

ВНУТРЕННЯЯ ИНИЦИАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ – РАЗНООБРАЗИЕ МЕХАНИЗМОВ И ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ В ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ КЛЕТКИ

© 2005 г.

М. В. СКУЛАЧЕВ

*Кафедра вирусологии биологического факультета
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва*

I. Введение. II. Кэп-зависимая инициация трансляции – основной механизм инициации белкового синтеза у эукариот. III. Альтернативные механизмы инициации трансляции. IV. Трансляция в условиях стресса. Значение внутренней инициации трансляции. V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Реализация генетической информации в клетке проходит в несколько этапов. Одной из важнейших стадий в этом процессе является трансляция – биосинтез белка, с помощью которого происходит «перекодирование» информации, записанной в нуклеиновых кислотах, в аминокислотную последовательность полипептида. Трансляция подразделяется на три фазы – инициация, элонгация и терминация. В эукариотической клетке главной лимитирующей стадией синтеза

Принятые сокращения: 4E-VP – 4E binding protein, 4E связывающий белок; Araf-1 – apoptosis protease activating protein, белок-активатор протеаз при апоптозе; BVDV – bovine viral diarrhea virus, вирус вирусной диареи рогатого скота; CP – coat protein, белок оболочки; CrPV – cricket paralysis virus, вирус паралича сверчка; CrTMV – crucifer tobamovirus, тобамовирус крестоцветных; CSFV – classical swine fever virus, вирус классической лихорадки свиней; DAP5 – Death-associated protein 5, смерть-ассоциированный белок 5); eIF – eukaryotic translation initiation factor, эукариотический фактор инициации трансляции; EMCV – encephalomyocarditis virus, вирус энцефаломиокардита; FMDV – foot and mouth disease virus, вирус ящура; HCV – hepatitis C virus, вирус гепатита C; IRES – internal ribosome entry site, область внутренней посадки рибосомы; ITAF – IRES *trans*-acting factor, действующий *in trans* фактор работы IRES; (*продолжение - см. сл. стр.*)

Адрес для корреспонденции: max@genebee.msu.su

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 05-04-62037-д, 02-04-48308а и 03-04-52008б.

белка является инициация трансляции — фаза, на которой осуществляется присоединение рибосомы к матричной РНК, поиск стартового кодона и начало синтеза полипептидной цепи. Как правило, регуляция трансляции направлена на облегчение или, наоборот, торможение именно инициации трансляции.

Инициация белкового синтеза подавляющего большинства эукариотических мРНК происходит по так называемому кэп-зависимому механизму. В обзоре рассмотрены основные детали этого механизма, однако наибольшее внимание уделено альтернативному способу инициации синтеза белка — кэп-независимой (внутренней) инициации трансляции мРНК. Рассмотрены возможные механизмы внутренней инициации трансляции, подходы к их классификации и сделаны предположения о биологической роли этого механизма в жизни эукариотической клетки.

КЭП-ЗАВИСИМАЯ ИНИЦИАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ — ОСНОВНОЙ МЕХАНИЗМ ИНИЦИАЦИИ БЕЛКОВОГО СИНТЕЗА У ЭУКАРИОТ

Сканирующая модель. Основные этапы.

Большинство эукариотических мРНК имеют сходное строение: они содержат на 5'-конце кэп-структуру: «инвертированный» и метилированный GTP [$^mG(5')ppp(5')N$], где N — первый нуклеотид мРНК (см. рис. 1), и несколько десятков остатков аденина на 3'-конце. Инициация трансляции подавляющего большинства (по некоторым оценкам — более 97%) эукариотических мРНК происходит по так называемому кэп-зависимому механизму. Для его описания в конце 80-х годов прошлого века была предложена «сканирующая модель» [1, 2]. Согласно этой модели, малая 40S субъединица рибосомы при помощи набора белков — факторов инициации трансляции (eIF, eukaryotic

(принятые сокращения, окончание) MFAG — middle fragment of apoptotic cleavage of eIF4G, средний фрагмент апоптозного разрезания eIF4G; MFC — multifactor complex, мультифакторный комплекс; MP — movement protein, транспортный белок; mTOR — mammalian target of rapamycin, объект действия рапамицина млекопитающих; PABP — poly-A binding protein, поли-A связывающий белок; PARS — polypurine-A-rich sequences, полипуриновые-А-богатые последовательности; PSIV — *Plautia Stali* intestine virus, кишечный вирус *Plautia Stali*; PTB — pyrimidine tract binding protein, белок, связывающийся с пиримидиновым трактом; TLS — tRNA like structure, тРНК-подобная структура; TMEV - Theiler's murine encephalomyelitis virus, вирус энцефаломиелита грызунов Тейлера; TMV — Tobacco mosaic virus, вирус табачной мозаики; TNF — tumor necrosis factor, фактор некроза опухоли; TRAIL — TNF-related apoptosis-inducing ligand, TNF-ассоциированный лиганд индуцирующий апоптоз; TYMV — turnip yellow mosaic virus, вирус желтой мозаики турнепса; XIAP — X-linked inhibitor of apoptosis protein, X-связанный ингибитор апоптоза; дцРНК — двуцепочечная РНК; НТО — нетранслируемая область; ОРС — открытая рамка считывания.

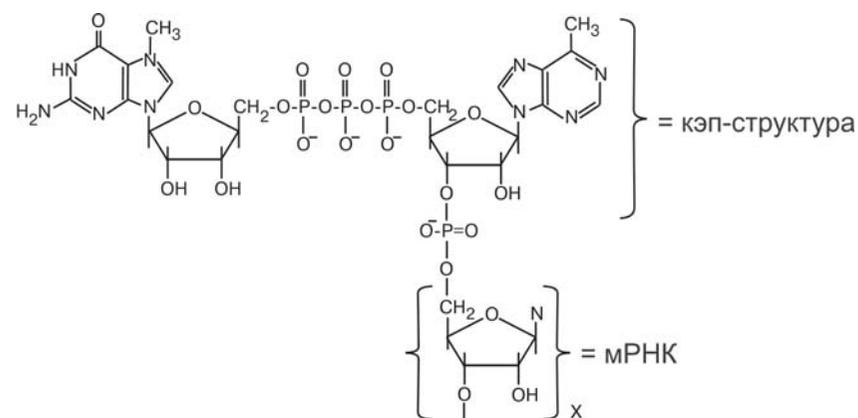


Рис. 1. Структура 5'-конца эукариотических мРНК (кэп-структура).

initiation factor) — присоединяется к кэп-структуре на 5'-конце мРНК. После этого 40S субъединица в комплексе с различными факторами движется по мРНК в 3'-направлении, сканируя 5'-нетранслируемую область в поисках стартового кодона — AUG. Как только такой кодон найден, к малой субъединице присоединяется большая 60S субъединица, т.е. собирается целая 80S рибосома, и начинается синтез полипептидной цепи.

Эта модель была предложена и в своих основных положениях подтверждена уже более 15 лет назад. Однако только в последние годы исследователям удалось более детально представить себе всю цепь событий, связанных с кэп-зависимой инициацией трансляции. Ниже приведено краткое описание основных этапов этого процесса (на основе [3–6]).

Присоединение инициаторной тРНК к 40S субъединице. Образование рибосомального прединициаторного комплекса.

Ключевую роль в инициации трансляции играет т.н. инициаторная тРНК (тРНК^{Met}). Именно с ее помощью, за счет кодон-антикодонного взаимодействия, сканирующий комплекс находит стартовый AUG-кодон. Но триплет AUG также кодирует аминокислоту — метионин — и на стадии элонгации узнается соответствующей тРНК. В клетке существует два вида метиониновой тРНК — тРНК_i^{Met} и тРНК_m^{Met}. Первая используется только на стадии инициации, вторая — при элонгации. Таким образом, тРНК^{Met} для каждого из этих процессов поступают из своего пула, и количество доступной тРНК_m^{Met} не влияет на эффективность инициации трансляции.

Участие тРНК_i^{Мет} в инициации трансляции обеспечивает фактор инициации eIF2, который состоит из трех разных субъединиц — альфа, бета и гамма. Через гамма-субъединицу осуществляется связывание с аминокислотированной инициаторной тРНК и молекулой GTP, через бета-субъединицу происходит взаимодействие с факторами eIF2B (см. ниже) и eIF5, альфа-субъединица участвует в регуляции активности eIF2 (за счет фосфорилирования серина 51 в ее составе).

тРНК_i^{Мет} и eIF2 участвуют в инициации трансляции в составе т.н. тройственного комплекса — тРНК_i^{Мет}—eIF2—GTP. Взаимодействие этого комплекса, 40S субъединицы рибосомы и факторов eIF1, eIF3, eIF1A приводит к образованию рибосомального прединициаторного комплекса (см. рис. 2А).

Подготовка мРНК к инициации трансляции

Определенные изменения происходят и с мРНК — при помощи других факторов инициации она подготавливается к связыванию с 43S комплексом. В эукариотической клетке свободная мРНК, как правило, ассоциирована с РНК-связывающими белками и образует рибонуклеопротеид (РНП). Для инициации трансляции необходимо очистить 5'-концевую часть РНП от молекул белка, а также «расплетсти» присутствующие в ней элементы вторичной структуры. Эта функция выполняется фактором 4F — одним из важнейших элементов трансляционного аппарата клетки, который состоит из трех различных белковых субъединиц: eIF4E, eIF4G и eIF4A. Небольшой белок eIF4E обладает сильным средством к кэп-структуре на 5'-конце мРНК (Кд около 10^{-9} М) и за счет него осуществляется присоединение eIF4F к мРНК. Фактор eIF4G играет важнейшую роль в инициации трансляции, обеспечивая связь между разными белками, участвующими в этом процессе. eIF4A является РНК-зависимой хеликазой, которая, используя энергию АТР, «раскручивает» элементы вторичной структуры 5'-области мРНК. Этот процесс стимулируется факторами eIF4B и eIF4H. Интересно, что 4A в клетке присутствует как в составе 4F, так и в виде свободного белка, и есть данные, что происходит постоянный обмен между eIF4A в составе 4F и свободным 4A [7–9] (см. рис. 2Б).

Присоединение прединициаторного комплекса к мРНК

«Активированная» при помощи факторов 4-й группы мРНК способна присоединить рибосомальный прединициаторный комплекс. Вероятно, что это присоединение обеспечивает eIF4G за счет взаимодействия с eIF3 в составе прединициаторного комплекса [10] и, таким образом, 40S субъединица и тРНК_i^{Мет} оказываются на 5'-конце мРНК. Однако антикодон тРНК еще не связан с инициаторным триплетом AUG. Следующим этапом кэп-зависимой инициации трансляции является поиск этого триплета в составе мРНК (см. рис. 2В).

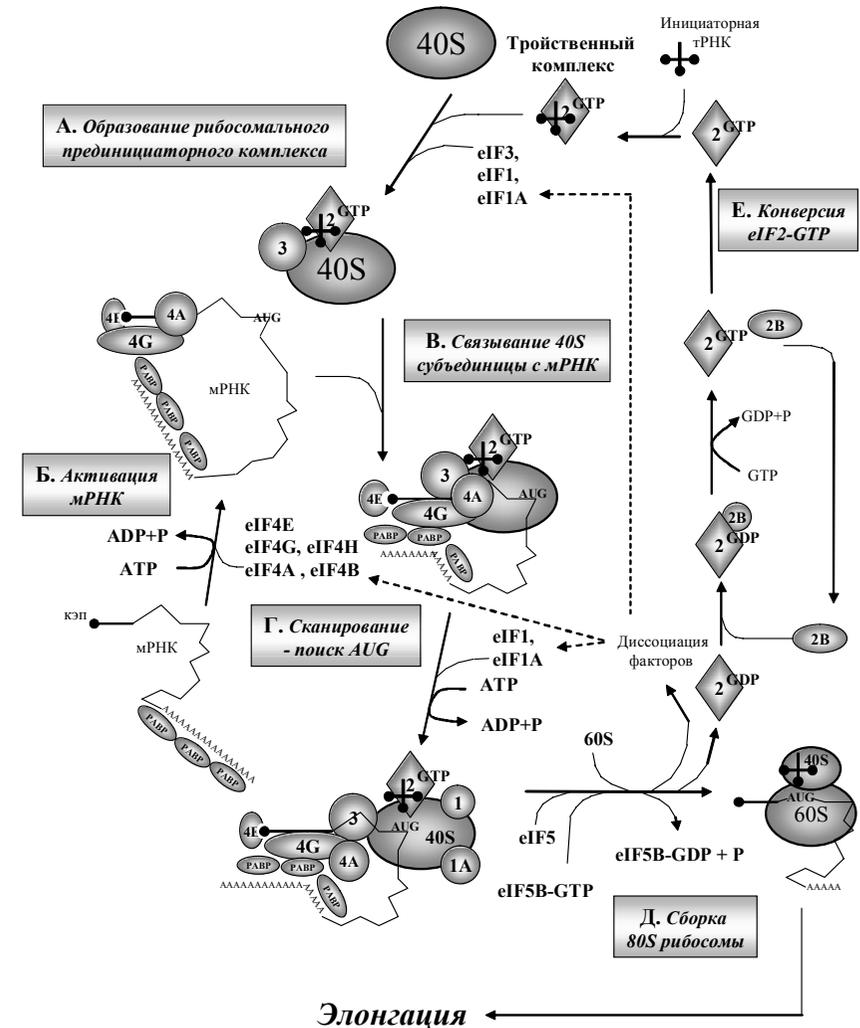


Рис. 2. Схема кэп-зависимой инициации трансляции у эукариот.

Сканирование мРНК в поисках инициаторного кодона AUG

Детали этого процесса до сих пор остаются неизвестными, однако считается что 40S субъединица в комплексе с факторами инициации двигается по мРНК в 3'-направлении, проверяя каждый триплет на комплементарность антикодону тРНК_i^{Мет}. Генетические исследования, проведенные на дрожжах, показали, что за узнавание инициаторного кодона ответственна именно тРНК, а белковые факторы ини-

циации трансляции влияют на точность и эффективность этого процесса [11, 12]. Следует отметить, что эффективность узнавания инициаторного кодона зависит от того, какие нуклеотиды находятся вокруг него — контекст AUG-кодона. Оптимальный нуклеотидный контекст (консенсус) для животных был определен как GCC(A/G)CCAUGG (наиболее важные нуклеотиды выделены жирным шрифтом) [1, 13–15]. Интересно, что для дрожжей и растений он иной (AAAAAUGUCU и AA(A/C)A-AUGGC, соответственно [16, 17]).

Наибольший вклад в исследование этого этапа инициации трансляции был сделан с использованием метода «toe-print» (отпечаток пальца). Этот метод заключается в реконструкции *in vitro* процесса инициации трансляции из отдельных компонентов трансляционной системы. Для этого смешиваются выделенные 40S субъединицы, очищенные или рекомбинантные белковые факторы, аминокислотированная инициаторная тРНК, GTP, ATP и мРНК. Сканирующий комплекс может быть обнаружен на мРНК при помощи обратной транскрипции на матрице мРНК — синтез кДНК будет остановлен, как только обратная транскриптаза дойдет до инициаторного комплекса, «сидящего» на мРНК. По длине синтезируемых кДНК можно с точностью до нуклеотида определить положение инициаторного комплекса на мРНК — например, остановка реакции происходит в 15–17 нуклеотидах перед AUG, если на нем находится комплекс.

При помощи этого метода удалось установить, что добавление к кэпированной бета-глобиновой мРНК ATP, GTP, факторов 2, 3, 4A, 4B, 4F и тРНК^{Met} приводило к образованию на 5'-конце мРНК 43S прединициаторного комплекса. Но он «оставался неподвижным». Однако, если изначально к этой смеси были добавлены еще и факторы 1 и 1A, то комплекс обнаруживался уже на AUG-кодоне [18]. Также было показано, что eIF1 необходим для правильного узнавания AUG-кодона и без него сканирующий комплекс «не различает» контекст стартового триплета. Предполагается, что присутствие eIF1 переводит рибосому в другое состояние, в котором взаимодействие с AUG становится более специфичным [6].

Также получены данные, свидетельствующие о том, что в сканировании каким-то образом задействован обмен между свободным eIF4A и 4A в составе eIF4F, сопровождающийся гидролизом ATP (рис. 2Г).

Сборка 80S рибосомы на AUG-кодоне

После правильного присоединения антикодона инициаторной тРНК к AUG 40S субъединица рибосомы должна быть освобождена от факторов инициации. Этот процесс обеспечивается факторами eIF5 и eIF5B. По-видимому, кодон-антикодонное взаимодействие приводит к изменению конформации eIF2, что, в свою очередь, ведет к гид-

ролизу GTP в составе тройственного комплекса. Гидролиз GTP происходит при помощи eIF5, который является т.н. GAP-белком (GTPase activating protein) и связывается с бета-субъединицей eIF2.

Для присоединения 60S субъединицы и сборки 80S рибосомы на AUG-кодоне необходим гидролиз еще одной молекулы GTP, связанной с фактором eIF5B [19]. Скорее всего, соединение 40S и 60S обеспечивает комплекс eIF5B и GTP, а гидролиз необходим для диссоциации eIF5B [19–22] (см. рис. 2Д).

Превращение eIF2-GDP в eIF2-GTP

Гидролиз GTP в составе тройственного комплекса ведет к освобождению eIF2-GDP. Как и большинство т.н. G-белков, eIF2 связывает GDP в 100 раз сильнее, чем GTP. Однако на начальных стадиях инициации трансляции eIF2 необходим в комплексе с GTP. Для этого специальный белок eIF2B обеспечивает замену GDP в комплексе с eIF2 на GTP [23] (см. рис. 2Е).

УЧАСТИЕ 3'-КОНЦА мРНК В ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ

Описанный выше механизм инициации белкового синтеза связан с 5'-концом мРНК, и главными *cis*-действующими элементами этого процесса являются кэп и 5'-НТО. Однако в инициации трансляции задействован и еще один структурный элемент мРНК — 3'-НТО, а точнее поли-А «хвост», т.е. несколько десятков остатков аденина, составляющих 3'-концевую часть большинства эукариотических мРНК. Оказалось, что эта поли-А последовательность не только защищает мРНК от 3'-5' дегградации, но и принимает самое активное участие в кэп-зависимой инициации трансляции, происходящей на противоположном конце мРНК. Синергизм действия кэп-структуры и поли-А был убедительно продемонстрирован как *in vitro*, так и *in vivo* [24–27] в различных эукариотических системах. В бесклеточной дрожевой системе поли-А «хвост» даже обеспечивал инициацию трансляции некэпированных мРНК [28]. Был идентифицирован белок, обеспечивающий участие поли-А в инициации трансляции — поли-А-связывающий белок или PABP (poly-A binding protein) [28]. Несколько молекул этого белка кооперативно присоединяясь к поли-А покрывают 3'-конец мРНК. Для дрожжей [29, 30] и растений [31] было показано, что PABP взаимодействует с N-концевой частью eIF4G. В случае животных PABP может взаимодействовать с одной из изоформ eIF4G [32] или некоторыми другими факторами инициации (см. ниже). Можно утверждать, что PABP и eIF4G являются связующими звеньями следующей цепи:

5'-конец мРНК—кэп—eIF4E—eIF4G—PABP—3'-конец мРНК.

Таким образом, в процессе инициации трансляции мРНК оказывается замкнутой в кольцо за счет РНК-белковых и белок-белковых взаимодействий. Такая «циклизация» кэпированной и полиаденилированной мРНК в присутствии eIF4E, eIF4G и PABP была реконструирована *in vitro* и закольцованные молекулы были обнаружены при помощи атомно-силовой микроскопии [33].

PABP также способен взаимодействовать с N-концевым доменом eIF4B [31], видимо, таким образом стабилизируется кольцо мРНК.

Интересно, что участие 3'-конца мРНК в инициации трансляции может происходить не только за счет поли-А, но и с помощью других последовательностей. Например, область псевдоузлов из 3'-НТО РНК вируса табачной мозаики (TMV) существенно стимулирует инициацию трансляции [34, 35], причем есть данные, что фактор элонгации трансляции 1-альфа взаимодействует с этой 3'-НТО и участвует в инициации трансляции (предположительно, выполняя функцию PABP) [36].

В клетках млекопитающих было обнаружено, что PABP взаимодействует еще с несколькими белками. Были идентифицированы белки *paip1* и *paip2* (PABP interacting proteins). *Paip1* гомологичен центральной части eIF4G, может взаимодействовать как с PABP, так и с eIF4A и стимулирует кэп-зависимую трансляцию [37, 38]. *Paip2*, напротив, связываясь с PABP, препятствует его взаимодействию с поли-А и ингибирует трансляцию полиаденилированных мРНК. *Paip1* и *Paip2* конкурируют между собой за связывание с PABP и, таким образом, предоставляют клетке еще одну возможность для регуляции трансляции [39].

«НЕ ВСЕ ТАК ПРОСТО»

Необходимо отметить, что выше описаны лишь основные этапы процесса инициации трансляции и в таком виде «сканирующая модель» является весьма упрощенной и, возможно, излишне «механистичной». Так, из всего сказанного выше следует, что большинство факторов участвуют в инициации трансляции в эквимольных соотношениях (действительно, eIF4E может связаться только с одной молекулой 4G, тот, в свою очередь, с одной молекулой eIF3 и eIF4A и т.д.). На самом деле молярные количества различных факторов инициации в клетке могут отличаться в сотни раз — например, по сравнению с количеством eIF4G, в дрожжевой клетке присутствует в 20 раз больше eIF4E и в 50 раз больше eIF4A [40].

Оценить всю сложность процесса инициации трансляции можно, взглянув на рис. 3. На этом рисунке не хватает всего нескольких линий, чтобы можно было сказать — при инициации трансляции каждый фактор взаимодействует с каждым.

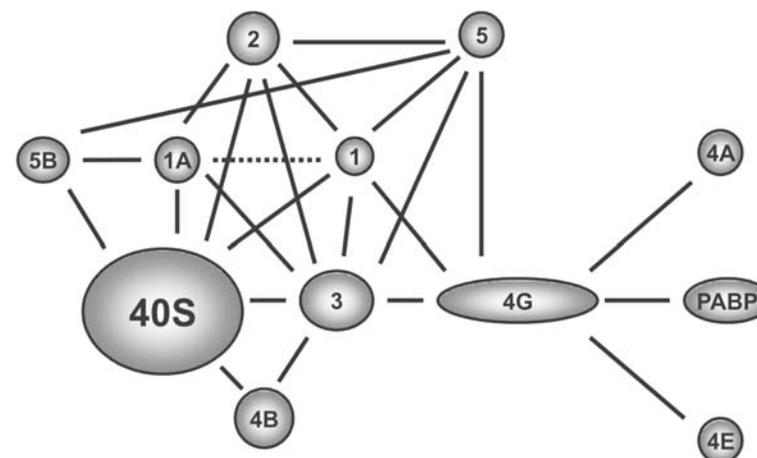


Рис. 3. Схема известных взаимодействий различных факторов инициации трансляции и 40S субъединицы рибосомы (по [41]).

Пунктир между eIF1A и eIF1 означает, что, возможно, это взаимодействие не прямое и обусловлено конформационным изменением в 40S субъединице.

Скорее всего, белки, принимающие участие в инициации трансляции, работают не по отдельности, а в составе т.н. мультифакторных комплексов (MFC, multifactor complex) [41]. То есть, определенный набор факторов, однажды связавшись друг с другом и образовав MFC, участвует в последующих раундах инициации трансляции как единый элемент. Использование MFC представляется чрезвычайно выгодным с точки зрения кинетики, энергетики, надежности и возможности регуляции процесса инициации трансляции. Действительно, если бы все факторы инициации участвовали в этом процессе по отдельности, то основное время уходило бы на поиск одним фактором другого, их комплексом — третьего и т.д. Для ускорения этого процесса пришлось бы резко увеличить константы связывания различных факторов, что, в свою очередь, привело бы к огромным энергетическим затратам (так как в начале инициации трансляции необходимо собрать большинство факторов и 40S субъединицу в комплекс на 5'-конце мРНК, а по достижении инициаторным аппаратом стартового кодона все факторы инициации должны диссоциировать — то есть чрезвычайно сильные межфакторные взаимодействия должны быть разрушены). Кроме того, постоянная ассоциация-диссоциация всех компонентов этой системы, на фоне интенсивного энергетического обмена, с большей вероятностью приводила бы к порче отдельных белков. Также была бы затруднена и регуляция всего процесса — например, для его выключения потребовалось бы инактивировать все молекулы

определенного фактора, присутствующие в клетке. В то время как в составе МФС, например, фосфорилирование одного из входящих в него белков может разрушить (и тем самым инактивировать) сразу весь комплекс. Интересно, что подобный подход используется в другом сложном и многостадийном процессе, происходящем в клетке — сплайсинге. Созревание пре-мРНК в ядре происходит при помощи аналогичного мультифакторного комплекса — сплайсосомы [42].

В случае же трансляции показано, что факторы инициации 1, 2, 3, 5 и инициаторная тРНК образуют МФС, стабильный *in vivo* [43], причем целостность этого комплекса необходима для нормальной трансляции [44–46]. Скорее всего, остальные факторы также находятся в составе других МФС, хотя прямых доказательств их существования и функциональной значимости не получено.

Неожиданным подтверждением такого представления о механизме инициации трансляции является проточная бесклеточная трансляционная система. В этой системе трансляция происходит в замкнутом объеме, в который через проницаемую мембрану поступают низкомолекулярные субстраты трансляции — аминокислоты, АТР, ГТР. Обратно, через ту же мембрану, выделяется синтезированный белок. Интересно, что при этом многие белковые факторы инициации могут быть «вымыты» из реакционной смеси, так как их размер меньше диаметра пор мембраны. Однако этого не происходит — следовательно небольшие факторы должны быть связаны в крупные МФС и/или ассоциированы с мРНК и рибосомами [47]. Таким образом, в проточной бесклеточной системе удастся добиться максимальной эффективности трансляции — в реакционном объеме присутствуют только активно работающие белки. Если какой-либо фактор инактивируется, денатурирует, то он тут же удаляется из трансляционной системы.

К сожалению, ограниченный объем данного обзора не позволяет полностью рассмотреть все нюансы механизма кэп-зависимой инициации трансляции. Тем читателям, которые хотели бы более подробно с ним ознакомиться, можно порекомендовать обзор [41], где механизм инициации белкового синтеза разобран гораздо более детально.

III. АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ

КЭП-ЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ

Из представленного выше механизма кэп-зависимой инициации трансляции можно сделать вывод, что у эукариот стартовым кодоном является ближайший к 5'-концу мРНК AUG-кодон. В большинстве случаев это действительно так, однако существует ряд исключений.

Leaky scanning

Как уже упоминалось, при сканировании мРНК большое значение имеет контекст AUG-кодона. Если его ближайшее окружение не соответствует консенсусу, то с некоторой вероятностью (и эта вероятность тем больше, чем больше «несоответствие») сканирующий комплекс пропустит этот AUG и тогда синтез белковой цепи начнется со следующего AUG. Такой вариант инициации трансляции получил название «leaky scanning» — «протекающее» сканирование [2].

Реинициация

Обычно, после того как транслирующая рибосома доходит до конца открытой рамки считывания — стоп-кодона — происходит терминация трансляции и рибосомальные субъединицы отсоединяются от мРНК. Однако в определенных условиях 40S субъединица может остаться на мРНК и начать сканирование в поисках следующего AUG, с которого трансляция возобновится [48, 49].

Рибосомальное шунтирование

Этот удивительный механизм инициации трансляции функционирует у нескольких вирусных мРНК (35S РНК вируса мозаики цветной капусты [50] и поздних РНК аденовирусов [51]). Трансляция этих мРНК осуществляется следующим образом: рибосомальная субъединица связывается с кэпом на 5'-конце мРНК и начинает сканирование. 5'-НТО таких РНК имеет выраженную вторичную структуру, но рибосомальная субъединица не «расплетает» ее, а каким-то образом обходит — шунтирует. Многие детали этого процесса неясны, однако было продемонстрировано, что для успешного «шунтирования» вторичной структуры большое значение имеет «посадочная площадка» для рибосомы непосредственно перед AUG-кодоном. Однако самым важным является факт трансляции небольшой (состоящей всего из 3-х кодонов) рамки считывания, находящейся перед вторичной структурой. Таким образом, формально рибосомальное шунтирование является модификацией реинициации трансляции [52].

ВНУТРЕННЯЯ ИНИЦИАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ

Согласно сканирующей модели инициации трансляции, рибосомальная субъединица может присоединяться исключительно к 5'-концу мРНК. Более 20 лет назад были проведены эксперименты, показывающие, на примере замкнутой в кольцо бета-глобиновой мРНК, что эукариотические рибосомы не способны связываться с 5'-дистальными (внутренними) участками мРНК [53]. Однако в природе существует большое количество активно транслирующихся мРНК, струк-

тура 5'-НТО которых исключает возможность инициации трансляции по механизму сканирования. К ним относятся РНК пикорнавирусов — например EMCV или вируса полиомиелита (полиовируса). 5'-НТО РНК этих вирусов чрезвычайно структурированы, а также содержат большое количество AUG-кодонов и терминирующих триплетов в разных рамках считывания и нуклеотидных контекстах, что полностью исключает возможность инициации трансляции на последнем AUG такой 5'-НТО по любому из описанных выше механизмов (например, в 5'-НТО полиовируса есть три «мини-цистрона» — коротких ОРС). В 1988 году двумя группами было показано, что инициация трансляции РНК пикорнавирусов происходит по альтернативному механизму внутренней инициации трансляции [54, 55]. В этих работах впервые было продемонстрировано, что эукариотическая рибосома способна осуществлять инициацию трансляции за счет присоединения к некоторому внутреннему участку мРНК — области внутренней посадки рибосом или IRES (Internal Ribosome Entry Site).

С тех пор — более чем за 15 лет — было обнаружено множество различных IRES в самых разных мРНК представителей всех царств эукариот. Однако оказалось, что не существует единого механизма функционирования всех участков внутренней посадки рибосом — аналогичного механизму кэп-зависимой инициации трансляции (сканированию). Более того, оказалось, что большинство IRES абсолютно не похожи друг на друга — не существует какого-то элемента структуры (будь то первичной, вторичной или третичной), общего для всех IRES, или какой-либо заметной гомологии в их последовательностях.

Тем не менее, к настоящему времени накоплено уже достаточное количество данных, позволяющих если не описать все возможные механизмы внутренней инициации трансляции, то хотя бы выделить несколько основных способов работы IRES. Следовательно, все известные на данный момент IRES можно разделить на несколько групп по механизму, лежащему в основе их функционирования (хотя следует признать, что последняя группа в этой классификации — «механизм неизвестен» — будет по-прежнему весьма многочисленна).

История открытия внутренней инициации

Некоторые общие принципы, лежащие в основе внутренней инициации трансляции, хорошо иллюстрируются первыми работами, посвященными открытию и изучению IRES пикорнавирусов.

Как упоминалось выше, структура 5'-НТО пикорнавирусов крайне неблагоприятна для инициации трансляции по механизму сканирования из-за большой протяженности (от 600 до 1500 нуклеотидов), структурированности и множества AUG-кодонов, расположенных

перед стартовым кодоном собственно транслируемой ОРС. Чисто теоретически, можно представить себе инициацию трансляции этой ОРС в результате невероятно сложной комбинации проскоков AUG, реинициаций и шунтирования элементов вторичной структуры, однако ниже приведен ряд фактов, которые исключают эту гипотетическую возможность:

- замена шести AUG-кодонов в составе 5'-НТО полиовируса на UUG не привела к увеличению эффективности его трансляции, чего можно было бы ожидать в случае использования механизма сканирования [56];

- РНК пикорнавирусов, выделенная из полисом (т.е. активно транслируемая РНК), не содержала кэп-структуры; на конце мРНК был фосфорилированный уридин (5'-pUp) [57]. Следовательно, для трансляции такой РНК не требуется взаимодействие с фактором 4E — а это ключевой этап классической модели инициации трансляции. Это предположение было подтверждено в последующих работах (см. ниже);

- трансляция пикорнавирусных РНК *in vitro* не подавлялась добавлением в реакцию кэп-аналога [58], в отличие от кэпированных мРНК;

- увеличение концентрации 4E-связывающего белка (4E-ВР, см. ниже) *in vitro* и *in vivo* не приводило к ингибированию трансляции пикорнавирусных РНК [7]. Трансляция этих РНК не чувствительна к рапамицину — антибиотику, вызывающему дефосфорилирование 4E-ВР, что, в свою очередь, блокирует работу eIF4E [59]. Более того, показано, что активность 4E-ВР возрастает при заражении клетки EMCV или полиовирусом [60] (см. ниже);

- в целом ряде работ было продемонстрировано, что трансляция РНК различных пикорнавирусов eIF4F независима, поскольку многие из них специально инактивируют этот фактор инициации при заражении клетки-хозяина, чтобы обеспечить преимущественную трансляцию собственной РНК. Так, полиовирус и вирус ящура (FMDV, foot and mouth disease virus) кодируют протеазы, расщепляющие фактор 4G на два фрагмента, один из которых содержит участки связывания с eIF4E и PABP, а другой — с eIF4A и eIF3, разобщая, таким образом, кэп- и рибосомо-связывающие функции eIF4G [10, 61, 62].

Таким образом, было доказано, что трансляция пикорнавирусов происходит по кэп-независимому механизму.

В самых первых работах [55] и [54] было продемонстрировано, что инициация трансляции РНК пикорнавирусов не только кэп-независима, но вообще никак не связана с 5'- концом мРНК. Это было показано при помощи метода, впоследствии названного «золотым

стандартом» доказательства внутренней инициации трансляции [63]. В его основе лежит использование искусственных бицистронных мРНК. Первый ген в составе такой мРНК транслируется по классическому кэп-зависимому механизму. В норме, второй – 3'-концевой – ген экспрессироваться не может. Однако оказалось, что если перед вторым геном – в качестве межцистронной области РНК – вставлена 5'-НТО пикорнавируса, то такая мРНК способна обеспечить трансляцию обоих генов. Причем транслируются они независимо – если первый ген заблокировать (например, стабильной вторичной структурой перед AUG-кодоном), то второй продолжает транслироваться с прежней эффективностью. То есть трансляция второго гена не может происходить в результате механизмов «leaky scanning» или реинициации.

Для объяснения этих результатов была предложена модель альтернативного механизма инициации трансляции, используемого пикорнавирусами, предусматривающая посадку рибосомы (или ее субъединицы) непосредственно на внутренний участок мРНК. В случае пикорнавирусов этот участок находится в 3'-концевой части 5'-НТО.

Разнообразие IRES-элементов

РНК вирусов полиомелита и EMCV были первыми эукариотическими матрицами, в составе которых были обнаружены IRES-структуры. В последующие 15 лет с той или иной степенью достоверности были описаны десятки IRES-элементов в мРНК самых разных организмов. Неудивительно, что большое количество IRES было обнаружено в вирусных РНК – так, все пикорнавирусы используют механизм внутренней инициации трансляции. Но IRES выявлены и в РНК других вирусов. В табл. 1 приведены примеры некоторых вирусов (отдельно растений и животных), в составе которых найдены IRES элементы.

Оказалось, что механизм внутренней инициации трансляции используется не только вирусными, но и клеточными мРНК. Первый «клеточный» IRES был идентифицирован в 5'-НТО РНК белка шаперона, связывающего тяжелые цепи иммуноглобулинов – *Vip* (immunoglobulin heavy chain binding protein). Интересно, что исследователи обратили внимание на эту мРНК, поскольку она продолжает активно транслироваться в клетке, зараженной полиовирусом, где кэп-зависимая трансляция подавлена [83]. Последующие исследования позволили идентифицировать большое количество IRES в составе клеточных РНК (см. табл. 2, РНК достаточно условно разбиты на несколько групп по функциям кодируемых ими белков).

Анализируя эти таблицы, следует принять во внимание несколько обстоятельств:

Таблица 1.
Примеры вирусных IRES

Название вируса	Ссылки
<i>Вирусы животных</i>	
Пикорнавирусы	
Полиовирус	[54]
Риновирус	[64]
Вирус энцефаломиокардита (EMCV)	[55]
Вирус ящура (FMDV)	[65]
Флавивирусы	
Вирус гепатита С (HCV)	[66]
Вирус классической лихорадки свиней (CSFV)	[67]
Ретровирусы	
Вирус лейкоза Молони грызунов (MuLV)	[68]
Вирус саркомы Рауса (RSV)	[69]
Вирус иммунодефицита человека (HIV)	[70]
Пикорнаподобные вирусы насекомых	
Кишечный вирус <i>Plautia Stali</i> (PSIV)	[71]
Вирус черемуховой тли (RPV)	[72]
Вирус паралича сверчка (CrPV)	[73]
ДНК-содержащие вирусы	
Саркома Капоши ассоциированный герпесвирус	[74]
<i>Вирусы растений</i>	
Потивирусы	
Y-вирус картофеля (PVY)	[75]
Потивирус мозаики турнепса (TuMV)*	[76]
Вирус гравировки табака (TEV)	[77]
Лютеовирусы	
Вирус скручиваемости листьев картофеля (PLRV)	[78]
Комовирусы	
Вирус мозаики коровьего горошка	[79]
Тобамовирусы	
Тобамовирус крестоцветных	[80]
Вирус табачной мозаики	[81]

* Недавно были получены данные, что фактор инициации 4E растений взаимодействует *in vitro* и *in vivo* с белком *vpg*, ковалентно присоединенным к 5'-концу РНК TuMV. Следовательно, трансляция этой РНК может осуществляться и по 5'-зависимому механизму, при этом роль кэп-структуры будет выполнять белок *vpg* [82].

– в табл. 2 приведены практически все известные на данный момент клеточные IRES, поэтому она существенно больше табл. 1. Однако не следует считать, что IRES в клеточных РНК встречаются чаще, чем в вирусных – просто в табл. 1 включены лишь несколько вирусных IRES. На самом деле их гораздо больше – например, все пикорнавирусы (для которых проводились подобные исследования) содержат IRES в составе 5'-НТО.

Таблица 2.
Примеры клеточных РНК, содержащих IRES-элементы

Название кодируемого белка	Ссылка
<i>Животные</i>	
Факторы роста	
Фактор роста фибробластов – 2 (FGF-2)	[84]
Фактор роста В из тромбоцитов PDGF/c-sis	[85]
Фактор роста сосудистого эндотелия VEGF	[86]
Инсулиноподобный ростовой фактор IGF-II	[87]
Транскрипционные факторы	
Ultrabithorax, Antennapedia	[88]
MYT-2	[89]
Репрессор NF-κB (NRF)	[90]
AML1/RUNX1	[91]
Гомеодоменный белок GTX	[92]
Mnt	[93]
Smad-5	[94]
Hairless	[95]
Онкогены	
C-myc	[96]
N-myc	[97]
L-myc	[98]
Pim-1	[99]
Секретируемый фактор ангиогенеза Cugb1	[99]
Изоформа p58 киназы PITSLRE	[100]
Белки, участвующие в апоптозе	
Araf-1	[101]
Xiap	[102]
Bcl-2	[103]
DAP5/p97/NAT1	[104]
Bag-1	[105]
APC	[106]
Шоковые белки, шапероны	
Bip/GRP78	[83]
HSP70	[107]
Белки, участвующие в трансляции	
EIF4G1	[108]
Белки, характерные для нервных клеток	
Регулируемый белок цитоскелета ARC	[109]
Кальмодулин-зависимая киназа II	[109]
Дендрин	[109]
Белок, ассоциированный с микротрубочками -2 (MAP2)	[109]
Нейрогранин	[109]
Белки, участвующие в ионном транспорте, передаче сигналов, рецепторы	
Переносчик аминокислот cat-1	[110]
Ядерная изоформа Notch-2	[111]
Белок калиевого канала Kv1.4	[112]
В-субъединица H ⁺ -ATP-синтазы	[113]
Коннексины 43 и 32	[114], [115]

См. окончание табл. 2

Окончание табл. 2

Название кодируемого белка	Ссылка
<i>Дрожжи</i>	
YAP-1P150	[116]
Прионоподобный белок Ure2p	[117]
<i>Растения</i>	
Фактор теплового шока -1 табака (NtHSF-1)	[118]

– даже при беглом взгляде на табл. 2 создается впечатление, что IRES встречаются в мРНК животных гораздо чаще, чем в мРНК представителей других царств. Возможно, это действительно так. Но следует учитывать, что регуляция трансляции животных РНК вообще лучше изучена, во всяком случае, по сравнению с растениями. Косвенным подтверждением того, что внутренняя инициация трансляции менее характерна для клеток дрожжей и растений, можно считать тот факт, что IRES из мРНК животных не работают в растениях – см. например [118] и дрожжах [119].

В отличие от большинства вирусных, клеточные IRES-содержащие РНК имеют на 5'-конце кэп-структуру. Следовательно, трансляция этих мРНК может происходить и по механизму сканирования и при помощи внутренней инициации трансляции. В работе [99] была предпринята попытка оценить, какую долю среди всех клеточных мРНК составляют матрицы, способные транслироваться по кэп-независимому механизму. С помощью метода микрочипов (microarray) было показано, что из отслеживаемых 7000 клеточных мРНК 200 остаются ассоциированными с полисомами в клетке, зараженной полиовирусом (в условиях подавленной кэп-зависимой трансляции). Эти результаты свидетельствуют, что около 3% клеточных мРНК могут транслироваться кэп-независимо.

Любопытно, что в этом эксперименте были также обнаружены две мРНК (Cugb1 и Pim-1), которые переходят в полисомальную фракцию только на фоне полиовирусной инфекции, хотя общее количество этих РНК в клетке при этом не изменяется. Опыты с использованием бицистронных конструкций подтвердили, что 5'-НТО этих мРНК содержат IRES [99].

IRES или артефакт?

Рассказывая о внутренней инициации трансляции, нельзя обойти стороной обширную дискуссию, развернувшуюся в научной литературе по поводу критериев доказательства существования IRES-элементов как в составе какой-либо конкретной мРНК, так и вообще в природе. Главным скептиком, ставящим под сомнение существование внутренней инициации, выступила М. Козак – автор сканирую-

щей модели трансляции. Ниже приведены основные соображения, дающие почву для таких сомнений:

- отсутствие каких-либо структурных особенностей, общих для всех IRES-элементов. Как уже упоминалось выше, некоторые IRES, обладающие определенной гомологией и, скорее всего, использующие один и тот же механизм инициации трансляции являются скорее исключением из общего правила.

- за 15 лет, прошедших с открытия первых IRES-элементов, не было предложено какой-то единой схемы (наподобие сканирующей модели), описывающей механизм внутренней инициации трансляции.

- эффективность трансляции, обеспечиваемой IRES в нормальных условиях, обычно существенно уступает кэп-зависимой инициации. Эффективность внутренних инициаций редко достигает 10% от уровня кэп-зависимой трансляции;

- подавляющее количество IRES находится в составе 5'-НТО моноцистронных мРНК. Хотя из самого определения IRES следует, что эта последовательность способна обеспечивать посадку рибосомы на внутренний участок мРНК и, следовательно, с помощью IRES можно было бы обеспечить экспрессию полицистронных мРНК (по примеру прокариотических мРНК). Однако в природе известно всего несколько таких случаев.

Таким образом, получается, что мы имеем дело со слабым эффектом – зачастую находящимся на пределе чувствительности регистрирующих методов – для которого нет сколько-нибудь разумного объяснения и не прослеживается никакой гомологии в обеспечивающих его элементах. Биологический смысл внутренней инициации трансляции также неясен – совершенно непонятно, чем было вызвано появление столь сложного варианта инициации синтеза белка, используемого для трансляции моноцистронных мРНК. В общем, нельзя не признать, что на первый взгляд феномен внутренней инициации трансляции действительно похож на артефакт. М. Козак отмечает это обстоятельство уже более 10 лет [1, 13, 120–125], видимо на правах изобретателя «сканирующей модели» (которая действительно описывает механизм инициации трансляции более чем 97% эукариотических мРНК).

Но как же быть с бицистронным тестом? Как, кроме внутренней посадки рибосомы, можно объяснить 5'-независимую трансляцию 3'-концевого гена в бицистронных мРНК? М. Козак предлагает несколько вариантов: во-первых, возможно, что IRES содержит последовательность, узнаваемую эндонуклеазой, и разрезание мРНК между генами приводит к образованию небольшого количества моноцистронной мРНК, которая и обеспечивает трансляцию второго гена (рис. 4А). Кроме того, тестирование IRES зачастую проводят при помощи

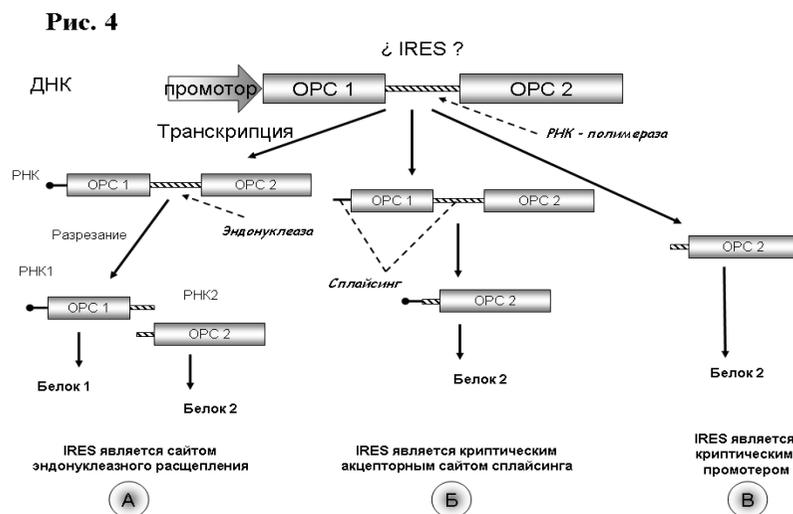


Рис. 4. Как, помимо внутренней инициации трансляции, может быть осуществлена экспрессия второго гена в составе бицистронных конструкций.

А – деградация РНК, Б – критический сайт сплайсинга, В – критический промотор.

трансфекции ДНК, несущей два гена под контролем одного промотора (рис. 4). Предполагается, что при транскрипции с такой конструкции образуется бицистронная РНК. Однако, межцистронная область (IRES) может содержать так называемый критический промотор – последовательность, с небольшой эффективностью узнаваемую РНК-полимеразой, вследствие чего синтезируется небольшое количество моноцистронной РНК (рис. 4В). Кроме того, в последовательности IRES может присутствовать скрытый акцепторный сайт сплайсинга, и пресловутая моноцистронная РНК будет образовываться в результате посттранскрипционной модификации исходного транскрипта (рис. 4Б). В связи с этим М. Козак настаивает на том, чтобы со всеми вновь открываемыми IRES-элементами проводились контрольные эксперименты, которые бы исключали все перечисленные возможности. Следует отметить, что настойчивость М. Козак приносит свои плоды. Так, некоторые последовательности, которые на основе первых экспериментов считались IRES-элементами, оказались критическими промоторами [126, 127], а по поводу некоторых других IRES продолжается полемика [116, 128, 129]. Подробнее с дискуссией Мерилин Козак и сторонников внутренней инициации можно познакомиться в ряде работ [5, 124, 125, 130].

Можно считать, что последнюю точку в споре о существовании феномена внутренней инициации трансляции поставила работа Ц. Чен и П. Сарноу [131]. Авторам удалось доказать факт присоединения рибосомы к РНК, ковалентно замкнутой в кольцо при помощи РНК-лигазы. Эта РНК содержала IRES EMCV, вставленный перед небольшой рамкой считывания, не содержащей стоп-кодона; в составе IRES все стоп кодоны также были удалены при помощи точечных мутаций. Добавление такой кольцевой РНК в бесклеточную трансляционную систему приводило к синтезу нескольких полипептидов, длина которых существенно превышала длину используемой рамки считывания (с учетом длины IRES) – белки такой длины могли образоваться только при прохождении рибосомой нескольких кругов по кольцевой РНК. Таким образом, этот эксперимент одновременно доказывал и факт присоединения рибосомы к IRES, и стабильность используемой мРНК.

К сожалению, такие эксперименты крайне трудоемки, и для доказательства большинства IRES используется простой бицистронный тест и, в лучшем случае, анализ стабильности бицистронной РНК при помощи Норзерн-гибридизации. Некоторые исследователи проводят большее количество дополнительных контрольных экспериментов.

ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВНУТРЕННЕЙ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ. ПОДХОДЫ К КЛАССИФИКАЦИИ IRES-ЭЛЕМЕНТОВ.

Результаты исследований последних лет значительно расширили представления о механизме внутренней инициации трансляции с участием IRES-элементов.

IRES пикорнавирусов

Анализ первичной и вторичной структур 5'-НТО РНК пикорнавирусов позволил разделить их на две группы [132, 133]. К первой относятся энтеровирусы и риновирусы, ко второй – кардио- и афто-вирусы. Типичным представителем первой группы можно считать вирус полиомиелита, второй – EMCV, FMDV и вирус энцефаломиелита грызунов Тейлера TMEV (Theiler's murine encephalomyelitis virus). Хотя внутри этих групп гомология 5'-НТО (IRES-элементов) не превышает 50%, но тем не менее последовательности обладают практически идентичной вторичной структурой [134]. Причем мутации, разрушающие основные элементы этой структуры, приводят к инактивации IRES. Картирование IRES обеих групп показало, что все они содержат на 3'-конце AUG кодон, а в 25 нуклеотидах перед ним находится протяженный полипиримидиновый тракт (рис. 5А,Б). Этот AUG используется в качестве стартового в случае IRES EMCV, TMEV и FMDV [135, 136] (рис. 5Б). В первой группе инициация трансляции на 3'-концевом AUG IRES происходит с очень небольшой вероятностью.

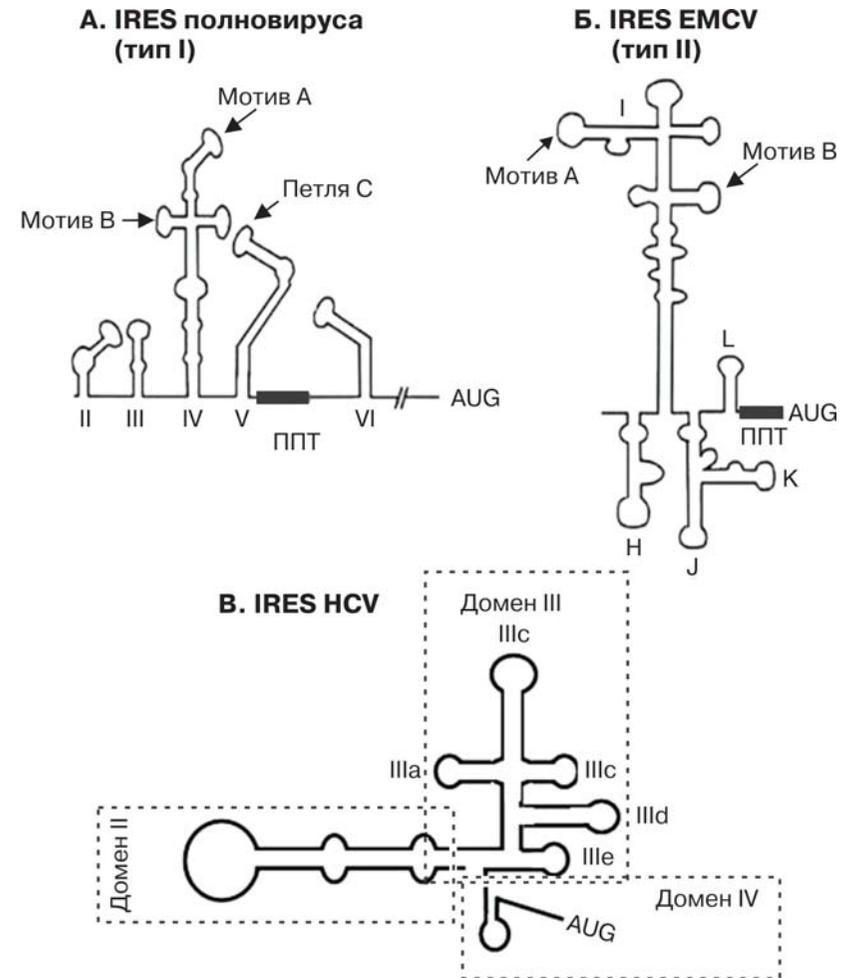


Рис. 5. Схема IRES полиовируса (А), EMCV (Б) и HCV (В). Латинскими буквами обозначены основные элементы вторичной структуры. ППТ – полипиримидиновый тракт.

Основной стартовый кодон находится на некотором расстоянии после IRES – в случае полиовируса это 160 нуклеотидов (рис. 5А). Предположительно, инициаторный комплекс достигает этого AUG, сканируя РНК. Таким образом, можно полагать, что IRES пикорнавирусов первого типа используют своеобразную комбинацию внутренней посадки рибосомы и сканирования [137–139].

При помощи упоминавшегося выше метода «тоу-принт» удалось выяснить, что для посадки 43S прединициаторного комплекса на IRES EMCV и образования 48S комплекса нужны те же факторы, что и для кэп-зависимой инициации трансляции, за исключением eIF4E, PABP, а также большая часть eIF4G [140, 141]. Оказалось, что для этой посадки достаточно участия eIF4A и центральной части белка eIF4G [142]. При использовании мутантного варианта eIF4A, образующего прочный неактивный комплекс с eIF4G и блокирующего таким образом обмен связанного 4A и свободного 4A, инициации на IRES EMCV не происходит [142].

eIF2, eIF3, eIF4A, eIF4B и eIF4G могут обеспечить сборку 48S комплекса на IRES EMCV, но при этом сборка с равной вероятностью будет происходить как на природном стартовом кодоне AUG₈₃₄, так и на AUG₈₂₆, на котором в норме инициации трансляции не происходит. Добавление же в реакционную смесь eIF1 приводило к узнаванию именно AUG₈₃₄ — «правильного» стартового кодона. Более того, eIF1 вызывал дестабилизацию комплекса на AUG₈₂₆, если он уже был сформирован в отсутствие этого фактора [18].

Дальнейшие исследования показали, что центральная часть eIF4G способна специфически связываться с определенным районом IRES EMCV и это связывание необходимо для инициации трансляции [140, 143].

Рентгеноструктурный анализ центрального домена eIF4G показал, что области, с которыми связываются eIF4A и элементы вторичной структуры IRES EMCV расположены рядом и даже пересекаются [144], что объясняет кооперативность работы факторов 4G и 4A при сборке 48S инициаторного комплекса на IRES EMCV [142].

Таким образом, приведенные выше данные позволили предложить модель внутренней инициации трансляции, обеспечиваемой IRES пикорнавирусов второго типа. Согласно этой модели, определенный район IRES EMCV взаимодействует с факторами 4G и 4A, которые, в свою очередь, обеспечивают связывание с 43S прединициаторным комплексом — эту же функцию они выполняют и при кэп-зависимой инициации. Далее при помощи eIF1 инициаторный комплекс устанавливается на «правильном» стартовом кодоне, и происходит сборка 80S рибосомы.

К сожалению, описанные выше опыты нельзя провести с IRES полиовируса или риновируса, поскольку эти IRES крайне неэффективно работают в бесклеточной системе. Однако активность IRES резко стимулируется при добавлении к лизату ретикулоцитов кролика «солевого смыва с рибосом» — суммы белков, отделяемых от рибосом в высокосолевого растворе [145]. Следовательно, в инициации трансляции на этих IRES участвуют некоторые клеточные белковые факторы, отсутствующие в лизате ретикулоцитов кролика — так называемые

мые ITAF (IRES *trans*-acting factor). Ряд ITAF был идентифицирован при помощи сшивания ультрафиолетом IRES и различных белковых фракций:

- пиримидин-тракт связывающий белок PTB (Pyrimidine-tract binding protein) [146, 147];
- ITAF45 [148];
- аутоантиген La [149];
- unr, unrip [150];
- поли-С-связывающий белок — 2 (PCBP-2) [151].

Некоторые из этих белков действительно резко стимулировали трансляцию, направляемую IRES полиовируса *in vitro*. Однако их роль в механизме внутренней инициации трансляции до конца еще не выяснена. Возможно, что некоторые из этих белков, связываясь с IRES, стабилизируют его пространственную структуру.

IRES вируса гепатита С и других флавириусов

5'-НТО родственных HCV флавириусов (CSFV, BVDV — bovine viral diarrhoea virus (вирус вирусной диареи рогатого скота), GB virus B) имеют весьма сходную вторичную и первичную структуру — изменения в последовательности нуклеотидов на одном участке обычно компенсируются заменами в другом таким образом, чтобы сохранялась вторичная структура 5'-НТО. Неудивительно, что, так же как и в случае HCV, в 5'-НТО всех этих вирусов были обнаружены IRES-элементы [66, 67, 152–154]. Сравнение последовательностей IRES этих вирусов позволило провести следующий эксперимент: мутации, инактивирующие IRES HCV, были скомпенсированы заменами, которые восстанавливали вторичную структуру IRES [153].

Вторичную структуру IRES флавириусов можно представить себе как три лепестка — три домена (II, III и IV, рис. 5B), расходящиеся из общего узла, и присоединенный к ним домен I. Последний включает 5'-концевую часть IRES и представляет собой протяженную, неидеальную шпильку; домен III состоит из 5 шпилек (IIIa-e); домен IV, соединен с II и III при помощи двух псевдоузлов и включает в себя стартовый кодон, прилегающий к нему участок кодирующей последовательности (рис. 5B). Более подробную схему IRES HCV и описание экспериментов по анализу его вторичной структуры см. [155].

Прилегающий к IRES участок кодирующей части не является необходимым для обеспечения внутренней инициации трансляции (например, в работах [66, 156] он был заменен на кодирующую часть репортерного гена). Однако, по некоторым данным, он повышает эффективность трансляции, видимо, стимулируя связывание IRES с 40S субъединицей [157, 158]. Также нельзя исключить, что другие

кодирующие части по каким-то причинам затрудняют присоединение рибосомы к IRES HCV.

Одним из ярких открытий в изучении внутренней инициации трансляции было обнаружение того, что IRES HCV способен связываться с 40S субъединицей рибосомы в отсутствие всяких факторов инициации трансляции, в том числе и тройственного комплекса [159]. Реконструкционные эксперименты показали, что при прибавлении субъединиц к IRES HCV, CSFV или BVDV рибосомальная субъединица обнаруживается на соответствующем стартовом кодоне. При этом, каким-то образом, стартовый AUG-кодон оказывается в Р-сайте рибосомальной субъединицы. Внешний вид комплекса IRES HCV и 40S субъединицы даже удалось реконструировать при помощи криоэлектронной микроскопии [160].

Последующее добавление тройственного комплекса (eIF2–GTP–тРНК_i^{Met}) приводило к образованию инициаторного комплекса, в составе которого стартовый AUG-кодон взаимодействовал с антикодоном инициаторной тРНК [159].

Несмотря на то, что другие факторы инициации трансляции не являются необходимыми для связывания рибосомы с IRES флавивирусов *in vitro*, скорее всего, они принимают участие в инициации трансляции в естественных условиях. Так, было показано, что eIF3 способен связываться с IRES HCV и CSFV [161]. До конца роль этого взаимодействия не ясна, хотя оказалось, что eIF3 принимает участие в сборке 80S рибосомы на AUG-кодоне [159, 162].

Показательно, что сборка 48S комплекса на IRES HCV и родственных вирусов не требует гидролиза АТФ. Этот факт хорошо укладывается в описанную выше модель инициации. Действительно, для взаимодействия этого IRES с рибосомой не нужно (и даже недопустимо) «расплетание» вторичной структуры мРНК, стартовый кодон в результате такого взаимодействия оказывается прямо в Р-сайте рибосомальной субъединицы и, следовательно, не требуется миграция инициаторного комплекса по мРНК [159, 163]. Таким образом, инициация трансляции, обеспечиваемая IRES HCV, является типичным исключением, подтверждающим правило – т.е. классическую модель инициации трансляции.

Необходимо отметить, что предложенная (и, в основном, подтвержденная) модель внутренней инициации трансляции, обеспечиваемой IRES флавивирусов, в первую очередь вызывает ассоциации с инициацией трансляции у прокариот.

Действительно, связывание рибосомы и мРНК у прокариот также происходит независимо от факторов инициации трансляции за счет комплементарного взаимодействия 16S рибосомальной РНК и опре-

деленного мотива в мРНК, расположенного в непосредственной близости от AUG-кодона – последовательности Шайн-Дальгарно [164]. Вообще, весьма привлекательно попытаться использовать аналогию с прокариотами для объяснения внутренней инициации трансляции у эукариот комплементарным взаимодействием 18S рибосомальной РНК с IRES. Примеры IRES, для которых предложена такая модель, приведены ниже. Однако в случае IRES HCV и родственных вирусов это предположение не подтверждается. Во-первых, картирование участков IRES, ответственных за связывание с 40S субъединицей, показало, что они находятся в различных доменах IRES и нет какого-то единого протяженного мотива, с которым могла бы взаимодействовать 18S рРНК. Анализ пространственной организации IRES подтвердил, что эти участки не сближены друг с другом за счет вторичной или третичной структур [159, 163]. Кроме того, при сшивании ультрафиолетом 40S субъединиц и IRES HCV при помощи 4-тиоуридина в составе мРНК не было обнаружено прямого взаимодействия 18S рРНК и мРНК. Однако сшивание с определенными рибосомальными белками происходило, что, по мнению авторов, подтверждает предположение о взаимодействии РНК с белками поверхности 40S субъединицы, а не с 18S рРНК [165]. Хотя следует отметить, что использованный метод позволяет выявить только очень «тесные» взаимодействия РНК.

IRES вируса паралича сверчка и родственных вирусов

Механизм внутренней инициации трансляции, обеспечиваемой IRES HCV, выглядит весьма необычным, поскольку в нем не задействован целый ряд факторов инициации, необходимых для кэп-зависимого сканирования. Но еще более неординарным оказался механизм инициации трансляции, используемый IRES пикорнаподобных вирусов насекомых.

В конце прошлого века была «прочитана» последовательность генома нескольких вирусов насекомых, родственных вирусу паралича сверчка (CrPV – cricket paralysis virus). На основе анализа этих последовательностей было сделано предположение, что РНК этих вирусов бицистронна – содержит две рамки считывания, из которых первая (с 5'-конца) кодирует неструктурный белок, а вторая, отделенная от первой межгенной областью, кодирует белок оболочки вируса. Было обнаружено, что трансляция обеих рамок считывания происходит по механизму внутренней инициации трансляции [71–73, 166] (кстати, это редчайший, если не единственный, случай, когда внутренняя инициация трансляции происходит на природной бицистронной РНК с неперекрывающимися ОРС).

Самые неожиданные результаты были получены при изучении межцистронных IRES. Анализ нуклеотидной последовательности этой области и последовательности аминокислот белка оболочки показал, что метионин не является первой аминокислотой этого белка. Стартовым кодоном соответствующего гена служит не AUG (и не «вырожденные» варианты стартового кодона – CUG и GUG). Инициация трансляции, направляемая IRES вирусов, родственных CrPV, происходила на CUU, CAA, GCA или GCU-кодонах (в разных вирусах) вместо AUG. Оказалось, что ключевым элементом таких IRES является элемент вторичной структуры – «псевдоузел» – расположенный непосредственно перед стартовым кодоном [71–73]. Исследование вторичной структуры межцистронных областей показало, что они представляют собой сложную комбинацию из «шпилек» и трех «псевдоузлов» [167]. Результаты мутационного анализа и сравнения последовательностей межцистронных областей разных вирусов свидетельствуют о том, что для работы IRES особенно важны неспаренные нуклеотиды «петель» вторичной структуры и «псевдоузлы».

Важной вехой в изучении IRES вирусов насекомых является работа [166], в которой четко доказано, что IRES PSIV обеспечивает инициацию трансляции начиная с остатка глутаминовой кислоты, кодируемого CAA-кодоном. В этом случае не происходит посттрансляционного отщепления остатка метионина и, следовательно, для функционирования IRES PSIV не нужна инициаторная метиониновая тРНК. Окончательное доказательство существования такого необычного механизма инициации трансляции было получено в реконструкционных экспериментах по сборке инициаторного комплекса. В этих же опытах обнаружили некоторые важные детали работы AUG-независимых IRES.

Эти эксперименты показали, что 40S субъединица способна связываться с IRES CrPV в отсутствие тройственного комплекса и остальных факторов инициации. При помощи «тоу-принт» анализа было определено положение 40S на IRES CrPV. Оказалось, что стартовый GCU-кодон находится в А-сайте рибосомы, а в Р-сайте – предшествующий ему триплет CCU [168]. Причем CCU может быть заменен на любой другой кодон – даже на стоп-кодон – и активность IRES не изменится (если только сохранится псевдоузел, присоединенный к этому кодону – за счет компенсирующих мутаций в соответствующей «петле» IRES)[73].

К немалому удивлению исследователей оказалось, что добавление к комплексу 40S/IRES 60S субъединиц приводило к образованию комплексов 80S/IRES (в отсутствие факторов eIF5, eIF5B и без гидролиза GTP). Более того, опыты с лизатом ретикулоцитов кролика

показали, что после такой сборки 80S рибосомы в А-сайт при помощи фактора элонгации 1 доставляется соответствующая стартовому GCU-кодону тРНК и происходит «псевдотранслокация» – триплет GCU перемещается в Р-сайт (естественно, никакой пептидной связи при этом не образуется) [168]. Этот процесс не ингибируется нерасщепляемым аналогом GTP и циклогексимином, следовательно, перемещение рибосомы не связано с активностью фактора элонгации 2 и образованием пептидной связи [168]. Но для «псевдотранслокации» необходимо присутствие в Р-сайте псевдоузла IRES CrPV.

Таким образом, приведенные выше результаты позволяют предложить следующую модель функционирования IRES из межгенной области пикорнаподобных вирусов насекомых: пространственно сложно организованный 180-нуклеотидный IRES взаимодействует с 40S субъединицей рибосомы таким образом, что CCU триплет оказывается в Р-сайте, следующий за ним «стартовый» GCU-кодон – в А-сайте, а часть IRES (шпилька вторичной структуры) помещается, собственно, в Р-сайте 40S субъединицы. Петля этой шпильки комплементарна CCU и образует псевдоузел, по всей видимости, имитируя кодон-антикодонное взаимодействие инициаторной тРНК. После этого возможно присоединение к комплексу большой субъединицы и сборка на CCU-кодоне 80S рибосомы. В ее А-сайте по-прежнему находится GCU-кодон и к нему, при помощи фактора 1, может присоединиться глутаминовая тРНК. Далее происходит «псевдотранслокация», в результате которой GCU-кодон перемещается в Р-сайт, видимо вытесняя из него псевдоузел IRES, и трансляция окончательно переходит в стадию элонгации. Природа и механизм «псевдотранслокации» неизвестны. Скорее всего, этот процесс катализируется самим IRES. Следовательно, IRES пикорнаподобных вирусов насекомых формально являются рибозимами.

Недавно был обнаружен сходный механизм инициации трансляции у TYMV – вируса желтой мозаики турнепса [169]. Естественно, этот вирус растений не является «родственным» вирусу паралича сверчка, однако механизм инициации трансляции одной из ОРС TYMV напоминает способ инициации трансляции пикорнаподобных вирусов насекомых.

Геномная РНК TYMV не содержит поли-А-«хвоста», вместо этого на 3'-конце этой РНК присутствует т.н. тРНК-подобная структура (особенность, характерная для многих вирусов растений – например, вируса табачной мозаики). Строение этого тРНК-подобного участка, называемого TLS (tRNA like structure), действительно очень близко к строению обычной валиновой тРНК. В растительной клетке TLS

TYMV может аминоацилироваться и, таким образом, на 3'-конце РНК TYMV присутствует остаток валина.

В составе геномной РНК TYMV транслируются две перекрывающиеся ОРС. Первая (5'-концевая) рамка считывания кодирует транспортный белок МР (movement protein) и транслируется по обычному кэп-зависимому механизму. Долгое время считалось, что перекрывающаяся с ней ОРС полипротеина транслируется при помощи механизма «leaky scanning». Действительно, стартовый кодон ОРС полипротеина находится всего в пяти нуклеотидах после AUG МР. Однако замена AUG-кодона МР на AGG или AAG не приводит к усилению трансляции полипротеина [170], и, наоборот, мутация стартового кодона полипротеина стимулирует трансляцию МР. В работе [169] было показано, что инициация трансляции полипротеина TYMV происходит по механизму внутренней инициации, причем ключевую роль в этом механизме играет TLS. С помощью серии изящных экспериментов, проведенных в бесклеточной трансляционной системе из экстракта зародышей пшеницы, удалось показать, что остаток валина, присоединенный к 3'-концу РНК TYMV, оказывается первой аминокислотой полипротеина и доставляется туда с помощью TLS. Аналогично псевдоузлу IRES пикорнаподобных вирусов насекомых, TLS TYMV имитирует тРНК: присоединяясь к Р-сайту 40S субъединицы рибосомы и выполняя роль инициаторной тРНК, обеспечивает инициацию трансляции на AUG полипротеина за счет САС триплета в составе своей антикодоновой петли [169]. Кстати, такой механизм является еще одним примером прямого участия 3'-конца мРНК в инициации трансляции.

Итак, РНК пикорнаподобных вирусов насекомых и РНК TYMV содержат структурные элементы, имитирующие инициаторную тРНК и способные взаимодействовать с 40S субъединицей. Таким образом, эти элементы осуществляют связывание мРНК с рибосомой, а, следовательно, и внутреннюю инициацию трансляции. Действительно, основной функцией как кэп-структуры, так и IRES является именно обеспечение посадки рибосомы на мРНК, и имитация элементом мРНК инициаторной тРНК с успехом выполняет эту роль.

Комплементарность IRES и рибосомальной РНК

Как уже упоминалось выше, представляется весьма привлекательным использовать аналогию с инициацией трансляции у прокариот и объяснить работу IRES комплементарным взаимодействием с 18S рибосомальной РНК (рРНК). Это предположение не получило подтверждения в случае IRES HCV [165]. Однако ряд авторов настаивает на возможности прямого связывания IRES с рРНК.

Наибольший вклад в развитие этого направления внесли американские ученые Винсент Мауро и Джеральд Эдельман. В своей первой работе, посвященной возможности комплементарного взаимодействия участков рибосомальной РНК и различных мРНК, они обнаружили, что в составе как тотальной клеточной РНК, так и фракции мРНК присутствует большое количество видов РНК, способных комплементарно соединяться (гибридизоваться) с различными участками 18S и 28S РНК [171]. Также был проведен компьютерный анализ последовательностей мРНК мышцы, который обнаружил множество участков как комплементарных, так и идентичных различным фрагментам 18S и 28S рРНК [171]. В следующей работе, при помощи сшивания ультрафиолетом, выяснилось, что определенные РНК-зонды способны комплементарно взаимодействовать с рРНК в составе рибосомы. Зонды были синтезированы как идеально комплементарные разным участкам рРНК, так и на основе некоторых мРНК, в составе которых были обнаружены комплементарные рРНК фрагменты [172].

Далее исследователи сконцентрировали свое внимание на определенной мРНК – 5'-НТО мышинного гомеодоменного белка GTX. Эта последовательность содержит участки, комплементарные нескольким районам 18S рРНК, и способна гибридизоваться с последней в составе рибосомальной субъединицы [173]. Было установлено, что мутации, изменяющие степень комплементарности исследуемого фрагмента к рРНК, влияют на эффективность трансляции мРНК, содержащей 5'-НТО GTX (причем могут как стимулировать ее, так и подавлять) [173]. В составе 5'-НТО GTX был выявлен 9-нуклеотидный участок (CCGGCGGGT), идеально комплементарный 18S рРНК с 1132 по 1124 нуклеотид. В следующей работе той же группы было показано, что это 9-нт участок может функционировать как IRES в культуре нервных клеток. Следует отметить, что авторы создали практически искусственный IRES – в их конструкциях 9-нт сегмент был отделен от стартового кодона 25-нт участком бета-глобиновой мРНК [92]. В той же работе было обнаружено, что если исследуемый 9-нт участок повторить несколько раз (до 10 копий), то такая последовательность может обеспечить эффективнейшую экспрессию второго гена в составе бицистронной конструкции – на два порядка более высокую, чем IRES EMCV. Причем активность этого искусственного IRES была сравнена с активностью IRES EMCV не только в нервных клетках, но и в самых разных культурах клеток животных и человека (хотя далеко не во всех клетках наблюдалось 100-кратное превосходство искусственного IRES над IRES EMCV).

Группа Мауро и Эдельмана добилась значительных результатов в поисках IRES, содержащих комплементарные рРНК участки. Такой

IRES обнаружен в индуцируемой холодным стрессом РНК Rbm3 [174], целых 5 IRES были локализованы в мРНК, характерных для дендритов [109], также обнаружены IRES в дрожжевых РНК [175]. Помимо этого был проведен опыт по селекции последовательности, обеспечивающей внутреннюю инициацию трансляции из библиотеки случайных 18-нуклеотидных участков. Выбранная в результате остроумной процедуры (подробнее см. [176]) последовательность также оказалась комплементарна 18S рРНК и, будучи повторена несколько раз, обеспечивала весьма эффективную внутреннюю инициацию трансляции.

Общим недостатком всех работ этой группы является отсутствие надлежащего количества контролей (особенно в свете полемики, упоминавшейся выше). Работы Мауро и соавт. чрезвычайно убедительно показывают, что исследуемые ими последовательности обеспечивают эффективную трансляцию второго гена в составе бицистронной конструкции при трансфекции ДНК в клетки. Однако эти результаты были проверены *in vitro* лишь для полноразмерных IRES Rbm3 и GTX, и только IRES Rbm3 был проверен «беспромоторным» тестом. Нозерн-блот анализы мРНК, содержащих исследуемые IRES, зачастую не слишком убедительны. К настоящему времени разработаны еще несколько изящных методов, позволяющих доказать, что экспрессия бицистронной конструкции происходит именно по механизму внутренней инициации трансляции (использование РНК-интерференции, метод защиты от РНКаз и т. п.). Применение этих методов к наиболее ярким IRES, сконструированным Мауро и соавт., безусловно, убедило бы многих скептиков, ставящих под сомнение существование такого необычного для эукариот механизма, как инициация трансляции за счет прямого взаимодействия рРНК и мРНК. И, разумеется, завершающим этапом в доказательстве существования и изучении механизма работы «комплементарных» IRES, могли бы стать эксперименты по «сборке» инициаторного комплекса (или целой рибосомы) в системе из индивидуальных компонентов – аналогичные опытам, проведенным в лабораториях И.Н. Шатского, Т.В. Пестовой и К. Хеллена с IRES пикорнаподобных вирусов. Такие эксперименты позволили бы избежать, например, полемики вокруг идентифицированного группой Мауро IRES в мРНК дрожжевого eIF4G [116, 128, 129].

Следует отметить, что возможность внутренней инициации трансляции за счет комплементарности рРНК и мРНК подтверждается также работой [177], где продемонстрирована важность такого взаимодействия как для кЭп-зависимой, так и для внутренней инициации трансляции. Интересно, что в этой работе эксперименты были проведены в растительной системе (и *in vitro*, и *in vivo*), а, как уже упомина-

лось выше, внутренняя инициация трансляции более характерна для животных.

Полипурип-А-богатые IRES

IRES еще одного типа был обнаружен в ходе исследования нового тобамовируса CrTMV, способного заражать растения семейства крестоцветных [178]. Оказалось, что при трансляции *in vitro*, с бицистронной субгеномной РНК I₂ экспрессируются оба гена – и 5'-концевой ген транспортного белка МР и 3'-ген белка оболочки СР (coat protein) [179]. Дальнейшие исследования показали, что участок длиной в 148 нуклеотидов, предшествующий гену СР, содержит IRES-элемент, способный обеспечивать трансляцию 3'-концевого гена в составе искусственных бицистронных конструкций *in vitro* (причем как в животной, так и в растительной бесклеточной системе) [80]. Активность этого 148-нуклеотидного IRES была продемонстрирована и *in vivo* – в протопластах табака [81] и трансгенных растениях [118]. Делеционный анализ IRES СР CrTMV показал, что входящие в его состав протяженные пурип-богатые участки ответственны за активность IRES [80, 118]. IRES СР содержит 32-нуклеотидный полипурипный тракт (ppt-32) в 100 нуклеотидах перед стартовым AUG и более короткий 11-нуклеотидный ppt-11 непосредственно перед AUG. Интересно, что компьютерное моделирование вторичной структуры IRES СР предполагает существование достаточно стабильной шпильки как раз между ppt-32 и ppt-11. То есть за счет вторичной структуры они могут быть объединены в еще более протяженный полипурипный тракт.

Полипурипные тракты, входящие в состав IRES СР, содержат больше остатков аденина (70%), чем гуанина (30%) – то есть являются полипурип-А-богатыми последовательностями – PARS (polypurine-A-rich sequences). В последующих экспериментах было обнаружено, что и искусственные PARS способны обеспечивать внутреннюю инициацию трансляции. Так, было показано, что повторенный 4 раза 19-нуклеотидный участок (PARS), входящий в состав ppt-32, является IRES-элементом, работающим и *in vitro* и *in vivo* [118]. Кроме того, полностью искусственная последовательность (GAAA)₁₆ также обеспечивала внутреннюю инициацию трансляции. Наконец, поиск в базе данных 5'-НТО растений позволил обнаружить большое количество PARS внутри 5'-НТО гена белка теплового шока 1 *Nicotiana tabacum*. С помощью бицистронного теста *in vitro* и *in vivo* было доказано, что эта последовательность также содержит IRES-элемент [118].

Неожиданной особенностью PARS-IRES оказалась их способность обеспечивать внутреннюю инициацию трансляции в разных эукариотических системах. Как уже упоминалось выше, большин-

ство IRES работают только в животной системе [118, 119]. Однако все упомянутые выше PARS-IRES (и искусственные, и природные) обеспечивали внутреннюю инициацию трансляции как в растительных, так и в животных системах (и *in vitro*, и в клетках растений или животных). Более того, 148-нт IRES CP работал и в клетках дрожжей [118]. Именно такая универсальность PARS-IRES позволяет предположить, что они используют какой-то иной механизм, по сравнению с остальными известными IRES. Однако никаких данных о природе этого механизма пока не получено.

В качестве совсем неожиданной особенности IRES CP тобамовируса крестоцветных следует упомянуть, что эта последовательность оказалась способна обеспечивать инициацию трансляции и в клетках *Escherichia coli* [180]. Хотя, скорее всего, в этом случае активность IRES объясняется небольшой гомологией с последовательностью Шайн-Дальгарно.

Интересно, что в геноме тобамовируса крестоцветных был обнаружен еще один IRES-элемент — в 75-нуклеотидном участке перед геном транспортного белка. Было также показано присутствие IRES в аналогичном участке типового тобамовируса (вируса табачной мозаики) [81]. Эти последовательности совершенно не похожи на PARS-IRES гена белка оболочки ввиду отсутствия протяженных полипуриновых трактов, однако они обеспечивали внутреннюю инициацию трансляции в растительной системе как *in vitro*, так и *in vivo* [81]. Показано также, что присутствие IRES перед геном транспортного белка необходимо для обеспечения эффективного межклеточного транспорта вируса [181] (несмотря на то, что и в отсутствие IRES этот ген мог выражаться при помощи субгеномной РНК).

Еще один PARS-IRES был обнаружен независимо в составе мРНК циклин-зависимой киназы PITSLRE p110, причем выяснилось, что с этой мРНК синтезируются две изоформы PITSLRE — полноразмерная 110 кДа и соответствующая ее С-концевой части 58 кДа [100]. Серия экспериментов убедительно показала, что укороченный вариант белка синтезируется за счет внутренней инициации трансляции. Также оказалось, что активность обнаруженного IRES резко стимулируется на определенных стадиях клеточного цикла (переход G2/M). В следующей работе той же группы было продемонстрировано, что активность IRES PITSLRE обусловлена как полипуриновыми трактами, так и взаимодействием IRES с белком unг — одним из транс-факторов внутренней инициации трансляции [182]. В отличие от большинства типов трансляции (в том числе и направляемых, например, IRES EMCV или риновируса) активность IRES PITSLRE сохранялась при фосфорилировании альфа-субъединицы eIF2 — на стадии G2/M, когда в клетке

увеличивается количество белка unг и происходит фосфорилирование eIF2 [182].

К сожалению, как и в случае комплементарных IRES Мауро и Эдельмана, работы по изучению PARS-IRES нельзя считать завершенными, поскольку с ними не были проведены эксперименты по реконструкции инициаторного комплекса и механизм инициации трансляции, обеспечиваемый этими IRES, остается неизвестным.

Другие клеточные IRES

Классификация IRES-элементов на основе их структуры и механизмов функционирования практически исчерпывается пятью приведенными выше типами. Такая систематика охватывает большую часть известных вирусных IRES (в основном пикорна- и пикорнаподобных вирусов), но при этом вне классификации оказывается подавляющее большинство IRES из клеточных мРНК. По аналогии с IRES пикорнавирусов можно предположить, что именно вторичная структура определяет работу клеточных IRES — тем более, что большинство из них отличаются повышенным содержанием G и C. Для нескольких из клеточных IRES химический и энзиматический анализы позволили установить основные элементы вторичной структуры [98, 183–186]. Однако оказалось, что пространственная организация IRES даже родственных белков (например с-тус и L-тус) не похожа [98, 183], хотя у различных клеточных IRES все же обнаружены некоторые общие элементы — например присутствие Y-образной структуры и расположенной неподалеку от стартового кодона небольшой шпильки [187]. Однако это весьма неопределенная структурная особенность и не было доказано, что удаление этих элементов ведет к инактивации IRES.

Следует отметить, что мутагенез клеточных IRES, зачастую дает весьма неожиданные результаты. Достаточно крупные делеции участков IRES далеко не всегда инактивируют их. Этот факт тем более удивителен, если учесть, что мутации, вызывающие даже малейшие нарушения во вторичной структуре, фатальны, например, для IRES пикорнавирусов. Кроме того, фрагменты некоторых клеточных IRES способны обеспечивать внутреннюю инициацию трансляции, хотя и с меньшей эффективностью [96, 101, 188]. Можно предположить, что клеточные IRES содержат несколько небольших элементов, обеспечивающих внутреннюю посадку рибосомы, причем их действие кооперативно и стимулируется вторичной структурой IRES. К сожалению, структура этих гипотетических элементов и природа их взаимодействия с трансляционным аппаратом клетки остается неизвестной.

Многие клеточные IRES, пусть и не имеющие видимых структурных гомологий, близки функционально. В определенных условиях,

когда обычная кэп-зависимая трансляция подавлена, такие IRES продолжают работать или даже увеличивают свою эффективность. Например, известна группа IRES, активирующихся во время апоптоза. Особенности трансляции в стрессовых условиях и роль IRES-элементов в этом процессе рассмотрены в следующем разделе.

VI. ТРАНСЛЯЦИЯ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА. ЗНАЧЕНИЕ ВНУТРЕННЕЙ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ

СТРЕССОВАЯ ТРАНСЛЯЦИЯ

Адаптация клетки к резкому изменению условий должна включать в себя изменение набора экспрессируемых белков. Работа большинства генов регулируется на уровне синтеза мРНК, причем зачастую синтезированные мРНК существуют в клетке достаточно продолжительное время. Следовательно, переключение транскрипции с одних генов на другие не приведет к быстрому изменению в белковом составе клетки, так как существующие мРНК будут продолжать транслироваться, пока, со временем, не будут заменены на новые матрицы, отвечающие изменившимся условиям. Следовательно, реакция на резкое изменение условий — стресс — должна включать в себя моментальную остановку всего биосинтеза белка в клетке.

Такой арест трансляции действительно происходит, причем не только в стрессовых ситуациях, но и на определенных стадиях клеточного цикла, в ответ на поступающие извне сигналы, при запуске каких-то программ, требующих кардинальной перестройки физиологии клетки (например, запрограммированной клеточной смерти).

Сложный механизм кэп-зависимой инициации трансляции имеет много «уязвимых мест». Наиболее часто трансляция подавляется за счет инактивации факторов eIF4E, eIF4G и eIF2.

Инактивация фактора 4E

Активность 4E может регулироваться несколькими путями. Дефосфорилирование этого фактора снижает его активность (см. например [189]). Фосфорилирование же 4E может осуществлять киназа mnk1. Интересно, что фактор eIF4G содержит сайт связывания для mnk1 и, таким образом, доставляет киназу к ее субстрату — eIF4E [190].

Основным же способом инактивации 4E является исключение этого фактора из процесса инициации трансляции в клетке с помощью связывания со специальными белками. Зачастую скорость инициации лимитируется количеством доступного 4E. В клетке существует несколько типов белков, связывающих eIF4E — т.н. 4E-ВР (4E binding

protein). Наиболее изучен 4E-ВР1. Этот белок взаимодействует с eIF4E и, таким образом, конкурирует с eIF4G. Связывание 4E-ВР1 с 4E регулируется при помощи фосфорилирования — гипофосфорилированный 4E-ВР1 образует с 4E прочный комплекс, в отличие от фосфорилированного 4E-ВР1 [191, 192]. В комплексе с 4E-ВР1 eIF4E не может участвовать в инициации трансляции.

Инактивация фактора 4G

Белок eIF4G, являющийся связующим звеном для других факторов инициации (4E, 4A, 3, РАВР, mnk1 [193]), как правило, служит объектом атаки протеаз — таким образом удается добиться «разобщения» перечисленных факторов инициации. EIF4G разрезается протеазами 2A и L, кодируемыми рядом пикорнавирусов [194, 195]. Кроме того, 4G может быть разрезан протеазой вируса иммунодефицита человека [196, 197]. Наконец, 4G является субстратом для каспазы 3 [198, 199].

Инактивация фактора 2

Большинство стрессов вызывают практически моментальное фосфорилирование альфа-субъединицы eIF2. Как уже упоминалось eIF2 входит в состав тройственного комплекса и осуществляет доставку инициаторной РНК к 40S субъединице. После завершения инициации трансляции молекула GTP, связанная с eIF2, гидролизует, и eIF2-GDP комплекс отделяется от рибосомы и связывается с eIF2B, который катализирует превращение GDP, ассоциированного с eIF2, в GTP (см. рис. 1). Однако фосфорилирование серина 51 альфа-субъединицы eIF2 резко увеличивает сродство этого белка к eIF2B и приводит к образованию прочного комплекса [200, 201]. Концентрация eIF2 в клетке существенно выше, чем eIF2B. Следовательно, связывание 2B фосфорилированным eIF2 приводит к недостатку 2B, что, в свою очередь, снижает скорость конверсии eIF2-GDP в eIF-GTP и подавляет инициацию трансляции в клетке.

Фосфорилирование eIF4B или рибосомального белка S6 также участвует в регуляции трансляции в ответ на различные стимулы [202].

Приведенные выше механизмы «выключения» трансляционных факторов реализуются в различных клетках и тканях в самых разных условиях. Так, инактивация 4E происходит при недостатке питательных веществ [203] — в частности при аминокислотном голодании [204], гипоксии и ишемии [205, 206], алкогольной интоксикации [207], избыточной нагрузке мышечной ткани [208], под воздействием глюкокортикоидов [209], массивном сепсисе [210].

Фосфорилирование eIF2 происходит при большинстве стрессов (физической, химической или физиологической природы — см. об-

зоры [202, 211]). Проиллюстрировать универсальность такого способа подавления трансляции можно, перечислив некоторые киназы, ответственные за фосфорилирование eIF2. Это может быть дцРНК-зависимая киназа PKR [211–213], активируемая при вирусной инфекции; киназа PERK, связанная с эндоплазматическим стрессом (ER-стресс вызывается, например, большим количеством неправильно свернутых белков, снижением концентрации кальция в эндоплазматическом ретикулуме); киназа GCN2, активирующаяся при аминокислотном голодании [198, 214].

В рамках одного обзора не представляется возможным разобрать все механизмы инактивации трансляции в стрессовых условиях — это и не является целью нашей работы. Однако сам факт существования стресс-зависимой инактивации подсказывает возможную биологическую роль внутренней инициации трансляции. Действительно, в большинстве случаев для работы IRES не требуются некоторые из факторов инициации. Следовательно, в случае стрессовой инактивации этих факторов, РНК, содержащие такие IRES, будут продолжать транслироваться. Таким образом, клетка получает дополнительную степень свободы — может сохранить экспрессию некоторых матриц на фоне остановленной трансляции остальных мРНК.

Наиболее очевидным примером, подтверждающим это предположение, является трансляция в клетке, зараженной полиовирусом. Протеаза 2A_{pro}, экспрессируемая этим вирусом, разрезает eIF4G, исключая таким образом фактор 4E из участия в трансляции. В этих условиях резко подавляется трансляция клеточных мРНК, а экспрессию РНК полиовируса обеспечивает IRES. В данном случае биологическая роль внутренней инициации очевидна (разумеется, с точки зрения полиовируса).

Можно предположить, что и в остальных случаях (в том числе и для клеточных IRES) внутренняя инициация выполняет похожую роль. Рассмотрим это предположение на примере апоптоза — одного из самых интересных случаев, когда изменение физиологического статуса клетки ведет к подавлению трансляции (в свою очередь, преодолеваемого при помощи IRES в составе некоторых мРНК).

ТРАНСЛЯЦИЯ В УСЛОВИЯХ АПОПТОЗА

Модификации факторов инициации трансляции, приводящие к подавлению белкового синтеза при апоптозе

Индукция апоптоза в различных типах клеток сопровождается быстрым падением общей эффективности синтеза белка [199, 214–216], причем наблюдается резкое снижение количества рибосом в составе полисом [198, 214, 217]. Следовательно, ингибирование происходит,

в основном, на стадии инициации трансляции (хотя нельзя исключить, например, и дестабилизацию мРНК).

Показано, что отдельные факторы инициации трансляции подвергаются разрезанию каспазами. Так, в клетках лимфомы ВJAB и Jurkat в ответ на индукцию апоптоза наблюдалось быстрое исчезновение фактора eIF4G, блокируемое ингибитором каспаз zVAD.FMK. Причем в отличие от 4G, деградации факторов 4A и 4E в этих клетках не происходило [199, 218, 219]. Важно отметить, что протеолиз 4G не происходил в клетках MCF-7, не содержащих каспазу 3 [219]. Также было показано, что при апоптозе происходит протеолиз фактора 4B и малой субъединицы p35 фактора 3 [220]. Следует отметить, что протеолиз eIF4B и eIF3 наблюдается значительно позже, чем разрезание 4G. Наконец, были получены свидетельства протеолиза альфа-субъединицы eIF2 и белка 4E-BP1 при индукции апоптоза ([220, 221]).

Исчезновение после индукции апоптоза eIF4G сопровождается появлением 72 кДа фрагмента его протеолиза (что также предотвращалось zVAD.FMK). Пептидный сиквенс этого фрагмента показал, что он соответствует центральной части белка, названной MFAG (middle fragment of apoptotic cleavage of eIF4G). Интересно, что разрезание 4G каспазой 3 происходит иначе, чем протеазой пикорнавирусов. Если последние отделяют сайт связывания eIF4E от остального белка, то в MFAG сохраняются домены, ответственные за взаимодействие как с eIF4E, так и с eIF4A и eIF3, но отрываются сайты связывания PABP и Mnk1.

Большое количество данных указывает на то, что фрагмент MFAG является важным белком, участвующим в инициации трансляции, а не просто инертным продуктом протеолиза eIF4G. Показано, что во время апоптоза MFAG ассоциирован с рибосомами [222, 223] и может поддерживать кэп-зависимую инициацию трансляции [193], хотя эффективность такой трансляции должна быть гораздо ниже, по сравнению с таковой, осуществляемой целым eIF4G. Действительно, MFAG не способен обеспечить взаимодействие 5'- и 3'-концов мРНК, так как в нем отсутствует сайт связывания с Paip. Кроме того, в MFAG нет и сайта связывания с киназой Mnk1, фосфорилирующей eIF4E (в случае, если она ассоциирована с eIF4G [190]). Следовательно, при использовании MFAG eIF4E может быть гипофосфорилирован, что приводит к снижению его активности [224]. Также можно предположить, что N- и C-концевые фрагменты 4G, отщепляемые каспазой, могут связываться, соответственно, с PABP и Mnk1, оттитровывая эти белки и подавляя тем самым инициацию трансляции. Следует отметить, что при апоптозе PABP-связывающий домен отрывается и от eIF4B, т.е. наносится еще один «удар» по закольцовыванию мРНК [225].

Интересно, что в клетке существует белок, гомологичный MFAG и участвующий в апоптозе, DAP5 (Death-associated protein 5, белок, связанный со смертью), называемый также p97 или NAT1. Экспрессия DAP5 в трансфицированных клетках приводила к подавлению трансляции и активации программы клеточной смерти [226, 227].

Кроме расщепления каспазами, факторы инициации могут быть инактивированы во время апоптоза при помощи фосфорилирования и дефосфорилирования. Так, индукторы апоптоза TNF (tumor necrosis factor) и TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TNF-подобный лиганд, индуцирующий апоптоз) стимулируют фосфорилирование eIF2- α и дефосфорилирование 4E-BP1 [226]. И то и другое приводит к подавлению трансляции. Однако не исключено, что в данном случае задействован обычный механизм стресс-зависимой инактивации eIF2 и eIF4E, поскольку и TNF, и TRAIL активируют киназу PKR, фосфорилирующую eIF2- α в стрессовых условиях [228]. Установлено, что ключевую роль в фосфорилировании 4E-BP1 играет киназа mTOR [229], активность которой подавляется как при апоптозе, так и в других стрессовых условиях.

С другой стороны, именно при апоптозе происходит активация киназ JNK и p38, что, в свою очередь, приводит к подавлению трансляции (по невыясненному пока механизму).

Кроме того, при апоптозе происходит расщепление каспазами киназы p70^{S6K}, фосфорилирующей рибосомальный белок s6, что также приводит к подавлению трансляции [226].

Несмотря на большое количество имеющихся данных, в механизме апоптоз-зависимого подавления трансляции остается еще много неизвестного. Так, например, этопозид – реагент, индуцирующий апоптоз, – вызывает резкое падение эффективности трансляции и этот эффект не блокируется ни ингибиторами каспаз, ни инактивацией PKR [218].

Также до конца не выяснена последовательность событий. В общих чертах ее можно представить следующим образом:

- фосфорилирование альфа-субъединицы eIF2 киназой PKR, дефосфорилирование 4E-BP1;
- расщепление eIF4G, образование MFAG;
- расщепление eIF4B и eIF3, дефосфорилирование 4E, дефосфорилирование s6;
- расщепление каспазами бета-субъединицы eIF2.

Интересно, что протеолиз eIF2 снимает блок трансляции, вызванный фосфорилированием eIF2-альфа (за счет освобождения eIF2B из комплекса с eIF2). Т. е., на более поздних стадиях программы клеточного самоубийства может происходить частичная реактивация трансляционного аппарата [230, 231].

Зачем специально отключать трансляцию при апоптозе?

Биологический смысл подавления трансляции на ранних стадиях программы клеточного самоубийства, на первый взгляд, непонятен – в конце концов, развитие апоптоза рано или поздно должно привести к отключению трансляции, как и всех остальных процессов, идущих в клетке. Зачем клетке задействовать специальный механизм для некоторого ускорения и без того неизбежного события? Ответа на этот вопрос, разумеется, нет (как и на большинство подобных вопросов), но современные представления о природе и механизме запрограммированной клеточной смерти позволяют высказать некоторые предположения на этот счет.

Согласно одной из точек зрения, в клетке поддерживается своеобразное равновесие между про- и антиапоптозными системами. Успешное развитие апоптоза (если слово «успешное» применимо к описанию самоубийства) в ответ на определенные стимулы, происходит в результате подавления антиапоптозных процессов и активации программы клеточной смерти. В большинстве случаев для развития апоптоза не требуется синтез белка. Можно предположить, что быстрое отключение общей трансляции в клетке дает существенное преимущество проапоптозной системе, поскольку блокирует синтез антиапоптозных белков (таких, как Bcl-2, XIAP) и, тем самым, не позволяет за счет увеличения их концентрации остановить развитие апоптоза. Таким образом, отключение биосинтеза белка при индукции апоптоза является одним из важнейших из этапов этого варианта запрограммированной клеточной смерти.

Более того, большое количество данных свидетельствует о том, что искусственное блокирование трансляции в большинстве клеток само по себе ведет к запуску программы клеточного самоубийства [232–234]. В этой связи интересна неожиданная параллель с прокариотами. В последнее время появились работы, демонстрирующие существование запрограммированной клеточной смерти у бактерий – например, система mazE/mazF у *E. coli* [230]. Эта система состоит из токсичного белка mazF и белка-антидота mazE. В нормальных условиях оба белка активно экспрессируются в бактериях, но mazF не проявляет своего токсичного действия, поскольку немедленно расщепляется белком mazE (являющимся специфичной протеиназой). Стабильность этих белков различна – протеиназа mazE весьма лабильна и подвержена быстрой деградации в *E. coli*, в то время как токсин mazF достаточно стабилен (разумеется, в отсутствие mazE). Следовательно, арест трансляции в бактериальной клетке должен приводить к достаточно быстрому исчезновению mazE, что, в свою очередь, ведет к накоплению токсина mazF и, стало быть, смерти клетки. В работе [235] таким образом объясняется токсичное действие многих антибиоти-

ков — ингибиторов трансляции. Таким образом, подавление белкового синтеза в бактериях может приводить к активации программы клеточного самоубийства.

Аналогия с прокариотами позволяет по-другому взглянуть на значение ареста трансляции при апоптозе. Например, проясняется, неожиданная, на первый взгляд, роль фактора инициации 4E в апоптозе и канцерогенезе. Установлено, что в большинстве культур раковых клеток концентрация 4E значительно выше, чем в нормальных клетках (см. обзор [236]). Что является в этом случае причиной, а что — следствием, позволили прояснить опыты, в которых суперэкспрессия eIF4E в нормальных клетках приводила к их малигнизации. И, наоборот, активация 4E-BP1 подавляла деление клеток и вызывала апоптоз [96, 101–104, 237]. Таким образом, можно предположить, что одной из причин раковой трансформации клетки может быть нарушение в описанном выше механизме подавления трансляции в ответ на индукцию апоптоза.

Используется ли внутренняя инициация трансляции во время апоптоза?

Как видно из табл. 2, некоторые из мРНК белков, связанных с апоптозом, содержат IRES-элементы. Причем это относится как к проапоптозным белкам (DAP5, Araf-1), так и к антиапоптозным (XIAP, cIAP, Bcl-2, c-myc) [238]. Согласно сделанному в предыдущем разделе предположению, быстрое подавление трансляции при индукции апоптоза необходимо для остановки синтеза антиапоптозных белков. Поскольку арест трансляции осуществляется, в основном, за счет инактивации факторов кэп-зависимой инициации, можно думать, что какие-то варианты IRES-зависимой трансляции могут продолжать работать в клетке на фоне развития апоптоза. Действительно, в ряде работ было показано, что IRES из мРНК XIAP (X-lined inhibitor of apoptosis protein, X-связанный ингибитор апоптоза) продолжает обеспечивать трансляцию в различных стрессовых условиях: при недостатке питательных веществ [239], обработке клеток γ -излучением [240], аноксии [241], других стрессах [240, 241] и при индукции апоптоза [240].

В то же время, как это убедительно продемонстрировано в работе [240], после обработки клеток этопозином — индуктором апоптоза — происходит активация IRES DAP5 и Araf-1. Заметим, что и DAP5 и Araf-1, в отличие от XIAP, являются проапоптозными белками. Интересно, что активность других IRES — EMCV, BiP, c-myc — в этих условиях не изменялась или даже снижалась.

Дальнейшие исследования позволили пролить свет на механизм активации IRES DAP5 и Araf-1 при апоптозе [218]. Так, было пока-

зано, что стимуляцию IRES DAP5 и Araf1 после индукции апоптоза предотвращал ингибитор каспаз zVAD.fmk. Кроме того, активность этих IRES увеличивалась при искусственной экспрессии в трансфицируемых клетках фрагмента протеолиза фактора 4G MFAG и продукта расщепления каспазами апоптозного фактора трансляции DAP5 — p87. При этом ко-экспрессия других фрагментов, отщепляемых каспазами от 4G (NFAG и CFAG), не приводила к активации исследуемых IRES.

К сожалению, этой работой практически исчерпываются данные о механизме работы IRES апоптоз-связанных белков. Активность IRES Araf1 и DAP5 связана с продуктами расщепления каспазами факторов инициации. Поскольку фрагмент MFAG содержит области связывания с eIF4E, eIF4A и eIF3, а фрагмент DAP5 p87 способен взаимодействовать с eIF4A и eIF3, можно предположить, что эти два фрагмента способны «переключить» инициацию трансляции на некоторый новый и, скорее всего, кэп-независимый механизм. Однако детали этого механизма остаются неизученными. Также непонятно, как этим IRES удастся преодолеть инактивацию фактора 2B в результате фосфорилирования eIF2-альфа. Не исключено, что здесь какую-то роль играет расщепление каспазами eIF2, в результате которого возможна его реактивация.

Интересно, что в IRES Araf1 присутствует несколько протяженных полипурин-А-богатых трактов. Но, к сожалению, неизвестно, необходимы ли эти структурные элементы для активности IRES в клетке.

Таким образом, к настоящему моменту установлен лишь феномен внутренней инициации трансляции, осуществляемой на фоне развития апоптоза, и имеется несколько весьма общих соображений об обеспечивающем ее механизме. Биологическая роль такого способа инициации белкового синтеза также не ясна, однако представляется весьма привлекательным (хотя и спекулятивным) следующее объяснение существования «апоптоз-зависимой» внутренней инициации трансляции. Возможно, что мы имеем дело с очередным витком «соперничества в гонке вооружений», происходящего между про- и антиапоптозными системами в клетке. Как уже сообщалось, арест трансляции при инициации апоптоза может быть необходим для подавления синтеза антиапоптозных белков. Присутствие IRES в 5'-НТО мРНК ингибитора апоптоза XIAP позволяет обойти этот блок за счет внутренней инициации трансляции. Кстати, наибольшей активностью из упомянутых выше IRES обладает именно IRES XIAP, что вполне согласуется с биологической ролью этого белка — одного из ключевых блокаторов апоптоза. Следовательно, такая клетка становится гораздо менее восприимчивой к сигналам запуска апоптоза. Чтобы преодолеть этот, с точки зрения всего организма, дефект, проапоптозные системы

также прибегают к использованию внутренней инициации — за счет появления IRES в 5'-НТО мРНК Araf-1 и DAP5. Некоторым подтверждением такой спекуляции можно считать тот факт, что IRES XIAP просто обеспечивает более или менее одинаковый уровень трансляции в нормальных условиях и при развитии апоптоза, в то время как IRES Araf-1 и DAP5 резко стимулируются после запуска программы клеточного самоуничтожения — как бы в ответ на продолжающуюся экспрессию XIAP.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важнейшая и, зачастую, лимитирующая стадия в процессе реализации генетической информации — стадия инициации биосинтеза белка — является сложным многоэтапным процессом, в котором участвует большое количество различных факторов — белков, молекул РНК, низкомолекулярных соединений. Основной механизм инициации трансляции у эукариот хорошо изучен, что позволяет достаточно детально описать процессы взаимодействия мРНК и рибосомы, последующего обнаружения и выбора стартового кодона, начала синтеза полипептидной цепи.

Как и многие сложные процессы, происходящие в клетке, инициация трансляции может быть заблокирована инактивацией практически любого из участвующих в ней компонентов — факторов инициации. Такой «арест трансляции» в клетке действительно происходит в самых разных условиях (при стрессе, на определенных стадиях клеточного цикла, при резком изменении физиологического статуса клетки). Однако удивительной особенностью эукариотической клетки является то, что «на этот случай» ею были разработаны альтернативные механизмы инициации трансляции, позволяющие определенным мРНК направлять синтез белка в отсутствие определенных факторов инициации.

Основной механизм инициации трансляции у эукариот подразумевает обязательное участие 5'-конца мРНК — с него начинается взаимодействие с трансляционным аппаратом. Оказалось, что альтернативные механизмы могут обеспечивать инициацию белкового синтеза 5' независимо, используя некоторый внутренний участок мРНК для посадки рибосомы. Соответственно, такой механизм получил название внутренней инициации трансляции, а обеспечивающие его элементы — области внутренней посадки рибосомы или IRES.

IRES-элементы обнаружены в составе десятков вирусных и клеточных мРНК. Механизм их работы во многих случаях остается неизвестным, но для некоторых типов IRES исследователям удалось выяс-

нить, инактивацию какого именно элемента трансляционного аппарата удается преодолеть с их помощью. В этой связи немаловажна роль внутренней инициации трансляции в изучении основного механизма инициации синтеза белка — как и во многих других случаях, исключение подтвердило правило.

Высказанное выше предположение о биологической роли IRES — обеспечивать трансляцию определенных мРНК при заблокированном синтезе белка с остальных матриц в клетке — подтверждается, например, особенностями трансляции в условиях апоптоза. Однако следует отметить, что при всей привлекательности такого предположения, оно достаточно спекулятивно. Потребуется немало усилий для окончательного решения вопроса о роли внутренней инициации трансляции в эукариотической клетке.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность И.Г. Атабекову и В.Г. Колупаевой за прочтение обзора, критические замечания и комментарии.

Рекомендуемые обзорные статьи:

1. Kapp, L.D. & Lorsch, J.R. (2004) The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 657–704.
2. Hellen, C.U. & Sarnow, P. (2001) Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev.*, **15**, 1593–1612.
3. Merrick, W.C. (2004) Cap-dependent and cap-independent translation in eukaryotic systems. *Gene*, **332**, 1–11.
4. Preiss, T. & Hentze, M. (2003) Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *Bioessays*, **25**, 1201–1211.
5. Pestova, T.V. & Kolupaeva, V.G. (2002) The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev.*, **16**, 2906–2922.
6. Pestova, T.V., Kolupaeva, V.G., Lomakin, I.B., Pilipenko, E.V., Shatsky, I.N., Agol, V.I. & Hellen, C.U. (2001) Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 7029–7036.
7. Brostrom, C.O. & Brostrom, M.A. (1998) Regulation of translational initiation during cellular responses to stress. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **58**, 79–125.
8. Clemens, M.J., Bushell, M., Jeffrey, I.W., Pain, V.M. & Morley, S.J. (2000) Translation initiation factor modifications and the regulation of protein synthesis in apoptotic cells. *Cell Death Differ.* **7**, 603–615.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kozak, M. (1999) *Gene*, **234**, 187–208.
2. Kozak, M. (1989) *J. Cell. Biol.*, **108**, 229–241.
3. Preiss, T. M. W. H. (2003) *Bioessays*, **25**, 1201–1211.
4. Merrick, W. (2003) *Biochem. Mol. Biol. Ed.*, **31**, 378–385.
5. Merrick, W.C. (2004) *Gene*, **332**, 1–11.
6. Pestova, T.V., Kolupaeva, V.G. (2002) *Genes Dev.*, **16**, 2906–2922.
7. Pause, A., Belsham, G.J., Gingras, A.C., Donze, O., Lin, T.A., Lawrence, J.C., Jr., Sonenberg, N. (1994) *Nature*, **371**, 762–767.

8. De Gregorio, E., Baron, J., Preiss, T., Hentze, M.W. (2001) *Rna*, **7**, 106–113.
9. Richter-Cook, N.J., Dever, T.E., Hensold, J.O., Merrick, W.C. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 7579–7587.
10. Lamphear, B.J., Kirchweiger, R., Skern, T., Rhoads, R.E. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 21975–21983.
11. Cigan, A.M., Feng, L., Donahue, T.F. (1988) *Science*, **242**, 93–97.
12. Williams, N., Hinnebusch, A., Donahue, T.F. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7515–7519.
13. Kozak, M. (2002) *Gene*, **299**, 1–34.
14. Kozak, M. (1987) *J. Mol. Biol.*, **196**, 947–950.
15. Kozak, M. (1986) *Cell*, **44**, 283–292.
16. Cigan, A.M., Donahue, T.F. (1987) *Gene*, **59**, 1–18.
17. Joshi, C.P., Zhou, H., Huang, X., Chiang, V.L. (1997) *Plant Mol. Biol.*, **35**, 993–1001.
18. Pestova, T.V., Borukhov, S.I., Hellen, C.U. (1998) *Nature*, **394**, 854–859.
19. Pestova, T.V., Lomakin, I.B., Lee, J.H., Choi, S.K., Dever, T.E., Hellen, C.U. (2000) *Nature*, **403**, 332–335.
20. Lee, J.H., Pestova, T.V., Shin, B.S., Cao, C., Choi, S.K., Dever, T.E. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 16689–16694.
21. Shin, B.S., Maag, D., Roll–Mecak, A., Arefin, M.S., Burley, S.K., Lorsch, J.R., Dever, T.E. (2002) *Cell*, **111**, 1015–1025.
22. Roll–Mecak, A., Cao, C., Dever, T.E., Burley, S.K. (2000) *Cell*, **103**, 781–792.
23. Anthony, T.G., Fabian, J.R., Kimball, S.R., Jefferson, L.S. (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, **1492**, 56–62.
24. Gallie, D.R. (1991) *Genes Dev.*, **5**, 2108–2116.
25. Iizuka, N., Najita, L., Franzusoff, A., Sarnow, P. (1994) *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 7322–7330.
26. Michel, Y.M., Poncet, D., Piron, M., Kean, K.M., Borman, A.M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 32268–32276.
27. Gebauer, F., Corona, D.F., Preiss, T., Becker, P.B., Hentze, M.W. (1999) *Embo J.*, **18**, 6146–6154.
28. Tarun, S.Z., Jr., Sachs, A.B. (1995) *Genes Dev.*, **9**, 2997–3007.
29. Tarun, S.Z., Jr., Sachs, A.B. (1996) *Embo J.*, **15**, 7168–7177.
30. Tarun, S.Z., Jr., Wells, S.E., Deardorff, J.A., Sachs, A.B. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 9046–9051.
31. Le, H., Tanguay, R.L., Balasta, M.L., Wei, C.C., Browning, K.S., Metz, A.M., Goss, D.J., Gallie, D.R. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 16247–16255.
32. Imataka, H., Gradi, A., Sonenberg, N. (1998) *Embo J.*, **17**, 7480–7489.
33. Wells, S.E., Hillner, P.E., Vale, R.D., Sachs, A.B. (1998) *Mol. Cell*, **2**, 135–140.
34. Gallie, D.R., Kobayashi, M. (1994) *Gene*, **142**, 159–165.
35. Zeyenko, V.V., Ryabova, L.A., Gallie, D.R., Spirin, A.S. (1994) *FEBS Lett.*, **354**, 271–273.
36. Zeenko, V.V., Ryabova, L.A., Spirin, A.S., Rothnie, H.M., Hess, D., Browning, K.S., Hohn, T. (2002) *J. Virol.*, **76**, 5678–5691.
37. Craig, A.W., Haghghat, A., Yu, A.T., Sonenberg, N. (1998) *Nature*, **392**, 520–523.
38. Roy, G., De Crescenzo, G., Khaleghpour, K., Kahvejian, A., O'Connor–McCourt, M., Sonenberg, N. (2002) *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 3769–3782.
39. Khaleghpour, K., Svitkin, Y.V., Craig, A.W., DeMaria, C.T., Deo, R.C., Burley, S.K., Sonenberg, N. (2001) *Mol. Cell*, **7**, 205–216.
40. von der Haar, T., McCarthy, J.E. (2002) *Mol. Microbiol.*, **46**, 531–544.
41. Kapp, L.D., Lorsch, J.R. (2004) *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 657–704.
42. Stevens, S.W., Ryan, D.E., Ge, H.Y., Moore, R.E., Young, M.K., Lee, T.D., Abelson, J. (2002) *Mol. Cell*, **9**, 31–44.
43. Asano, K., Clayton, J., Shalev, A., Hinnebusch, A.G. (2000) *Genes Dev.*, **14**, 2534–2546.
44. Valasek, L., Nielsen, K.H., Hinnebusch, A.G. (2002) *Embo J.*, **21**, 5886–5898.
45. Naranda, T., MacMillan, S.E., Donahue, T.F., Hershey, J.W. (1996) *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 2307–2313.

46. Asano, K., Shalev, A., Phan, L., Nielsen, K., Clayton, J., Valasek, L., Donahue, T.F., Hinnebusch, A.G. (2001) *Embo J.*, **20**, 2326–2337.
47. Spirin, A.S., Baranov, V.I., Ryabova, L.A., Ovodov, S.Y., Alakhov, Y.B. (1988) *Science*, **242**, 1162–1164.
48. Morris, D.R., Geballe, A.P. (2000) *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 8635–8642.
49. Hinnebusch, A.G. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 21661–21664.
50. Futterer, J., Kiss–Laszlo, Z., Hohn, T. (1993) *Cell*, **73**, 789–802.
51. Yueh, A., Schneider, R.J. (1996) *Genes Dev.*, **10**, 1557–1567.
52. Ryabova, L.A., Hohn, T. (2000) *Genes Dev.*, **14**, 817–829.
53. Kozak, M. (1979) *Nature*, **280**, 82–85.
54. Pelletier, J., Sonenberg, N. (1988) *Nature*, **334**, 320–325.
55. Jang, S.K., Krausslich, H.G., Nicklin, M.J., Duke, G.M., Palmberg, A.C., Wimmer, E. (1988) *J. Virol.*, **62**, 2636–2643.
56. Pelletier, J., Flynn, M.E., Kaplan, G., Racaniello, V., Sonenberg, N. (1988) *J. Virol.*, **62**, 4486–4492.
57. Nomoto, A., Kitamura, N., Golini, F., Wimmer, E. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5345–5349.
58. Canaani, D., Revel, M., Groner, Y. (1976) *FEBS Lett.*, **64**, 326–331.
59. Beretta, L., Gingras, A.C., Svitkin, Y.V., Hall, M.N., Sonenberg, N. (1996) *Embo J.*, **15**, 658–664.
60. Gingras, A.C., Svitkin, Y., Belsham, G.J., Pause, A., Sonenberg, N. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5578–5583.
61. Gradi, A., Svitkin, Y.V., Imataka, H., Sonenberg, N. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11089–11094.
62. Lamphear, B.J., Yan, R., Yang, F., Waters, D., Liebig, H.D., Klump, H., Kuechler, E., Skern, T., Rhoads, R.E. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 19200–19203.
63. Sachs, A.B. (2000) *Cell*, **101**, 243–245.
64. Borman, A., Jackson, R.J. (1992) *Virology*, **188**, 685–696.
65. Kuhn, R., Luz, N., Beck, E. (1990) *J. Virol.*, **64**, 4625–4631.
66. Tsukiyama–Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M., Nomoto, A. (1992) *J. Virol.*, **66**, 1476–1483.
67. Rijnbrand, R., van der Straaten, T., van Rijn, P.A., Spaan, W.J., Bredenbeek, P.J. (1997) *J. Virol.*, **71**, 451–457.
68. Vagner, S., Waysbort, A., Marena, M., Gensac, M.C., Amalric, F., Prats, A.C. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 20376–20383.
69. Deffaud, C., Darlix, J.L. (2000) *J. Virol.*, **74**, 11581–11588.
70. Buck, C.B., Shen, X., Egan, M.A., Pierson, T.C., Walker, C.M., Siliciano, R.F. (2001) *J. Virol.*, **75**, 181–191.
71. Sasaki, J., Nakashima, N. (1999) *J. Virol.*, **73**, 1219–1226.
72. Domier, L.L., McCoppin, N.K., D'Arcy, C.J. (2000) *Virology*, **268**, 264–271.
73. Wilson, J.E., Powell, M.J., Hoover, S.E., Sarnow, P. (2000) *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 4990–4999.
74. Grundhoff, A., Ganem, D. (2001) *J. Virol.*, **75**, 1857–1863.
75. Levis, C., Astier–Manificac, S. (1993) *Virus Genes*, **7**, 367–379.
76. Basso, J., Dallaire, P., Charest, P.J., Devantier, Y., Laliberte, J.F. (1994) *J. Gen. Virol.*, **75**, 3157–3165.
77. Gallie, D.R. (2001) *J. Virol.*, **75**, 12141–12152.
78. Tacke, E., Prufer, D., Salamini, F., Rohde, W. (1990) *J. Gen. Virol.*, **71**, 2265–2272.
79. Thomas, A.A., ter Haar, E., Wellink, J., Voorma, H.O. (1991) *J. Virol.*, **65**, 2953–2959.
80. Ivanov, P.A., Karpova, O.V., Skulachev, M.V., Tomashevskaya, O.L., Rodionova, N.P., Dorokhov, Yu.L., Atabekov, J.G. (1997) *Virology*, **232**, 32–43.
81. Skulachev, M.V., Ivanov, P.A., Karpova, O.V., Korpela, T., Rodionova, N.P., Dorokhov, Yu.L., Atabekov, J.G. (1999) *Virology*, **263**, 139–154.
82. Leonard, S., Viel, C., Beauchemin, C., Daigneault, N., Fortin, M.G., Laliberte, J.F. (2004) *J. Gen. Virol.*, **85**, 1055–1063.

83. Macejak, D.G., Sarnow, P. (1991) Nature, **353**, 90–94.
84. Vagner, S., Gensac, M.C., Maret, A., Bayard, F., Amalric, F., Prats, H., Prats, A.C. (1995) Mol. Cell. Biol., **15**, 35–44.
85. Bernstein, J., Sella, O., Le, S.Y., Elroy-Stein, O. (1997) J. Biol. Chem., **272**, 9356–9362.
86. Akiri, G., Nahari, D., Finkelstein, Y., Le, S.Y., Elroy-Stein, O., Levi, B.Z. (1998) Oncogene, **17**, 227–236.
87. Pedersen, S.K., Christiansen, J., Hansen, T.O., Larsen, M.R., Nielsen, F.C. (2002) Biochem. J., **363**, 37–44.
88. Ye, X., Fong, P., Iizuka, N., Choate, D., Cavener, D.R. (1997) Mol. Cell. Biol., **17**, 1714–1721.
89. Kim, J.G., Armstrong, R.C., Berndt, J.A., Kim, N.W., Hudson, L.D. (1998) Mol. Cell. Neurosci., **12**, 119–140.
90. Oumard, A., Hennecke, M., Hauser, H., Nourbakhsh, M. (2000) Mol. Cell. Biol., **20**, 2755–2759.
91. Pozner, A., Goldenberg, D., Negreanu, V., Le, S.Y., Elroy-Stein, O., Levanon, D., Groner, Y. (2000) Mol. Cell. Biol., **20**, 2297–2307.
92. Chappell, S.A., Edelman, G.M., Mauro, V.P. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**, 1536–1541.
93. Stoneley, M., Spencer, J.P., Wright, S.C. (2001) Oncogene, **20**, 893–897.
94. Shiroki, K., Ohsawa, C., Sugi, N., Wakiyama, M., Miura, K., Watanabe, M., Suzuki, Y., Sugano, S. (2002) Nucleic Acids Res., **30**, 2851–2861.
95. Maier, D., Nagel, A.C., Preiss, A. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **99**, 15480–15485.
96. Stoneley, M., Paulin, F.E., Le Quesne, J.P., Chappell, S.A., Willis, A.E. (1998) Oncogene, **16**, 423–428.
97. Jopling, C.L., Willis, A.E. (2001) Oncogene, **20**, 2664–2670.
98. Jopling, C.L., Spriggs, K.A., Mitchell, S.A., Stoneley, M., Willis, A.E. (2004) Rna, **10**, 287–298.
99. Johannes, G., Carter, M.S., Eisen, M.B., Brown, P.O., Sarnow, P. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 13118–13123.
100. Cornelis, S., Bruynooghe, Y., De-necker, G., Van Huffel, S., Tinton, S., Beyaert, R. (2000) Mol. Cell, **5**, 597–605.
101. Coldwell, M.J., Mitchell, S.A., Stoneley, M., MacFarlane, M., Willis, A.E. (2000) Oncogene, **19**, 899–905.
102. Holcik, M., Korneluk, R.G. (2000) Mol. Cell. Biol., **20**, 4648–4657.
103. Sherrill, K.W., Byrd, M.P., Van Eden, M.E., Lloyd, R.E. (2004) J. Biol. Chem., **279**, 29066–29074.
104. Henis-Korenblit, S., Strumpf, N.L., Goldstaub, D., Kimchi, A. (2000) Mol. Cell. Biol., **20**, 496–506.
105. Yang, X., Chernenko, G., Hao, Y., Ding, Z., Pater, M.M., Pater, A., Tang, S.C. (1998) Oncogene, **17**, 981–989.
106. Heppner Goss, K., Trzepacz, C., Tuohy, T.M., Groden, J. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **99**, 8161–8166.
107. Rubtsova, M.P., Sizova, D.V., Dmitriev, S.E., Ivanov, D.S., Prassolov, V.S., Shatsky, I.N. (2003) J. Biol. Chem., **278**, 22350–22356.
108. Johannes, G., Sarnow, P. (1998) Rna, **4**, 1500–1513.
109. Pinkstaff, J.K., Chappell, S.A., Mauro, V.P., Edelman, G.M., Krushel, L.A. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98**, 2770–2775.
110. Fernandez, J., Yaman, I., Mishra, R., Merrick, W.C., Snider, M.D., Lamers, W.H., Hatzoglou, M. (2001) J. Biol. Chem., **276**, 12285–12291.
111. Lauring, A.S., Overbaugh, J. (2000) Mol. Cell, **6**, 939–945.
112. Negulescu, D., Leong, L.E., Chandry, K.G., Semler, B.L., Gutman, G.A. (1998) J. Biol. Chem., **273**, 20109–20113.
113. Izquierdo, J. M., Cuezva, J. M. (2000) Biochem. J., **346**, 849–855.
114. Schiavi, A., Hudder, A., Werner, R. (1999) FEBS Lett., **464**, 118–122.
115. Werner, R. (2000) IUBMB Life, **50**, 173–176.

116. Zhou, W., Edelman, G.M., Mauro, V.P. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98**, 1531–1536.
117. Komar, A.A., Lesnik, T., Cullin, C., Merrick, W.C., Trachsel, H., Altmann, M. (2003) Embo J., **22**, 1199–1209.
118. Dorokhov, Y.L., Skulachev, M.V., Ivanov, P.A., Zvereva, S.D., Tjulkina, L.G., Merits, A., Gleba, Y.Y., Hohn, T., Atabekov, J.G. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **99**, 5301–5306.
119. Evstafieva, A.G., Beletsky, A.V., Borovjagin, A.V., Bogdanov, A.A. (1993) FEBS Lett., **335**, 273–276.
120. Kozak, M. (1992) Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., **27**, 385–402.
121. Kozak, M. (1996) Mamm. Genome, **7**, 563–574.
122. Kozak, M. (1998) Nucleic Acids Res., **26**, 4853–4859.
123. Kozak, M. (2000) Genomics, **70**, 396–406.
124. Kozak, M. (2001) Mol. Cell. Biol., **21**, 1899–1907.
125. Kozak, M. (2003) Gene, **318**, 1–23.
126. Gan, W., LaCelle, M., Rhoads, R.E. (1998) J. Biol. Chem., **273**, 5006–5012.
127. Han, B., Zhang, J. T. (2002) Mol. Cell. Biol., **22**, 7372–84.
128. Verge, V., Vonlanthen, M., Masson, J.M., Trachsel, H., Altmann, M. (2004) Rna, **10**, 277–286.
129. Mauro, V.P., Edelman, G.M., Zhou, W. (2004) Rna, **10**, 895–897; discussion 898.
130. Schneider, R., Agol, V.I., Andino, R., Bayard, F., Cavener, D.R., Chappell, S.A., Chen, J.J., Darlix, J.L., Dasgupta, A., Donze, O., Duncan, R., Elroy-Stein, O., Farabaugh, P.J., Filipowicz, W., Gale, M., Jr., Gehrke, L., Goldman, E., Groner, Y., Harford, J.B., Hatzoglou, M., He, B., Hellen, C.U., Hentze, M.W., Hershey, J., Hershey, P., Hohn, T., Holcik, M., Hunter, C. P., Igarashi, K., Jackson, R., Jagus, R., Jefferson, L.S., Joshi, B., Kaempfer, R., Katze, M., Kaufman, R.J., Kiledjian, M., Kimball, S.R., Kimchi, A., Kirkegaard, K., Koromilas, A.E., Krug, R. M., Kruiys, V., Lamphear, B. J., Lemon, S., Lloyd, R.E., Maquat, L.E., Martinez-Salas, E., Mathews, M.B., Mauro, V.P., Miyamoto, S., Mohr, I., Morris, D.R., Moss, E.G., Nakashima, N., Palmenberg, A., Parkin, N.T., Pe'ery, T., Pelletier, J., Peltz, S., Pestova, T.V., Pilipenko, E.V., Prats, A.C., Racaniello, V., Read, G.S., Rhoads, R.E., Richter, J.D., Rivera-Pomar, R., Rouault, T., Sachs, A., Sarnow, P., Scheper, G.C., Schiff, L., Schoenberg, D.R., Semler, B.L., Siddiqui, A., Skern, T., Sonenberg, N., Tahara, S.M., Thomas, A. A., Toulme, J.J., Wilusz, J., Wimmer, E., Witherell, G., Wormington, M. (2001) Mol. Cell. Biol., **21**, 8238–8246.
131. Chen, C.Y., Sarnow, P. (1995) Science, **268**, 415–417.
132. Pilipenko, E.V., Blinov, V.M., Chernov, B.K., Dmitrieva, T.M., Agol, V.I. (1989) Nucleic Acids Res., **17**, 5701–5711.
133. Pilipenko, E.V., Blinov, V.M., Romanova, L.I., Sinyakov, A.N., Maslova, S.V., Agol, V.I. (1989) Virology, **168**, 201–209.
134. Jackson, R.J., Kaminski, A. (1995) Rna, **1**, 985–1000.
135. Kaminski, A., Belsham, G.J., Jackson, R.J. (1994) Embo J., **13**, 1673–1681.
136. Pilipenko, E.V., Gmyl, A.P., Maslova, S.V., Belov, G.A., Sinyakov, A.N., Huang, M., Brown, T.D., Agol, V.I. (1994) J. Mol. Biol., **241**, 398–414.
137. Belsham, G.J. (1992) Embo J., **11**, 1105–1110.
138. Hellen, C.U., Pestova, T.V., Wimmer, E. (1994) J. Virol., **68**, 6312–6322.
139. Pestova, T.V., Hellen, C.U., Wimmer, E. (1994) Virology, **204**, 729–737.
140. Pestova, T.V., Hellen, C.U., Shatsky, I.N. (1996) Mol. Cell. Biol., **16**, 6859–6869.
141. Pestova, T.V., Shatsky, I.N., Hellen, C.U. (1996) Mol. Cell. Biol., **16**, 6870–6878.
142. Lomakin, I.B., Hellen, C.U., Pestova, T.V. (2000) Mol. Cell. Biol., **20**, 6019–6029.

143. Kolupaeva, V.G., Pestova, T.V., Hellen, C.U., Shatsky, I.N. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 18599–18604.
144. Marcotrigiano, J., Lomakin, I.B., Sonenberg, N., Pestova, T.V., Hellen, C.U., Burley, S.K. (2001) *Mol. Cell*, **7**, 193–203.
145. Brown, B.A., Ehrenfeld, E. (1979) *Virology*, **97**, 396–405.
146. Luz, N., Beck, E. (1991) *J. Virol.*, **65**, 6486–6494.
147. Kolupaeva, V.G., Hellen, C.U., Shatsky, I.N. (1996) *Rna*, **2**, 1199–1212.
148. Pilipenko, E.V., Pestova, T.V., Kolupaeva, V.G., Khitina, E.V., Poperechnaya, A.N., Agol, V.I., Hellen, C.U. (2000) *Genes Dev.*, **14**, 2028–2045.
149. Meerovitch, K., Svitkin, Y.V., Lee, H.S., Lejbkowitz, F., Kenan, D.J., Chan, E.K., Agol, V.I., Keene, J.D., Sonenberg, N. (1993) *J. Virol.*, **67**, 3798–3807.
150. Hunt, S.L., Hsuan, J.J., Totty, N., Jackson, R.J. (1999) *Genes Dev.*, **13**, 437–448.
151. Blyn, L.B., Swiderek, K.M., Richards, O., Stahl, D.C., Semler, B.L., Ehrenfeld, E. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11115–11120.
152. Poole, T.L., Wang, C., Popp, R.A., Poigietter, L.N., Siddiqui, A., Collett, M.S. (1995) *Virology*, **206**, 750–754.
153. Rijnbrand, R., Abell, G., Lemon, S.M. (2000) *J. Virol.*, **74**, 773–783.
154. Grace, K., Gartland, M., Karayiannis, P., McGarvey, M.J., Clarke, B. (1999) *J. Gen. Virol.*, **80**, 2337–2341.
155. Hellen, C.U., Sarnow, P. (2001) *Genes Dev.*, **15**, 1593–1612.
156. Wang, C., Stiles, C.D. (1993) *Cell Growth Differ.*, **4**, 871–877.
157. Reynolds, J.E., Kaminski, A., Kettinen, H.J., Grace, K., Clarke, B.E., Carroll, A.R., Rowlands, D.J., Jackson, R.J. (1995) *Embo J.*, **14**, 6010–6020.
158. Lu, H.H., Wimmer, E. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1412–1417.
159. Pestova, T.V., Shatsky, I.N., Fletcher, S.P., Jackson, R.J., Hellen, C.U. (1998) *Genes Dev.*, **12**, 67–83.
160. Spahn, C.M., Kieft, J.S., Grassucci, R.A., Penczek, P.A., Zhou, K., Doudna, J.A., Frank, J. (2001) *Science*, **291**, 1959–1962.
161. Sizova, D.V., Kolupaeva, V.G., Pestova, T.V., Shatsky, I.N., Hellen, C.U. (1998) *J. Virol.*, **72**, 4775–4782.
162. Kolupaeva, V.G., Pestova, T.V., Hellen, C.U. (2000) *Rna*, **6**, 1791–1807.
163. Pestova, T.V., Hellen, C.U. (1999) *Virology*, **258**, 249–256.
164. Shine, J., Dalgarno, L. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 1342–1346.
165. Otto, G.A., Lukavsky, P.J., Lancaster, A.M., Sarnow, P., Puglisi, J.D. (2002) *Rna*, **8**, 913–923.
166. Sasaki, J., Nakashima, N. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 1512–1515.
167. Kanamori, Y., Nakashima, N. (2001) *Rna*, **7**, 266–274.
168. Wilson, J.E., Pestova, T.V., Hellen, C.U., Sarnow, P. (2000) *Cell*, **102**, 511–520.
169. Barends, S., Bink, H.H., van den Worm, S.H., Pleij, C.W., Kraal, B. (2003) *Cell*, **112**, 123–129.
170. Weiland, J.J., Dreher, T.W. (1989) *Nucleic Acids Res.*, **17**, 4675–4687.
171. Mauro, V.P., Edelman, G.M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 422–427.
172. Tranque, P., Hu, M.C., Edelman, G.M., Mauro, V.P. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 12238–12243.
173. Hu, M.C., Tranque, P., Edelman, G.M., Mauro, V.P. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 1339–1344.
174. Chappell, S.A., Owens, G.C., Mauro, V.P. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 36917–36922.
175. Zhou, W., Edelman, G.M., Mauro, V.P. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 4457–4462.
176. Owens, G.C., Chappell, S.A., Mauro, V.P., Edelman, G.M. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 1471–1476.
177. Akbergenov, R., Zhanybekova, S., Kryldakov, R.V., Zhigailov, A., Polimbetova,

- N.S., Hohn, T., Iskakov, B.K. (2004) *Nucleic Acids Res.*, **32**, 239–247.
178. Dorokhov, Yu., L., Ivanov, P.A., Novikov, V.K., Agranovsky, A.A., Morozov, S., Efimov, V.A., Casper, R., Atabekov, J.G. (1994) *FEBS Lett.*, **350**, 5–8.
179. Дорохов Ю.Л., Иванов П.А., Карпова О.В., Скулачев М.В., Родионова Н.В., Фролова О.Ю., Борисова О.В., Атабеков И.Г. (1997) Докл. Акад. наук, **357**, 547–549.
180. Комарова Т.В., Скулачев М.В., Иванов П.А., Ключин А.Г., Дорохов Ю.Л., Атабеков И.Г. (2003) Докл. Акад. наук, **389**, 821–824.
181. Zvereva, S.D., Ivanov, P.A., Skulachev, M.V., Klyushin, A.G., Dorokhov, Y.L., Atabekov, J.G. (2004) *J. Gen. Virol.*, **85**, 1739–1744.
182. Tinton, S.A., Schepens, B., Bruynooghe, Y., Beyaert, R., Cornelis, S. (2004) *Biochem. J.*, электронная публикация от 26.08.2004.
183. Le Quesne, J.P., Stoneley, M., Fraser, G.A., Willis, A.E. (2001) *J. Mol. Biol.*, **310**, 111–126.
184. Bonnal, S., Schaeffer, C., Creancier, L., Clamens, S., Moine, H., Prats, A.C., Vagner, S. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 39330–39336.
185. Mitchell, S.A., Spriggs, K.A., Coldwell, M.J., Jackson, R.J., Willis, A.E. (2003) *Mol. Cell*, **11**, 757–771.
186. Yaman, I., Fernandez, J., Liu, H., Caprara, M., Komar, A.A., Koromilas, A.E., Zhou, L., Snider, M.D., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Hatzoglou, M. (2003) *Cell*, **113**, 519–531.
187. Le, S.Y., Maizel, J.V., Jr. (1997) *Nucleic Acids Res.*, **25**, 362–369.
188. Yang, Q., Sarnow, P. (1997) *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2800–2807.
189. Quevedo, C., Salinas, M., Alcazar, A. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **291**, 560–566.
190. Beretta, L., Singer, N.G., Hinderer, R., Gingras, A.C., Richardson, B., Hanash, S.M., Sonenberg, N. (1998) *J. Immunol.*, **160**, 3269–3273.
191. Marcotrigiano, J., Gingras, A.C., Sonenberg, N., Burley, S.K. (1999) *Mol. Cell*, **3**, 707–716.
192. Gradi, A., Imataka, H., Svitkin, Y.V., Rom, E., Raught, B., Morino, S., Sonenberg, N. (1998) *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 334–342.
193. Pyronnet, S., Imataka, H., Gingras, A.C., Fukunaga, R., Hunter, T., Sonenberg, N. (1999) *Embo J.*, **18**, 270–279.
194. Eichison, D., Milburn, S.C., Ederly, I., Sonenberg, N., Hershey, J.W. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 14806–14810.
195. Lloyd, R.E., Grubman, M.J., Ehrenfeld, E. (1988) *J. Virol.*, **62**, 4216–4223.
196. Ventoso, I., Blanco, R., Perales, C., Carrasco, L. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 12966–12971.
197. Ohlmann, T., Prevot, D., Decimo, D., Roux, F., Garin, J., Morley, S.J., Darlix, J.L. (2002) *J. Mol. Biol.*, **318**, 9–20.
198. Marissen, W.E., Lloyd, R.E. (1998) *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 7565–7574.
199. Clemens, M.J., Bushell, M., Morley, S.J. (1998) *Oncogene*, **17**, 2921–2931.
200. Safer, B. (1983) *Cell*, **33**, 7–8.
201. Rowlands, A.G., Panniers, R., Henshaw, E.C. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 5526–5533.
202. Proud, C.G. (1992) *Curr. Top. Cell. Regul.*, **32**, 243–369.
203. Yoshizawa, F., Kimball, S.R., Vary, T.C., Jefferson, L.S. (1998) *Am. J. Physiol.*, **275**, E814–20.
204. van Sluijters, D.A., Dubbelhuis, P.F., Blommaert, E.F., Meijer, A.J. (2000) *Biochem. J.*, **351**, 545–550.
205. Tinton, S.A., Buc-Calderon, P.M. (1999) *FEBS Lett.*, **446**, 55–59.
206. Martin, M.E., Munoz, F.M., Salinas, M., Fando, J.L. (2000) *Biochem. J.*, **351 Pt 2**, 327–334.
207. Lang, C.H., Kimball, S.R., Frost, R.A., Vary, T.C. (2001) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **33**, 457–473.
208. Gautsch, T.A., Anthony, J.C., Kimball, S.R., Paul, G.L., Layman, D.K.,

- Jefferson, L.S. (1998) *Am. J. Physiol.*, **274**, C406–414.
209. Shah, O.J., Kimball, S.R., Jefferson, L.S. (2000) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **278**, E76–82.
210. Vary, T.C., Kimball, S.R. (2000) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **279**, E1178–1184.
211. Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., Ron, D. (2000) *Mol. Cell.*, **6**, 1099–1108.
212. Brostrom, C.O., Brostrom, M.A. (1998) *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.*, **58**, 79–125.
213. Brostrom, M.A., Brostrom, C.O. (2003) *Cell Calcium*, **34**, 345–363.
214. Morley, S.J., McKendrick, L., Bushell, M. (1998) *FEBS Lett.*, **438**, 41–48.
215. Deckwerth, T.L., Johnson, E.M., Jr. (1993) *J. Cell Biol.*, **123**, 1207–1222.
216. Scott, C.E., Adebodun, F. (1999) *J. Cell Physiol.*, **181**, 147–152.
217. Zhou, B.B., Li, H., Yuan, J., Kirschner, M.W. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6785–6790.
218. Satoh, S., Hijikata, M., Handa, H., Shimotohno, K. (1999) *Biochem. J.*, **342**, 65–70.
219. Bushell, M., McKendrick, L., Janicke, R. U., Clemens, M. J., Morley, S. J. (1999) *FEBS Lett.*, **451**, 332–336.
220. Bushell, M., Wood, W., Clemens, M. J., Morley, S. J. (2000) *Eur. J. Biochem.*, **267**, 1083–1091.
221. Bushell, M., Poncet, D., Marissen, W.E., Flotow, H., Lloyd, R.E., Clemens, M.J., Morley, S.J. (2000) *Cell Death Differ.*, **7**, 628–36.
222. De Gregorio, E., Preiss, T., Hentze, M.W. (1999) *Embo J.*, **18**, 4865–4874.
223. Morino, S., Imataka, H., Svitkin, Y. V., Pestova, T.V., Sonenberg, N. (2000) *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 468–77.
224. Bushell, M., Wood, W., Carpenter, G., Pain, V.M., Morley, S. J., Clemens, M.J. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 23922–23928.
225. Imataka, H., Olsen, H.S., Sonenberg, N. (1997) *Embo J.*, **16**, 817–825.
226. Jeffrey, I.W., Bushell, M., Tilleray, V.J., Morley, S., Clemens, M.J. (2002) *Cancer Res.*, **62**, 2272–2280.
227. Yamanaka, S., Poksay, K.S., Arnold, K.S., Innerarity, T.L. (1997) *Genes Dev.*, **11**, 321–333.
228. Horton, L.E., Bushell, M., Barth-Baus, D., Tilleray, V.J., Clemens, M.J., Hensold, J.O. (2002) *Oncogene*, **21**, 5325–5334.
229. Wang, X., Campbell, L.E., Miller, C.M., Proud, C.G. (1998) *Biochem. J.*, **334**, 261–267.
230. Engelberg-Kulka, H., Sat, B., Reches, M., Amitai, S., Hazan, R. (2004) *Trends Microbiol.*, **12**, 66–71.
231. Sat, B., Hazan, R., Fisher, T., Khaner, H., Glaser, G., Engelberg-Kulka, H. (2001) *J. Bacteriol.*, **183**, 2041–2045.
232. Goldstaub, D., Gradi, A., Bercovitch, Z., Grosmann, Z., Nophar, Y., Luria, S., Sonenberg, N., Kahana, C. (2000) *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 1271–1277.
233. Calandria, C., Irurzun, A., Barco, A., Carrasco, L. (2004) *Virus Res.*, **104**, 39–49.
234. Neumann, F., Krawinkel, U. (1997) *Exp. Cell Res.*, **230**, 252–261.
235. Polunovsky, V.A., Gingras, A.C., Sonenberg, N., Peterson, M., Tan, A., Rubins, J.B., Manivel, J.C., Bitterman, P.B. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 24776–24780.
236. Zimmer, S.G., DeBenedetti, A., Graff, J.R. (2000) *Anticancer Res.*, **20**, 1343–1351.
237. Jiang, H., Coleman, J., Miskimins, R., Miskimins, W.K. (2003) *Cancer Cell Int.*, **3**, 2.
238. Holcik, M., Yeh, C., Korneluk, R.G., Chow, T. (2000) *Oncogene*, **19**, 4174–4177.
239. Holcik, M., Lefebvre, C., Yeh, C., Chow, T., Korneluk, R.G. (1999) *Nat. Cell Biol.*, **1**, 190–192.
240. Nevins, T.A., Harder, Z.M., Korneluk, R.G., Holcik, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 3572–3579.
241. Holcik, M. (2003) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1010**, 249–258.