, 3'-концевой нуклеотид, содержащий окисленный до диальдегида остаток рибозы, отмечен звёздочкой.

Обозначение	Последовательность аналога
+7A	AAAAA <u>UUC</u> GACA*
+9A	AAA <u>UUC</u> GACAAA*
+12A	UUCGACAAAAAA*
+3C	AAUAAA <u>UUC</u> *
+4A	AUAAA <u>UUC</u> A*
+5A	UAAA <u>UUC</u> AA*

Анализ белков, модифицированных мечеными диальдегидными производными олигорибонуклеотидов в составе различных рибосомных комплексов (рис. 31), гельэлектрофорезом показал, что независимо от присутствия тРНК во всех дорожках проявляется двойная полоса, положение которой соответствует ожидаемому положению сшитого гр uS3. Кроме того, в комплексах, образованных с участием тРНК, где остаток окисленной рибозы находился в положениях от +4 до +7, присутствует полоса, которую можно отнести к сшитому гр uS19 в соответствии с полученными ранее данными [14, 16]. Идентификация сшитых рибосомных белков uS3 и uS19 подтверждена с помощью иммуноблотинга с использованием специфичных антител против соответствующих белков млекопитающих (рис. 32). Так, в экспериментах с антителами против данных белков над полосами немодифицированных белков обнаружены полосы сшитых белков (рис. 32А, дорожки +4A(+) и +5A(+); рис. 32Б, все дорожки, кроме дорожек *TP* и *K*), положение которых в геле совпадало с положением соответствующих радиоактивных полос на авторадиограммах (рис. 31). Видно, что молекула тРНК в А-участке экранирует сшивку с гр uS19. Подобное экранирование отмечали ранее при использовании аналогов мРНК с остатком тиоуридина, направляемым в А-участок, при связывании в этом участке фактора терминации eRF1 [231, 232]. Наблюдаемое раздвоение полос rp uS3 и rp uS3*

указывало на присутствие в 40S субчастице рибосомы человека двух форм этого белка: фосфорилированной и нефосфорилированной, поскольку такие формы гр uS3 ранее были выявлены в рибосомах дрожжей [233]. Для проверки этого предположения проведен массспектрометрический анализ всех полос в верхней части окрашенного геля, где происходит разделение рибосомных белков uS3, uS5, eS1 (S3a), eS4 и RACK1 (рис. 33). Результаты анализа показали, что в 40S субчастице рибосомы человека действительно присутствует



Рис. 31. Анализ белков 40S субчастиц, сшитых в комплексах 80S рибосом с 5'-[³²P]-мечеными аналогами мРНК +3A, +4A, +5A (A) и +7A, +9A, +12A (Б), в 15%-ном SDS-ПААГ. Радиоавтограф. Дорожка *TP* - окрашенный кумасси R-250 гель после разделения белков 40S субчастиц. Полосы, соответствующие сшитым рибосомным белкам, отмечены звёздочкой.



Рис. 32. Идентификация рибосомных белков, сшитых с аналогами мРНК в составе рибосомных комплексов, с помощью антител против rp uS19 (A) и rp uS3 (Б). Дорожка *TP* - окрашенный кумасси R-250 после разделения белков 40S субчастицы гель. Дорожка *K* - результат анализа суммарного белка 40S субчастицы. Белки, сшитые с аналогами мРНК, отмечены звездочкой.

как нефосфорилированный гр uS3 (нижняя полоса *b*), так и его фосфорилированная форма (верхняя полоса *a*, содержащая также белок uS5). Пептиды гр uS3, содержащие фосфатную группу, найденные с помощью масс-спектрометрии, приведены в таблице 8. Поскольку результаты масс-спектрометрического анализа показали, что полоса фосфорилированного гр uS3 совпадает с полосой гр uS5 (рис. 33), нельзя исключить, что наряду с гр uS3 в сшивке с диальдегидными производными олигорибонуклеотидов участвовал также гр uS5. Для проверки этого предположения сшитые белки анализировали иммуноблотингом с использованием антител против гр uS5 кролика. Как видно из результатов, приведенных на рис. 34, во всех случаях проявляется только полоса, соответствующая немодифицированному гр uS5, на основании чего сделан вывод о том, что этот белок не сшивался с используемыми производными олигорибонуклеотидов.



Рис. 33. Идентификация rp uS3 в SDS-ПААГ. Окрашенная кумасси R-250 электрофореграмма после анализ белков 40S субчастицы в 15%-ном SDS-ПААГ (слева) и в 12% SDS-ПААГ (справа). Ha электрофореграмме 12%-ного SDS-ΠΑΑΓ представлена часть геля, в которой содержатся белки, полосы которых выделены прямоугольником на 15%-ном SDS-ПААГ. На этой электрофореграмме указаны стрелками белки, идентифицированные в соответствующих полосах с помощью масс-спектрометрии.

Таблица 8. Идентификация фосфорилированных пептидов rp uS3 в полосе *a*, с помощью масс-спектрометрии. В таблице суммированы результаты, полученные в 3 независимых экспериментах.

Пептид	Расчётная	Найденные	Последовательность пептида
	масса	экспериментально	
		значения массы	
46-54	1108.5893	1109.7008	рТЕШІАТК или ТЕШІАрТК
55-62	968.4185	968.42	R.pTQNVLGEK.G
77-90	1732.638	1732.81	FGFPEGpSVELpYAEK
118-124	917.3830	918.387	ACpYGVLR
215-227	1629.6940	1630.2144	DEILP pTpT PISEQK



Рис. 34. Идентификация рибосомных белков, сшитых с аналогами мРНК в составе рибосомных комплексов, с помощью антител против гр uS5 кролика. Дорожка *TP* - окрашенный кумасси R-250 гель после разделения белков 40S субчастицы. Дорожка *K* соответствует суммарному белку 40S субчастицы.

Таким образом, диальдегидные производные олигорибонуклеотидов способны с высокой эффективностью сшиваться с гр uS3, независимо от их длины и последовательности, причем гр uS3 способен участвовать в сшивке, находясь как в свободных рибосомах, так и их комплексах с тРНК и мРНК. Участок сшивки в rp uS3 определен на примере производного +7А (см. таблицу 7) с помощью сопоставления массспектров триптических пептидов сшитого белка до и после гидролиза РНКазой А остатков пришитого к нему олигорибонуклеотида. В масс-спектрах, соответствующих пептидам гр uS3, сшитого с производным +7А в составе бинарной смеси с рибосомами и в составе тройного комплекса рибосом, образованного с участием тРНК, обнаружен единственный пик, соответствующий пептиду с массой 1335 Да, появляющийся в результате обработки РНКазой А, который мог бы соответствовать сшитому пептиду с одним остатком аденозина, оставшимся после гидролиза РНК (рис. 35). Сшитый пептид выявлен с помощью анализа всех возможных комбинаций масс триптических пептидов rp uS3 с учетом массы сшитого с ними модифицированного остатка аденозина, проведённого подобно тому, как ранее было сделано при определении пептидов гр eL42 (L36AL), сшитых с окисленной 3'-концевой рибозой аналога тРНК [234]. Этот анализ однозначно показал, что сшитым является пептид 55-TQNVLGEKGR-64, тогда как расчетные массы всех других пептидов отличались от величины 1335 Да более чем на 12 Да. Следовательно, этот пептид rp uS3 сшивался с диальдегидными производными олигорибонуклеотидов, независимо от того, были ли рибосомы свободными или находились в составе комплекса с тРНК и мРНК. Оказалось, что пептид 55-TQNVLGEKGR-64 входит в состав консервативного КН-домена гр uS3, представляющего собой структурный мотив, характерный для белков, взаимодействующих с одноцепочечными нуклеиновыми кислотами [235, 236]. В модели пространственной структуры 80S рибосомы кролика, ассоциированной с мРНК и тРНК [237] этот пептид



Рис. 35. Масс-спектрометрический анализ триптических пептидов гр uS3, сшитых с производным +7А в составе рибосомных комплексов, образованных с участием (А), или в отсутствие (Б) тРНК^{Phe}, до гидролиза (-RNAseA) или после гидролиза пришитого к пептиду остатка олигорибонуклеотида с помощью РНКазы А (+RNAseA). Положение пика, соответствующего сшитому пептиду гр uS3, указано стрелкой. Массы пептидов (m/z) указаны по оси абсцисс.



Рис. 36. Взаимное расположение гр uS3 и мРНК на 40S субчастице в модели пространственной структуры комплекса 80S рибосомы с мРНК и тРНК (PDB номер 4CXC). Общий вид (слева) и увеличенная структура фрагмента 40S субчастицы, содержащего гр uS3 и мРНК (справа). Участок 55-64 гр uS3, сшивающийся с аналогами мРНК, показан пурпурным, КН-домен - синим, а остальная часть белка выделена голубым; мРНК показана красным. Некоторые положения мРНК относительно первого нуклеотида кодона в Р-участке, указаны цифрами.

гр uS3 находится на удалении от мРНК-связывающего центра и экспонирован на поверхности субчастицы (рис. 36), что хорошо согласуется с его способностью взаимодействовать с короткими одноцепочечными РНК, не фиксированными кодонантикодоновым взаимодействием в мРНК-связывающем центре рибосомы.

3.1.4. Исследование конформационных перестроек в 40S субчастице, происходящие с участием rp uS3 и h16 18S pPHK при инициации трансляции

Для выявления конформационных перестроек, вовлекающих rp uS3 и спираль h16 18S рРНК, изучена степень их экспонированности (доступности зондам) в составе 48S PIC и 80S комплексов, собранных с использованием разного типа модельных мРНК в бесклеточной белоксинтезирующей системе трансляции на основе ЛРК. Степень экспонированности rp uS3 исследована с помощью диальдегидных производных РНК, соответствующих фрагментам модельных канонических мРНК или HCV IRES и служивших также в качестве аналогов мРНК при сборке вышеупомянутых комплексов в ЛРК. Доступность h16 18S рРНК в составе таких же комплексов, собранных на соответствующих немодифицированных РНК, изучена с помощью химического футпринтинга, с использованием в качестве зонда бензоилцианида (BzCN). Этот реагент конформационно-подвижные предпочтительно атакует нуклеотиды И образует ковалентные аддукты с 2'-ОН рибозы [238]. Уровень модификации нуклеотидов рРНК в исследуемых комплексах определён с помощью обратной транскрипции, поскольку ревертаза делает паузы на соответствующих модифицированных нуклеотидах.

3.1.4.1. Определение степени экспонированности rp uS3 на различных стадиях трансляции

Очевидно, что о степени экспонированности гр uS3 в рибосомных комплексах можно судить по его способности сшиваться с одноцепочечными РНК вне мРНК связывающего центра. Для выявления этой способности гр uS3 в составе рибосомных комплексов, соответствующих конкретным стадиях трансляции, в настоящей работе в качестве зондов были использованы диальдегидные производные меченных ³²P по 5'- или 3'-концу 43-49-звенных РНК, синтезированных и охарактеризованных в лаборатории химии РНК ИХБФМ СО РАН. Эти производные содержали в 3'-концевой части триплет AUG, позволяющий собирать на них трансляционные комплексы (48S PIC и 80S комплексы) с помощью ЛРК (см. таблицу 9). Для того чтобы эти производные РНК могли выполнять одновременно роль как аналогов мРНК, так и зондов, они были взяты в избытке по отношению к рибосомам, содержащимся в ЛРК. Аналоги мРНК (в

дальнейшем называемые модельными каноническими мРНК МІ-МІІІ) были использованы в некэпированном виде, поскольку эффективность трансляции в системе на основе ЛРК практически не зависит от наличия кэпа в мРНК [239]. В дополнение к производным МІ-МІІІ, в качестве зонда использовано также аналогичное производное IRES_{AUG} (рис. 37).

Таблица 9. Последовательности РНК, использованных для сборки модельных комплексов, образующихся в результате инициации трансляции по каноническому механизму. Старт-кодон олигорибонуклеотидов выделен и подчеркнут.

Обоз-	Последовательность
начение	
MI	5'-GCCUAAGCUUACAAAUACUCCCCCACAACAGCUUGUCGACCAUG-3'
MII	5'-GCCUAAGCUUACAACGACGGACAACAACAGCUUGUCGACCAUGUUC-3'
MIII	5'-
	CCUAAGCUUACAACGACGGACAACAACAGCUUGUCGACC <u>AUG</u> UUCGAC-3'

Схематичное изображение модельных комплексов, использованных в настоящей работе, приведено на рис. 38. Как и в опытах, описанных выше (см. раздел 3.1.2.1), 48S PIC получен в присутствии GMPPNP. Комплексы типа 80S IC собраны на производных мPHK MI и IRES_{AUG}, ограниченных с 3'-конца старт-кодоном. Комплекс 80S EC реконструирован на MII и MIII в присутствии GTP и антибиотика анизомицина, блокирующего образование пептидной связи и останавливающего трансляцию на стадии, соответствующей связыванию в А-участке первой элонгаторной аа-тPHK в комплексе с eEF1A и GTP. Для того чтобы подтвердить, что полученные комплексы находятся на



Рис. 37. Вторичная структура фрагмента HCV IRES, ограниченного с 3'-стороны старт-кодоном и содержащего на 3'-конце остаток [³²P]C. Старт-кодон подчеркнут.



Рис. 38. Схематическое изображение комплексов 48S PIC и 80S IC, а также комплекса 80S EC, полученного с антибиотиком анизомицином. Комплексы с мРНК МІІ не показаны, поскольку они точно соответствует комплексам с мРНК МІІ.

соответствующей стадии трансляции, проводили пост-мечение суммарной РНК, выделенной из соответствующих комплексов, на примере мРНК МІІІ (таблица 9). Из рис. 39 видно, что в комплексе, моделирующем 48S РІС, содержится одна тРНК, а именно – инициаторная тРНК_i^{Met}, а в 80S ЕС, полученном в присутствии анизомоцина, – две тРНК, одна из которых - инициаторная, очевидно, связана в Р-участке, а другая - элонгаторная – в А-участке.

Для изучения влияния длины последовательности мРНК после старт-кодона на доступность гр uS3 при канонической инициации трансляции, соответствующие 48S PIC и 80S EC были собраны на производных мРНК МІ-МІІІ, содержащих ³²P-меченый 5'-фосфат или [³²P]pCp на 3'-конце. В этих комплексах в мРНК-связывающем центре рибосом после старт-кодона оказывались помещёнными от 1 до 7 нуклеотидов, и, следовательно, 3'-концевой нуклеотид мРНК с окисленным остатком рибозы находился в положении от +4 до +9 относительно первого нуклеотида старт-кодона в P-участке. Анализ белков, выделенных из рибосомных комплексов, обработанных цианборгидридом и очищенных в сахарозном градиенте, с помощью гель-электрофореза выявил двойную


Рис. 39. Анализ РНК, выделенной из 48S РІС и 80S ЕС, собранных на МІІІ, после её обработки Cu^{2+} и мечения с помощью 5'-[³²P]pCp. Радиоавтограф. Дорожка *К* соответствует комплексу 80S ЕС, полученному без добавления мРНК. Положения тРНК^{Phe} и тРНК^{Met}, а также рРНК из 60S субчастиц обозначены стрелками. В скобках указаны длины соответствующих РНК.

полосу, характерную для сшитого гр uS3, в контрольной дорожке с бинарной смесью мРНК МІ с 40S субчастицами (рис. 40A), а также в дорожках, соответствующих комплексам 48S PIC и 80S EC, собранных на мРНК МІІІ (рис. 40Б). Видно, что пришитая к rp uS3 PHK значительно снижает его электрофоретическую подвижность, но после её гидролиза РНКазой А положение радиоактивных полос сшитого белка практически совпадает с положением полос, соответствующих немодифицированному rp uS3 в окрашенном геле (рис. 40Б). Кроме полос, соответствующих сшитому гр uS3, для 48S PIC со всеми производными РНК выявлена полоса в нижней части геля. Эта полоса отнесена к сшивке с rp uS19 – компонентом декодирующего центра [14] на основании того, что после гидролиза сшитого с белком остатка РНК положение соответствующей радиоактивной полосы совпадало с положением полосы немодифицированного гр uS19 в окрашенном геле (рис. 40Б). Эта сшивка могла происходить только с участием производного РНК, связанного в мРНК-связывающем центре, что свидетельствует о расположении нуклеотида со сшивающей группой в кодоне, связанном в декодирующем центре, или кодоне, прилегающим к нему с 3'-стороны (см. рис. 38). Наличие этой сшивки подтверждает, что соответствующие комплексы с аналогами мРНК были собраны правильно. В 80S EC с аналогом MIII гр uS19 не модифицируется (рис. 40A, левая дорожка), что, очевидно, связано с экранированием модифицированного нуклеотида в положении +7 от сшивки с этим белком молекулой тРНК, находящейся в А-участке (рис. 31Б). Полученные результаты показали, что в 48S PIC часть КН-домена rp uS3, экспонированная на поверхности 40S субчастицы, недоступна для сшивки с РНК, когда 3'-концевой нуклеотид РНК, несущий диальдегидную группу, находится в положении от +4 до +7. Таким образом, гр uS3 полностью теряет свою способность к связыванию одноцепочечных РНК, когда от 1 до 4 нуклеотидов после старт-кодона в P-участке оказываются в мРНК-связывающем канале. При этом в 80S IC, собранном на мРНК МІ, КН-домен uS3 оказался доступным для сшивки с РНК (рис. 40Б, дорожка 80S с мРНК МІ). Поэтому можно сделать вывод, что в случае аналогов мРНК, содержащих не более 4-х нуклеотидов после старт-кодона, образование 48S PIC сопровождается экранированием КН-домена uS3, а после присоединения к нему 60S субчастицы белок становится вновь доступным. Экранирование гр uS3 от сшивки в 48S PIC обнаружено также при использовании в качестве зонда диальдегидного производного IRES_{AUG} (рис. 40Б, правая дорожка); в соответствующей дорожке видна также сшивка с гр uS19, подтверждающая правильное позиционирование старт-кодона производного IRES_{AUG} в P-участке.



Рис. 40. Анализ рибосомных белков, сшитых с производными МІ-МІІІ, содержащими окисленную рибозу на 3'-конце, в модельных комплексах, с помощью SDS-ПААГ. Радиоавтограф. А, сшивка с производными МІ-МІІІ, меченными либо по 3'-концу с помощью $[^{32}P]pC$ (обозначены 3'), либо по 5'-концу (обозначены 5'). Положение нуклеотида с окисленной рибозой относительно первого нуклеотида старт-кодона обозначено цифрами вверху геля. Обозначения I-III соответствуют РНК МІ-МІІІ. Б, сшивка с IRES_{AUG} и аналогом МІ, меченными $[^{32}P]pC$, после исчерпывающего гидролиза сшитых белков РНКазой А (+) или без гидролиза (-). Дорожка *ТР* - окрашенный гель после разделения белков 40S субчастицы. Положения сшитых белков указаны стрелками. Обозначение ** соответствует сшитым белкам без гидролиза РНКазой А, а * - с гидролизом.



Рис. 41. Анализ белков, сшитых с фотоактивируемым 5'[³²P]-UUUAACU производным В его смеси co свободными 40S субчастицами (40S), с бинарным комплексом (40S+IRES_{AUG}) или с 48S PIC, собранном на HCV IRES_{AUG} (48S IRES_{AUG}). Радиоавтограф. Дорожки, соответствующие облученным комплексам, обозначены (+), а не необлучённым - (-). Дорожка ТР - окрашенный гель после разделения белков 40S субчастицы. Полосы модифицированного гр uS3 на радиоавтографе (uS3*), и немодифицированного гр uS3 на окрашенном геле отмечены стрелками. Rp uS3 представлен нефосфорилированной и фосфорилированной формами, которые проявляются как нижняя и верхняя полосы, соответственно.

Для того чтобы проверить, зависят ли результаты сшивок от типа сшивающей группы в РНК-зонде, используемом для определения доступности КН-домена uS3, предварительно полученные рибосомные комплексы с немеченым IRES_{AUG} обрабатывали $5'-[^{32}P]$ -меченым производным гептарибонуклеотида 5'-UUUAACU-3', несущим тетрафторфенилазидогруппу (см рис. 21А), присоединённую к атому C5 остатка 3'-концевого уридина. Образование сшивки индуцировали мягким УФ-светом (см. раздел 2.2.8.). Результаты, полученные с использованием этого зонда (рис. 41), показали, что гр uS3 доступен для сшивок с ним в свободных 40S субчастицах и в бинарном комплексе с IRES_{AUG}, тогда как в 48S PIC этот белок оказался неспособным к модификации. Таким образом, эффект экранирования КН-домена гр uS3 в 48S PIC, собранных на мPHK, имеющих не более 4-х нуклеотидов после старт-кодона, не зависит от типа сшивающей группы в PHK-зонде.

На основании полученных данных можно предположить, что экранирование КНдомена гр uS3 в 48S PIC обусловлено одним из факторов инициации. Имеющиеся литературные данные о взаимодействии факторов инициации с 40S субчастицей в 43S и 48S PIC показывают, что в районе 40S субчастицы, находящемся вблизи участка входа в мРНК-связывающийся канал, где расположен гр uS3, могут связываться два таких фактора (см. раздел 1.4.1.3). Один из них - субъединица ј фактора eIF3 (eIF3j), а второй - так называемый фактор сканирования DHX29, необходимый для эффективной трансляции структурированных мРНК у высших эукариот [70]. Поэтому было проверено наличие eIF3j и DHX29 в 48S PIC и 80S комплексах, собранных в бесклеточной белоксинтезирующей системе на модельных мРНК (MI, MIII, IRES_{FI} и IRES_{AUG}), с помощью иммуноблотинга с использованием соответствующих специфичных антител. Оказалось, для всех типов мРНК eIF3j детектируется только в 48S PIC, но его содержание в комплексе с мРНК МШ, содержащей 6 нуклеотидов после старт-кодона, несравнимо меньше, чем в комплексе с мРНК МІ, ограниченной с 3'-конца старт-кодоном (рис. 42А). Аналогично, DHX29 детектируется только в 48S PIC, но уровень его связывания находится в обратной зависимости от уровня связывания eIF3j (рис.38Б). Результаты опытов с IRES_{FI} и IRES_{AUG} выявили те же закономерности, что и опыты с MI и MIII, хотя и при более низких уровнях связывания DHX29 (полоса которого практически не видна в дорожке, соответствующей 48S PIC с IRES_{AUG}). Таким образом, полученные результаты показывают, что экранирование РНК-связывающего фрагмента КН-домена rp uS3, наблюдаемое в 48S PIC, собранных на мРНК МІ (рис. 40А и Б), МІІ (рис. 40А) и на IRES_{AUG} (рис. 40Б и 41), вызвано связыванием eIF3j в непосредственной близости от участка входа мРНК в рибосому.



Рис. 42. Установление содержания eIF3j (A) или DHX29 (Б) в комплексах, полученных с использованием ЛРК, с помощью иммуноблотинга. Производные РНК, использованные для получения комплексов, обозначены вверху над линиями. Комплексы 80S EC с мРНК МШ и HCV IRES_{FI} получены в присутствии анизомицина (отмечены словом анизо). Положения маркеров молекулярной массы указаны слева. Полосы, соответствующие eIF3j и DHX29, указаны стрелками.

3.1.4.2. Химический пробинг структуры 18S рРНК в районе участка входа мРНК

В формировании участка входа в мРНК-связывающий канал наряду с rp uS3 и h16 18S pPHK, принимают участие также спирали h18 и h34, и в процессе инициации трансляции они могут быть вовлечены в конформационные перестройки (см. разд.1.4.2.1.). В свободной 40S субчастице спирали h34 и h18 18S pPHK взаимодействуют друг с другом, а при её связывании с eIF1 и eIF1A связь между этими спиралями разрушается, и такое состояние поддерживается в течение всего этапа сканирования. После узнавания старт-кодона и диссоциации eIF1 и фосфата связь между этими спиралями образуется вновь, что приводит к фиксации мРНК на 40S субчастице, а переходит в состояние P_{in} в современной терминологии. Поэтому комплекс представлялось важным изучить, как меняется доступность соответствующих районов 18S рРНК при переходе от свободных 40S субчастиц к 48S PIC и далее к 80S комплексам. обратной транскрипции Анализ результатов на 18S pPHK. выделенной ИЗ соответствующих комплексов после их обработки BzCN, показал, что ни один из нуклеотидов в спиралях h18 и h34 не модифицируется этим реагентом ни в свободных 40S субчастицах, ни в модельных трансляционных комплексах (соответствующие данные не приведены). Атаке BzCN подвергались лишь два нуклеотида A544 и A545 в центральной части h16 (рис. 43). Эти нуклеотиды сильно модифицировались в свободных 40S субчастицах человека и в 80S рибосомных комплексах, собранных без участия факторов инициации (в отсутствие ЛРК) (рис. 43Б). Более того, во всех комплексах, собранных в присутствии ЛРК (см. рис. 43А и Г, дорожки 48S, 80S) независимо от типа аналога мРНК, эти нуклеотиды оказались значительно экранированными от модификации BzCN по сравнению с комплексами, полученными в отсутствие ЛРК (см. рис. 43А и Г, дорожки 40S, и 43Б). Маловероятно, чтобы этот эффект был связан с различиями между рибосомами человека, использованными в экспериментах без ЛРК, и кролика, поскольку структуры 40S субчастиц рибосом у этих организмов очень сходны между собой. Этот вывод основан на сравнении трёхмерных моделей 40S субчастицы человека (PDB номер 4ug0) и кролика (PDB номер 4kzz), и на идентичности последовательностей соответствующих рРНК. Поэтому можно заключить, что в процессе инициации трансляции участок h16 18S pPHK, включающий нуклеотиды A544 и A545, подвергается конформационным перестройкам, приводящим к уменьшению доступности этих нуклеотидов для модификации BzCN (а, следовательно, и к уменьшению их конформационной подвижности). Видно, что подобные изменения не происходили в бинарных комплексах 40S субчастиц с IRES_{FI} (рис. 43Г, дорожки 40S IRES_{AUG} и 40S *IRES_{Fl}*), где кодирующая часть РНК находилась в мРНК-связывающем центре.

113

Следовательно, перестройки h16 18S pPHK, наблюдаемые в ЛРК-зависимых комплексах (рис. 43A, B, Г), могли быть индуцированы связыванием 40S субчастиц с eIF3j на этапе



Рис. 43. Анализ доступности участка 18S рРНК, включающего h16, для модификации BzCN в 48S PIC и 80S пост-инициаторных комплексах, собранных на мРНК MI (A и B) и MIII (B), а также на HCV IRES_{AUG} и IRES_{FI} (Г). Результаты разделения в 8%-ном ПААГ продуктов обратной транскрипции на PHK, выделенной из рибосомных комплексов, обработанных (+), либо необработанных (-) BzCN, с использованием ³²P-меченого праймера, комплементарного участку 655-674 18S рРНК. Радиоавтограф геля. Панель Б - 18S рРНК, выделенная из бинарных смесей 40S субчастиц или 80S рибосом человека с соответствующими мРНК, полученных в отсутствии факторов инициации. Дорожки 40S в панелях A и Γ - 18S рРНК, выделенная из бинарных смесей 40S субчастиц с соответствующими матрицами. A, C, G и U - сиквенсные дорожки, номера нуклеотидов 18S рРНК указаны сбоку. Положения нуклеотидов, на которых обратная транскриптаза делает паузы, обозначены стрелками.

образования соответствующих PIC. Как показал анализ с помощью имуноблотинга (рис. 42A), eIF3j действительно присутствовал в MI-, MIII-, IRES_{AUG}- и IRES_{FL}-содержащих 48S PIC, для которых изменения в доступности нуклеотидов h16 18S pPHK для модификации BzCN были выявлены (см. раздел 3.1.4.1.). Видно, что изменённая конформация h16 сохраняется в 48S PIC после диссоциации eIF3j от рибосомы (рис. 43B, Γ дорожки 48S *MIII* и *IRES_{FL}*), с которой вместо него оказывается связанным DHX29 (см. рис. 42Б). Более того, конформация, которую приобретает h16 при инициации трансляции, поддерживается и в 80S рибосомных комплексах, образующихся на начальной стадии элонгации трансляции (рис. 43B, Γ , дорожки 80S анизо).

В общем, результаты, полученные при изучении доступности гр uS3 и спирали h16 18S pPHK на различных стадиях трансляции, показали, что гр uS3 не способен взаимодействовать с одноцепочечными PHK, когда в 48S PIC присутствует субъединица ј фактора инициации eIF3. Однако после узнавания старт-кодона и установления кодирующей последовательности в мPHK-связывающем канале eIF3j диссоциирует от рибосомы, и благодаря этому гр uS3 становится снова доступным для таких взаимодействий. Связывание eIF3j с 40S субчастицей индуцирует конформационные изменения в h16 18S pPHK, которые сохраняются в 48S PIC при диссоциации eIF3j от 40S субчастицы и далее в 80S пост-инициаторных комплексах, по крайней мере, до образования пептидной связи на первом цикле элонгации.

Таким образом, в настоящей работе показано, что в 80S рибосомных комплексах фрагмент мРНК с 5'-стороны от кодона в Е-участке, соответствующий её 5'-НТО при инициации трансляции, соседствует с консервативным у эукариот мотивом УххРКхУхК rp S26, расположенным в его центральной части. Обнаружено, что в 48S предынициаторных комплексах rp uS7 и субъединица α фактора инициации eIF2 контактируют между собой своими N-концевыми фрагментами. Установлено, что экспонированный на поверхности 40S субчастицы пептид 55-64 гр uS3, находящийся вдали от мРНК-связывающего центра рибосомы, способен взаимодействовать с короткими неструктурированными РНК, причём это взаимодействие характерно как для свободных 80S рибосом, так и для их комплексов с тРНК и мРНК. Показано, что в 48S предынициаторных комплексах, образованных с участием мРНК, несущих не более одного триплета после старт кодона, данный пептид экранирован от взаимодействий с неструктурированными РНК субъединицей і фактора инициации eIF3. Выявлено, что при инициации трансляции участок h16 18S pPHK, включающий нуклеотиды A544 и A545, подвергается реструктурированию, проявляющемуся в уменьшении доступности этих нуклеотидов для модификации BzCN в 48S PIC, содержащих eIF3j или DHX29, а также в пост-инициаторных 80S комплексах, соответствующих состоянию после связывания аминоацил-тРНК в А-участке перед образованием первой пептидной связи. Выявлены универсальные черты канонической и HCV IRES-зависимой инициации трансляции у млекопитающих, обеспечивающие правильное расположение кодирующей части мРНК в соответствующих 48S PIC.

3.2. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.

3.2.1. Структурно-функциональная роль эукариот-специфичного фрагмента rp eS26 в процессе трансляции

Анализ крио-ЭМ модели 40S субчастицы с наилучшим на сегодняшний день разрешением (3 Å) [229] показал, что эукариот-специфичный мотив 62-YxxPKxYxK-70 гр eS26, соседствующий с 5'-частью мРНК с 3'-стороны от кодона в Е-участке, расположен на внешней поверхности субчастицы вблизи места выхода мРНК из мРНК-связывающего канала (рис. 44). Этот мотив входит в антипараллельную β-складку гр eS26, и его аминокислотный остаток в положении Tyr62 контактирует с Arg114 uS11 (S14), а Tyr68 контактирует с Ser112 гр uS1 (S3a) и с A1869 18S pPHK (PDB номер 4UG0). Экспонированные остатки пептида 62-УххРКхҮхК-70, не принимающие участия во внутририбосомных взаимодействиях, по-видимому, вовлекаются в связывание с мРНК с 5'-стороны от кодона в Е-участке. Это предположение находится в хорошем соответствии с данными о расположении мРНК на рибосоме, полученными совсем недавно с помощью крио-ЭМ 48S PIC рибосом дрожжей [6]. Согласно этим данным нуклеотид мРНК в положении -10 расположен на расстоянии 4 Å от Lys66 гр eS26. В обсуждаемой модели пространственной структуры 48S PIC некоторые другие участки гр eS26 также оказались сближенными с нуклеотидами мРНК, соответствующими её 5'-НТО; в частности, аминокислотные остатки гр eS26 в положениях Arg42 и Arg82 соседствуют с нуклеотидами мРНК в положениях -8 и -4 соответственно. Неполное соответствие между результатами настоящей работы и данными крио-ЭМ, может быть объяснено тем, что некоторые районы rp eS26, контактирующие с 5'-НТО мРНК, остались не выявленными с помощью метода аффинной модификации вследствие отсутствия в них подходящих мишеней для сшивки с аналогами мРНК. Кроме того, необходимо отметить, что собственно крио-ЭМ модели могут существенно отличаться между собой по расположению мРНК относительно гр eS26. В частности, это касается моделей, описанных в работах [26, 237, 240]. Так, например, в модели 80S EC [237] с нуклеотидами мРНК в положениях -6 и -8 относительно первого нуклеотида кодона в Р-участке контактируют аминокислотные остатки His80 и Lys82 гр eS26 соответственно. Однако в моделях 48S PIC [6, 26] нуклеотиды мРНК в указанных положениях удалены от гр eS26; при этом с нуклеотидом в положении -4 сближен Arg82, а нуклеотид в положении -10 контактирует с Lys66. Эти различия могут быть связаны со способами обработки данных крио-ЭМ, иногда приводящими к получению существенно различающихся между собой структур из одних и тех же данных (см. раздел 1.4.2.1).



Рис. 44. Положение гр eS26 на 40S субчастице в модели дрожжевого 43S PIC, содержащего eIF3, eIF1 и eIF1A [38]. Общий вид модели (слева) и увеличенный фрагмент eS26 в составе субчастицы (справа). Субъединица *a* eIF3 отмечена синим. Атом цинка в Zn-связывающем домене белка выделен жёлтым; участок, гомологичный сшивающемуся с аналогами мPHK фрагменту белка eS26 человека, выделен фиолетовым.

Следует отметить, что с помощью масс-спектроскопии триптического гидролизата цельноклеточного лизата, приготовленного на основе культуры клеток MV4-11 человека, было обнаружено, что остатки лизина в положениях 66 и 113 гр eS26 ацетилированы [241]. Однако препараты гр eS26, полученные из 40S субчастиц рибосом крысы и человека, не содержат модификации по остатку Lys66 [242, 243], и это может служить указанием на то, что данная модификация сохраняется в гр eS26 до сборки рибосом и что остаток Lys66 деацетилируется в процессе сборки. Все это дает основание полагать, что в составе рибосом положительный заряд остатка лизина в положении 66 требуется для взаимодействия этого белка с рибозофосфатным остовом мРНК.

Кроме 5'-НТО мРНК, во взаимодействии с мотивом YxxPKxYxK гр eS26 мог бы участвовать также фактор инициации трансляции eIF3. Это предположение основано на

том, что при аффинной модификации рибосом тиоуридин-содержащими аналогами мРНК остаток 4-тиоуридина из одного и того же положения мог сшиваться как с гр eS26, так и с одной из субъединиц eIF3, которая была идентифицирована как eIF3d [15]. Однако в недавно опубликованной крио-ЭМ модели пространственной структуры 43S PIC рибосом кролика [38] было установлено, что с гр eS26 контактирует субъединица eIF3a, которая взаимодействует с остатками Phe59, Asp60 и Ala61, непосредственно примыкающими к эукариот-специфичному пептиду 62-70. Следует отметить, что эта субъединица играет ключевую роль в поддержании структуры кора eIF3 (см. раздел 1.4.1.3.) и принимает участие в рекрутировании мРНК в 43S PIC [43].

Таким образом, полученные в настоящей работе результаты в сочетании с данными крио-ЭМ свидетельствуют о том, что консервативный для эукариот мотив 62-70 гр eS26 принимает непосредственное участие в образовании 48S PIC через связывание с eIF3a и 5'-НТО мРНК, последовательность которой, а именно нуклеотиды в положениях -3 и +4 относительно первого нуклеотида старт-кодона, имеет определяющее значение для эффективности инициации трансляции на соответствующем старт-кодоне [21]. Взаимодействие этого мотива с 5'-НТО сохраняется, по-видимому, при инициации по каноническому и IRES-зависимому механизмам, поскольку, как было установлено при анализе крио-ЭМ структуры бинарного комплекса HCV IRES с 40S субчастицами, фрагмент 51-66 гр eS26 контактирует с псевдоузлом и прилегающей к нему частью домена IV IRES [139].

Функциональная роль мотива YxxPKxYxK rp eS26 недавно была изучена с помощью сайт-направленного мутагенеза в культуре дрожжей [244]. Делеция всего участка 62-70 в гр eS26 оказалась летальной для клеток: 40S субчастицы, содержащие мутированный белок, были не способны участвовать в трансляции. Вместе с тем, замена одновременно 5 аминокислотных остатков Туг62, Pro65, Lys66, Tyr68 и Lys70 на остатки Ala вызывала лишь нарушения в формировании 80S рибосом. Точечные мутации любого из перечисленных аминокислотных остатков не вызывали видимых изменений в росте клеток. На основании полученных данных был сделан вывод о важной роли гр eS26 в ассоциации рибосомных субчастиц. На основании данных о соседстве eIF3 и гр S26 в PIC (см. выше) авторы [244] сделали предположение, что нарушение структуры гр S26 может влиять на связывание eIF3 с рибосомами и ассоциацию субчастиц при инициации трансляции.

3.2.2. Взаимодействие eIF2α с rp uS7 в 48S PIC

Известно, что eIF2 играет важную роль в процессе сканирования мРНК

посредством 43S PIC. После узнавания старт-кодона eIF2 α оказывается вблизи нуклеотида мPHK в положении -3, который контактирует с rp uS7 (см. раздел 1.3.2.2.1.). Согласно результатам настоящей работы в соответствующем 48S PIC пептиды 2-18 и 72-85 гр uS7 контактируют соответственно с пептидами 68-75 и 81-87 eIF2 α . Эти же контакты, как оказалось, реализуются также и при HCV IRES-зависимой инициации трансляции. Чтобы получить представление об организации 48S PIC, построена его модель (рис. 45) с использованием описанных ранее алгоритмов [245, 246] на основании моделей рибосом и их трансляционных комплексов, доступных к моменту получения этих результатов, а именно структуры дрожжевой 40S субчастицы [196] (PDB номер 3U5C), комплекса бактериальной 30S субчастицы с мPHK с тPHK в P-участке [247] (PDB номер 2HGR) и TC из архей [197] (PDB номер 3V11).



Рис. 45. Модель 48S PIC, основанная на структуре дрожжевой 40S субчастицы (PDB номер 3U5C, вид со стороны платформы). pPHK и белки субчастицы даны в бледно-сером цвете, eIF2 и rp uS7 показаны в виде «стерженьков», eIF2 α отмечена синим, eIF2 β и γ – зелёно-голубым, rp uS7 – зелёным. Участки eIF2 α и rp uS7, контактирующие согласно результатам данной работы, отмечены красными и жёлтыми шариками (контактирующие пептиды имеют один цвет). тPHK и мPHK отображены в виде спиралей малинового и коричневого цветов соответственно. Нуклеотид мPHK в положении -3 отображён шариком. Направление сдвига пептидов eIF2 α , благодаря которому они образуют контакты с нуклеотидом -3 мPHK и участками rp uS7, указано серыми стрелками.

Вопреки ожиданиям, оказалось, что в полученной модели eIF2 α значительно удалён как от нуклеотида мРНК в положении -3, так и от гр uS7 (рис. 45). Маловероятно, чтобы это было связано с различиями в строении фактора архей (использованного для построения модели) и эукариот, поскольку конфигурации α D1 aIF2 в кристаллической структуре TC архей (PDB ID: 3V11) [197] и N-концевой половины eIF2 α человека [248] (PDB ID: 1KL9) очень сходны. Более того, известно, что 48S PIC человека может быть собран с участием археального TC [249]. Следовательно, если eIF2 α в 48S PIC располагается так, как можно было бы ожидать из построенной модели (рис. 45), прямые контакты eIF2 α с гр uS7 и нуклеотидом мРНК в положении -3 были бы невозможны, что позволило сделать вывод о крупных конформационных перестройках, которые должна была претерпевать eIF2 α , чтобы обеспечить эти контакты.

Очевидно, что перестройки в eIF2 осуществляются благодаря значительной подвижности eë домена αD1 [200, 201. 250]. Анализ аминокислотных последовательностей rp uS7 (NCBI номер P46782) и eIF2a (NCBI номер P05198) показал, что фрагмент 2-40 гр uS7 (где находится пептид 2-18, контактирующий с eIF2 α) содержит 8 кислотных и 2 основных остатка, а фрагмент 1-90 eIF2α включает несколько участков. содержащих основные остатки, а именно 53-56, 61-67, 75-80 и 87-89. Участок 87-89 eIF2α перекрывается с участком 81-87, идентифицированным в настоящей работе. Следовательно, можно полагать, что электростатическое взаимодействие между Nконцевыми доменами гр uS7 и eIF2 α является движущей силой, приводящей к сближению данных белков на стадии образования 43S PIC при инициации трансляции по каноническому механизму или на стадии связывания TC с комплексом HCV IRES•40S субчастица при HCV IRES-зависимой инициации трансляции. Примечательно, что предложенная гипотеза была вскоре подтверждена с помощью крио-ЭМ. Так, было показано, что расположение eIF2 в модели 43S PIC кролика [19] не соответствует ожидаемому на основании структуры eIF2 в PCA модели TC архей, поскольку N-концевая часть этой субъединицы повёрнута по направлению к 40S субчастице, что делает возможным е`взаимодействие с гр uS7. В дальнейшем взаимодействие домена D1 eIF2α с гр uS7 было подтверждено с помощью крио-ЭМ высокого разрешения благодаря модели 43S PIC дрожжей [204]. Стоит отметить, что в этой модели 43S PIC, так же как и в недавно опубликованных моделях 48S PIC рибосом дрожжей [6, 26], расстояние между пептидами rp uS7 и eIF2α, сшивающимися по результатам настоящей работы, слишком велико (не менее 20 Å) для возможности их сшивки под действием формальдегида. Это, очевидно, свидетельствует о высокой конформационной подвижности соответствующих доменов этих белков в PIC.

Таким образом, в настоящей работе выявлена универсальная черта инициации трансляции у млекопитающих. Эта черта состоит в том, что связывание TC с 43S PIC при инициации трансляции по каноническому пути или с комплексом HCV IRES с 40S субчастицами при HCV IRES-зависимой инициации трансляции вызывает в TC крупные конформационные перестройки, обеспечивающие взаимодействия между N-концевыми фрагментами eIF2 α и гр uS7. Следовательно, можно заключить, что гр uS7 играет ключевую роль при инициации трансляции, при этом аминокислотные остатки в β -складке центральной части гр uS7 необходимы для точного распознавания старт-кодона [251], а его N-концевой домен отвечает за правильное позиционирование D1 eIF2 α , распознающего контекст старт-кодона в положении -3, относительно рибосомы.

3.2.3. Взаимодействие одноцепечечных РНК с rp uS3 в участке входа в мРНКсвязывающий канал

Согласно моделям структур малых субчастиц прокариот [252] и млекопитающих [237] гр uS3 контактирует с мРНК с 3'-стороны от кодона в А-участке в малой субчастице рибосом бактерий; в частности, нуклеотиды в положениях от +7 до +12 в модели комплекса 80S рибосом с тРНК и мРНК расположены на расстоянии нескольких ангстрем от фрагмента 116-146 этого белка [237]. С этим согласуются данные по сшивкам тиоуридин-содержащих мРНК с гр uS3 из мРНК-связывающего канала в составе рибосом млекопитающих, когда тиоуридин находился в положения от +9 до +11 (при этом сшивка из положения +11 происходила с более высокой эффективностью) [15]. Однако в настоящей работе сшивок аналогов мРНК, содержащих диальдегидную группу на остатке рибозы в положениях от +9 до +11, с данным фрагментом гр uS3 не обнаружено. Отсутствие сшивок с фрагментом 116-146 гр uS3 может быть объяснено либо тем, что диальдегидные группы в аналогах мРНК не дотягивались до этого фрагмента, либо отсутствием в нем подходящей для модификации мишени. По этой же причине не происходило сшивок с rp uS5, которые можно было ожидать на основании вышеупомянутой крио-ЭМ модели 80S рибосом, где гр uS5 расположен на расстоянии 4 Å от остатка рибозы в положении +12 и на расстоянии 10-15 Å от остатков рибозы в положениях +7 и + 9.

Пептид 55-64 гр uS3, сшивающийся с аналогами мРНК с окисленной 3'-концевой рибозой, экспонирован на поверхности 40S субчастицы в участке входа в мРНК-

связывающий канал и принадлежит к РНК-связывающему КН-домену [235, 236]. Этот пептид rp uS3 не принимает участия в формировании мРНК связывающего канала [237] и не вовлечён во внутририбосомные взаимодействия [194, 196, 237], что хорошо согласуется с его выраженной способностью взаимодействовать с одноцепочечными неструктурированными РНК, не играющими роль аналогов мРНК. Наблюдаемое в настоящей работе взаимодействие rp uS3 с диальдегидным производным HCV IRES_{AUG} не соответствует данным о структуре бинарного комплекса HCV IRES•40S субчастица [151]. Следовательно, rp uS3 сшивался с производным HCV IRES_{AUG} по тому же принципу, по которому он взаимодействует с короткими одноцепочечными РНК, т.е. благодаря тому, несущий диальдегидную 3'-конце что нуклеотид, группу, находился на 37). неструктурированного 14-звенного фрагмента Это предположение (рис. подтверждается данными о том, что производные полноразмерного HCV IRES с фотоактивируемой группой на остатке гетероциклического основания в двуцепочечном участке домена IIb, IIId или IIIe не образовывали сшивок с гр uS3 [9, 10]. Поэтому можно полагать, что один и тот же пептид rp uS3 сшивался с короткими аналогами мРНК (таблица 7) и неструктурированным участком HCV IRES. Таким образом, пептид 55-64 гр придаёт этому белку в составе 40S субчастиц уникальную uS3 способность взаимодействовать с короткими одноцепочечными РНК вне мРНК-связывающего центра.

3.2.4. Участок входа мРНК в рибосому и факторы инициации

Три фактора инициации, eIF1A, eIF3j и DHX29, участки связывания которых расположены вблизи декодирующего центра, могут присутствовать в 48S PIC, собранном в ЛРК, поэтому возможно перекрывание участков связывания этих факторов и кодирующей части мРНК в составе 48S PIC. Фактор eIF1A - компонент 48S PIC, образующегося при инициации трансляции по каноническому пути. Место связывания этого фактора на 40S субчастице находится вблизи A-участка [245, 246, 253-255]. Взаимодействие eIF1A с 40S субчастицей становится более прочным после узнавания старт-кодона и диссоциации eIF1, т.е. после завершения сканирования [256]. eIF1A принимает также участие на последней стадии инициации трансляции; в частности он взаимодействует с eIF5B [61, 257], что способствует гидролизу GTP, осуществляемому eIF5B, и ассоциации субчастиц [154, 258]. Для образования 48S PIC на HCV IRES, в отличие от канонического PIC, участие eIF1A не обязательно (см. раздел 1.3.2.2.4.). Известно, что eIF1A не контактирует с гр uS3; кроме того, в составе 48S PIC участок связывания eIF1A на 40S субчастице удалён от спирали h16 18S PHK, расположенной вместе с гр uS3 в участке входа мРНК [5]. В комплексах, собранных в присутствии JPK на

122

полноразмерном HCV IRES и его фрагменте, ограниченном с 3'-стороны старт-кодоном AUG были обнаружены те же изменения в доступности гр uS3 и спирали h16, что и в комплексах с модельными каноническими мРНК. Следовательно, можно было заключить, что эти изменения вызваны eIF3j, либо DHX29.

Роли DHX29 и eIF3j в процессе инициации остаются до сих пор не до конца понятными; так, точно неизвестно, на каком этапе этого процесса факторы связываются с 40S субчастицами и диссоциируют из комплексов. Субъединица eIF3j консервативна у эукариот (в дрожжах она обозначается как HCR1); она непрочно связана с остальной частью большого мультисубъединичного комплекса eIF3 и легко диссоциирует из него [62, 207, 259]. Известно, что связывание eIF3j и мРНК с 40S субчастицами носит антикооперативный характер [62, 207]. Однако в исследованиях *in vivo* на дрожжах было показано, что eIF3j остаётся на 40S субчастице в процессе сканирования и после связывания с ней мРНК [206]. Результаты настоящей работы показывают, что присутствие в мРНК-связывающем центре более 4 нуклеотидов после старт-кодона AUG приводит к резкому снижению уровня eIF3j в 48S PIC. Это свидетельствует о физической диссоциации eIF3j от рибосомы на стадии образования 48S PIC, когда мРНКсвязывающий канал становится занятым кодирующей последовательностью, следующей за старт-кодоном. Это, в свою очередь, указывает на то, что eIF3j остаётся на 40S субчастице только до тех пор, пока сканирование не закончено, и диссоциирует после узнавания кодона AUG, т.е. после образования 48S комплекса, что объясняет наличие eIF3j в PIC, содержащих мРНК [206]. Все это согласуется с полученными недавно данными крио-ЭМ исследований, согласно которым мРНК образует прочные контакты с 40S субчастицей только тогда, когда PIC после узнавания старт-кодона приобретает «закрытую» конформацию (Pin, раздел 1.4.1.1.), в то время как в «открытой» конформации PIC (Pout, раздел 1.4.1.1) контакты мРНК с рибосомой минимальны [26]. Результаты настоящей работы объясняют, почему до узнавания старт-кодона на 40S субчастице могут находиться одновременно и eIF3j, и мРНК. Тот факт, что eIF3j содержится преимущественно в тех 48S PIC, где последовательность мРНК после старт-кодона не длиннее 4 нуклеотидов (рис. 42А), свидетельствует о том, что участок связывания eIF3j физически перекрывается с участком связывания фрагмента мРНК, начиная с третьего триплета её кодирующей последовательности. С другой стороны, полученные результаты указывают на то, что участки связывания кодирующей последовательности мРНК и DHX29 не перекрываются, поскольку при наличии в модельных мРНК нуклеотидов после старт-кодона уровень связывания DHX29 в 48S PIC был даже выше, чем при их отсутствии (рис. 42Б).

3.2.4.1. Взаимодействие между uS3 и eIF3j

Мы показали, что РНК-связывающий пептид в КН домене uS3 становится экранированным в комплексах типа 48S PIC, собранных на модельных канонических



Рис. 46. Расположение rp uS3 и h16 в 40S субчастице рибосомы человека (PDB ID: 4UG0). А, общий вид субчастицы с внешней стороны (слева), и увеличенное изображение фрагмента, содержащего uS3 and h16 (справа). Предполагаемое расположение eIF3j показано пунктирным овалом на основании данных крио-ЭМ [204], бледная часть которого соответствует части фактора, расположенного с обратной стороны субчастицы. Rp uS3 выделен синим цветом, а его PHKсвязывающий пептид в KH домене – красным прямоугольником. Спираль h16 18S rRNA показана розовым цветом, нуклеотиды A544 и A 545 отмечены красным. Б, вторичная структура 18S pPHK кролика и её увеличенный фрагмент, содержащий h16.

мРНК, содержащих не более 4 нуклеотидов после старт-кодона. Именно в этих комплексах содержание eIF3j резко повышено (рис. 42A). Поскольку экранирование упомянутого пептида имеет место также в 48S PIC, образованном на IRES_{AUG}, можно

заключить, что экранирующий эффект не связан со сканированием мРНК. Очевидно, что этот эффект обусловлен только присутствием eIF3j в 48S PIC с соответствующими укороченными мРНК. По-видимому, eIF3j вызывает экранирование PHK-связывающего пептида rp uS3 в 48S PIC из-за непосредственного взаимодействия с rp uS3, либо вследствие вторичных эффектов. Однако, последнее представляется маловероятным, поскольку конформация rp uS3, его устройство в 40S субчастице и контакты с 18S рРНК в PIC, содержащем eIF3j (PDB номер 4UER [204]), существенно не отличаются от таковых в свободных 40S субчастицах (PDB номер 4KZX [5]) и в рибосомных комплексах, не содержащих eIF3j (PDB номер 4KZZ [5], PDB номер 4CXC [237]). Скорее всего, eIF3j физически экранирует РНК-связывающий пептид гр uS3 в 48S PIC. Хотя eIF3j не присутствует ни на одной из депонированных в PDB моделей эукариотических PIC, о его расположении на модели 40S субчастицы можно приблизительно судить по данным химического футпринтинга [70] и крио-ЭМ 43S PIC дрожжей [204]. Из рис. 46 видно, что непосредственное взаимодействие eIF3j с rp uS3 представляется весьма вероятным, однако это взаимодействие, по-видимому, вовлекает не сам РНК-связывающий пептид, а соседствующий с ним α-спиральный фрагмент rp uS3 вблизи участка входа в мРНКсвязывающий канал, что и делает РНК-связывающий пептид недоступным для связывания неструктурированных РНК.

3.2.4.2. Перестройки в спирали h16 18S pPHK, вызванные связыванием eIF3j и DHX29

Доступность нуклеотидов A544 and A545 h16 18S pPHK снижалась сходным образом в 48S PIC как с высоким содержанием eIF3j, так и с низким содержанием этого фактора (рис. 43A и Γ). Тот факт, что связывание eIF3j и DHX29 в 48S PIC носит антикооперативный характер (рис. 42), в совокупности с данными о значительном перекрывании участков связывания этих факторов на 40S субчастице [204] указывает на то, что в каждом конкретном 48S PIC может присутствовать либо eIF3j, либо DHX29. Следовательно, перестройки в h16 18S pPHK, индуцированные фактором eIF3j, после его диссоциации от 40S субчастицы поддерживаются DHX29. Принимая во внимание то, что ВZCN реагирует предпочтительно с конформационно-подвижными нуклеотидами, можно предположить, что защищённое состояние спирали h16 связано с её переходом в более жёсткую конформацию на стадии образования 48S PIC, которая сохраняется и в 80S пост-инициаторных комплексах. Анализ структур свободных 40S субчастиц и 80S рибосом (PDB номер 4KZX [5]и PDB номер 4UG0 [229]), 48S PIC (PDB номер 4KZZ [5], PDB номер 3JAP и 3JAQ [26]), а также элонгационных комплексов 80S рибосом (PDB номер 125

4CXC [237]) показал, что конформация h16 18S pPHK и её расположение на 40S субчастице практически не зависят от функционального состояния рибосомы. Это значит, что характерная особенность обнаруженного в настоящей работе «защищённого» состояния h16 заключается в снижении подвижности фрагмента спирали без видимых изменений её устройства на рибосоме.

Таким образом, применение химического футпринтинга 18S рРНК с использованием зонда, чувствительного к конформационной подвижности нуклеотидов РНК, позволило обнаружить свойство h16, которое не удалось выявить paнее в структурных исследованиях, проведённых с помощью крио-ЭМ и рентгеноструктурного рибосомных комплексов. Функциональное анализа назначение обнаруженного конформационного перехода в h16 может быть связано с тем, что он «уплотняет» контакты мРНК с рибосомой в участке входа и тем самым придает этому участку свойства, оптимальные для связывания мРНК и её последующего движения по мРНКсвязывающему каналу в процессе элонгации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящей работы позволили прояснить на пептидно-нуклеотидном уровне ряд структурно-функциональных аспектов молекулярных механизмов, лежащих в основе инициации трансляции у высших эукариот, и выявить сходство в структурной организации 48S предынициаторных комплексов, образующихся при инициации этого процесса по каноническому и HCV IRES-зависимому механизмам. С помощью аффинной модификации рибосом аналогами мРНК, несущими перфторарилазидогруппу в заданном положении, установлено, что мотив 62-YxxPKxYxK-70 гр S26e, консервативный у эукариот, участвует в поддержании пути мРНК от области кодон-антикодоновых взаимодействий до места её выхода из мРНК-связывающего канала. Соседствуя с частью мРНК, соответствующей её 5'-НТО при инициации трансляции, этот мотив тем самым способствует поддержанию правильной рамки считывания, а также рекрутированию мРНК к 40S субчастице рибосомы фактором eIF3. С помощью метода сшивок с использованием формальдегида показано, что в 48S предынициаторном комплексе, образующемся после узнавания старт-кодона мРНК (модельной канонической или НСV IRES) тройным комплексом eIF2•Met-тPHK_i^{Met}•GTP, субъединица eIF2α взаимодействует с rp uS7, что оказывается возможно благодаря крупным конформационным перестройкам eIF2a, сопровождающим связывание eIF2 с 40S субчастицей. Такие перестройки, очевидно, требуются для правильного позиционирования eIF2α по отношению к другим компонентам 48S предынициаторного комплекса, что, в свою очередь, обеспечивает

126

инициацию трансляции на надлежащем инициирующем кодоне. Все эти результаты и сделанные на их основе заключения недавно были полностью подтверждены с помощью крио-ЭМ.

С использованием производных олигорибонуклеотидов с окисленной З'-концевой рибозой идентифицирован РНК-связывающий пептид 55-TQNVLGEKGR-64 В консервативном домене KH rp uS3, экспонированный на поверхности 40S субчастицы в участке входа мРНК и ответственный за способность рибосом взаимодействовать с короткими одноцепочечными РНК вне мРНК-связывающего центра. В 48S предынициаторных комплексах, образованных на модельной канонической мРНК или фрагменте HCV IRES, ограниченном с 3'-стороны тетраплетом AUGC, этот пептид становится экранированным от взаимодействия с РНК субъединицей eIF3j, чей участок связывания на 40S субчастице перекрывается с участком связывания кодирующей части мРНК. Когда в мРНК-связывающем канале оказывается более 4 нуклеотидов после старткодона, eIF3j диссоциирует от рибосомы и гр uS3 становится снова доступным для РНК. eIF3j взаимодействия С одноцепочечными Следовательно, способствует рекрутированию мРНК К 40S субчастице на стадии формирования 48S предынициаторного комплекса. С помощью химического футпринтинга удалось выявить роль eIF3 в реструктурировании участка входа в мРНК-связывающий канал. Оказалось, что в присутствии eIF3j резко уменьшается конформационная гибкость спирали h16 18S рРНК, расположенной в этом участке вместе с гр uS3. После диссоциации eIF3j измененная конформация спирали h16 поддерживается фактором DHX29, причём после диссоциации DHX29 эта же конформация h16 сохраняется в 80S рибосомных комплексах, по крайней мере, до первого цикла элонгации. Очевидно, что более жёсткая конформация h16 должна способствовать сужению входа в мРНК-связывающий канал, что необходимо для поддержания правильного пути мРНК через рибосому в процессе трансляции. Таким образом, именно eIF3 ввляется ключевой субъединицей фактора eIF3, благодаря которой участок входа в мРНК-связывающий канал на 40S субчастице приобретает конформацию, оптимальную для последующего продвижения в нем мРНК в процессе удлинения полипептидной цепи.

Пока неизвестно, какую роль в жизни клеток играет ярко выраженная способность экспонированного на поверхности 40S субчастицы пептида в КН-домене rp uS3 связывать неструктурированные PHK. Можно полагать, что этот пептид вовлекается в регуляцию трансляции через его распознавание специальными малыми одноцепочечными PHK, которые взаимодействуя с ним, могли бы влиять на трансляционные свойства рибосом и тем самым контролировать синтез белков. Появление кодирующей части мPHK в мPHK-

связывающем канале, вытесняющей из него eIF3j, может быть триггером этого регуляторного процесса.

Таким образом, в настоящей работе получена новая информация об особенностях структурной организации мРНК-связывающего центра и участка входа в мРНКсвязывающий канал в 80S рибосомах и об устройстве субъединицы eIF2α в 48S предынициаторных комплексах, а также о роли субъединицы eIF3j в индуцировании конформационных изменений 40S субчастицы в участке входа мРНК. Эта информация является принципиально важной для понимания как молекулярных механизмов трансляции у эукариот, так и тех регуляторных процессов, которые обеспечивают эффективность и точность белкового синтеза.

выводы

• Рибосомный белок eS26 соседствует своим эукариот-специфичным мотивом YxxPKxYxK с частью мPHK с 5'-стороны от кодона в Е-участке, соответствующей её 5'нетранслируемой области при инициации трансляции, что указывает на роль этого мотива в поддержании правильной рамки считывания и во взаимодействии 40S субчастицы рибосомы с одним из ключевых факторов инициации, eIF3.

• Фрагменты 2-18 и 72-85 рибосомного белка uS7 контактируют соответственно с фрагментами 68-75 и 81-87 субъединицы α фактора инициации eIF2 в 48S предынициаторном комплексе, что требует крупных конформационных перестроек в eIF2α, которые должны сопровождать связывание тройного комплекса eIF2•MetтPHK_i^{Met}•GTP с 40S субчастицей рибосомы.

• Рибосомный белок uS3 обладает ярко выраженной способностью взаимодействовать с короткими одноцепочечными РНК посредством пептида 55-TQNVLGEKGR-64 в его КН-домене, экспонированного на поверхности 40S субчастицы рибосомы вблизи участка входа мРНК, что указывает на возможное участие этого пептида в регуляции трансляции.

• РНК-связывающий пептид рибосомного белка uS3 экранирован от взаимодействий с РНК в 48S предынициаторном комплексе, когда субъединица ј фактора eIF3 связана с 40S субчастицей, и становится доступным после её диссоциации, которая происходит в результате фиксации мРНК в мРНК-связывающем канале, что указывает на возможную роль eIF3j в регуляции РНК-связывающей способности белка uS3.

• Рибосомный белок uS3 не образует связи со спиралью h16 18S pPHK в 48S предынициаторных комплексах, содержащих eIF3j или геликазу DHX29, тогда как конформация h16 в этих комплексах оказывается более жёсткой, чем в комплексах, полученных в отсутствие факторов трансляции, что должно способствовать оптимальной аккомодации мPHK в мPHK-связывающем канале в ходе трансляции.

• Взаимодействие рибосомного белком uS7 с eIF2α и eIF3j-зависимое реструктурирование 40S субчастицы в участке входа мРНК, сопровождающееся экранированием рибосомного белка uS3, являются универсальными чертами канонического и HCV IRES-зависимого механизмов инициации трансляции у млекопитающих.

129

Список литературы

- 1. Ban N., Beckmann R., Cate J. H., Dinman J. D., Dragon F., Ellis S. R., Lafontaine D. L. A new system for naming ribosomal proteins // Curr Opin Struct Biol. 2014. V. 24 P. 165-169.
- 2. Shatsky I. N., Dmitriev S. E., Terenin I. M., Andreev D. E. Cap- and IRES-independent scanning mechanism of translation initiation as an alternative to the concept of cellular IRESs // Mol Cells. 2010. V. 30 (4) P. 285-293.
- 3. Hinnebusch A. G. The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation // Annu Rev Biochem. 2014. V. 83 P. 779-812.
- 4. Jackson R. J. The current status of vertebrate cellular mRNA IRESs // Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013. V. 5 (2) a011569.
- 5. Lomakin I. B., Steitz T. A. The initiation of mammalian protein synthesis and mRNA scanning mechanism // Nature. 2013. V. 500 (7462) P. 307-311.
- Hussain T., Llacer J. L., Fernandez I. S., Munoz A., Martin-Marcos P., Savva C. G., Lorsch J. R., Hinnebusch A. G., Ramakrishnan V. Structural changes enable start codon recognition by the eukaryotic translation initiation complex // Cell. — 2014. — V. 159 (3) — P. 597-607.
- 7. Graifer D., Karpova G. Roles of ribosomal proteins in the functioning of translational machinery of eukarvotes // Biochimie. 2015. V. 109 P. 1-17.
- 8. Graifer D., Karpova G. Photoactivatable RNA derivatives as tools for studying the structural and functional organization of complex cellular ribonucleoprotein machineries // RSC Advances. 2013. V. 3 (9) P. 2858-2872.
- 9. Laletina E., Graifer D., Malvgin A., Ivanov A., Shatskv I. N., Karpova G. G. Proteins surrounding hairpin IIIe of the hepatitis C virus internal ribosome entry site on the human 40S ribosomal subunit // Nucleic Acids Res. 2006. V. 34 (7) P. 2027-2036.
- Babavlova E., Graifer D., Malvgin A., Stahl J., Shatskv I. N., Karpova G. Positioning of subdomain IIId and apical loop of domain II of the hepatitis C IRES on the human 40S ribosome // Nucleic Acids Res. 2009. V. 37 (4) P. 1141-1151.
 Khairulina J., Graifer D., Bulvgin K., Ven'vaminova A., Frolova L., Karpova G.
- 11. Khairulina J., Graifer D., Bulygin K., Ven'yaminova A., Frolova L., Karpova G. Eukarvote-specific motif of ribosomal protein S15 neighbors A site codon during elongation and termination of translation // Biochimie. 2010. V. 92 (7) P. 820-825.
- Bulvgin K. N., Khairulina Y. S., Kolosov P. M., Ven'vaminova A. G., Graifer D. M., Vorobjev Y. N., Frolova L. Y., Karpova G. G. Adenine and guanine recognition of stop codon is mediated by different N domain conformations of translation termination factor eRF1 // Nucleic Acids Res. — 2011. — V. 39 (16) — P. 7134-7146.
 Bulvgin K. N., Khairulina Y. S., Kolosov P. M., Ven'vaminova A. G., Graifer D. M.,
- Bulvgin K. N., Khairulina Y. S., Kolosov P. M., Ven'vaminova A. G., Graifer D. M., Vorobiev Y. N., Frolova L. Y., Kisselev L. L., Karpova G. G. Three distinct peptides from the N domain of translation termination factor eRF1 surround stop codon in the ribosome // RNA. — 2010. — V. 16 (10) — P. 1902-1914.
- 14. Graifer D., Molotkov M., Stvazhkina V., Demeshkina N., Bulygin K., Eremina A., Ivanov A., Laletina E., Ven'vaminova A., Karpova G. Variable and conserved elements of human ribosomes surrounding the mRNA at the decoding and upstream sites // Nucleic Acids Res. 2004. V. 32 (11) P. 3282-3293.
- Pisarev A. V., Kolupaeva V. G., Yusupov M. M., Hellen C. U., Pestova T. V. Ribosomal position and contacts of mRNA in eukaryotic translation initiation complexes // EMBO J. — 2008. — V. 27 (11) — P. 1609-1621.
- Molotkov M. V., Graifer D. M., Popugaeva E. A., Bulygin K. N., Meschaninova M. I., Ven'vaminova A. G., Karpova G. G. mRNA 3' of the A site bound codon is located close to protein S3 on the human 80S ribosome // RNA Biol. — 2006. — V. 3 (3) — P. 122-129.
- to protein S3 on the human 80S ribosome // RNA Biol. 2006. V. 3 (3) P. 122-129.
 Spahn C. M., Kieft J. S., Grassucci R. A., Penczek P. A., Zhou K., Doudna J. A., Frank J. Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit // Science. 2001. V. 291 (5510) P. 1959-1962.
- 18. Passmore L. A., Schmeing T. M., Maag D., Applefield D. J., Acker M. G., Algire M. A., Lorsch J. R., Ramakrishnan V. The eukarvotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome // Mol Cell. 2007. V. 26 (1) P. 41-50.
- 19. Hashem Y., des Georges A., Dhote V., Langlois R., Liao H. Y., Grassucci R. A., Hellen C.

U., Pestova T. V., Frank J. Structure of the mammalian ribosomal 43S preinitiation complex bound to the scanning factor DHX29 // Cell. — 2013. — V. 153 (5) — P. 1108-1119.

- 20. Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes // Cell. 1986. V. 44 (2) P. 283-292.
- 21. Pisarev A. V., Kolupaeva V. G., Pisareva V. P., Merrick W. C., Hellen C. U., Pestova T. V. Specific functional interactions of nucleotides at key -3 and +4 positions flanking the initiation codon with components of the mammalian 48S translation initiation complex // Genes Dev. 2006. V. 20 (5) P. 624-636.
- Schmidt C., Beilsten-Edmands V., Robinson C. V. Insights into Eukarvotic Translation Initiation from Mass Spectrometry of Macromolecular Protein Assemblies // J Mol Biol. — 2016. — V. 428 (2 Pt A) — P. 344-356.
- 2016. V. 428 (2 Pt A) P. 344-356.
 23. Fletcher C. M., Pestova T. V., Hellen C. U., Wagner G. Structure and interactions of the translation initiation factor eIF1 // EMBO J. 1999. V. 18 (9) P. 2631-2637.
- 24. Battiste J. L., Pestova T. V., Hellen C. U., Wagner G. The eIF1A solution structure reveals a large RNA-binding surface important for scanning function // Mol Cell. 2000. V. 5 (1) P. 109-119.
- Saini A. K., Nanda J. S., Lorsch J. R., Hinnebusch A. G. Regulatory elements in eIF1A control the fidelity of start codon selection by modulating tRNA(i)(Met) binding to the ribosome // Genes Dev. 2010. V. 24 (1) P. 97-110.
 Llacer J. L., Hussain T., Marler L., Aitken C. E., Thakur A., Lorsch J. R., Hinnebusch A.
- Llacer J. L., Hussain T., Marler L., Aitken C. E., Thakur A., Lorsch J. R., Hinnebusch A. G., Ramakrishnan V. Conformational Differences between Open and Closed States of the Eukaryotic Translation Initiation Complex // Mol Cell. 2015. V. 59 (3) P. 399-412.
- 27. Zhang F., Saini A. K., Shin B. S., Nanda J., Hinnebusch A. G. Conformational changes in the P site and mRNA entry channel evoked by AUG recognition in veast translation preinitiation complexes // Nucleic Acids Res. 2015. V. 43 (4) P. 2293-2312.
- Naveau M., Lazennec-Schurdevin C., Panvert M., Mechulam Y., Schmitt E. tRNA binding properties of eukarvotic translation initiation factor 2 from Encephalitozoon cuniculi // Biochemistry. — 2010. — V. 49 (40) — P. 8680-8688.
- 29. Flvnn A., Oldfield S., Proud C. G. The role of the beta-subunit of initiation factor eIF-2 in initiation complex formation // Biochim Biophys Acta. 1993. V. 1174 (1) P. 117-121.
- 30. Graifer D., Karpova G. Interaction of tRNA with eukaryotic ribosome // Int J Mol Sci. 2015. V. 16 (4) P. 7173-7194.
- 31. Kapp L. D., Lorsch J. R. GTP-dependent recognition of the methionine moietv on initiator tRNA by translation factor eIF2 // J Mol Biol. 2004. V. 335 (4) P. 923-936.
- Jennings M. D., Zhou Y., Mohammad-Oureshi S. S., Bennett D., Pavitt G. D. eIF2B promotes eIF5 dissociation from eIF2*GDP to facilitate guanine nucleotide exchange for translation initiation // Genes Dev. — 2013. — V. 27 (24) — P. 2696-2707.
 Damoc E., Fraser C. S., Zhou M., Videler H., Mayeur G. L., Hershey J. W., Doudna J. A.,
- 33. Damoc E., Fraser C. S., Zhou M., Videler H., Maveur G. L., Hershey J. W., Doudna J. A., Robinson C. V., Leary J. A. Structural characterization of the human eukarvotic initiation factor 3 protein complex by mass spectrometry // Mol Cell Proteomics. — 2007. — V. 6 (7) — P. 1135-1146.
- 34. Thompson H. A., Sadnik I., Scheinbuks J., Moldave K. Studies on native ribosomal subunits from rat liver. Purification and characterization of a ribosome dissociation factor // Biochemistry. — 1977. — V. 16 (10) — P. 2221-2230.
- 35. Mitchell S. F., Walker S. E., Algire M. A., Park E. H., Hinnebusch A. G., Lorsch J. R. The 5'-7-methylguanosine cap on eukarvotic mRNAs serves both to stimulate canonical translation initiation and to block an alternative pathway // Mol Cell. 2010. V. 39 (6) P. 950-962.
- 36. Scheel H., Hofmann K. Prediction of a common structural scaffold for proteasome lid, COP9-signalosome and eIF3 complexes // BMC Bioinformatics. 2005. V. 6 P. 71.
- 37. Ponting C. P., Aravind L., Schultz J., Bork P., Koonin E. V. Eukarvotic signalling domain homologues in archaea and bacteria. Ancient ancestry and horizontal gene transfer // J Mol Biol. 1999. V. 289 (4) P. 729-745.
- 38. des Georges A., Dhote V., Kuhn L., Hellen C. U., Pestova T. V., Frank J., Hashem Y. Structure of mammalian eIF3 in the context of the 43S preinitiation complex // Nature. —

2015. — V. 525 (7570) — P. 491-495.

- 39. Zhou M., Sandercock A. M., Fraser C. S., Ridlova G., Stephens E., Schenauer M. R., Yokoi-Fong T., Barsky D., Leary J. A., Hershey J. W., Doudna J. A., Robinson C. V. Mass spectrometry reveals modularity and a complete subunit interaction map of the eukarvotic translation factor eIF3 // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2008. — V. 105 (47) — P. 18139-18144.
- 40. Khoshnevis S., Gunisova S., Vlckova V., Kouba T., Neumann P., Beznoskova P., Ficner R., Valasek L. S. Structural integrity of the PCI domain of eIF3a/TIF32 is required for mRNA recruitment to the 43S pre-initiation complexes // Nucleic Acids Res. 2014. V. 42 (6) P. 4123-4139.
- 41. Valasek L., Nielsen K. H., Zhang F., Fekete C. A., Hinnebusch A. G. Interactions of eukarvotic translation initiation factor 3 (eIF3) subunit NIP1/c with eIF1 and eIF5 promote preinitiation complex assembly and regulate start codon selection // Mol Cell Biol. 2004. V. 24 (21) P. 9437-9455.
- 42. Dong Z., Zhang J. T. Initiation factor eIF3 and regulation of mRNA translation, cell growth, and cancer // Crit Rev Oncol Hematol. 2006. V. 59 (3) P. 169-180.
- 43. Karaskova M., Gunisova S., Herrmannova A., Wagner S., Munzarova V., Valasek L. Functional characterization of the role of the N-terminal domain of the c/Nip1 subunit of eukarvotic initiation factor 3 (eIF3) in AUG recognition // J Biol Chem. — 2012. — V. 287 (34) — P. 28420-28434.
- 44. Morino S., Imataka H., Svitkin Y. V., Pestova T. V., Sonenberg N. Eukarvotic translation initiation factor 4E (eIF4E) binding site and the middle one-third of eIF4GI constitute the core domain for cap-dependent translation, and the C-terminal one-third functions as a modulatory region // Mol Cell Biol. 2000. V. 20 (2) P. 468-477.
- 45. Asano K., Shalev A., Phan L., Nielsen K., Clavton J., Valášek L., Donahue T. F., Hinnebusch A. G. Multiple roles for the C-terminal domain of eIF5 in translation initiation complex assembly and GTPase activation // EMBO J. — 2001. — V. 20 (9) — P. 2326-2337.
- Valasek L., Nielsen K. H., Hinnebusch A. G. Direct eIF2-eIF3 contact in the multifactor complex is important for translation initiation in vivo // EMBO J. — 2002. — V. 21 (21) — P. 5886-5898.
- 47. Valasek L., Mathew A. A., Shin B. S., Nielsen K. H., Szamecz B., Hinnebusch A. G. The veast eIF3 subunits TIF32/a. NIP1/c. and eIF5 make critical connections with the 40S ribosome in vivo // Genes Dev. 2003. V. 17 (6) P. 786-799.
- 48. Pestova T. V., Kolupaeva V. G. The roles of individual eukarvotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection // Genes Dev. 2002. V. 16 (22) P. 2906-2922.
- 49. Uchida N., Hoshino S., Imataka H., Sonenberg N., Katada T. A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with polv(A)-binding protein in Cap/Polv(A)-dependent translation // J Biol Chem. 2002. V. 277 (52) P. 50286-50292.
- 50. Yu Y., Abaeva I. S., Marintchev A., Pestova T. V., Hellen C. U. Common conformational changes induced in type 2 picornavirus IRESs by cognate trans-acting factors // Nucleic Acids Res. 2011. V. 39 (11) P. 4851-4865.
 51. Bi X., Ren J., Goss D. J. Wheat germ translation initiation factor eIF4B affects eIF4A and
- 51. Bi X., Ren J., Goss D. J. Wheat germ translation initiation factor eIF4B affects eIF4A and eIFiso4F helicase activity by increasing the ATP binding affinity of eIF4A // Biochemistry. — 2000. — V. 39 (19) — P. 5758-5765.
- 52. Methot N., Song M. S., Sonenberg N. A region rich in aspartic acid, arginine, tvrosine, and glvcine (DRYG) mediates eukarvotic initiation factor 4B (eIF4B) self-association and interaction with eIF3 // Mol Cell Biol. 1996. V. 16 (10) P. 5328-5334.
- 53. Conte M. R., Kelly G., Babon J., Sanfelice D., Youell J., Smerdon S. J., Proud C. G. Structure of the eukarvotic initiation factor (eIF) 5 reveals a fold common to several translation factors // Biochemistry. 2006. V. 45 (14) P. 4550-4558.
- 54. Yamamoto Y., Singh C. R., Marintchev A., Hall N. S., Hannig E. M., Wagner G., Asano K. The eukarvotic initiation factor (eIF) 5 HEAT domain mediates multifactor assembly and scanning with distinct interfaces to eIF1, eIF2, eIF3, and eIF4G // Proc Natl Acad Sci U S A. 2005. V. 102 (45) P. 16164-16169.
- 55. Sokabe M., Fraser C. S., Hershey J. W. The human translation initiation multi-factor complex promotes methionyl-tRNAi binding to the 40S ribosomal subunit // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40 (2) P. 905-913.
- 56. Luna R. E., Arthanari H., Hiraishi H., Akabayov B., Tang L., Cox C., Markus M. A., Luna

L. E., Ikeda Y., Watanabe R., Bedova E., Yu C., Alikhan S., Wagner G., Asano K. The interaction between eukarvotic initiation factor 1A and eIF5 retains eIF1 within scanning preinitiation complexes // Biochemistry. — 2013. — V. 52 (52) — P. 9510-9518.

- 57. Luna R. E., Arthanari H., Hiraishi H., Nanda J., Martin-Marcos P., Markus M. A., Akabayov B.The C-terminal domain of eukaryotic initiation factor 5 promotes start codon recognition by its dynamic interplay with eIF1 and eIF2beta // Cell Rep. 2012. V. 1 (6) P. 689-702.
- 58. Jennings M. D.Pavitt G. D. eIF5 has GDI activity necessary for translational control by eIF2 phosphorylation // Nature. 2010. V. 465 (7296) P. 378-381.
- 59. Yu Y., Marintchev A., Kolupaeva V. G., Unbehaun A., Vervasova T., Lai S. C., Hong P., Wagner G., Hellen C. U., Pestova T. V. Position of eukarvotic translation initiation factor eIF1A on the 40S ribosomal subunit mapped by directed hydroxyl radical probing // Nucleic Acids Res. — 2009. — V. 37 (15) — P. 5167-5182.
- Nucleic Acids Res. 2009. V. 37 (15) P. 5167-5182.
 Nanda J. S., Saini A. K., Munoz A. M., Hinnebusch A. G., Lorsch J. R. 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. V. 288 (8) P. 5316-5329.
- 61. Marintchev A., Kolupaeva V. G., Pestova T. V., Wagner G. Mapping the binding interface between human eukarvotic initiation factors 1A and 5B: a new interaction between old partners // Proc Natl Acad Sci U S A. 2003. V. 100 (4) P. 1535-1540.
- 62. Unbehaun A., Borukhov S. I., Hellen C. U., Pestova T. V. Release of initiation factors from 48S complexes during ribosomal subunit joining and the link between establishment of codon-anticodon base-pairing and hydrolysis of eIF2-bound GTP // Genes Dev. 2004. V. 18 (24) P. 3078-3093.
- 63. Sorensen H. P., Hedegaard J., Sperling-Petersen H. U., Mortensen K. K. Remarkable conservation of translation initiation factors: IF1/eIF1A and IF2/eIF5B are universally distributed phylogenetic markers // IUBMB Life. 2001. V. 51 (5) P. 321-327.
- 64. Roll-Mecak A., Cao C., Dever T. E., Burlev S. K. X-Rav structures of the universal translation initiation factor IF2/eIF5B: conformational changes on GDP and GTP binding // Cell. 2000. V. 103 (5) P. 781-792.
- 65. Shin B. S., Acker M. G., Kim J. R., Maher K. N., Arefin S. M., Lorsch J. R., Dever T. E. Structural integrity of [alpha]-helix H12 in translation initiation factor eIF5B is critical for 80S complex stability // RNA. 2011. V. 17 (4) P. 687-696.
- 66. Zheng A., Yu J., Yamamoto R., Ose T., Tanaka I., Yao M. X-rav structures of eIF5B and the eIF5B-eIF1A complex: the conformational flexibility of eIF5B is restricted on the ribosome by interaction with eIF1A // Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2014. V. 70 (Pt 12) P. 3090-3098.
- 67. Kuhle B., Ficner R. eIF5B employs a novel domain release mechanism to catalyze ribosomal subunit joining // EMBO J. 2014. V. 33 (10) P. 1177-1191.
- Ceci M., Gaviraghi C., Gorrini C., Sala L. A., Offenhauser N., Marchisio P. C., Biffo S. Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly // Nature. — 2003. — V. 426 (6966) — P. 579-584.
- 2003. V. 426 (6966) P. 579-584.
 69. Parsvan A., Shahbazian D., Martineau Y., Petroulakis E., Alain T., Larsson O., Mathonnet G., Tettweiler G., Hellen C. U., Pestova T. V., Svitkin Y. V., Sonenberg N. The helicase protein DHX29 promotes translation initiation, cell proliferation, and tumorigenesis // Proc Natl Acad Sci U S A. 2009. V. 106 (52) P. 22217-22222.
- Pisareva V. P., Pisarev A. V., Komar A. A., Hellen C. U., Pestova T. V. Translation initiation on mammalian mRNAs with structured 5'UTRs requires DExH-box protein DHX29 // Cell. — 2008. — V. 135 (7) — P. 1237-1250.
 Soto-Rifo R., Rubilar P. S., Limousin T., de Brevne S., Decimo D., Ohlmann T. DEAD-
- 71. Soto-Rifo R., Rubilar P. S., Limousin T., de Brevne S., Decimo D., Ohlmann T. DEADbox protein DDX3 associates with eIF4F to promote translation of selected mRNAs // EMBO J. — 2012. — V. 31 (18) — P. 3745-3756.
- 72. Miller W. A., Wang Z., Treder K. The amazing diversity of cap-independent translation elements in the 3'-untranslated regions of plant viral RNAs // Biochem Soc Trans. 2007. V. 35 (Pt 6) P. 1629-1633.
- 73. Simon A. E., Miller W. A. 3' cap-independent translation enhancers of plant viruses // Annu Rev Microbiol. 2013. V. 67 P. 21-42.
- 74. Nicholson B. L., White K. A. 3' Cap-independent translation enhancers of positive-strand RNA plant viruses // Curr Opin Virol. 2011. V. 1 (5) P. 373-380.
- 75. Gazo B. M., Murphy P., Gatchel J. R., Browning K. S. A novel interaction of Cap-binding

protein complexes eukarvotic 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. — V. 279 (14) — P. 13584-13592.

- 76. Mizumoto H., Tatsuta M., Kaido M., Mise K., Okuno T. Cap-independent translational enhancement by the 3' untranslated region of red clover necrotic mosaic virus RNA1 // J Virol. 2003. V. 77 (22) P. 12113-12121.
- 77. Guo L., Allen E., Miller W. A. Structure and function of a cap-independent translation element that functions in either the 3' or the 5' untranslated region // RNA. 2000. V. 6 (12) P. 1808-1820.
- 78. Shen R., Miller W. A. The 3' untranslated region of tobacco necrosis virus RNA contains a barley vellow dwarf virus-like cap-independent translation element // J Virol. 2004. V. 78 (9) P. 4655-4664.
- 79. Wang S., Browning K. S., Miller W. A. A viral sequence in the 3'-untranslated region mimics a 5' cap in facilitating translation of uncapped mRNA // EMBO J. 1997. V. 16 (13) P. 4107-4116.
- 80. Legault P., Li J., Mogridge J., Kav L. E., Greenblatt J. NMR structure of the bacteriophage lambda N peptide/boxB RNA complex: recognition of a GNRA fold by an arginine-rich motif // Cell. 1998. V. 93 (2) P. 289-299.
- 81. Treder K., Kneller E. L., Allen E. M., Wang Z., Browning K. S., Miller W. A. The 3' capindependent translation element of Barley vellow dwarf virus binds eIF4F via the eIF4G subunit to initiate translation // RNA. — 2008. — V. 14 (1) — P. 134-147.
- 82. Iwakawa H. O., Tajima Y., Taniguchi T., Kaido M., Mise K., Tomari Y., Taniguchi H., Okuno T. Poly(A)-binding protein facilitates translation of an uncapped/nonpolyadenylated viral RNA by binding to the 3' untranslated region // J Virol. 2012. V. 86 (15) P. 7836-7849.
- 83. Sharma S. D., Kraft J. J., Miller W. A., Goss D. J. 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. V. 290 (18) P. 11268-11281.
- 84. Batten J. S., Desvoves B., Yamamura Y., Scholthof K.-B. G. A translational enhancer element on the 3'-proximal end of the Panicum mosaic virus genome // FEBS Letters. 2006. V. 580 (11) P. 2591-2597.
- 85. Wang Z., Treder K., Miller W. A. Structure of a viral cap-independent translation element that functions via high affinity binding to the eIF4E subunit of eIF4F // J Biol Chem. 2009. V. 284 (21) P. 14189-14202.
- 86. Wang Z., Parisien M., Scheets K., Miller W. A. The cap-binding translation initiation factor, eIF4E, binds a pseudoknot in a viral cap-independent translation element // Structure. 2011. V. 19 (6) P. 868-880.
- Stupina V. A., Meskauskas A., McCormack J. C., Yingling Y. G., Shapiro B. A., Dinman J. D., Simon A. E. The 3' proximal translational enhancer of Turnip crinkle virus binds to 60S ribosomal subunits // RNA. 2008. V. 14 (11) P. 2379-2393.
- 88. Stupina V. A., Yuan X., Meskauskas A., Dinman J. D., Simon A. E. Ribosome binding to a 5' translational enhancer is altered in the presence of the 3' untranslated region in capindependent translation of turnip crinkle virus // J Virol. — 2011. — V. 85 (10) — P. 4638-4653.
- 89. Nicholson B. L., Zaslaver O., Mayberry L. K., Browning K. S., White K. A. Tombusvirus Y-Shaped Translational Enhancer Forms a Complex with eIF4F and Can Be Functionally Replaced by Heterologous Translational Enhancers // J Virol. 2013. V. 87 (3) P. 1872-1883.
- 90. Miras M., Truniger V., Querol-Audi J., Aranda M. A. Analysis of the interacting partners eIF4F and 3'-CITE required for Melon necrotic spot virus cap-independent translation // Mol Plant Pathol. 2016. mpp.12422.
- 91. Truniger V., Nieto C., Gonzalez-Ibeas D., Aranda M. Mechanism of plant eIF4E-mediated resistance against a Carmovirus (Tombusviridae): cap-independent translation of a viral RNA controlled in cis by an (a)virulence determinant // Plant J. 2008. V. 56 (5) P. 716-727.
- 92. Gao F., Kasprzak W., Stupina V. A., Shapiro B. A., Simon A. E. A ribosome-binding, 3' translational enhancer has a T-shaped structure and engages in a long-distance RNA-RNA interaction // J Virol. 2012. V. 86 (18) P. 9828-9842.
- 93. Gao F., Kasprzak W. K., Szarko C., Shapiro B. A., Simon A. E. The 3' untranslated region

of Pea Enation Mosaic Virus contains two T-shaped, ribosome-binding, cap-independent translation enhancers // J Virol. — 2014. — V. 88 (20) — P. 11696-11712.

- 94. Gao F., Gulav S. P., Kasprzak W., Dinman J. D., Shapiro B. A., Simon A. E. The kissingloop T-shaped structure translational enhancer of Pea enation mosaic virus can bind simultaneously to ribosomes and a 5' proximal hairpin // J Virol. — 2013. — V. 87 (22) — P. 11987-12002.
- 95. Matveeva O. V., Shabalina S. A. Intermolecular mRNA-rRNA hybridization and the distribution of potential interaction regions in murine 18S rRNA // Nucleic Acids Res. 1993. V. 21 (4) P. 1007-1011.
- 96. Hu M. C., Tranque P., Edelman G. M., Mauro V. P. rRNA-complementarity in the 5' untranslated region of mRNA specifying the Gtx homeodomain protein: evidence that base- pairing to 18S rRNA affects translational efficiency // Proc Natl Acad Sci U S A. 1999. V. 96 (4) P. 1339-1344.
- 97. Akbergenov R., Zhanybekova S., Kryldakov R. V., Zhigailov A., Polimbetova N. S., Hohn T., Iskakov B. K. ARC-1, a sequence element complementary to an internal 18S rRNA segment, enhances translation efficiency in plants when present in the leader or intercistronic region of mRNAs // Nucleic Acids Res. 2004. V. 32 (1) P. 239-247.
- 98. Levis C., Astier-Manifacier S. The 5' untranslated region of PVY RNA, even located in an internal position, enables initiation of translation // Virus Genes. 1993. V. 7 (4) P. 367-379.
- 99. Vanderhaeghen R., De Clercq R., Karimi M., Van Montagu M., Hilson P., Van Lijsebettens M. Leader sequence of a plant ribosomal protein gene with complementarity to the 18S rRNA triggers in vitro cap-independent translation // FEBS Lett. 2006. V. 580 (11) P. 2630-2636.
- 100. Жигайлов А. В., Грайфер Д. М., Бабайлова Е. С., Полимбетова Н. С., Искаков Б. К., Карпова Г. Г. Район 1112–1123 центрального домена 18S рРНК в 40S субчастицах рибосом растений: Доступность для комплементарных взаимодействий и функциональная роль // Биоорган химия — 2010 — Т. 36 (3) — С. 366-374
- функциональная роль // Биоорган. химия. 2010. Т. 36 (3) С. 366-374.
 101. Жигайлов А. В., Бабайлова Е. С., Полимбетова Н. С., Грайфер Д. М., Карпова Г. Г., Искаков Б. К. Возможное участие з'-концевого сегмента 18S рРНК в процессе инициации трансляции некепированных мрнк у растений // Молекуляр. биология. 2011. Т. 45 (2) С. 325-334.
- 102. Chappell S. A., Edelman G. M., Mauro V. P. A 9-nt segment of a cellular mRNA can function as an internal ribosome entry site (IRES) and when present in linked multiple copies greatly enhances IRES activity // Proc Natl Acad Sci U S A. 2000. V. 97 (4) P. 1536-1541.
- 103. Жигайлов А. В., Бабайлова Е. С., Полимбетова Н. С., Грайфер Д. М., Карпова Г. Г., Искаков Б. К. Фрагмент кодирующей части мрнк, комплементарный участку 1638-1650 18S ррнк пшеницы, проявляет свойства трансляционного усилителя // Молекуляр. биология. — 2012. — Т. 46 (5) — С. 747-756.
- Молекvляр. биология. 2012. Т. 46 (5) С. 747-756. 104. Martin F., Menetret J. F., Simonetti A., Myasnikov A. G., Vicens O., Prongidi-Fix L., Natchiar S. K., Klaholz B. P., Eriani G. Ribosomal 18S rRNA base pairs with mRNA during eukaryotic translation initiation // Nat Commun. — 2016. — V. 7 — 12622. 105. Chappell S. A., Edelman G. M., Mauro V. P. Ribosomal tethering and clustering as
- 105. Chappell S. A., Edelman G. M., Mauro V. P. Ribosomal tethering and clustering as mechanisms for translation initiation // Proc Natl Acad Sci U S A. 2006. V. 103 (48) P. 18077-18082.
- 106. Pestova T. V., Hellen C. U., Wimmer E. A conserved AUG triplet in the 5' nontranslated region of poliovirus can function as an initiation codon in vitro and in vivo // Virology. — 1994. — V. 204 (2) — P. 729-737.
- 107. Kaminski A., Povry T. A., Skene P. J., Jackson R. J. Mechanism of initiation site selection promoted by the human rhinovirus 2 internal ribosome entry site // J Virol. 2010. V. 84 (13) P. 6578-6589.
- Blyn L. B., Swiderek K. M., Richards O., Stahl D. C., Semler B. L., Ehrenfeld E. Poly(rC) binding protein 2 binds to stem-loop IV of the poliovirus RNA 5' noncoding region: identification by automated liquid chromatography-tandem mass spectrometry // Proc Natl Acad Sci U S A. 1996. V. 93 (20) P. 11115-11120.
 Deniz N., Lenarcic E. M., Landry D. M., Thompson S. R. Translation initiation factors are
- 109. Deniz N., Lenarcic E. M., Landry D. M., Thompson S. R. Translation initiation factors are not required for Dicistroviridae IRES function in vivo // RNA. 2009. V. 15 (5) P. 932-946.
- 110. Yamashita T., Sakae K., Tsuzuki H., Suzuki Y., Ishikawa N., Takeda N., Miyamura T.,

Yamazaki S. Complete nucleotide sequence and genetic organization of Aichi virus, a distinct member of the Picornaviridae associated with acute gastroenteritis in humans // J Virol. — 1998. — V. 72 (10) — P. 8408-8412.

- 111. Woo P. C., Lau S. K., Huang Y., Lam C. S., Poon R. W., Tsoi H. W., Lee P., Tse H., Chan A. S., Luk G., Chan K. H., Yuen K. Y. Comparative analysis of six genome sequences of three novel picornaviruses, turdiviruses 1, 2 and 3, in dead wild birds, and proposal of two novel genera, Orthoturdivirus and Paraturdivirus, in the family Picornaviridae // J Gen Virol. 2010. V. 91 (Pt 10) P. 2433-2448.
- 112. Yu Y., Sweenev T. R., Kafasla P., Jackson R. J., Pestova T. V., Hellen C. U. The mechanism of translation initiation on Aichivirus RNA mediated by a novel type of picornavirus IRES // EMBO J. 2011. V. 30 (21) P. 4423-4436.
- 113. Duke G. M., Hoffman M. A., Palmenberg A. C. Sequence and structural elements that contribute to efficient encephalomyocarditis virus RNA translation // J Virol. 1992. V. 66 (3) P. 1602-1609.
- 114. Ali I. K., McKendrick L., Morley S. J., Jackson R. J. Activity of the hepatitis A virus IRES requires association between the cap-binding translation initiation factor (eIF4E) and eIF4G // J Virol. 2001. V. 75 (17) P. 7854-7863.
- 115. Rijnbrand R., van der Straaten T., van Rijn P. A., Spaan W. J., Bredenbeek P. J. Internal entry of ribosomes is directed by the 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon // J Virol. 1997. V. 71 (1) P. 451-457.
- 116. Fletcher S. P., Jackson R. J. Pestivirus internal ribosome entry site (IRES) structure and function: elements in the 5' untranslated region important for IRES function // J Virol. 2002. V. 76 (10) P. 5024-5033.
- 117. Kieft J. S., Zhou K., Jubin R., Doudna J. A. Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA // RNA. 2001. V. 7 (2) P. 194-206.
- 118. Filbin M. E., Vollmar B. S., Shi D., Gonen T., Kieft J. S. HCV IRES manipulates the ribosome to promote the switch from translation initiation to elongation // Nat Struct Mol Biol. 2013. V. 20 (2) P. 150-158.
- 119. Fraser C. S., Hershev J. W., Doudna J. A. The pathwav of hepatitis C virus mRNA recruitment to the human ribosome // Nat Struct Mol Biol. 2009. V. 16 (4) P. 397-404.
- 120. Otto G. A., Puglisi J. D. The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation // Cell. - 2004. - V. 119 (3) - P. 369-380.
- 121. Locker N., Easton L. E., Lukavsky P. J. HCV and CSFV IRES domain II mediate eIF2 release during 80S ribosome assembly // EMBO J. 2007. V. 26 (3) P. 795-805.
- 122. Honda M., Beard M. R., Ping L. H., Lemon S. M. A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation // J Virol. 1999. V. 73 (2) P. 1165-1174.
- 123. Hellen C. U., de Brevne S. A distinct group of hepacivirus/pestivirus-like internal ribosomal entry sites in members of diverse picornavirus genera: evidence for modular exchange of functional noncoding RNA elements by recombination // J Virol. 2007. V. 81 (11) P. 5850-5863.
- 124. Jubin R., Vantuno N. E., Kieft J. S., Murray M. G., Doudna J. A., Lau J. Y., Baroudy B. M. Hepatitis C virus internal ribosome entry site (IRES) stem loop IIId contains a phylogenetically conserved GGG triplet essential for translation and IRES folding // J Virol. 2000. V. 74 (22) P. 10430-10437.
- 125. Costantino D. A., Pfingsten J. S., Rambo R. P., Kieft J. S. tRNA-mRNA mimicry drives translation initiation from a viral IRES // Nat Struct Mol Biol. 2008. V. 15 (1) P. 57-64.
- 126. Jackson R. J., Kaminski A. Internal initiation of translation in eukarvotes: the picornavirus paradigm and beyond // RNA. 1995. V. 1 (10) P. 985-1000.
- 127. Fernandez-Miragall O., Martinez-Salas E. Structural organization of a viral IRES depends on the integrity of the GNRA motif // RNA. 2003. V. 9 (11) P. 1333-1344.
- 128. Hellen C. U. IRES-induced conformational changes in the ribosome and the mechanism of translation initiation by internal ribosomal entry // Biochim Biophys Acta. — 2009. — V. 1789 (9-10) — P. 558-570.
- 129. Hellen C. U., Sarnow P. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules // Genes Dev. 2001. V. 15 (13) P. 1593-1612.
- 130. Kolupaeva V. G., Pestova T. V., Hellen C. U. An enzymatic footprinting analysis of the

interaction of 40S ribosomal subunits with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus // J Virol. — 2000. — V. 74 (14) — P. 6242-6250.

- 131. Lukavsky P. J., Otto G. A., Lancaster A. M., Sarnow P., Puglisi J. D. Structures of two RNA domains essential for hepatitis C virus internal ribosome entry site function // Nat Struct Biol. 2000. V. 7 (12) P. 1105-1110.
- Lytle J. R., Wu L., Robertson H. D. Domains on the hepatitis C virus internal ribosome entry site for 40s subunit binding // RNA. — 2002. — V. 8 (8) — P. 1045-1055.
 Kieft J. S., Zhou K., Jubin R., Murray M. G., Lau J. Y., Doudna J. A. The hepatitis C virus
- 133. Kieft J. S., Zhou K., Jubin R., Murray M. G., Lau J. Y., Doudna J. A. The hepatitis C virus internal ribosome entry site adopts an ion-dependent tertiary fold // J Mol Biol. — 1999. — V. 292 (3) — P. 513-529.
- 134. Малыгин А. А., Грайфер Д. М., Лалетина Е. С., Шатский. И. Н., Карпова Г. Г. Подход к выявлению функционально важных участков РНК, основанный на комплементарно-адресованной модификации // Молекуляр. биология. — 2003. — Т. 37 — С. 1027-1034.
- 135. Fukushi S., Okada M., Stahl J., Kagevama T., Hoshino F. B., Katavama K. Ribosomal protein S5 interacts with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus // J Biol Chem. 2001. V. 276 (24) P. 20824-20826.
- 136. Otto G. A., Lukavsky P. J., Lancaster A. M., Sarnow P., Puglisi J. D. Ribosomal proteins mediate the hepatitis C virus IRES-HeLa 40S interaction // RNA. 2002. V. 8 (7) P. 913-923.
- 137. Малыгин А. А., Шатский И. Н., Карпова Г. Г. Белки 40S субчастицы рибосомы человека, участвующие в связывании IRES-элемента рнк вируса гепатита с по данным флуоресцентного мечения // Биохимия. — 2013. — Т. 78 (1) — С. 53-59.
- 138. Landry D. M., Hertz M. I., Thompson S. R. RPS25 is essential for translation initiation by the Dicistroviridae and hepatitis C viral IRESs // Genes Dev. 2009. V. 23 (23) P. 2753-2764.
- 139. Joseph A. P., Bhat P., Das S., Srinivasan N. Re-analysis of crvoEM data on HCV IRES bound to 40S subunit of human ribosome integrated with recent structural information suggests new contact regions between ribosomal proteins and HCV RNA // RNA Biol. 2014. V. 11 (7) P. 891-905.
- 140. Ouade N., Boehringer D., Leibundgut M., van den Heuvel J., Ban N. Crvo-EM structure of Hepatitis C virus IRES bound to the human ribosome at 3.9-A resolution // Nat Commun. 2015. V. 6 7646.
- 141. Angulo J., Ulrvck N., Deforges J., Chamond N., Lopez-Lastra M., Masquida B., Sargueil B. LOOP IIId of the HCV IRES is essential for the structural rearrangement of the 40S-HCV IRES complex // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44 (3) P. 1309-1325.
- 142. Yamamoto H., Collier M., Loerke J., Ismer J., Schmidt A., Hilal T., Sprink T., Yamamoto K., Mielke T., Burger J., Shaikh T. R., Dabrowski M., Hildebrand P. W., Scheerer P., Spahn C. M. Molecular architecture of the ribosome-bound Hepatitis C Virus internal ribosomal entry site RNA // EMBO J. 2015. V. 34 (24) P. 3042-3058.
- 143. Hertz M. I., Landry D. M., Willis A. E., Luo G., Thompson S. R. Ribosomal protein S25 dependency reveals a common mechanism for diverse internal ribosome entry sites and ribosome shunting // Mol Cell Biol. 2013. V. 33 (5) P. 1016-1026.
 144. Malygin A. A., Kossinova O. A., Shatsky I. N., Karpova G. G. HCV IRES interacts with
- 144. Malygin A. A., Kossinova O. A., Shatsky I. N., Karpova G. G. HCV IRES interacts with the 18S rRNA to activate the 40S ribosome for subsequent steps of translation initiation // Nucleic Acids Res. 2013. V. 41 (18) P. 8706-8714.
- 145. Cannone J. J., Subramanian S., Schnare M. N., Collett J. R., D'Souza L. M., Du Y., Feng B., Lin N., Madabusi L. V., Muller K. M., Pande N., Shang Z., Yu N., Gutell R. R. The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs // BMC Bioinformatics. 2002. V. 3 P. 1-31.
- 146. Lancaster L., Noller H. F. Involvement of 16S rRNA nucleotides G1338 and A1339 in discrimination of initiator tRNA // Mol Cell. 2005. V. 20 (4) P. 623-632.
- 147. Selmer M., Dunham C. M., Murphy F. V. t., Weixlbaumer A., Petry S., Kelley A. C., Weir J. R., Ramakrishnan V. Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA // Science. 2006. V. 313 (5795) P. 1935-1942.
- 148. Boehringer D., Thermann R., Ostareck-Lederer A., Lewis J. D., Stark H. Structure of the hepatitis C virus IRES bound to the human 80S ribosome: remodeling of the HCV IRES // Structure. 2005. V. 13 (11) P. 1695-1706.
- 149. Демешкина Н. А., Лалетина Е. С., Мещанинова М. И., Репкова. М. Н., Веньяминова

А. Г., Грайфер Д. М., Карпова Г. Г. Окружение кодонов мРНК в Р- и Е-участках рибосом человека по данным фотосшивок с производными pUUUGUU // Молекуляр. биология. — 2003. — Т. 37 (1) — С. 147-155.

- 150. Beznoskova P., Cuchalova L., Wagner S., Shoemaker C. J., Gunisova S., von der Haar T., Valasek L. S. Translation initiation factors eIF3 and HCR1 control translation termination and stop codon read-through in yeast cells // PLoS Genet. 2013. V. 9 (11) e1003962.
- 151. Hashem Y., des Georges A., Dhote V., Langlois R., Liao H. Y., Grassucci R. A., Pestova T. V., Hellen C. U., Frank J. Hepatitis-C-virus-like internal ribosome entry sites displace eIF3 to gain access to the 40S subunit // Nature. 2013. V. 503 (7477) P. 539-543.
- Sun C., Ouerol-Audi J., Mortimer S. A., Arias-Palomo E., Doudna J. A., Nogales E., Cate J. H. Two RNA-binding motifs in eIF3 direct HCV IRES-dependent translation // Nucleic Acids Res. 2013. V. 41 (15) P. 7512-7521.
 Jaafar Z. A., Oguro A., Nakamura Y., Kieft J. S. Translation initiation by the hepatitis C
- 153. Jaafar Z. A., Oguro A., Nakamura Y., Kieft J. S. Translation initiation by the hepatitis C virus IRES requires eIF1A and ribosomal complex remodeling // Elife. 2016. V. 5 e21198.
- 154. Acker M. G., Shin B. S., Dever T. E., Lorsch J. R. Interaction between eukarvotic initiation factors 1A and 5B is required for efficient ribosomal subunit joining // J Biol Chem. 2006. V. 281 (13) P. 8469-8475.
- 155. Ron D., Harding H. P. eIF2α Phosphorylation in Cellular Stress Responses and Disease // In: Sonenberg N, Hershey J, Mathews M editors. Translational Control Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press — 2007 — P. 349-372.
- 156. Pestova T. V., de Brevne S., Pisarev A. V., Abaeva I. S., Hellen C. U. eIF2-dependent and eIF2-independent modes of initiation on the CSFV IRES: a common role of domain II // EMBO J. 2008. V. 27 (7) P. 1060-1072.
- 157. Skabkin M. A., Skabkina O. V., Dhote V., Komar A. A., Hellen C. U., Pestova T. V. Activities of Ligatin and MCT-1/DENR in eukaryotic translation initiation and ribosomal recycling // Genes Dev. 2010. V. 24 (16) P. 1787-1801.
- 158. Kim J. H., Park S. M., Park J. H., Keum S. J., Jang S. K. eIF2A mediates translation of hepatitis C viral mRNA under stress conditions // EMBO J. 2011. V. 30 (12) P. 2454-2464.
- 159. Terenin I. M., Dmitriev S. E., Andreev D. E., Shatsky I. N. Eukarvotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2 // Nat Struct Mol Biol. — 2008. — V. 15 (8) — P. 836-841.
- 160. Terenin I. M., Dmitriev S. E., Andreev D. E., Rovall E., Belsham G. J., Roberts L. O., Shatsky I. N. A cross-kingdom internal ribosome entry site reveals a simplified mode of internal ribosome entry // Mol Cell Biol. — 2005. — V. 25 (17) — P. 7879-7888.
- 161. Dmitriev S. E., Terenin I. M., Andreev D. E., Ivanov P. A., Dunaevsky J. E., Merrick W. C., Shatsky I. N. GTP-independent tRNA delivery to the ribosomal P-site by a novel eukarvotic translation factor // J Biol Chem. 2010. V. 285 (35) P. 26779-26787.
- 162. Aravind L., Koonin E. V. Novel predicted RNA-binding domains associated with the translation machinery // J Mol Evol. 1999. V. 48 (3) P. 291-302.
- 163. de Brevne S., Yu Y., Pestova T. V., Hellen C. U. Factor requirements for translation initiation on the Simian picornavirus internal ribosomal entry site // RNA. 2008. V. 14 (2) P. 367-380.
- 164. Spahn C. M., Jan E., Mulder A., Grassucci R. A., Sarnow P., Frank J. Crvo-EM visualization of a viral internal ribosome entry site bound to human ribosomes: the IRES functions as an RNA-based translation factor // Cell. 2004. V. 118 (4) P. 465-475.
- 165. Thompson S. R., Gulvas K. D., Sarnow P. Internal initiation in Saccharomyces cerevisiae mediated by an initiator tRNA/eIF2-independent internal ribosome entry site element // Proc Natl Acad Sci U S A. 2001. V. 98 (23) P. 12972-12977.
- 166. Pestova T. V., Lomakin I. B., Hellen C. U. Position of the CrPV IRES on the 40S subunit and factor dependence of IRES/80S ribosome assembly // EMBO Rep. 2004. V. 5 (9) P. 906-913.
- 167. Fernandez I. S., Bai X. C., Murshudov G., Scheres S. H., Ramakrishnan V. Initiation of translation by cricket paralysis virus IRES requires its translocation in the ribosome // Cell. — 2014. — V. 157 (4) — P. 823-831.
- 168. Deforges J., Locker N., Sargueil B. mRNAs that specifically interact with eukaryotic ribosomal subunits // Biochimie. 2015. V. 114 P. 48-57.
- 169. Muhs M., Hilal T., Mielke T., Skabkin M. A., Sanbonmatsu K. Y., Pestova T. V., Spahn C.

M. Crvo-EM of ribosomal 80S complexes with termination factors reveals the translocated cricket paralysis virus IRES // Mol Cell. — 2015. — V. 57 (3) — P. 422-432.

- 170. Blyn L. B., Towner J. S., Semler B. L., Ehrenfeld E. Requirement of poly(rC) binding protein 2 for translation of poliovirus RNA // J Virol. 1997. V. 71 (8) P. 6243-6246.
- 171. Silvera D., Gamarnik A. V., Andino R. The N-terminal K homology domain of the polv(rC)-binding protein is a major determinant for binding to the poliovirus 5'untranslated region and acts as an inhibitor of viral translation // J Biol Chem. — 1999. — V. 274 (53) — P. 38163-38170.
- 172. Walter B. L., Parslev T. B., Ehrenfeld E., Semler B. L. Distinct polv(rC) binding protein KH domain determinants for poliovirus translation initiation and viral RNA replication // J Virol. 2002. V. 76 (23) P. 12008-12022.
- 173. Llovd R. E. Nuclear proteins hijacked by mammalian cytoplasmic plus strand RNA viruses // Virology. 2015. V. 479-480 P. 457-474.
- 174. Jackson R. J., Howell M. T., Kaminski A. The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation // Trends Biochem Sci. — 1990. — V. 15 (12) — P. 477-483.
- 175. Andreev D. E., Hirnet J., Terenin I. M., Dmitriev S. E., Niepmann M., Shatsky I. N. Glycyl-tRNA synthetase specifically binds to the poliovirus IRES to activate translation initiation // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40 (12) P. 5602-5614.
- 176. Ochs K., Saleh L., Bassili G., Sonntag V. H., Zeller A., Niepmann M. Interaction of translation initiation factor eIF4B with the poliovirus internal ribosome entry site // J Virol. 2002. V. 76 (5) P. 2113-2122.
- 177. Sweenev T. R., Abaeva I. S., Pestova T. V., Hellen C. U. The mechanism of translation initiation on Type 1 picornavirus IRESs // EMBO J. 2014. V. 33 (1) P. 76-92.
- 178. Gamarnik A. V., Andino R. Two functional complexes formed by KH domain containing proteins with the 5' noncoding region of poliovirus RNA // RNA. 1997. V. 3 (8) P. 882-892.
- 179. Zell R., Ihle Y., Effenberger M., Seitz S., Wutzler P., Gorlach M. Interaction of polv(rC)binding protein 2 domains KH1 and KH3 with coxsackievirus RNA // Biochem Biophys Res Commun. — 2008. — V. 377 (2) — P. 500-503.
- 180. Gamarnik A. V., Andino R. Interactions of viral protein 3CD and polv(rC) binding protein with the 5' untranslated region of the poliovirus genome // J Virol. — 2000. — V. 74 (5) — P. 2219-2226.
- 181. Kafasla P., Morgner N., Robinson C. V.Jackson R. J. Polvpvrimidine tract-binding protein stimulates the poliovirus IRES by modulating eIF4G binding // EMBO J. — 2010. — V. 29 (21) — P. 3710-3722.
- 182. Никонова Е.Ю., Михайлина А.О., Леконцева Н.В., Никонов О.С., Кляшторный В.Г., Кравченко О.В., Андреев Д.Е., Шатский И.Н., Гарбер М.Б. Определение минимального фрагмента полиовирусного IRES-элемента, необходимого для образования специфического комплекса с человеческой глицил-тРНК-синтетазой // Биофизика. 2016. Т. 61 (2) С. 277-285.
 183. Lin J. Y., Li M. L., Huang P. N., Chien K. Y., Horng J. T., Shih S. R. Heterogeneous
- 183. Lin J. Y., Li M. L., Huang P. N., Chien K. Y., Horng J. T., Shih S. R. Heterogeneous nuclear ribonuclear protein K interacts with the enterovirus 71 5' untranslated region and participates in virus replication // J Gen Virol. 2008. V. 89 (Pt 10) P. 2540-2549.
- 184. Lewis S. M., Holcik M. For IRES trans-acting factors, it is all about location // Oncogene. — 2008. — V. 27 (8) — P. 1033-1035.
- 185. Pelletier J., Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukarvotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA // Nature. — 1988. — V. 334 (6180) — P. 320-325.
- 186. Hunt S. L., Jackson R. J. Polypyrimidine-tract binding protein (PTB) is necessary, but not sufficient, for efficient internal initiation of translation of human rhinovirus-2 RNA // RNA. 1999. V. 5 (3) P. 344-359.
- 187. Kolupaeva V. G., Pestova T. V., Hellen C. U., Shatsky I. N. Translation eukarvotic initiation factor 4G recognizes a specific structural element within the internal ribosome entry site of encephalomyocarditis virus RNA // J Biol Chem. 1998. V. 273 (29) P. 18599-18604.
- 188. Chamond N., Deforges J., Ulrvck N., Sargueil B. 40S recruitment in the absence of eIF4G/4A by EMCV IRES refines the model for translation initiation on the archetype of Type II IRESs // Nucleic Acids Res. 2014. V. 42 (16) P. 10373-10384.

- 189. Sanz M. A., Welnowska E., Redondo N., Carrasco L. Translation driven by picornavirus IRES is hampered from Sindbis virus replicons: rescue by poliovirus 2A protease // J Mol Biol. — 2010. — V. 402 (1) — P. 101-117.
- 190. Belsham G. J., McInernev G. M., Ross-Smith N. Foot-and-mouth disease virus 3C protease induces cleavage of translation initiation factors eIF4A and eIF4G within infected cells // J Virol. 2000. V. 74 (1) P. 272-280.
- 191. Moral-Lopez P., Alvarez E., Redondo N., Skern T., Carrasco L. L protease from foot and mouth disease virus confers eIF2-independent translation for mRNAs bearing picornavirus IRES // FEBS Lett. 2014. V. 588 (21) P. 4053-4059.
- 192. Sweenev T. R., Dhote V., Yu Y., Hellen C. U. A distinct class of internal ribosomal entry site in members of the Kobuvirus and proposed Salivirus and Paraturdivirus genera of the Picornaviridae // J Virol. 2012. V. 86 (3) P. 1468-1486.
 193. Lomakin I. B., Kolupaeva V. G., Marintchev A., Wagner G., Pestova T. V. Position of
- 193. Lomakin I. B., Kolupaeva V. G., Marintchev A., Wagner G., Pestova T. V. Position of eukaryotic initiation factor eIF1 on the 40S ribosomal subunit determined by directed hydroxyl radical probing // Genes Dev. 2003. V. 17 (22) P. 2786-2797.
- 194. Rabl J., Leibundgut M., Ataide S. F., Haag A., Ban N. Crystal structure of the eukarvotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1 // Science. 2011. V. 331 (6018) P. 730-736.
- 195. Erzberger J. P., Stengel F., Pellarin R., Zhang S., Schaefer T., Avlett C. H., Cimermancic P., Boehringer D., Sali A., Aebersold R., Ban N. Molecular architecture of the 40SeIF1eIF3 translation initiation complex // Cell. 2014. V. 158 (5) P. 1123-1135.
- 196. Ben-Shem A., Garreau de Loubresse N., Melnikov S., Jenner L., Yusupova G., Yusupov M. The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 A resolution // Science. 2011. V. 334 (6062) P. 1524-1529.
- 197. Schmitt E., Panvert M., Lazennec-Schurdevin C., Coureux P. D., Perez J., Thompson A., Mechulam Y. Structure of the ternary initiation complex aIF2-GDPNP-methionylated initiator tRNA // Nat Struct Mol Biol. 2012. V. 19 (4) P. 450-454.
- 198. Simonetti A., Brito Ouerido J., Mvasnikov A. G., Mancera-Martinez E., Renaud A., Kuhn L., Hashem Y. eIF3 Peripheral Subunits Rearrangement after mRNA Binding and Start-Codon Recognition // Mol Cell. 2016. V. 63 (2) P. 206-217.
- 199. Palam L. R., Baird T. D., Wek R. C. Phosphorvlation of eIF2 facilitates ribosomal bypass of an inhibitory upstream ORF to enhance CHOP translation // J Biol Chem. 2011. V. 286 (13) P. 10939-10949.
- 200. Stolboushkina E., Nikonov S., Nikulin A., Blasi U., Manstein D. J., Fedorov R., Garber M., Nikonov O. Crvstal structure of the intact archaeal translation initiation factor 2 demonstrates very high conformational flexibility in the alpha- and beta-subunits // J Mol Biol. 2008. V. 382 (3) P. 680-691.
- 201. Sokabe M., Yao M., Sakai N., Tova S., Tanaka I. Structure of archaeal translational initiation factor 2 betagamma-GDP reveals significant conformational change of the beta-subunit and switch 1 region // Proc Natl Acad Sci U S A. 2006. V. 103 (35) P. 13016-13021.
- 202. Shin B. S., Kim J. R., Walker S. E., Dong J., Lorsch J. R., Dever T. E. Initiation factor eIF2gamma promotes eIF2-GTP-Met-tRNAi(Met) ternary complex binding to the 40S ribosome // Nat Struct Mol Biol. 2011. V. 18 (11) P. 1227-1234.
- 203. Martin-Marcos P., Cheung Y. N., Hinnebusch A. G. Functional elements in initiation factors 1, 1A, and 2beta discriminate against poor AUG context and non-AUG start codons // Mol Cell Biol. 2011. V. 31 (23) P. 4814-4831.
- 204. Avlett C. H., Boehringer D., Erzberger J. P., Schaefer T., Ban N. Structure of a veast 40SeIF1-eIF1A-eIF3-eIF3j initiation complex // Nat Struct Mol Biol. — 2015. — V. 22 (3) — P. 269-271.
- 205. Kouba T., Danvi I., Gunisova S., Munzarova V., Vlckova V., Cuchalova L., Neueder A., Milkereit P., Valasek L. S. Small ribosomal protein RPS0 stimulates translation initiation by mediating 40S-binding of eIF3 via its direct contact with the eIF3a/TIF32 subunit // PLoS One. 2012. V. 7 (7) e40464.
- 206. Elantak L., Wagner S., Herrmannova A., Karaskova M., Rutkai E., Lukavsky P. J., Valasek L. The indispensable N-terminal half of eIF3j/HCR1 cooperates with its structurally conserved binding partner eIF3b/PRT1-RRM and with eIF1A in stringent AUG selection // J Mol Biol. 2010. V. 396 (4) P. 1097-1116.
- 207. Fraser C. S., Berry K. E., Hershey J. W., Doudna J. A. eIF3j is located in the decoding

center of the human 40S ribosomal subunit // Mol Cell. — 2007. — V. 26 (6) — P. 811-819.

- 208. Fernandez I. S., Bai X. C., Hussain T., Kellev A. C., Lorsch J. R., Ramakrishnan V., Scheres S. H. Molecular architecture of a eukaryotic translational initiation complex // Science. — 2013. — V. 342 (6160) — e1240585.
- 209. Kuhle B., Ficner R. Structural insight into the recognition of amino-acylated initiator tRNA by eIF5B in the 80S initiation complex // BMC Struct Biol. 2014. V. 14 P. 1-10.
- Yamamoto H., Unbehaun A., Loerke J., Behrmann E., Collier M., Burger J., Mielke T., Spahn C. M. Structure of the mammalian 80S initiation complex with initiation factor 5B on HCV-IRES RNA // Nat Struct Mol Biol. — 2014. — V. 21 (8) — P. 721-727.
 Dong J., Nanda J. S., Rahman H., Pruitt M. R., Shin B. S., Wong C. M., Lorsch J. R.,
- 211. Dong J., Nanda J. S., Rahman H., Pruitt M. R., Shin B. S., Wong C. M., Lorsch J. R., Hinnebusch A. G. Genetic identification of yeast 18S rRNA residues required for efficient recruitment of initiator tRNA(Met) and AUG selection // Genes Dev. — 2008. — V. 22 (16) — P. 2242-2255.
- 212. Martin-Marcos P., Nanda J. S., Luna R. E., Zhang F., Saini A. K., Cherkasova V. A., Wagner G., Lorsch J. R., Hinnebusch A. G. Enhanced eIF1 binding to the 40S ribosome impedes conformational rearrangements of the preinitiation complex and elevates initiation accuracy // RNA. 2014. V. 20 (2) P. 150-167.
- 213. Asano K., Clavton J., Shalev A., Hinnebusch A. G. A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation intermediate in vivo // Genes Dev. 2000. V. 14 (19) P. 2534-2546.
- 214. Matasova N. B., Myltseva S. V., Zenkova M. A., Graifer D. M., Vladimirov S. N., Karpova G. G. Isolation of ribosomal subunits containing intact rRNA from human placenta: estimation of functional activity of 80S ribosomes // Anal Biochem. — 1991. — V. 198 (2) — P. 219-223.
- 215. Semenkov Yu P., Kirillov S. V., Stahl J. 40 S subunits from rat liver ribosomes contain two codon-dependent sites for transfer RNA // FEBS Lett. 1985. V. 193 (1) P. 105-108.
- Репкова М. Н., Иванова Т. М., Комарова Н. И., Мешанинова М. И., Кузнецова М. А., Веньяминова А. Г. Н-фосфонатный синтез олигорибонуклеотидов, содержащих модифицированные основания. Фотоактивируемые производные олигорибонуклеотидов с перфторарилазидными группами в гетероциклических основаниях // Биоорган. химия. — 1999. — Т. 25 — С. 690-701.
 217. Hardy S. J., Kurland C. G., Voynow P., Mora G. The ribosomal proteins of Escherichia
- 217. Hardv S. J., Kurland C. G., Vovnow P., Mora G. The ribosomal proteins of Escherichia coli. I. Purification of the 30S ribosomal proteins // Biochemistry. 1969. V. 8 (7) P. 2897-2905.
- 218. Beckler G. S., Thompson D., Oosbree T., In Vitro Translation Using Rabbit Reticulocyte Lysate. 1995. P. 215-232.
- 219. Dmitriev S. E., Pisarev A. V., Rubtsova M. P., Dunaevsky Y. E., Shatsky I. N. Conversion of 48S translation preinitiation complexes into 80S initiation complexes as revealed by toeprinting // FEBS Lett. 2003. V. 533 (1-3) P. 99-104.
- 220. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 227 (5259) P. 680-685.
- 221. Strohalm M., Hassman M., Kosata B., Kodicek M. mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis // Rapid Commun Mass Spectrom. 2008. V. 22 (6) P. 905-908.
- 222. Молотков М. В., Грайфер Д. М., Еремина А. В., Иванов А. В., Лалетина Е. С., Репкова М. Н., Веньяминова А. Г., Карпова Г. Г. Часть матрицы с 5'-стороны от кодона в Е-участке сближена с белком S26 на 80S рибосоме человека // Молекуляр. биология — 2004. — Т. 38 (6) — С. 1033-1040.
- 223. Sutherland B. W., Toews J., Kast J. Utility of formaldehvde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein-protein interactions // J Mass Spectrom. 2008. V. 43 (6) P. 699-715.
- 224. Carson F. L., Martin J. H., Lynn J. A. Formalin fixation for electron microscopy: a reevaluation // Am J Clin Pathol. — 1973. — V. 59 (3) — P. 365-373.
- 226. Kossinova O., Malvgin A., Krol A., Karpova G. The SBP2 protein central to selenoprotein synthesis contacts the human ribosome at expansion segment 7L of the 28S rRNA // RNA. - 2014. - V. 20 (7) - P. 1046-1056.

- 227. Bulvgin K. N., Bartuli Y. S., Malvgin A. A., Graifer D. M., Frolova L. Y., Karpova G. G. Chemical footprinting reveals conformational changes of 18S and 28S rRNAs at different steps of translation termination on the human ribosome // RNA. 2016. V. 22 (2) P. 278-289.
- 228. Malvgin A. A., Graifer D. M., Bulvgin K. N., Zenkova M. A., Yamkovov V. I., Stahl J., Karpova G. G. Arrangement of mRNA at the decoding site of human ribosomes. 18S rRNA nucleotides and ribosomal proteins cross-linked to oligouridylate derivatives with alkylating groups at either the 3' or the 5' termini // Eur J Biochem. — 1994. — V. 226 (2) — P. 715-723.
- 229. Khatter H., Myasnikov A. G., Natchiar S. K., Klaholz B. P. Structure of the human 80S ribosome // Nature. 2015. V. 520 (7549) P. 640-645.
- 230. Хайрулина Ю. С., Молотков М. В., Булыгин К. Н., Грайфер Д. М., Веньяминова А. Г., Фролова Л. Ю., Шталь И., Карпова Г.Г. Фрагменты белка S3, соседствующие с мРНК в рибосоме человека при элонгации и терминации трансляции // Биоорган. химия. 2008. Т. 34 (6) С. 773-780.
- 231. Bulygin K., Chavatte L., Frolova L., Karpova G., Favre A. The first position of a codon placed in the A site of the human 80S ribosome contacts nucleotide C1696 of the 18S rRNA as well as proteins S2, S3, S3a, S30, and S15 // Biochemistry. 2005. V. 44 (6) P. 2153-2162.
- 232. Chavatte L., Frolova L., Laugaa P., Kisselev L., Favre A. Stop codons and UGG promote efficient binding of the polypeptide release factor eRF1 to the ribosomal A site // J Mol Biol. 2003. V. 331 (4) P. 745-758.
- 233. Schafer T., Maco B., Petfalski E., Tollervey D., Bottcher B., Aebi U., Hurt E. Hrr25dependent phosphorylation state regulates organization of the pre-40S subunit // Nature. — 2006. — V. 441 (7093) — P. 651-655.
- 234. Baouz S., Woisard A., Sinapah S., Le Caer J. P., Argentini M., Bulvgin K., Aguie G., Hountondji C. The human large subunit ribosomal protein L36A-like contacts the CCA end of P-site bound tRNA // Biochimie. — 2009. — V. 91 (11-12) — P. 1420-1425.
- end of P-site bound tRNA // Biochimie. 2009. V. 91 (11-12) P. 1420-1425.
 235. Garcia-Mavoral M. F., Hollingworth D., Masino L., Diaz-Moreno I., Kellv G., Gherzi R., Chou C. F., Chen C. Y., Ramos A. The structure of the C-terminal KH domains of KSRP reveals a noncanonical motif important for mRNA degradation // Structure. 2007. V. 15 (4) P. 485-498.
- 236. Yadavilli S., Mavo L. D., Higgins M., Lain S., Hegde V., Deutsch W. A. Ribosomal protein S3: A multi-functional protein that interacts with both p53 and MDM2 through its KH domain // DNA Repair. 2009. V. 8 (10) P. 1215-1224.
- KH domain // DNA Repair. 2009. V. 8 (10) P. 1215-1224.
 Budkevich T. V., Giesebrecht J., Behrmann E., Loerke J., Ramrath D. J., Mielke T., Ismer J., Hildebrand P. W., Tung C. S., Nierhaus K. H., Sanbonmatsu K. Y., Spahn C. M. Regulation of the mammalian elongation cvcle by subunit rolling: a eukaryotic-specific ribosome rearrangement // Cell. 2014. V. 158 (1) P. 121-131.
- 238. Weeks K. M. Advances in RNA structure analysis by chemical probing // Curr Opin Struct Biol. 2010. V. 20 (3) P. 295-304.
- 239. Dasso M. C., Jackson R. J. On the fidelity of mRNA translation in the nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate system // Nucleic Acids Res. — 1989. — V. 17 (8) — P. 3129-3144.
- 240. Svidritskiv E., Brilot A. F., Koh C. S., Grigorieff N., Korostelev A. A. Structures of veast 80S ribosome-tRNA complexes in the rotated and nonrotated conformations // Structure. — 2014. — V. 22 (8) — P. 1210-1218.
- Choudharv C., Kumar C., Gnad F., Nielsen M. L., Rehman M., Walther T. C., Olsen J. V., Mann M. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions // Science. — 2009. — V. 325 (5942) — P. 834-840.
 Louie D. F., Resing K. A., Lewis T. S., Ahn N. G. Mass spectrometric analysis of 40 S
- 242. Louie D. F., Resing K. A., Lewis T. S., Ahn N. G. Mass spectrometric analysis of 40 S ribosomal proteins from Rat-1 fibroblasts // J Biol Chem. 1996. V. 271 (45) P. 28189-28198.
- 243. Malygin A. A., Karpova G. G. Site-specific cleavage of the 40S ribosomal subunit reveals eukarvote-specific ribosomal protein S28 in the subunit head // FEBS Lett. 2010. V. 584 (21) P. 4396-4400.
- 244. Belvy A., Levanova N., Tabakova I., Rospert S., Belvi Y. Ribosomal Protein Rps26 Influences 80S Ribosome Assembly in Saccharomyces cerevisiae // mSphere. — 2016. — V. 1 (1) — e00109-15.
- 245. Voigts-Hoffmann F., Klinge S., Ban N. Structural insights into eukaryotic ribosomes and

the initiation of translation // Curr Opin Struct Biol. — 2012. — V. 22 (6) — P. 768-777.

- 246. Valasek L. S. 'Ribozoomin'--translation initiation from the perspective of the ribosomebound eukaryotic initiation factors (eIFs) // Curr Protein Pept Sci. — 2012. — V. 13 (4) — P. 305-330.
- 247. Yusupova G., Jenner L., Rees B., Moras D., Yusupov M. Structural basis for messenger RNA movement on the ribosome // Nature. 2006. V. 444 (7117) P. 391-394.
- 248. Nonato M. C., Widom J., Clardy J. Crystal structure of the N-terminal segment of human eukaryotic translation initiation factor 2alpha // J Biol Chem. 2002. V. 277 (19) P. 17057-17061.
- 249. Dmitriev S. E., Stolboushkina E. A., Terenin I. M., Andreev D. E., Garber M. B., Shatsky I. N. Archaeal translation initiation factor aIF2 can substitute for eukarvotic eIF2 in ribosomal scanning during mammalian 48S complex formation // J Mol Biol. 2011. V. 413 (1) P. 106-114.
- 250. Yatime L., Mechulam Y., Blanquet S., Schmitt E. Structure of an archaeal heterotrimeric initiation factor 2 reveals a nucleotide state between the GTP and the GDP states // Proc Natl Acad Sci U S A. 2007. V. 104 (47) P. 18445-18450.
- 251. Visweswaraiah J., Pittman Y., Dever T. E., Hinnebusch A. G. The beta-hairpin of 40S exit channel protein Rps5/uS7 promotes efficient and accurate translation initiation in vivo // Elife. 2015. V. 4 e07939.
- 252. Demeshkina N., Jenner L., Westhof E., Yusupov M., Yusupova G. A new understanding of the decoding principle on the ribosome // Nature. 2012. V. 484 (7393) P. 256-259.
- 253. Hinnebusch A. G. Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes // Microbiol Mol Biol Rev. 2011. V. 75 (3) P. 434-467.
- 254. Aitken C. E., Lorsch J. R. A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes // Nat Struct Mol Biol. 2012. V. 19 (6) P. 568-576.
- 255. Hinnebusch A. G., Lorsch J. R. The mechanism of eukarvotic translation initiation: new insights and challenges // Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012. V. 4 (10) P. 1-25.
- 256. Maag D., Fekete C. A., Grvczvnski Z., Lorsch J. R. A conformational change in the eukarvotic translation preinitiation complex and release of eIF1 signal recognition of the start codon // Mol Cell. 2005. V. 17 (2) P. 265-275.
- 257. Olsen D. S., Savner E. M., Mathew A., Zhang F., Krishnamoorthv T., Phan L., Hinnebusch A. G. Domains of eIF1A that mediate binding to eIF2. eIF3 and eIF5B and promote ternary complex recruitment in vivo // EMBO J. 2003. V. 22 (2) P. 193-204.
- ternarv complex recruitment in vivo // EMBO J. 2003. V. 22 (2) P. 193-204.
 Acker M. G., Shin B. S., Nanda J. S., Saini A. K., Dever T. E., Lorsch J. R. Kinetic analysis of late steps of eukaryotic translation initiation // J Mol Biol. 2009. V. 385 (2) P. 491-506.
- 259. Fraser C. S., Lee J. Y., Maveur G. L., Bushell M., Doudna J. A., Hershev J. W. The isubunit of human translation initiation factor eIF3 is required for the stable binding of eIF3 and its subcomplexes to 40 S ribosomal subunits in vitro // J Biol Chem. — 2004. — V. 279 (10) — P. 8946-8956.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю признательность всем сотрудникам лаборатории структуры и функции рибосом ИХБФМ СО РАН, оказавшим содействие в выполнении представленной работы, за ценные советы и поддержку. Отдельную благодарность автор выражает Бартули Юлии Сергеевне за помощь при освоении метода анализа модифицированных нуклеотидов рРНК обратной транскрипцией, а также Булыгину Константину Николаевичу за внимательное прочтение диссертации и поддержку во время работы над ней.

Автор выражает благодарность Ковалю Владимиру Васильевичу за ценные рекомендации по подготовке белковых проб для масс-спектрометрии и идентификации модифицированных пептидов.

Автор благодарит своего научного руководителя д.х.н., доцента Грайфера Дмитрия Маратовича за помощь в выполнении работы, активное участие при осмыслении полученных результатов, а также конструктивную критику текста диссертации.

Особую благодарности автор выражает зав. лабораторией структуры и функции рибосом, д.х.н. профессору Карповой Галине Георгиевне за всестороннюю поддержку, ценные консультации в постановке экспериментов и обсуждении результатов, а также помощь при написании настоящей работы.