

МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ С ДОМЕНОМ ХОЛОДОВОГО ШОКА В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

© 2004 г. М. А. СКАБКИН, О. В. СКАБКИНА,
Л. П. ОВЧИННИКОВ

Институт белка РАН, Пущино, Московская область

I. Введение. II. Главные белки холодового шока бактерий. III. Эукариотические белки с доменом холодового шока. IV. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Живые организмы от бактерий до человека содержат семейство белков с очень консервативной аминокислотной последовательностью длиной около 70 аминокислотных остатков. Бактериальные белки этого семейства состоят только из этой последовательности и имеют молекулярную массу около 7 кДа. Синтез нескольких из них активируется в десятки раз при понижении температуры окружающей среды (холодовой шок). Они служат для адаптации бактерий к росту при низких температурах и получили название «главные белки холодового шока» (major CSP, Cold Shock Proteins) [240]. Высокоомологичная бактериальным белкам аминокислотная последовательность в составе более крупных эукариотических представителей семейства была названа доменом холодового шока (CSD, Cold Shock Domain) [214, 231]. У эукариот белки с CSD (CSD-белки) обнаружены в митохондриях, ядре и цитозоле и содержат от одного до пяти CSD, наряду с другими доменами, различающимися по своему строению у разных членов этого семейства (рис. 1). Растительные CSD-белки, подобно бактериальным, способствуют адаптации растений к низким температурам [98].

Адрес для корреспонденции: ovchinn@vega.protres.ru

Работа поддержана грантами РФФИ № 01-04-49038, № НШ-1959.2003.4, № 03-04-06645-мас, грантом по Программе Президиума РАН по физико-химической биологии, грантом по Программе Президиума РАН «Фундаментальная наука медицине».

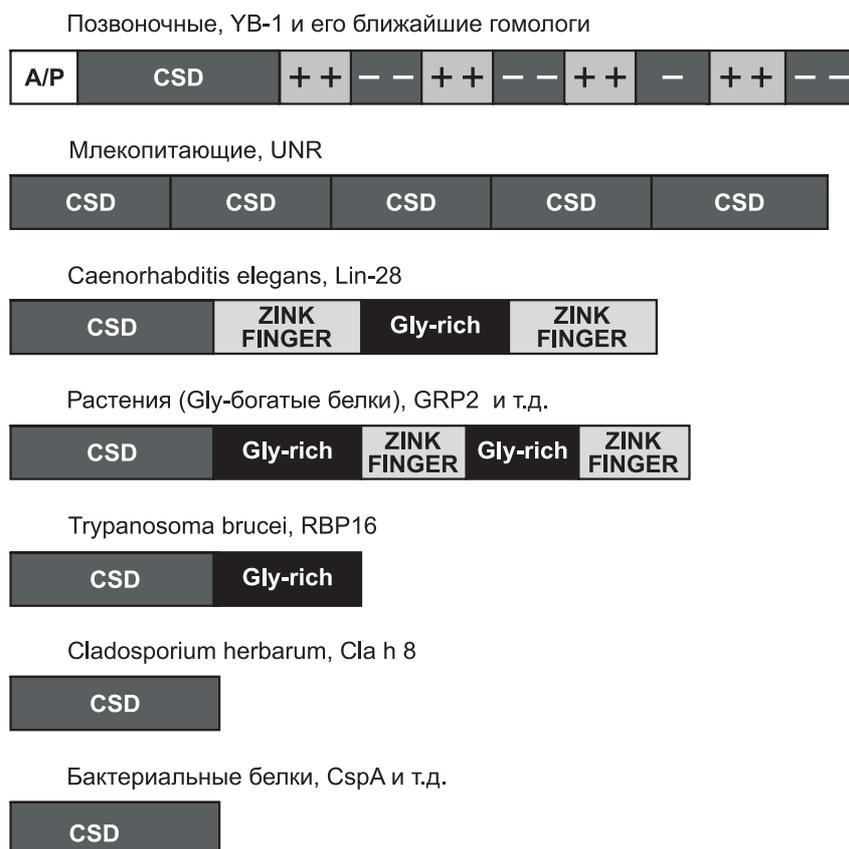


Рис. 1. Краткая схема строения различных представителей семейства белков с доменом холодного шока.

CSD — домен холодного шока; Gly-rich — домен с высоким содержанием глицина; A/P — домен с высоким содержанием аланина и пролина; ZINK FINGER — участок белка, содержащий мотивы «цинковые пальцы». Знаками «+» и «-» отмечены кластеры положительно и отрицательно заряженных аминокислот.

Все исследованные CSD-белки обладают высоким средством как к ДНК, так и к РНК и могут связываться с любыми нуклеотидными последовательностями, хотя оказывают определенное предпочтение некоторым специфическим мотивам, особенно в составе одноцепочечных участков нуклеиновых кислот [133, 161]. Возможно, что именно

в силу большего сродства к одноцепочечным участкам бактериальные и эукариотические CSD-белки существенно понижают температуру плавления двойных спиралей РНК и ДНК [42, 249]. Предполагается, что благодаря своей плавающей способности, CSD-белки компенсируют «замораживающее» действие низких температур на вторичную структуру нуклеиновых кислот и возвращают нуклеиновым кислотам тот уровень структурной подвижности, который они имели при оптимальных физиологических температурах и который необходим для их нормального функционирования [89]. Для одного из CSD-белков млекопитающих (p50) было показано, что он может не только понижать температуру плавления двухцепочечных участков нуклеиновых кислот, но тысячекратно ускорять отжиг длинных взаимодополнительных цепей, а также катализировать их обмен в дуплексах до получения наиболее протяженных и совершенных двойных спиралей [199]. Вполне вероятно, что именно эти свойства белков рассматриваемого семейства лежат в основе многочисленных функций, выполняемых ими в РНК- и ДНК-зависимых процессах. Эти функции суммированы на рис. 2. Связываясь с ДНК в бактериях и эукариотах,



Рис. 2. Основные функции белков с доменом холодового шока.

белки работают как факторы транскрипции и активируют, а иногда подавляют экспрессию большого количества генов, участвующих в клеточном делении, дифференцировке и кодирующих разнообразные защитные белки [212]. CSD-белки эукариот могут участвовать в процессах репарации, репликации и, возможно, рекомбинации ДНК [102]. Один из CSD-белков эукариот (YB-1) связывается с предшественниками эукариотических мРНК в клеточном ядре и принимает участие в сплайсинге [21, 209]. Этот же белок в цитоплазме упаковывает мРНК в мРНК (информосомы) и осуществляет глобальный позитивный и негативный контроль трансляции мРНК, а также стабилизирует мРНК, защищая ее от экзонуклеаз [161]. Митохондриальный белок с доменом холодного шока RBP16 участвует в процессе редактирования мРНК [164].

На физиологическом уровне, как уже было сказано выше, бактериальные и растительные CSD-белки помогают выживанию организмов при низких температурах окружающей среды. YB-1 млекопитающих повышает устойчивость клеток к ультрафиолету и токсическим химическим агентам, повреждающим ДНК, а переход этого белка из цитоплазмы в клеточное ядро рассматривается как наиболее ранний маркер множественной лекарственной устойчивости [102]. Недавно было показано, что YB-1 защищает клетки от онкогенной трансформации по инозитол-3-фосфат-/Akt-киназному пути, выполняя функцию супрессора опухоли [5].

Несмотря на то, что CSD-белки широко распространены в живом мире от бактерий до человека, в геномах некоторых организмов гены таких белков не обнаружены [240]. К таким организмам относятся археобактерии. Предполагается, что археобактериям CSD-белки не нужны, поскольку они обычно обитают при высоких и стабильно поддерживаемых температурах. Однако ни одного гена CSD-белков пока не обнаружено и у пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. До сих пор нет ответа на вопрос, почему такие важные для других организмов гены отсутствуют в дрожжах, и чем компенсируется их отсутствие.

История изучения CSD-белков насчитывает не более 15 лет. Функции большинства членов этого семейства пока не исследованы. Наиболее хорошо изучены к настоящему времени некоторые бактериальные белки семейства, прежде всего в *Escherichia coli*, а также эукариотические представители подсемейства YB-1. Именно об этих белках, в основном, и пойдет речь в данном обзоре.

II. ГЛАВНЫЕ БЕЛКИ ХОЛОДОВОГО ШОКА БАКТЕРИЙ

Резкое понижение температуры при выращивании бактериальных культур приводит к временной остановке их роста, а затем к его постепенному возобновлению после определенного периода адаптации [92, 153]. Чем сильнее понижается температура, тем продолжительнее период адаптации и тем меньше скорость последующего роста культуры. Более того, существует предельно низкая температура, ниже которой адаптация становится невозможной. Например, для *E. coli*, у которой оптимальная температура роста около 37 °С, процесс адаптации начинает наблюдаться при температурах ниже 20 °С, а предельно минимальная температура для адаптации составляет около 8 °С. Что же происходит в период адаптации? Понижение температуры значительно ингибирует многие клеточные процессы, прежде всего те, которые связаны с реализацией генетической информации – транскрипцию и трансляцию [17, 52, 195]. Сравнительно недавно было показано, что при резком понижении температуры до величин, близких к критическим для адаптации, наблюдается полная остановка синтеза всех ранее синтезированных белков, и начинается активный синтез нескольких (четырёх в случае *E. coli*) низкомолекулярных белков, сходных по электрофоретической подвижности, но отличающихся по изоэлектрической точке [90, 240]. Именно эти белки, оказавшиеся близкими гомологами, были названы главными белками холодового шока (major CSP). Вскоре после начала синтеза главных CSP активируется синтез еще около двух десятков разных негомологичных белков холодового шока, участвующих в процессе адаптации бактерий. Среди них преобладают белки, задействованные в структурных переходах и превращениях нуклеиновых кислот, такие как РНК-хеликаза DeaD, белки RbfA, GyrA, H-NS, Hub, RecA и т.д. (см. обзор [68]). Наконец, спустя 3-4 часа после понижения температуры постепенно восстанавливается синтез тех белков, которые синтезировались при оптимальных условиях роста, и возобновляется рост и размножение клеток [92, 153, 219]. Повышенная экспрессия главных CSP при низких температурах является необходимым условием адаптации бактерий к росту и размножению в этих изменившихся условиях.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ГЛАВНЫХ БЕЛКОВ ХОЛОДОВОГО ШОКА И ИХ ГОМОЛОГОВ У БАКТЕРИЙ

В клетках *E. coli* содержится девять открытых рамок считывания, кодирующих высокогомологичные аминокислотные последовательности, в том числе главные белки холодового шока (табл. 1). Эти гены получили сокращенное обозначение от *cspA* до *cspI*. Было показано,

Таблица 1.
Гены CSD-белков *Escherichia coli*

Ген	Протяжен- ность ко- дируемого белка, а.о.	Степень идентичнос- ти кодируе- мого белка с CspA	pI ко- дируе- мого белка	Индук- ция при холодо- вом шоке	Функции	Лите- ратура
CspA	70	—	5,5	да	1) регуляция транскрипции 2) регуляция трансляции	[91, 111] [14, 68]
CspB	71	80%	7,6	да	не известны	[116]
CspC	69	69%	7,6	нет	1) регуляция транскрипции 2) участвует в правильном расхождении бактериального нуклеоида при делении клеток (?) 3) поддержание бактериаль- ного нуклеоида в конденса- рованном состоянии	[6] [238] [80]
CspD	74	49%	5,8	нет	регуляция репликации бактериальной ДНК	[243]
CspE	69	70%	9,4	нет*	1) регуляция транскрипции 2) стабилизация мРНК 3) участвует в правильном расхождении бактериального нуклеоида при делении клеток (?) 4) поддержание бактериаль- ного нуклеоида в конденса- рованном состоянии	[6, 70] [47] [238] [80]
CspF	70	44%	9,9	нет	не известны	[240]
CspG	70	73%	5,6	да	не известны	[149]
CspH	70	47%	10,7	нет	не известны	[240]
CspI	70	70%	6,1	да	не известны	[227]

* — хотя CspE обычно не рассматривается как белок, индуцирующийся при холодовом шоке, его количество при понижении температуры увеличивается в 2–3 раза [236].

что все девять генов рассматриваемого семейства способны экспрес-
сировать соответствующие белковые продукты [59, 116, 149, 227, 236,
238, 239]. Все гены, за исключением *cspA*, кластеризованы и распо-
ложены на бактериальной хромосоме вблизи сайта терминации
репликации на 34 минуте. Ген *cspA*, наоборот, максимально удален

от этого кластера и располагается рядом с местом начала репликации ДНК на 84 минуте [240].

Все белки семейства имеют примерно одинаковый размер – от 69 до 74 аминокислотных остатков (а. о.), но характеризуются очень широким диапазоном значений изоэлектрических точек (pI) – от 5,5 до 10,7 (табл. 1). Степень идентичности по аминокислотной последовательности белку CspA колеблется у остальных белков семейства от 80% (CspB) до 44% (CspF). Высокая гомология последовательностей и кластеризация на хромосоме позволили предположить, что большая часть генов семейства главных белков холодового шока могла проистойти в результате дупликации исходного гена-предшественника [240].

Несмотря на значительное сходство аминокислотной последовательности белков этого семейства у *E. coli*, отдельные его представители синтезируются при разных физиологических условиях и выполняют, по всей вероятности, несколько разные функции. При холодовом шоке сильно активизируется синтез белков CspA, CspB, CspG и CspI, которые участвуют в адаптации бактериальных клеток [59, 116, 149, 227]. Наиболее активно среди них синтезируется CspA, и доля радиоактивного метионина, включенного в этот белок при холодовом стрессе, достигает 13%. Ни один из CSD-белков сам по себе не является критичным для выживания клеток при низких температурах – серьезные нарушения в адаптации наступают только при удалении трех основных индуцируемых генов *cspA*, *cspB* и *cspG*, а также *cspE*, продукт которого хотя и присутствует в клетках при оптимальных температурах, но также немного повышает свой уровень при холодовом шоке [236]. Более того, делецию перечисленных четырех генов можно супрессировать перепроизводством любого члена семейства CSD-белков *E. coli*, за исключением CspD. Эти данные свидетельствуют о сильном перекрывании функции CSD-белков, выполняемых ими, по крайней мере в процессе адаптации к росту при низких температурах.

О функциях остальных членов семейства имеются только фрагментарные сведения. Например, было показано, что синтез белка CspD индуцируется в стационарной фазе роста клеток и при недостатке глюкозы [239]. На синтез CspD позитивно влияет универсальный эффектор ppGpp, уровень которого повышается при недостатке источников питания. В то же время перепроизводство CspD вызывает гибель клеток, возможно, за счет подавления репликации бактериальной ДНК [243]. Белок CspE, помимо участия в адаптации клеток к холодовому шоку, супрессирует негативное действие камфоры, вызывающей деконденсацию клеточного нуклеоида [80]. Предполагается, что CspE способствует поддержанию ДНК нуклеоида в конденсированном состоянии.

Поиск гомологичных генов у других прокариот обнаружил их широкое распространение у эубактерий, имеющих разные температурные оптимумы роста, включая термофилов, мезофилов, психротрофов и психрофилов [240]. У *Bacillus subtilis* имеется три гена этого семейства – *cspB*, *cspC* и *cspD*, которые кодируют белки со степенью идентичности по аминокислотной последовательности более 70% [63, 230]. У некоторых бактерий, таких как *Haemophilus influenzae*, обнаружено по одному гену CSD-белков [48]. Ряд прокариотических организмов не имеет их вовсе. К последним принадлежат *Mycoplasma genitalium* [51], *Mycoplasma pneumoniae* [77], *Methanococcus jannaschi* [18], *Helicobacter pylori* [222] и некоторые другие. Эубактерии и архебактерии, не имеющие генов CSD-белков, обычно обитают в стабильных условиях окружающей среды, в том числе температурных, и, по-видимому, не нуждаются в белках этого семейства, необходимых для адаптации к стрессовым условиям.

СТРУКТУРА ГЛАВНЫХ БЕЛКОВ ХОЛОДОВОГО ШОКА БАКТЕРИЙ

Как уже было сказано выше, бактериальные CSD-белки состоят только из одного домена холодого шока. Характерной особенностью CSD является наличие двух консенсусных мотивов РНП-1 (K/N-G-F/Y-G-F-I/V) и РНП-2 (V-F-V-H-F) [113, 240] (рис. 3а). Эти мотивы обогащены ароматическими остатками и необходимы для связывания с нуклеиновыми кислотами (см. ниже). Пространственная структура была определена для нескольких бактериальных CSD-белков: для CspA *E. coli* – методом рентгеноструктурного анализа [188] и ЯМР [152]; для CspB *B. subtilis* – методом рентгеноструктурного анализа [187] и ЯМР [192]; для Csp *B. caldolyticus* – методом рентгеноструктурного анализа [144]; для Csp *Thermotoga maritima* – методом ЯМР [107]. Все известные пространственные структуры бактериальных CSD-белков очень схожи и состоят из пяти β -тяжей (рис. 3б). Эти β -тяжи формируют два антипараллельных β -листа: один β -лист образован тяжом $\beta 1$ (ближайшим к N-концу белка) вместе с тяжами $\beta 2$ и $\beta 3$, а другой – тяжами $\beta 4$ и $\beta 5$. Эти два β -листа в пространстве прилегают друг к другу так, что образуется бочонкообразная структура, называемая β -баррелем. При формировании такой структуры β -тяжи укладываются по типу «греческого ключа». Хотя структуры различных CSD-белков почти совпадают, некоторые отличия между ними наблюдаются в основном в петлях, соединяющих β -тяжи, и прежде всего в протяженной петле между $\beta 3$ и $\beta 4$. Образующий β -баррель очень компактен. РНП-1 и РНП-2 консенсусы находятся, соответственно, на $\beta 2$ и $\beta 3$ тяжах и оказываются сближенными в пространстве.

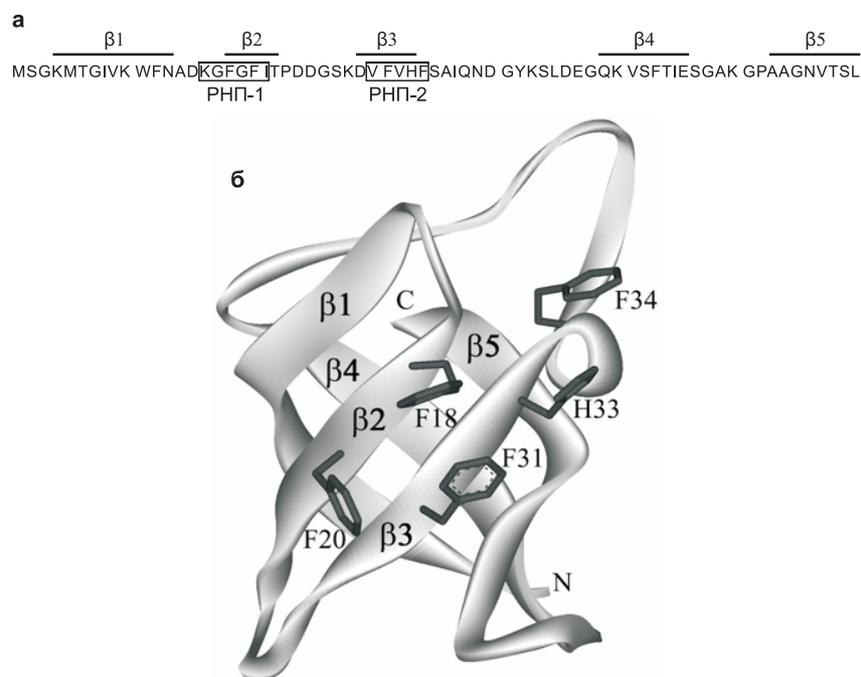


Рис. 3. Структура главного белка холодового шока *E. coli* CspA.

а) Первичная структура CspA [59]. Линиями отмечены последовательности β-тяжей. Прямоугольной рамкой выделены консенсусные мотивы РНП-1 и РНП-2.

б) Пространственная структура CspA [152, 188]. Показаны боковые цепи ароматических аминокислотных остатков, которые входят в состав РНП мотивов и образуют гидрофобный кластер на поверхности белка.

CSD имеет укладку, почти совпадающую с доменом S1 бактериального рибосомного белка S1, хотя между ними отсутствует гомология по первичной структуре [19]. Негомологичные домены с укладкой, как у S1, были также идентифицированы в полинуклеотидфосфорилазе (PNP, polynucleotide phosphorylase), факторах инициации трансляции IF1 и eIF2α, в дрожжевой РНК-хеликазе PRP22, в РНКазе E и многих других белках. Все эти домены были объединены в группу с так называемой укладкой ОВ (oligonucleotide/oligosaccharide binding fold) [19, 148]. Основным признаком этой группы доменов является укладка в β-баррель, состоящий из пяти антипараллельных β-тяжей. Оказалось, что сходство между ОВ доменами перечисленных белков не ограничивается близким сходством пространственной структуры.

Негомологичные домены этой группы белков могут выполнять сходные функции и заменять друг друга в некоторых процессах. Например, делеция генов CSD-белков *E. coli*, приводящая к нарушению процесса адаптации клеток к росту при низких температурах, может быть супрессирована за счет экспрессии ОВ домена белка PNP с плазмиды [236], а делеция генов CSD-белков *B. subtilis*, вызывающая нарушения роста и споруляции при нормальных температурах, супрессирована за счет дополнительного синтеза фактора инициации трансляции IF1 [229].

Особенностью структуры CSD является то, что РНП консенсусы обогащены ароматическими остатками, которые в основном располагаются на поверхности белка. У CspA это остатки — Phe¹⁸, Phe²⁰, Phe³¹, His³³, Phe³⁴ (рис. 3б). Они очень консервативны и присутствуют в CSD не только белков из *E. coli*, но и других организмов. Эти остатки формируют на поверхности CSD гидрофобный кластер необычно большого размера — около 790 Å², в то время как в большинстве случаев у других белков он не превышает 350 Å² [76, 152]. Хотя обычно расположение гидрофобных аминокислот на поверхности вызывает дестабилизацию структуры белка, гидрофобный участок на поверхности CSD-белков, наоборот, по-видимому, стабилизирует структуру CSD, и замена ароматических остатков в кластере на другие аминокислоты, как полярные, так и неполярные, снижает общую стабильность CSD-белков [76, 176, 190]. Точная причина стабилизирующего действия гидрофобного кластера на структуру CSD-белков неизвестна, но предполагается, что большую роль здесь может играть сеть гидрофобных взаимодействий между ароматическими остатками кластера, которая нарушается при замене их на другие остатки.

Денатурация CSD-белков *in vitro* идет в одну стадию без промежуточных состояний. Процессы денатурации и ренатурации CSD-белков происходят с очень высокими скоростями (характерное время рефолдинга для разных членов семейства 1–5 мс) [174, 189]. Разница в энергии между денатурированным и нативным состояниями у CSD-белков составляет всего 10–12 кДж/моль, что приводит к значительной нестабильности их структуры при физиологических температурах [174, 189]. В результате *in vitro*, даже при 25 °С в отсутствие денатурирующих агентов, несколько процентов CSD-белков пребывает в денатурированном состоянии [191]. Внутри клетки CSD-белки гораздо более стабильны, вероятно, за счет взаимодействия с нуклеиновыми кислотами.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЛАВНЫХ БЕЛКОВ ХОЛОДОВОГО ШОКА
БАКТЕРИЙ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

В ряде исследований было показано, что CSD-белки могут связывать как ДНК, так и РНК, проявляя значительное предпочтение к одноцепочечным участкам [62, 89]. Изучение комплексов природных и мутированных CSD-белков с нуклеиновыми кислотами различными методами, включая ЯМР и метод замедления подвижности нуклеиновых кислот в геле, позволило идентифицировать аминокислотные остатки, вовлеченные в связывание ДНК и РНК [152, 193, 250]. Оказалось, что все эти остатки находятся на одной поверхности β -барреля, образованной $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 3$ тяжами. В основном это ароматические остатки в РНП-1 и РНП-2 консенсусах, образующие вышеупомянутый гидрофобный кластер. Другая часть остатков, принимающих участие в связывании РНК и ДНК, располагается в протяженной петле, соединяющей $\beta 3$ и $\beta 4$ тяжи. Предполагается, что боковые группы ароматических остатков могут интеркалировать между азотистыми основаниями и участвовать в стэкинг-взаимодействии.

Сродство CSD-белков к одноцепочечным ДНК (оцДНК) и одноцепочечным РНК (оцРНК) невелико, и для обоих комплексов константы диссоциации находятся в пределах 10^{-6} – 10^{-5} М [123, 124, 165]. CSD-белки связываются с нуклеиновыми кислотами кооперативно, отдавая небольшое предпочтение некоторым нуклеотидным последовательностям [63, 89]. Например, сообщалось, что белок CspA *E. coli* специфически взаимодействует с регуляторными участками гена *gugA*, кодирующего ДНК гиразу, и гена *hns*, кодирующего белок, ассоциированный с нуклеоидом [91, 111]. CspB *B. subtilis* проявляет более высокое сродство к последовательностям, обогащенным пиримидиновыми основаниями [123, 125].

CSD-белки прокариот способны плавить вторичную структуру РНК [89]. Причем в отличие от РНК-хеликаз, расплетающих РНК за счет гидролиза АТФ, CSD-белки не требуют для этой активности дополнительных источников энергии. Точный механизм этого процесса неизвестен, но, возможно, он основан на более высоком сродстве CSD-белков к одноцепочечной форме РНК. Связывание белка с одноцепочечными участками приводит к постепенному сдвигу равновесия, существующего в растворе, в сторону накопления расплавленных структур. В случае белка CspE было показано, что для его РНК-плавящей активности наиболее критичны аминокислотные остатки Phe¹⁷, Phe³⁰ и His³² [167]. Все они находятся в РНП консенсусах, участвуют в образовании гидрофобного кластера на поверхности белка и взаимодействуют с нуклеиновыми кислотами (см. выше). Для проявления РНК-плавящей активности, по-видимому, важна спо-

способность боковых групп аминокислотных остатков интеркалировать между основаниями РНК, поскольку замена His³² на Arg, не влияющая на сродство белка к РНК, сильно ингибирует плавление вторичной структуры РНК белком CspE [166].

МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ CSD-БЕЛКОВ НА АДАПТАЦИЮ БАКТЕРИЙ К РОСТУ ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Специфическое сродство CSD-белков к определенным нуклеотидным последовательностям ДНК в промоторных участках некоторых генов и их способность влиять на структуру ДНК в месте связывания обуславливают то, что CSD-белки действуют как факторы транскрипции целого ряда генов, в том числе генов, отвечающих за процесс адаптации бактерий к росту и размножению при низких температурах [40, 68]. CspA при понижении температуры повышает транскрипцию двух генов холодового шока: *hns*, кодирующего белок нуклеоида [111], и *gyrA*, кодирующего субъединицу А фермента ДНК гиразы [91]. Оба этих белка участвуют в регуляции структуры ДНК и существенны для адаптации клеток [35, 91]. Не исключено, что CSD-белки могут также регулировать транскрипцию ряда других, пока неустановленных генов, участвующих в ответе клеток на холод.

В двух вышеперечисленных случаях CSD-белки стимулируют транскрипцию генов, связываясь с их промоторными участками. Однако оказалось, что эти белки могут также способствовать экспрессии генов, ингибируя процесс преждевременной терминации транскрипции. Ряд генов, синтезирующихся в ответ на холодовой шок и участвующих в адаптации клеток, такие как *nusA*, *infB*, *rbfA* и *pnp*, организованы в один оперон [184]. При оптимальной температуре роста эти дистально расположенные гены оперона не транскрибируются из-за преждевременной терминации транскрипции по р-независимому механизму. r-Независимый терминатор представляет собой РНК-шпильку, образующуюся на синтезирующейся мРНК. Эта шпилька препятствует дальнейшему движению РНК-полимеразы по матрице ДНК и приводит к ее диссоциации из комплекса с ДНК матрицей. При понижении температуры с 37 °С до 15 °С происходит накопление CSD-белков, их связывание с растущей цепью РНК, предотвращение образования шпилечной терминаторной структуры на РНК или ее плавление и продолжение транскрипции дистальных цистронов полицистронной мРНК [166]. Функцию антитерминаторов выполняют прежде всего CSD-белки CspE и CspA [6].

РНК-плавящая активность CSD-белков может быть также важна для трансляции мРНК. Более развитая и стабильная при низких температурах вторичная структура мРНК, в отсутствие CSD-белков, может препятствовать присоединению рибосомы и ее движению вдоль

мРНК, что должно приводить к подавлению трансляции [67]. Плавая вторичную структуру мРНК, CSD-белки должны способствовать преодолению отрицательного эффекта стабилизации структуры мРНК на трансляцию [64, 89]. Эта гипотеза активно обсуждается в научной литературе на протяжении последних пяти лет, однако экспериментальные данные, поддерживающие ее, пока отсутствуют. Косвенно в ее пользу свидетельствует тот факт, что выключение синтеза CSD-белков в результате делеции их генов в клетках *B. subtilis* приводит к ингибированию общего уровня синтеза белков при низких температурах [63].

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ГЛАВНЫХ БЕЛКОВ ХОЛОДОВОГО ШОКА

Экспериментальные данные, полученные при изучении механизмов синтеза CSD-белков при понижении температуры (см. обзор [68]), носят несколько противоречивый характер. Вначале полагали, что этот синтез происходит главным образом за счет усиления транскрипции генов CSD-белков, особенно гена *cspA* [217]. Однако дальнейшие исследования показали, что в повышении уровня синтеза CSD-белков транскрипционный контроль не играет заметной роли. При замене промотора гена *cspA* на неиндуцируемые промоторы других генов индукция экспрессии этого гена в ответ на холодовой шок сохранялась [14, 57, 140]. Авторы пришли к заключению, что синтез CspA, а также, вероятно, и других CSD-белков регулируется на посттранскрипционном уровне. Выяснилось, что усиление синтеза CSD-белков при низких температурах происходит главным образом за счет повышения концентрации мРНК этих белков в результате избирательной, очень сильной стабилизации. Так, при 37 °C время полураспада мРНК *cspA* составляет около 10 с, а при 15 °C оно возрастает до 10-15 мин [46, 56]. Поиск последовательности мРНК *cspA*, отвечающей за такую значительную стабилизацию, показал, что основную роль в этом процессе играет 5' НТО (5' нетранслируемая область) мРНК *cspA* [14, 46, 237]. Мутации всего трех нуклеотидов рядом с последовательностью Шайна-Дальгарно перед стартовым кодоном AUG в 150 раз повышали время жизни мРНК *cspA* при 37 °C [46], тогда как удаление небольшой шпильки в самом начале этой мРНК понижало ее стабильность при холодовом шоке [237]. Наиболее вероятным ферментом, осуществляющим быструю деградацию мРНК *cspA* при оптимальных температурах, является РНКаза E – ее выключение в клетках приводило к накоплению этой мРНК [46].

Еще одним фактором, способствующим увеличению синтеза CSD-белков в ответ на холодовой шок, является повышение эффективности трансляции их мРНК. В экстрактах бактериальных клеток,

подвергшихся холодовому шоку, мРНК *cspA* транслировалась значительно более эффективно, чем в экстракте из необработанных клеток. Этого не наблюдалось с мРНК белков, не индуцирующихся при холодом шоке [14]. До сих пор неизвестны полностью механизмы, способствующие повышению активности мРНК CSD-белков в трансляции по сравнению с мРНК других белков при понижении температуры. Вероятно, это результат действия нескольких факторов.

Во-первых, 5' НТО мРНК CSD-белков сама по себе имеет повышенное сродство к бактериальным рибосомам. Было показано, что ее перепроизводство с плазмиды при холодом шоке может уводить рибосомы из трансляции и препятствовать возобновлению синтеза нешоковых клеточных белков по завершении стадии акклиматизации [88, 235]. Интересно то, что сами рибосомы из клеток, подвергшихся охлаждению, приобретают склонность к преимущественной трансляции мРНК CSD-белков, хотя по белковому составу они ничем не отличаются от рибосом из обычных клеток [14, 68].

Во-вторых, преимущественная трансляция мРНК CSD-белков в период акклиматизации к низким температурам может быть результатом действия дополнительных белков, синтезирующихся или модифицирующихся в таких условиях. Например, было показано, что сам белок *CspA*, накапливающийся в начальной стадии периода акклиматизации, стимулирует трансляцию мРНК CSD-белков [14, 68]. Среди белков, синтезирующихся в период акклиматизации, обнаружены факторы инициации трансляции IF1, IF2 и IF3, из которых IF3 оказывает наиболее сильный стимулирующий эффект на трансляцию мРНК белков холодом шока [68].

Запуск синтеза CSD-белков — это только первая стадия сложного процесса акклиматизации бактериальных клеток к росту и размножению при низких температурах. По прошествии определенного времени синтез индуцированных CSD-белков прекращается параллельно с возобновлением синтеза обычных клеточных белков. Исследования показали, что выключение синтеза CSD-белков происходит в результате усиления деградации их мРНК к концу периода акклиматизации. В отличие от деградации мРНК CSD-белков при 37 °С, происходящей главным образом под действием рибонуклеазы E, в конце периода акклиматизации деградацию этих мРНК осуществляет преимущественно полинуклеотидфосфорилаза (PNP) [151, 241]. Этот фермент катализирует фосфоролит мРНК в направлении 3' → 5' и, наряду с другими РНКазами и РНК-хеликазами, входит в состав мультикомпонентного белкового комплекса (деградасомы), расщепляющего большинство мРНК бактериальной клетки (см. обзор [24]). Фермент PNP сама является белком холодом шока, индуцирующимся при

понижении температуры [10, 90]. Однако, в отличие от большинства других CSD-белков, максимальный синтез PNP наступает только к концу периода акклиматизации [248].

После открытия в 1987 г. первого бактериального CSD-белка CspA считалось, что он появляется в клетках только в ответ на холодовой шок и полностью отсутствует при оптимальных температурах роста. Поэтому большой неожиданностью стало сообщение из лаборатории К. Гуалерзи об обнаружении этого белка во вполне детектируемых количествах в клетках *E. coli*, растущих при 37 °C [15]. В предыдущих исследованиях уровень CspA оценивали по количеству включившейся радиоактивной аминокислоты в белок, выявляемый как пятно на двумерной гель-электрофореграмме. Сравнение электрофореграмм меченых белков растущих клеток и клеток, проходящих акклиматизацию, позволяет говорить об увеличении скорости синтеза этого белка, но не дает информации о его содержании в клетках. Определение содержания CspA с помощью иммуноблоттинга позволило получить информацию о суммарном количестве белка. Оказалось, что содержание белка CspA сильно изменяется в зависимости от фазы роста бактериальной культуры при оптимальной температуре: уровень максимален на ранней фазе экспоненциального роста. В этот период концентрация белка в клетке составляла около 50 мкМ или $\sim 5 \times 10^5$ молекул на клетку и падала до почти недетектируемых количеств в поздней фазе роста культуры. Похожим образом меняется концентрация мРНК *cspA*. Это достигается за счет того, что на ранней фазе экспоненциального роста бактериальной культуры скорость синтеза этой РНК выше, а скорость ее распада ниже, чем в последующий период. Соответственно, уровень индукции CspA при холодовом шоке сильно зависит от фазы роста клеточной культуры, в которой происходит понижение температуры. Для клеток на начальной фазе роста стимуляция синтеза CspA оказалась не такой значительной, как считалось ранее. Гораздо большая индукция CspA наблюдалась в клетках, находившихся в поздней фазе роста культуры. Разведение культуры клеток свежей порцией среды также ведет к повышению уровня CspA, из чего был сделан вывод, что CspA чувствителен к количеству питательных ресурсов и при их избытке запускается синтез этого белка [15, 242]. У *B. subtilis* все три гена CSD-белков *cspB*, *cspC* и *cspD* важны для жизнедеятельности клеток как при холодовом шоке, так и при оптимальной температуре роста — удаление двух из этих генов сильно уменьшает скорость роста, а удаление всех трех генов приводит к гибели клеток при любых условиях [63]. Пока неизвестно, какие функции выполняют бактериальные CSD-белки при оптимальных условиях окружающей среды.

III. ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ БЕЛКИ С ДОМЕНОМ ХОЛОДОВОГО ШОКА

ОБНАРУЖЕНИЕ CSD-БЕЛКОВ У ЭУКАРИОТ

Первые эукариотические белки этого семейства были описаны еще в начале 70-х годов прошлого века как мажорные компоненты цитоплазматических мРНК из ретикулоцитов млекопитающих (кролик) [11] и птиц (утка) [141, 142]. Белки имели электрофоретическую подвижность при SDS-гель электрофорезе, соответствующую белкам с молекулярной массой около 50 кДа, и несколько позже получили название р50. Дальнейшие исследования привели к обнаружению сходных по электрофоретической подвижности белков в качестве мажорных компонентов цитоплазматических мРНК из различных типов клеток, включая клетки KB [121], HeLa [109], асцитной карциномы Эрлиха [226], клетки почки [82], ооциты *Xenopus* [30] и некоторые другие [86]. Эти результаты продемонстрировали универсальный характер белка р50 в качестве мажорного белка мРНК позвоночных. Секвенирование белков из *Xenopus* [146] и кролика [42] показало их высокую гомологию по аминокислотной последовательности и позволило установить их принадлежность к семейству белков с доменом холодового шока.

Независимо эти белки были обнаружены как ДНК-связывающие факторы, взаимодействующие с регуляторными элементами некоторых генов. В 1988 г. почти одновременно и независимо друг от друга американская [38] и японская [182] группы исследователей провели скрининг экспрессируемой библиотеки кДНК человека на основе вектора *lg t11*, используя в качестве пробы для поиска специфически связывающихся экспрессируемых белков фрагмент ДНК, содержащий промоторный участок генов главного комплекса гистосовместимости класса II (МНС II) с Y-бокс мотивом [38] или энхансер гена, кодирующего рецептор эпидермального фактора роста человека [182]. Американская группа обнаружила при скрининге и секвенировала по кДНК белок, получивший название YB-1 (Y-box binding protein). Японская группа обнаружила два гомологичных белка, названных dbpA и dbpB (DNA-binding protein). Оказалось, что dbpB полностью идентичен YB-1, а dbpA гомологичен YB-1/dbpB примерно на 46%. Оба белка, dbpA и dbpB, содержали недалеко от N-конца последовательность CSD.

Большинство обнаруженных к настоящему времени CSD-белков позвоночных имеет сходный тип строения и высокую степень гомологии с белком YB-1 человека (рис. 1). Эти белки характеризуются наличием трех доменов, центральным из которых является домен

холодового шока, а в С-концевой части молекулы располагается характерный домен, состоящий из чередующихся кластеров положительно и отрицательно заряженных остатков (подробнее см. следующую главу). Список ближайших гомологов белка YB-1 приведен в начале таблицы 2, и их названия выделены жирным шрифтом. Многие из них были обнаружены как мажорные компоненты цитоплазматических мРНК соответствующих организмов. Эти белки можно объединить в одно подсемейство YB-1-подобных белков, исходя из их структурно-функционального сходства. Хотя белок FRGY2 и не имеет столь высокой степени гомологии с YB-1, как остальные белки этого подкласса, его вполне можно отнести к YB-1-подобным белкам на основании сходной доменной организации и близости выполняемых функций. Этот белок упаковывает и маскирует мРНК в ооцитах и заменяется на соматическую форму, белок FRGY1, в раннем эмбриональном развитии на стадии гаструлы [146, 175, 232].

Другой CSD-белок, DbrA, также включенный в это подсемейство, отличается от остальных белков более протяженным N-концевым доменом [182]. Белки *Chironomus tentans* St-p40/p50 имеют очень близкий тип доменной организации и также могут быть отнесены к этому подсемейству [204]. Аминокислотные последовательности этих белков на протяжении первых 259 а. о. полностью совпадают и отличаются только последовательностью следующих аминокислотных остатков, которых у St-p40 пять, а у St-p50 — пятьдесят три. Предполагается, что оба белка кодируются одним геном, но синтезируются с разных мРНК, возникающих за счет альтернативного сплайсинга. Эти белки связываются с мРНК еще на стадии ее транскрипции на хромосомах и сопровождают мРНК на всем протяжении жизненного цикла. Обе изоформы белка St-40/50 обнаружены в клетках слюнных желез насекомого, но только одна из них, St-40, присутствовала в культивируемой линии эпителиальных клеток этого организма.

Многие эукариотические CSD-белки имеют отличный от YB-1 тип строения, хотя все они содержат хотя бы один домен холодового шока (рис. 1). Наиболее близок по первичной структуре к прокариотическим членам семейства белок Cla 8 h из плесневого грибка *Cladosporium herbarum*, который состоит только из одного домена CSD и имеет 76% гомологии с главным белком холодового шока *E. coli* CspA [45]. Почти все CSD-белки содержат одну копию CSD. Исключение составляет белок млекопитающих UNR (upstream of N-ras), чей ген расположен непосредственно перед геном N-ras. Этот белок образован пятью CSD, довольно сильно различающимися по своей аминокислотной последовательности, и не содержит других доменов [39]. CSD-белки беспозвоночных и растений содержат в С-концевой части

Таблица 2.
CSD-белки эукариот и их функции

Белок	Организм	Функция	Лите- ратура
1	2	3	4
YB-1/ DbpB*	<i>Homo sapiens</i> Человек	1) репрессия/активация транскрипции с промоторов и энхансеров генов, участвующих в клеточном росте, дифференцировке, стрессовом ответе, а также вирусных генов 2) участие в репарации ДНК 3) сплайсинг гетерогенной ядерной РНК 4) стабилизация мРНК 5) регуляция трансляции 6) репликация ДНК 7) 3'→5' ДНК-экзонуклеазная активность	[194, 212] [71, 83, 131] [21, 209] [22, 20] [3] [78] [85]
p50	<i>Oryctolagus cuniculus</i> Кролик	1) регуляция трансляции мРНК 2) регуляция стабильности мРНК	[44] [41]
DbpA	<i>Homo sapiens</i> Человек	регуляция транскрипции	[28, 122]
EF1_A	<i>Rattus norvegicus</i> Крыса	регуляция транскрипции	[162]
FRGY1	<i>Xenopus laevis</i> Лягушка	регуляция транскрипции	[213]
FRGY2 (p54/p56)	—	1) регуляция транскрипции 2) регуляция трансляции, запасание мРНК 3) регуляция структуры ядрышек	[213] [12, 146, 172] [60]
MSY1	<i>Mus musculus</i> Мышь	запасание мРНК, регуляция трансляции	[110, 215]
MSY2	—	запасание мРНК, регуляция трансляции	[66, 247]
MSY4	—	запасание мРНК, регуляция трансляции	[31· 55]

см. окончание табл. 2

окончание табл. 2

1	2	3	4
CknYB-1	<i>Gallus gallus</i> Курица	1) регуляция транскрипции	[96]
		2) участие в клеточной пролиферации и репликации ДНК	[61]
Ct-p40/p50	<i>Chironomus tentans</i> Двукрылое насекомое	упаковка пре-мРНК в ядре и мРНК в цитоплазме	[204]
ZONAB	<i>Homo sapiens</i> Человек	1) регуляция транскрипции	[7]
UNR	—	2) регуляция пролиферации клеток	[8]
NSEP1	—	регуляция трансляции по механизму внутренней посадки рибосомы	[81]
		регуляция транскрипции	[105, 106]
RYB-a	<i>Rattus norvegicus</i> Крыса	1) регуляция транскрипции	[84]
		2) участие в клеточной пролиферации	
YB-3	<i>Xenopus laevis</i> Лягушка	регуляция транскрипции	[25]
YPS	<i>Drosophila melanogaster</i> Дрозофила	внутриклеточная локализация мРНК	[129]
DjY1	<i>Planaria</i> Планария	1) регуляция трансляции и маскирование мРНК	[183]
		2) участие в регенерационных процессах	
GFYP2	<i>Carassius auratus</i> Золотая рыбка	маскирование мРНК	[99]
GRP-2	<i>Nicotiana sylvestris</i> Лесной табак	не известны	[154]
Clah 8	<i>Cladosporium herbarum</i> Плесневой грибок	не известны	[45]
RBP16	<i>Trypanosoma brucei</i> Трипаносома	1) редактирование митохондриальной пре-мРНК	[72]
		2) стабилизация митохондриальной мРНК	[164]

* – жирным шрифтом выделены названия белков, имеющих сходное строение с YB-1.

молекулы вместо чередующихся положительно и отрицательно заряженных кластеров участки, обогащенные глицином, а также дополнительные мотивы, такие как «цинковые пальцы» [72, 143, 154].

Эукариотические CSD-белки оказались многофункциональными. Помимо упаковки мРНК в цитоплазме, к настоящему времени установлено их участие в ряде как ДНК-зависимых (репликация, репарация и транскрипция), так и РНК-зависимых процессов (сплайсинг, редактирование, трансляция и деградация мРНК) [44, 102, 133]. Основные функции CSD-белков перечислены в таблице 2, причем этот список непрерывно пополняется как за счет описания новых членов этого семейства, так и нахождения новых активностей у уже известных белков.

Так как на сегодняшний день YB-1 подобные белки являются наиболее хорошо изученными белками описываемого семейства, далее в основном будет рассмотрено их строение и функционирование.

ДОМЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ YB-1

YB-1 содержит 324 а. о. и состоит из трех доменов. На N-конце находится небольшой домен, богатый аланином и пролином (A/P-домен), далее идет домен холодового шока (CSD), а за ним — протяженный C-концевой домен (C-домен), состоящий из чередующихся кластеров положительно и отрицательно заряженных аминокислотных остатков, с размером каждого кластера примерно в 25–30 остатков (рис. 1). В целом, для YB-1 характерна очень высокая изоэлектрическая точка, около 10, молекулярная масса около 35–36 кДа и аномальная электрофоретическая подвижность при SDS-гель электрофорезе, соответствующая размеру белка около 50 кДа. Белок способен мультимеризоваться с образованием крупных гомоолигомерных комплексов с молекулярной массой от 150 до 800 кДа [42, 54, 214].

A/P-домен содержит участок связывания актина [177], фактора сплайсинга SRp30c [170] и фактора транскрипции, супрессора опухолей, p53 [160].

CSD способен специфично и неспецифично связывать ДНК [101, 214] и РНК [13, 112]

C-домен неспецифически связывает РНК, усиливает взаимодействие CSD с нуклеиновыми кислотами и обеспечивает гомомультимеризацию белка [13, 147, 214]. В C-домене содержатся участки связывания некоторых важных регуляторных белков, таких как белок K_gРНП [198], p53 [160] и IRP-2 (iron-regulatory protein 2), участвующий в регуляции трансляции ферритиновой мРНК [3]. C-концевой и CSD домены совместно формируют участки связывания фактора транскрипции Runx [178], фактора транскрипции вируса HIV-1, Tat, [1], большого Т антигена полиомавируса JC [179].

Структура домена холодового шока (CSD) белка YB-1

Пространственная структура CSD белка YB-1 человека была установлена методом ЯМР [101]. Как и предполагалось исходя из высокой степени гомологии (~45% идентичности белку CspA *E. coli*), пространственная структура CSD YB-1 очень сходна с пространственной структурой главных белков холодового шока бактерий. В то же время CSD YB-1 почти полностью идентичен по аминокислотной последовательности CSD других белков эукариот. Это означает, что CSD остальных эукариотических членов семейства имеют, по-видимому, такую же пространственную структуру, как и CSD белка YB-1. Этот домен состоит из пяти β -тяжей, уложенных антипараллельно в β -баррель. Как и у прокариотических белков, в CSD белка YB-1 имеется два консенсусных мотива – РНП-1 и РНП-2, которые, соответственно, находятся на β 2 и β 3-тяжах. И так же, как у бактериальных CSD-белков, ароматические аминокислотные остатки этих консенсусов участвуют в связывании нуклеиновых кислот (см. ниже). Хотя структура доменов CSD эукариот и прокариот очень сходна, небольшое отличие между ними заключается в более протяженной петле, соединяющей β 3 и β 4-тяжи у YB-1.

С-КОНЦЕВОЙ ДОМЕН YB-1 (С-ДОМЕН)

Характерной особенностью этого домена является присутствие чередующихся кластеров положительно и отрицательно заряженных аминокислотных остатков (по четыре кластера каждого знака) и высокое содержание пролиновых остатков. Аномальную электрофоретическую подвижность белка при SDS-гель электрофорезе связывают именно с наличием этих заряженных кластеров в С-домене [36, 44]. С-домен значительно менее консервативен в эволюции, чем CSD. Сложности в определении пространственной структуры С-домена связаны с тем, что у белка в мономерной форме этот домен, по всей вероятности, является подвижным и не имеет стабильной уникальной укладки. Его конформация, скорее всего, фиксируется только при связывании лигандов и может быть разной в комплексе с разными лигандами [13, 132]. Компьютерные программы предсказывают отсутствие в С-домене протяженных α - и β -элементов вторичной структуры и наиболее вероятную укладку домена в виде вытянутой поли(L-пролиновой) спирали II типа [128]. Как было сказано выше, С-домен участвует в гомоолигомеризации YB-1 [214]. Предполагается, что олигомеризация происходит в результате взаимодействия положительно и отрицательно заряженных кластеров этого домена на одной молекуле с противоположно заряженными кластерами этого же домена на других молекулах [162].

СТРУКТУРА ГЕНОВ Υ B-1 И ЕГО ГОМОЛОГОВ У ПОЗВОНОЧНЫХ

Структура генов CSD-белков позвоночных изучена только для двух представителей этого семейства – Υ B-1 и *dbpA* человека [108, 127, 221]. В обоих случаях гены содержат большое число интронов. Ген белка *dbpA*, размером 24 kb, имеет 10 экзонов, ген Υ B-1, размером 19 kb – 8 экзонов. Удивительно, что небольшой CSD в этих белках закодирован в нескольких экзонах: в пяти (с первого по пятый) у Υ B-1 и в четырех (со второго по пятый) у *dbpA*. В промоторах указанных генов отсутствуют наиболее характерные регуляторные последовательности ТАТА и ССААТ. Вместо этого, в промоторе гена Υ B-1 присутствует несколько E-боксов, а в начале первого экзона содержится много CG-повторов, а также GATA-мотивы, и этот участок первого экзона необходим для транскрипции гена. Пока надежно не установлено, какие именно факторы могут связываться с промотором гена Υ B-1 и регулировать его активность, хотя есть сообщения, что с E-боксом может связываться белок с-Мус [225], а с GATA-мотивами – транскрипционные факторы GATA-1 и GATA-2, необходимые для развития клеток эритроидного ряда [245].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ CSD-БЕЛКОВ С ДНК

Связывание CSD-белков с нуклеиновыми кислотами изучено очень подробно [203, 233]. Поскольку Υ B-1 был впервые обнаружен благодаря взаимодействию с двухцепочечной ДНК, содержавшей Υ -бокс мотив (CTGATTGG^c/_T^c/AA) промотора генов главного комплекса гистосовместимости II класса, белки этого семейства получили еще одно название – Υ -бокс-связывающие белки или просто Υ -бокс белки [38, 232]. В последующие годы в разных лабораториях было выделено несколько новых членов данного семейства с помощью фрагментов разных промоторов, также содержавших Υ -бокс последовательности [162, 213, 233]. Соответственно, эти белки стали рассматривать как белки, специфически связывающиеся с Υ -боксом содержащей ДНК. Однако почти в то же время стали появляться сообщения о выделении CSD-белков, взаимодействующих с фрагментами ДНК, не содержащими Υ -бокс мотива [61, 71, 96, 244]. Более того, при сравнении сродства CSD-белков к ДНК с разными последовательностями было обнаружено, что эти белки не проявляют особого предпочтения к Υ -боксам ДНК [61, 71, 96, 106]. Они хорошо связывались с самыми разными последовательностями, включая апурированную ДНК [117] и ДНК в H-форме [79]. Очень четко было показано, что CSD-белки проявляют заметно большее сродство к одноцепочечной форме ДНК по сравнению с двухцепочечной [71, 126]. Недавно, используя технологию микрочипов с иммобилизован-

ными олигодезоксирибонуклеотидами, был проведен подробный анализ специфичности связывания кроличьего белка р50 с различными последовательностями одноцепочечных и двухцепочечных фрагментов ДНК [249]. Установлено, что р50 связывает очень широкий спектр различных последовательностей, обнаруживая наибольшее предпочтение к одноцепочечному мотиву GGGG, а затем к одноцепочечным и двуцепочечным мотивам CACC и CATC. В то же время к последовательностям, встречающимся в Y-боксах, белок проявлял лишь умеренное сродство. Обнаруженные в этом исследовании G-богатые мотивы присутствуют в промоторах некоторых генов, к которым CSD-белки имеют повышенное сродство [27, 96, 186]. На взаимодействие CSD-белков с ДНК очень сильно влияют различные типы нарушений вторичной структуры ДНК, вызываемые такими повреждающими агентами, как УФ-облучение, обработка лекарственными препаратами, окислительный стресс [102, 212]. Выделение некоторых членов семейства CSD-белков с использованием фрагментов ДНК, содержащих Y-бокс, можно объяснить относительно высоким сродством этих белков к ДНК по сравнению с другими клеточными белками, хотя для самих CSD-белков Y-бокс последовательность не является наиболее предпочтительной.

В опытах с фрагментами CSD-белков было показано, что для взаимодействия с ДНК необходим CSD [147, 214]. С помощью метода ЯМР установлено, что в связывание с одноцепочечной ДНК вовлечены в основном остатки ароматических аминокислот, входящие в состав мотивов РНП-1 и РНП-2, а также ряд положительно заряженных остатков в петлях, соединяющих β -тяжи [101]. Эти остатки создают на поверхности домена участок связывания нуклеиновых кислот, аналогичный таковому у бактериальных белков. Этот участок ограничен петлями, соединяющими β 1 и β 2, а также β 4 и β 5-тяжи. Основную роль в связывании с ДНК играют электростатические силы и стэкинг-взаимодействия фенилаланиновых остатков с основаниями ДНК. Кроме того, было показано, что большая петля, соединяющая β 3 и β 4-тяжи в эукариотических белках, при пересадке ее в белок CspA *E. coli* придает последнему способность связывать не только одноцепочечную, но и двуцепочечную ДНК [228].

При связывании YB-1 с ДНК в области промотора генов главного комплекса гистосовместимости II класса наблюдалось плавление двойной спирали ДНК. Появление одноцепочечных участков было зарегистрировано по увеличению чувствительности ДНК к эндонуклеазам, специфичным к одноцепочечной форме ДНК [126]. Опыты на микрочипах показали, что р50 кролика наиболее эффективно дестабилизирует двуспиральные участки ДНК с мотивами GGTG,

GATG и GTGG, в то время как GGGGG-содержащие дуплексы, наоборот, сильно стабилизировались белком р50 [249]. Кроме того, было обнаружено, что р50 может в тысячи раз ускорять ренатурацию двухцепочечной ДНК при физиологических условиях [199]. Будут ли CSD-белки плавить или, наоборот, стабилизировать вторичную структуру ДНК – по-видимому, сильно зависит от соотношения белок/ДНК, а также от состава нуклеотидов и протяженности комплементарных участков ДНК. Это означает, что эти белки могут по-разному взаимодействовать с ДНК с разной последовательностью нуклеотидов и оказывать разное влияние на ее пространственную структуру.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ CSD-БЕЛКОВ С РНК

В ряде работ было установлено, что YB-1 и его ближайшие гомологи могут взаимодействовать с любыми последовательностями РНК, хотя и отмечено некоторое предпочтение к участкам с определенным составом и сочетанием нуклеотидов [13, 55, 130, 138, 168, 200]. Связывание YB-1 с РНК характеризуется высокой константой ассоциации $\sim 1-2,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ [138, 147, 247]. YB-1 и его гомологи гораздо лучше связываются с РНК в одноцепочечной форме [130]. При неспецифическом связывании белки образуют почти исключительно контакты с сахаро-фосфатным остовом РНК [168].

Специфический участок для связывания с РНК был первоначально идентифицирован для белков FRGY1 и FRGY2/p56 *Xenopus laevis* с помощью метода SELEX [13]. Этот участок, названный YRS (FRGY recognized sequence), имеет последовательность AACAUС. Его присутствие в РНК повышает константу ассоциации РНК с FRGY2 в несколько раз. Вставка мотива YRS в репортерную мРНК приводит к усилению ингибирования ее трансляции белком FRGY2 в ооцитах *Xenopus* [132]. Позже были выявлены участки специфического связывания с РНК трех других членов семейства CSD-белков: UNR [223], MSY4 [55] и р50 [200]. Вероятно, на специфичность взаимодействия этих белков с РНК в клетке могут оказывать влияние их ковалентные модификации, а также связывание с другими белками.

Два домена YB-1 и его гомологов, CSD и С-домен, проявляют РНК-связывающую активность [13, 112, 147]. CSD взаимодействует с РНК, по-видимому, с помощью аминокислотных остатков в мотивах РНП-1 и РНП-2 [64, 203]. Применение метода сайт-направленного мутагенеза показало, что ароматические остатки в РНП-1 действительно очень важны для связывания с РНК [13, 132]. Участки в С-домене, связывающиеся с РНК, пока неизвестны, но, вероятно, они находятся в положительно заряженных кластерах с очень высоким содержанием аргинина. Было показано, что для специфического

связывания белка лягушки FRGY2 с РНК необходим CSD, хотя С-домен, а также N-концевой А/Р-домен значительно стабилизируют эту связь [13]. Сродство к РНК двух РНК-связывающих доменов белка FRGY2 по-разному меняется в ответ на изменение концентрации Mg^{2+} и гепарина [112]. Повышение концентрации Mg^{2+} подавляет связывание с РНК CSD, а повышение концентрации гепарина – связывание С-домена. Это позволяет предположить, что природа сил, обеспечивающих взаимодействие с РНК двух доменов, различается. В комплексах кроличьего р50 с мРНК, образованных при небольших молярных соотношениях белок/РНК, характерных для транслируемых полисомных мРНК (см. ниже), оба РНК-связывающих домена р50, CSD и С-домен, способны эффективно связываться с мРНК. Однако в неактивных в трансляции комплексах мРНК с р50 с высоким содержанием белка он связан с мРНК преимущественно доменом CSD, тогда как С-домен вытесняется из комплекса с РНК и олигомеризуется (Skabkin et al., in preparation).

Белок р50 кролика способен значительно изменять вторичную структуру РНК. Подобно CspA *E. coli*, р50 может плавить до 60% вторичной структуры глобиновой РНК при физиологической температуре [42, 199]. Но, кроме того, он способен при тех же условиях на три порядка ускорять образование дуплексов между взаимодоплементарными цепями РНК, т.е. ускорять их отжиг. Наконец, при физиологических условиях он может катализировать обмен доплементарных цепей РНК до получения наиболее протяженного и совершенного дуплекса [199]. Оказалось, что соотношение между РНК-плавящей и РНК-отжигающей активностью р50 зависит от соотношения р50/РНК в комплексе: в ненасыщенных белком комплексах преобладает РНК-отжигающая, тогда как в насыщенных – РНК-плавящая активность [199].

УЧАСТИЕ CSD-БЕЛКОВ В ДНК-ЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССАХ

Взаимодействие CSD-белков с ДНК может приводить к изменению уровня транскрипции некоторых генов. С каждым годом список таких генов непрерывно растет (табл. 3). В их число входят важнейшие клеточные гены, продукты которых участвуют в регуляции клеточного роста, дифференцировки и апоптоза (Fas, p53, GM-CSF, PDGF, ErbB-2, циклины А и В1), а также в регуляции экспрессии вирусных генов. CSD-белки могут оказывать как позитивное, так и негативное действие на промоторы различных генов. Хотя полностью механизм действия CSD-белков в транскрипции ни в одном из случаев пока неизвестен, было предложено несколько правдоподобных моделей такой регуляции.

Таблица 3.
**Некоторые клеточные гены и вирусные промоторы,
регулируемые CSD-белками**

Регулируемый ген	Эффект CSD-белков на транскрипцию	Литература
MHC II (HLA DR α , I-A β) (гены главного комплекса гистосовместимости II класса)	ингибирование	[122, 220]
p53 (супрессор опухолей)	ингибирование	[115]
GM-CSF (ген фактора роста гранулоцитов и макрофагов)	ингибирование	[26, 194]
VEGF (ген фактора роста эндотелия сосудов)	ингибирование	[28]
PDGF (ген тромбоцитарного фактора роста)	активация	[207]
<i>mdr1</i> (ген белка, отвечающего за множественную лекарственную устойчивость)	активация	[9, 58]
Fas (Apo-1/CD95) (ген рецептора семейства TNF/NGF, участвующего в апоптозе)	ингибирование	[114]
Гелатиназа А (ген матричной металлопротеиназы, играющей центральную роль в ангиогенезе и злокачественной инвазии)	активация	[135]
ggr78/ВiР (ген белкового шаперона)	ингибирование	[120]
РТР1В (ген тирозиновой фосфатазы, вовлеченной в регуляцию различных сигнальных путей)	активация	[53]
ErbB-2 (протоонкоген рецептора с активностью тирозиновой киназы)	ингибирование	[7]
Ген циклина А	активация	[94]
Ген циклина В1	активация	[94]
Ген рецептора тиротропина	ингибирование	[159]
Ген δ -субъединицы никотинового рецептора ацетилхолина	ингибитрование	[185]
Промоторы и энхансер JCV (полиомавируса)	активация	[171, 180]
Промоторы в LTR RSV (вируса саркомы Рауса)	активация ингибирование	[211] [23]
TAR-промотор вируса HIV-1 (вирус иммунодефицита человека 1-ого типа)	активация	[1]

Функционирование CSD-белков в качестве активаторов транскрипции особенно хорошо изучено в случае регуляции генов полиомавируса человека JCV [171, 178, 179]. Промотор этого вируса является общим регуляторным элементом для ранних и поздних вирусных генов и состоит из большого числа участков связывания различных регуляторных факторов, включая YB-1. Активность промотора зависит от белкового комплекса, который собирается на нем в определенный момент жизненного цикла вируса. В состав комплекса может входить YB-1 и другие регуляторные белки, такие как Pura, Rel65(p65), большой T-антиген. Связывая друг друга, белки могут взаимно влиять на ДНК-связывающую активность своих партнеров. Например, связываясь с Pura и Rel65(p65), YB-1 способствует их посадке на промотор, что приводит к активации транскрипции соответствующих генов вируса. Взаимодействие YB-1 с T-антигеном усиливает способность последнего стимулировать транскрипцию поздних генов, но ослабляет его активность в подавлении транскрипции ранних генов. Подобная схема активации промотора с участием YB-1 наблюдается и в случае TAR-зависимой транскрипции генов вируса HIV1 [1]. TAR-элемент представляет собой протяженную шпильку РНК, образующуюся на 5'-конце вирусных транскриптов. С TAR-элементом связывается вирусный белок Tat, и такое взаимодействие активирует транскрипцию вирусных РНК. Было показано, что YB-1 может образовывать комплекс с Tat и TAR, что ведет к усилению активности Tat в транскрипции. Аналогично YB-1 стимулирует транскрипцию гена гелатиназы А, взаимодействуя в этом случае с факторами транскрипции p53 и AP2 на промоторе этого гена [136].

Высказано предположение, что ингибирующее действие CSD-белков на транскрипцию может быть связано с их способностью переводить ДНК в области промотора в одноцепочечную конформацию или стабилизировать такую конформацию благодаря повышенному сродству этих белков к одноцепочечным участкам ДНК [28, 126, 212]. Переходу ДНК в одноцепочечную форму может способствовать сильная асимметрия в распределении пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, а также наличие инвертированных повторов нуклеотидов [50, 93, 103]. Именно такие участки обнаружены в промоторах ряда генов, регулируемых CSD-белками [212]. Перевод ДНК в промоторных участках в одноцепочечную форму будет препятствовать посадке транскрипционных факторов, взаимодействующих с двухцепочечной ДНК, и приведет к ингибированию транскрипции. Такой механизм может лежать в основе негативного действия CSD-белков на транскрипцию гена белка Fas [114], белков МНС II [126], GM-CSF [26] и VEGF [28]. В случае белка VEGF прямо показано, что посадка

CSD-белка DbpA на промотор гена этого белка и следующая за этим репрессия транскрипции связаны с появлением в промоторе одноцепочечной формы ДНК [28]. Многие промоторы, даже при отсутствии заметной гомологии по нуклеотидной последовательности, могут содержать участки, склонные переходить в одноцепочечную форму, которая является высокоаффинным сайтом для связывания CSD-белков, что легко объясняет столь большое количество генов, контролируемых CSD-белками.

Кроме того, в некоторых случаях CSD-белки могут ингибировать транскрипцию, связываясь непосредственно с факторами, активирующими транскрипцию, и препятствуя их посадке на промоторный участок ДНК [120, 122].

CSD-белки часто рассматриваются как факторы, участвующие в репликации и репарации ДНК [44, 71, 83]. Эти выводы основываются на косвенных данных, так как доказательства прямого участия CSD-белков в этих процессах отсутствуют. В пользу участия CSD-белков в репликации свидетельствует наличие четкой положительной корреляции между повышением их внутриклеточного уровня и уровня кофактора ДНК-полимеразы σ – циклина PCNA (proliferating cell nuclear antigen), циклинов A и B1, а также ДНК полимеразы $\Pi\alpha$ в активно делящихся клетках [65, 94, 197]. Возможность участия CSD-белков в репарации ДНК основывается пока на двух фактах. Во-первых, эти белки проявляют повышенное сродство к ДНК, поврежденной различными внутри- и внеклеточными агентами, включая УФ-облучение и обработку противоопухолевыми препаратами [71, 83, 117]. И, во-вторых, *in vitro* они могут напрямую стимулировать активность эндонуклеазы III человека (hNth1), участвующей в удалении пиримидиновых нуклеотидов, модифицированных в результате эндогенного окисления или различных типов облучения [131].

CSD-БЕЛКИ В БИОГЕНЕЗЕ И ФУНКЦИОНИРОВАНИИ мРНК

УВ-1 и его ближайшие гомологи присоединяются к мРНК еще во время транскрипции и сопровождают ее на всех этапах жизнедеятельности, вплоть до распада в цитоплазме [41, 202, 204, 234]. К настоящему моменту четко установлено участие этих белков в трех процессах, зависимых от мРНК: в процессинге, в трансляции и стабилизации мРНК.

Участие CSD-белков в процессинге мРНК

Недавно появились сообщения, что УВ-1 принимает участие в процессах сплайсинга, включая альтернативный сплайсинг [21, 209]. Оказалось, что УВ-1 может присоединяться к транскрипционному комплексу за счет взаимодействия с протоонкобелком TLS [21, 173].

TLS входит в состав транскрипционного комплекса и обеспечивает сопряжение процессов транскрипции и сплайсинга путем одновременного взаимодействия с РНК-полимеразой II и факторами сплайсинга. Привлекая белок YB-1 в этот комплекс, TLS способствует его вовлечению в последующий сплайсинг мРНК. В случае некоторых злокачественных опухолей С-концевой домен TLS, взаимодействующий с YB-1, заменяется в результате генетических перестроек на последовательности факторов транскрипции SNOP (C/EBP homologous protein) или ERG. Это приводит к подавлению связывания YB-1 с РНК-полимеразным комплексом и исключает участие YB-1 в сплайсинге некоторых гетерогенных ядерных РНК [173]. На каких стадиях самой реакции сплайсинга участвует YB-1, пока неизвестно. Возможно, он действует посредством связывания с некоторыми факторами сплайсинга, такими как SRp30c и SRp86 [119, 170].

CSD-белки участвуют в процессинге мРНК не только в ядре, но и в митохондриях. Например, небольшой белок с доменом холодового шока RBP16 в митохондриях простейшего *Trypanosoma brucei* проявляет повышенное сродство к гидовой РНК (guide RNA) и способен стимулировать ее активность в редактировании некоторых мРНК, которая заключается в удалении или вставке уридиловых нуклеотидов [72, 164]. Выключение синтеза этого белка приводит к накоплению неотредактированных предшественников мРНК.

Участие CSD-белков в регуляции трансляции мРНК

Гомологи белка YB-1 – p56/FRGY2 ооцитов *Xenopus* и его укороченный с С-конца вариант p54 – являются основными упаковочными белками маскированных мРНК, накапливающихся при созревании ооцитов [30, 145, 146]. Было высказано предположение, что именно эти белки отвечают за репрессию мРНК в ооцитах до их оплодотворения. В пользу этого предположения можно привести следующие аргументы. Вовлечение запасенных мРНК в трансляцию сразу после оплодотворения сопровождается дефосфорилированием p54/p56 и диссоциацией их из комплексов с мРНК [100, 201]. Дальнейшая активация процесса трансляции в раннем эмбриогенезе происходит при постепенном снижении количества p54/p56 и их заменой на соматический белок этого семейства – FRGY1 [146, 232]. Наконец, p54/p56 ингибирует трансляцию мРНК *in vitro* и *in vivo* [12, 100, 132, 172, 175].

p50 в ретикулоцитах кролика является мажорным белком как нетранслируемых (свободных), так и транслируемых (полисомных) мРНК. Однако содержание этого белка в транслируемых мРНК на то же количество мРНК вдвое ниже, чем в свободных [137]. p50 из ретикулоцитов кролика способен ингибировать процесс трансляции

как в бесклеточных системах [137, 150], так и в культуре клеток млекопитающих [32]. р50 *in vitro* избирательно подавляет процесс трансляции некэпированных мРНК при более низких концентрациях, чем кэпированных мРНК [210]. Предполагается, что р50 может обеспечить селективное выключение трансляции тех мРНК, которые вступили на путь деградации, одним из первых этапов которой является отщепление кэпа от мРНК. Подавление трансляции кэпированных мРНК наступает при соотношениях р50/мРНК близких к таковому в свободных нетранслируемых мРНК, где содержание р50 очень высоко, и белок, по-видимому, насыщает мРНК. Ингибирование под действием р50 наблюдается исключительно на стадии инициации. Более детальное исследование этапа инициации трансляции, который ингибируется р50, показало, что это происходит до присоединения малой субчастицы рибосомы к мРНК, так что мРНК обнаруживается в присутствии ингибирующих количеств р50 в форме свободных мРНК [150]. За ингибирование трансляции отвечает в основном С-домен р50. Этот домен, так же как и целый р50, вытесняет из комплекса с мРНК фактор инициации eIF4G [150] – наиболее крупную из субъединиц фактора инициации eIF4F, которая взаимодействует с мРНК и служит платформой для размещения двух других субъединиц этого фактора: АТФ-зависимой хеликазы eIF4A и кэп-связывающей субъединицы eIF4E, а также фактора инициации eIF3 и поли(А)-связывающего белка РАВР (Poly(A) Binding Protein), ассоциирующего с 3' концевой поли(А) последовательностью мРНК.

Участие р50 в трансляции не ограничивается только одним ингибированием этого процесса. При удалении р50 из лизата или при добавлении мРНК в высокой концентрации процесс трансляции также останавливается. Добавление р50 в такие лизаты, характеризующиеся очень низким соотношением р50/мРНК, ведет к активации трансляции [43, 132, 137, 210]. Процесс белкового синтеза стимулируется р50 исключительно на стадии инициации и не оказывает никакого влияния на элонгацию и терминацию полипептидных цепей. Удаление белка р50 из лизатов ретикулоцитов кролика приводит к накоплению 48S преинициаторного комплекса, т.е. остановка белкового синтеза в лизате, дефицитном по р50, может происходить или на этапе присоединения 60S субчастицы рибосом к 48S комплексу, или на предыдущей стадии сканирования 5' НТО мРНК малой субчастицей рибосом до иницирующего кодона. [43]. Опыты по реконструкции преинициаторного комплекса 48S из очищенных компонентов (мРНК, 40S субчастицы рибосом и факторов инициации трансляции) показали, что при ограниченном количестве факторов инициации р50 стимулирует появление 48S преинициаторного

комплекса, в котором малая субчастица рибосом завершила сканирование 5' НТО мРНК и находится на иницирующем кодоне [168]. Совокупность этих данных позволяет предположить, что, скорее всего, р50 облегчает продвижение малой субчастицы рибосом вдоль 5' НТО мРНК к иницирующему кодону за счет своей способности вызывать плавление вторичной структуры мРНК. Нельзя исключить и более раннее предположение о механизме позитивного действия р50 на инициацию трансляции. Согласно этому предположению, р50 препятствует неспецифическому связыванию РНК-связывающих факторов инициации трансляции вдоль всей молекулы мРНК, что вызывает их концентрацию в районе кэпа и 5' НТО [137, 168, 210].

Представленные данные свидетельствуют о двояком действии р50 на трансляцию: при относительно низком соотношении р50/мРНК (вплоть до соотношения, наблюдаемого в полисомных мРНК) р50 стимулирует трансляцию, а при насыщении мРНК белком (как в свободных мРНК) р50 проявляет активность репрессора трансляции.

Как уже отмечалось выше, эукариотические CSD-белки проявляют высокое неспецифическое сродство к РНК и являются единственными универсальными мажорными белками цитоплазматических мРНК различных организмов, как транслируемых, так и нетранслируемых. Вполне очевидно, что эти белки рассматриваются наиболее подходящими кандидатами на роль основных мРНК-формирующих белков, упаковывающих мРНК в цитоплазме [161, 203]. CSD-белки могли бы выполнять функцию, аналогичную той, которую выполняют гистоны в упаковке хромосомной ДНК. Цитоплазматические мРНК, выделенные из различных источников, характеризуются постоянным набором свойств, а именно: 1) они проявляют широкое седиментационное распределение, отражающее гетерогенность мРНК по размерам в большинстве клеток, причем коэффициенты седиментации мРНК обычно превышают коэффициент седиментации свободной мРНК в 2,5–3 раза; 2) они имеют высокое весовое соотношение белок/РНК, равное 3-м для свободных цитоплазматических РНК и 2-м для транслируемых полисомных РНК, что приводит к уникальной плавучей плотности в градиенте CsCl, равной 1,39–1,4 г/см³ для свободных цитоплазматических мРНК и 1,45 г/см³ для полисомных мРНК; 3) мРНК в составе мРНК обладает высокой чувствительностью к эндорибонуклеазам, что свидетельствует о ее поверхностном расположении в частицах [169].

Исследования комплексов белка р50 и мРНК показали, что одного этого белка достаточно для образования частиц, полностью соответствующих по вышеперечисленным свойствам природным мРНК, полученным из различных объектов. Упаковывая мРНК,

CSD-белки могут влиять на ее трансляционный статус, что достаточно четко следует из приведенных выше данных. Кроме того, эти исследования обнаружили, что упаковка мРНК в частицах, соответствующих по соотношению белок/РНК свободным и полисомным мРНП, различна (Skabkin et al., in preparation). При относительно низком соотношении p50/мРНК p50 связан с мРНК в виде мономеров обоими РНК-связывающими доменами – CSD и С-доменом. Это приводит к разворачиванию мРНП, что делает содержащуюся в них мРНК доступной для взаимодействия с различными белками, другими РНК, а также рибосомными субчастицами (рис. 4). При

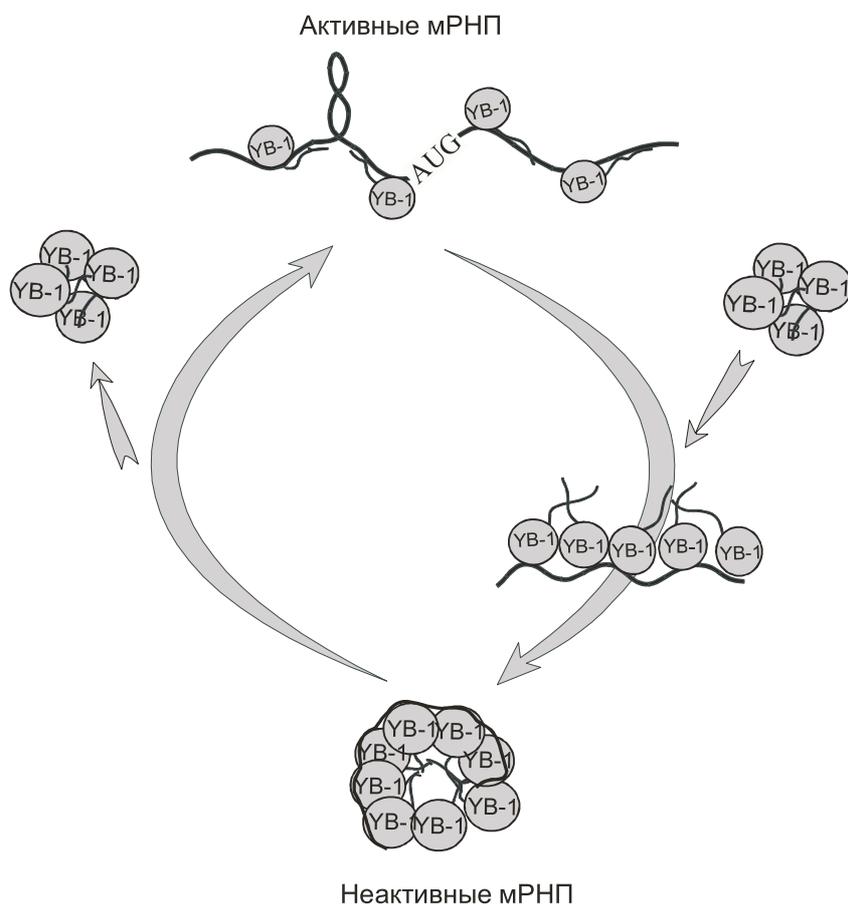


Рис. 4. Возможная модель участия YB-1 в структурной организации и функционировании цитоплазматических мРНП.

высоком соотношении р50/мРНК, характерном для свободных мРНК, молекулы р50 взаимодействуют с мРНК только CSD, а С-домены вытесняются с мРНК и олигомеризуются, формируя крупный мультимерный комплекс. мРНК упаковывается на поверхности мультимерного комплекса, причем ее вторичная структура в значительной мере расплавлена. В таком комплексе мРНК становится недоступна для взаимодействия с белками аппарата инициации трансляции, хотя очень легко атакуется эндорибонуклеазами.

Отдельного упоминания в связи с регуляцией трансляции CSD-белками заслуживает UNR – белок с молекулярной массой около 90 кДа, состоящий только из пяти последовательных повторов CSD (рис. 1). Оказалось, что этот белок способен значительно стимулировать трансляцию по механизму внутренней посадки рибосомы на специальные участки РНК, обогащенные вторичной структурой (IRES-элементы, Internal Ribosome Entry Segment) [81]. Участки IRES обнаруживаются у РНК пикорновирусов животных и некоторых клеточных мРНК [73]. По-видимому, UNR стимулирует трансляцию таких РНК, возможно, за счет изменения вторичной структуры РНК в области IRES, делая ее более благоприятной для посадки рибосомной субчастицы [139].

Участие CSD-белков в регуляции стабильности мРНК

Недавно было обнаружено, что YB-1 и его гомологи способны эффективно стабилизировать мРНК, содержащие кэп структуру, препятствуя их распаду в клетках и клеточных лизатах [20, 22, 41]. Наибольшая стабилизация мРНК достигается при высоком соотношении YB-1/мРНК, что сопряжено с выходом мРНК из полисом и исключением их трансляции [41]. Кэп-зависимая стабилизация мРНК в клетке и лизатах не исключает чрезвычайно высокую чувствительность мРНК к эндорибонуклеазам. Парадокс легко объясняется тем, что деградация мРНК в клетке происходит обычно с концов под действием экзонуклеаз [34], а при высоких соотношениях YB-1/мРНК концы мРНК, вероятно, становятся недоступными для этих нуклеаз. Исследование роли различных доменов YB-1 в стабилизации мРНК показало, что стабилизация обеспечивается CSD, который вытесняет факторы инициации трансляции eIF4E, eIF4A и eIF4B с кэп-структуры мРНК. С-домен, обладающий наибольшей активностью в подавлении белкового синтеза и вытесняющий eIF4G с тела мРНК, не повышает стабильности мРНК [41]. Способность YB-1 и его гомологов предохранять молекулы мРНК от деградации при их насыщении белком может объяснять высокую стабильность маскированных мРНК, запасенных в виде комплексов с этими белками в половых клетках [30, 49].

Помимо специфической упаковки молекул мРНК в транскрибируемых и нетранскрибируемых мРНК, регуляции трансляции и стабильности мРНК в клетке, белок р50 может участвовать в локализации трансляционно активных мРНК на актиновом скелете. Как уже было сказано выше (см. главу «Доменная организация YB-1»), N-концевой A/P домен р50 имеет специфическое место связывания для актина. Белок взаимодействует как с мономерным, так и с полимерным актином и в модельных экспериментах декорирует актиновые микрофиламенты внутри клетки [177]. Белок сохраняет свою способность связываться с актином, находясь в комплексах с мРНК с относительно небольшим соотношением р50/мРНК, характерным для транскрибируемых мРНК. Однако белок утрачивает свою способность взаимодействовать с актином в составе комплексов, в которых мРНК насыщена белком р50, т.е. в составе свободных нетранскрибируемых мРНК [177]. Это означает, что белок р50 может локализовать только транскрибируемую мРНК на актиновом скелете и, возможно, участвует в специфической локализации мРНК в клетке, что служит самым первым шагом на пути к клеточной дифференцировке.

В завершении раздела об участии CSD-белков в РНК-зависимых процессах стоит упомянуть еще об одной недавно обнаруженной функции этих белков, вызывающей очень большой интерес. Оказалось, что белок ооцитов земноводных, FRGY2, отвечает за обратимую разборку ядрышек, которая происходит после овуляции ооцитов [60, 69]. Пока механизм этого явления непонятен. Важно, что такая разборка не связана с ингибированием транскрипции рибосомной РНК, хотя это могло бы быть наиболее естественным объяснением этого процесса.

РЕГУЛЯЦИЯ СОДЕРЖАНИЯ CSD-БЕЛКОВ В КЛЕТКЕ

Принимая во внимание, что CSD-белки осуществляют регуляцию многочисленных ДНК- и РНК-зависимых процессов, следует ожидать, что их содержание и функциональная активность в клетке должны строго контролироваться. Содержание CSD-белков в клетках позвоночных может меняться в зависимости от физиологического состояния клетки или стадии ее дифференцировки. Так, белки FGRY2 и MSY2 в ооцитах лягушки и сперматоцитах мыши, где белковый синтез подавлен, присутствуют в очень большой концентрации, достигающей 2% от суммарного белка [30, 134, 246]. Содержание YB-1 достаточно велико в ретикулоцитах кролика и некоторых раковых клетках, активно синтезирующих белок [9, 32, 87]. Таким образом, корреляция между активностью белок-синтезирующего аппарата и содержанием в клетке YB-1 и его гомологов наблюдается далеко не всегда.

Количество мРНК CSD-белков также сильно различается в разных тканях и типах клеток, например, оно высоко в сердце и поперечно-полосатых мышцах как у эмбрионов, так и у взрослых организмов, но незначительно в почках, легких и печени [61, 108, 205]. Причем в печени уровень мРНК γ -1-подобных белков резко уменьшается по мере развития организма [61, 84]. Кроме того, уровень мРНК, кодирующих эти белки, а также уровень самих белков сильно меняется при стимуляции пролиферации клеток [61, 84] и при различных стрессовых воздействиях на клетки [157, 197, 218]. Изменение содержания мРНК CSD-белков может быть следствием как изменения скорости ее образования, так и скорости ее распада. В какой степени это содержание определяется первым или вторым фактором, в настоящее время сказать нельзя.

Изменение содержания CSD-белков в клетке, в свою очередь, также зависит от скорости их синтеза и распада, а скорость синтеза определяется не только количеством мРНК в клетке, которое, как было сказано выше, может сильно варьировать, но и эффективностью трансляции мРНК. По предварительным данным в лизатах одних типов клеток мРНК *p50* может присутствовать в нетранслируемой форме, в виде свободных информосом, тогда как в лизатах других типов она в значительной мере выявляется в активных полисомах (Скабкина и др., неопубл. данные). Эти результаты свидетельствуют о существовании механизма, регулирующего поступление мРНК *p50* в полисомы. В 3' нетранслируемой области мРНК *p50* был обнаружен участок, специфически связывающий два мажорных белка мРНК — *p50* и PABP [200]. Было показано, что PABP позитивно влияет на трансляцию мРНК *p50* по механизму, независимому от 3' концевой поли(А) последовательности. Благодаря такому механизму регуляции экспрессии белка *p50*, может поддерживаться необходимое для эффективной трансляции соотношение двух мажорных белков мРНК, *p50* и PABP. С другой стороны, специфическое связывание *p50* приводит к селективному подавлению трансляции мРНК *p50* при относительно низких концентрациях *p50*, которые не оказывают ингибиторного действия на синтез других клеточных белков. Другими словами, экспрессия *p50* авторегулируется на уровне трансляции мРНК *p50* (Скабкина и др., 2004, ДАН, в печати).

ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЕ CSD-БЕЛКОВ МЕЖДУ ЯДРОМ И ЦИТОПЛАЗМОЙ

CSD-белки являются ядерно-цитоплазматическими белками, и их распределение между ядром и цитоплазмой может меняться в зависимости от физиологического состояния клетки и фазы митотического цикла. В клетках HeLa переход γ -1 из цитоплазмы в ядро

наблюдался в конце G1 начале S фазы. Накопление YB-1 в ядре в этот достаточно короткий интервал времени коррелировало с запуском синтеза циклинов, гены которых, как оказалось, содержат в промоторах участки специфического связывания YB-1 (Y-боксы) и активируются под действием YB-1 [94].

Переход CSD-белков в клеточное ядро стимулировался при УФ-облучении клеток, под действием некоторых противоопухолевых препаратов, повреждающих ДНК, например цис-платины, а также при гипертермии (повышении температуры инкубации клеток до 43 °C) [104, 206, 224]. Стабильно высокая концентрация этих белков как в ядре, так и в цитоплазме, наблюдается у некоторых видов клеток, обладающих множественной лекарственной устойчивостью (см. ниже) [9, 156]. Механизмы перераспределения CSD-белков между ядром и цитоплазмой в настоящее время активно исследуются.

Достаточно давно было высказано предположение, что перераспределение CSD-белков из ядра в цитоплазму может происходить по мере выхода мРНК из ядра и ее накопления в цитоплазме [172, 216]. Понижение концентрации мРНК в цитоплазме за счет ослабления ее транскрипции и усиления деградации могло бы способствовать обратному переходу этих белков в клеточное ядро, что должно активировать процесс транскрипции. Благодаря описанному механизму, YB-1 и другие CSD-белки могут поддерживать баланс между скоростью транскрипции мРНК в ядре и ее содержанием в цитоплазме. Было показано, что в зрелых ооцитах *Xenopus*, в которых большое количество маскированной мРНК накоплено в цитоплазме, а клеточное ядро слабо активно в процессе транскрипции, подавляющее количество FRGY2 находится в цитоплазме [12]. Замена фенилаланинового и тирозинового остатков в РНП-1 консенсусной последовательности YB-1, приводящая к утрате или сильному понижению сродства белка к РНК, вызывает переход мутированного белка из цитоплазмы в клеточное ядро [5]. Эти данные свидетельствуют о том, что цитоплазматическая локализация CSD-белков во многом определяется их взаимодействием с мРНК в цитоплазме.

С другой стороны, в эндотелиальных клетках, обработанных тромбином, наблюдалось отщепление С-концевого фрагмента от YB-1 в районе 205-го а. о. и переход большого N-концевого фрагмента белка, включающего N-концевой А/Р-домен, CSD и часть С-домена, в клеточное ядро [208]. Более сильное укорачивание этого N-концевого фрагмента приводило к потере его способности переходить в ядро. Полученный результат был интерпретирован следующим образом: YB-1 в первой половине С-домена (ближайшей к CSD)

содержит сигнал ядерной локализации, который маскирован некой аминокислотной последовательностью, расположенной вблизи С-конца белка. Отщепление этой последовательности протеазой, активируемой через каскад регуляторных процессов, запускаемых тромбином, экспонирует сигнал ядерной локализации на YB-1. Перешедший в ядро большой фрагмент YB-1 сохраняет свою активность в качестве фактора транскрипции и запускает в ядре транскрипцию ряда генов, вызывающих процесс дифференцировки эндотелиальных клеток [208].

Детальный анализ роли различных участков молекулы YB-1 в ядерно-цитоплазматическом распределении белка был проведен в работе немецких авторов [94]. В ней исследовалось влияние различных фрагментов YB-1, слитых с GFP (Green Fluorescent Protein), на распределение репортерного белка внутри клеток, находящихся на разных стадиях митотического цикла. В молекуле YB-1 в районе аминокислотных остатков 186–205 был обнаружен сигнал ядерной локализации, что полностью соответствует полученным ранее результатам [208]. Добавление этой последовательности к флуоресцирующему репортерному белку GFP обеспечивает нерегулируемый по циклу переход слитого белка в клеточное ядро. Были найдены также два регуляторных сигнала в молекуле YB-1, ограничивающие поступление этого белка в ядро узким временным интервалом в клеточном цикле (переход из G1 в S). Один из этих сигналов был локализован в CSD, в то время как другой – в последнем положительно заряженном кластере С-домена [94].

Однако остается открытым вопрос, почему YB-1 переходит в ядро только на определенной стадии клеточного цикла. Вероятно, существуют какие-то дополнительные модификации CSD-белков, которые могут регулировать не только переход CSD-белков из ядра в цитоплазму, но также их активность в разнообразных РНК- и ДНК-зависимых процессах. Это могут быть нековалентные взаимодействия CSD-белков с другими клеточными белками, такими как SRp30c [170] и p53 [251], а также ковалентные модификации.

Ранее в ряде работ было показано, что YB-1-подобные белки фосфорилируются как *in vivo*, так и *in vitro* [4, 33, 138, 145]. Более того, в составе цитоплазматических мРНК, наряду с CSD-белками, обнаруживается протеинкиназная активность, вызывающая их фосфорилирование *in vitro* [29, 74, 97, 145], причем выяснилось, что *in vitro* казеинкиназа II фосфорилирует эти белки по сериновым остаткам [37, Скабкин М. и Устинов В., неопубл. данные]. В ряде работ сообщалось, что степень фосфорилирования CSD-белков может влиять на эффективность трансляции связанных с этими бел-

ками мРНК: фосфорилированные CSD-белки вызывали ингибирование трансляции *in vivo* и *in vitro*, тогда как их дефосфорилирование снижало ингибирующий эффект [100, 201]. Однако подробно эффект фосфорилирования CSD-белков на трансляцию не исследован. Кроме того, до сих пор не установлена протеинкиназа (киназа), фосфорилирующая эти белки *in vivo*. Ряд данных указывает на то, что фосфорилирование задействовано в регуляции транспорта CSD-белков из цитоплазмы в ядро. Например, в фибробластах человека индуцируемый интерфероном γ переход YB-1 в ядро подавлялся в присутствии специфического ингибитора киназы II [75], а в клетках KB индуцируемая УФ-облучением транслокация YB-1 в ядро не произошла при добавлении специфического ингибитора протеинкиназы C [104]. Однако, роль фосфорилирования в регуляции перехода CSD-белков между ядром и цитоплазмой, так же как и влияние этой модификации на активность CSD-белков в ДНК-зависимых процессах, пока еще не установлены точно. В единственной работе [199] было показано, что фосфорилирование белка p50 киназой II *in vitro* в несколько раз снижает его способность ускорять ренатурацию комплементарных цепей ДНК.

Обнаружена еще одна ковалентная модификация CSD-белков – метилирование аргининовых остатков в митохондриальном белке RBP16 в *Trypanosoma brucei* [163]. Однако пока неясно, оказывает ли эта модификация какое-либо влияние на функционирование CSD-белков.

CSD-БЕЛКИ И МЕДИЦИНА

Особый интерес к CSD-белкам возник в 1997 году после появления в солидном научном журнале «Nature Medicine» сообщения об обнаружении прямой корреляции между ядерной локализацией YB-1 и появлением множественной лекарственной устойчивости клеток рака молочной железы человека [9]. Напротив, в клетках, чувствительных к противоопухолевым препаратам, YB-1 обнаруживался только в цитоплазме. Дополнительный синтез YB-1 с плазмиды в таких чувствительных клетках вызывал повышение уровня гликопротеина Р и устойчивость клеток к лекарственным препаратам. Было найдено разумное объяснение обнаруженной корреляции. Оказалось, что ген *mdr-1*, кодирующий гликопротеин Р – мембранный белок, выкачивающий ксенобиотики из клетки и обеспечивающий множественную лекарственную устойчивость, имеет Y-бокс в своем промоторе, и его экспрессия находится под контролем YB-1 [58, 158]. Переход YB-1 в ядро вызывает активацию синтеза мРНК с гена *mdr-1* и приводит к появлению у клеток множественной лекарственной

устойчивости. Было предложено рассматривать ядерную локализацию YB-1 как наиболее ранний маркер множественной лекарственной устойчивости клеток рака молочной железы человека [9, 87, 181].

Переход YB-1 в ядро наблюдается не только в случае рака молочной железы, но и при других типах злокачественных опухолей, например, остеосаркоме [155], аденокарциноме яичника [95], раке легкого [196], синовиальной саркоме [156] и т.д. Во всех случаях появление YB-1 в ядре свидетельствовало о плохом прогнозе у пациентов после операции. Опухоли, в клетках которых YB-1 обнаруживался в ядре, характеризовались как более агрессивные и более устойчивые к послеоперационному лечению химиотерапией. Помимо активации гена *mdr-1*, которая четко коррелировала с переходом YB-1 в ядро, оказалось, что эффект такого перехода на физиологию опухолевых клеток может быть связан с ингибированием гена белка p53 [115]. Уровень этого белка значительно повышается при разнообразных воздействиях на клетку, вызывающих повреждение ДНК (различные типы облучения, токсичные химические агенты и т.п.). p53 участвует в запуске механизмов, позволяющих клетке восстановить целостность генома, а при наиболее тяжелых повреждениях активность p53 приводит к клеточной смерти (апоптозу), препятствуя злокачественной трансформации клеток [118]. Оказалось, что YB-1, накапливаясь в ядре, способен ингибировать промотор гена p53, предотвращая его экспрессию. Ингибирование синтеза p53, наряду с запуском синтеза гликопротеина Р, при ядерной локализации YB-1, способствует более агрессивному поведению злокачественной опухоли, что, в свою очередь, приводит к плохому прогнозу выздоровления. Кроме того, YB-1 активирует промотор гена металлопротеиназы гелатиназы А, которая расщепляет белки базальных мембран и способствует инвазии раковых клеток в соседние ткани [136]. Таким образом, переход YB-1 в ядро приводит к ряду событий, способствующих росту и размножению раковых клеток. Однако, внутриклеточные процессы, запускающие и регулирующие такой переход, особенно при перерождении клеток, почти не изучены (см. предыдущий раздел).

В некоторых случаях CSD-белки могут, по-видимому, выступать в роли супрессоров опухоли. Онкогенная трансформация может быть вызвана различными причинами, одной из которых является повышение активности протоонкобелков P3k (Phosphatidylinositol 3-kinase) и Akt, являющихся протеинкиназами инозитол-3-фосфат-/Akt-киназного пути, который запускается при обработке клеток некоторыми факторами роста и гормонами [16]. P3k и Akt вызывают трансформацию, стимулируя через каскад реакций процесс трансляции [2]. Оказалось, что дополнительная продукция YB-1 с плазмиды при-

водит к подавлению трансформации, вызванной возросшей активностью Р3к или Akt, и возвращает трансформированным клеткам нормальный фенотип [5]. Однако супрессорный эффект YB-1 не наблюдался в случае трансформации другими онкобелками, такими как Src, Jun, Qln. Авторы статьи показали, что наиболее вероятным механизмом подавления трансформирующего действия Р3к/Akt на клетки является ингибирование трансляции, вызванное повышением уровня белка YB-1. В отличие от вышеприведенных примеров, когда YB-1 действовал в ядре на уровне транскрипции и стимулировал развитие рака, в данном случае YB-1 подавлял трансформацию, проявляя свое действие на уровне трансляции в цитоплазме.

IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя вышеизложенные данные, можно утверждать, что CSD-белки являются одними из ключевых регуляторов внутриклеточных процессов у про- и эукариот. Широкое распространение среди различных видов организмов и высокая степень гомологии свидетельствуют о древнем происхождении белков этого семейства. Несмотря на то, что CSD-белки были охарактеризованы сравнительно недавно и их интенсивное исследование началось лишь в последние годы, поражает все более расширяющийся с каждым годом спектр функций, обнаруживаемых у этих белков. Например, совершенно неожиданным явилось сообщение в 2003 году о наличии у такого хорошо описанного белка *Xenopus* как FRGY2 способности регулировать структуру ядрышек в оогенезе. Таким образом, CSD-белки являются чрезвычайно интересным и богатым на сюрпризы объектом исследований.

Пристальное внимание к CSD-белкам приковано, прежде всего, по причине их участия в ответах на стрессы. Бактериальные CSD-белки помогают клеткам преодолеть стресс, вызванный понижением температуры окружающей среды (холодовой шок). Эукариотические CSD-белки задействованы в более широком наборе внутриклеточных реакций, что, по-видимому, вызвало появление у них дополнительных доменов помимо CSD.

Интенсивные исследования CSD-белков в течение последних лет пока не смогли ответить на несколько важнейших вопросов. В случае прокариотических CSD-белков до сих пор неизвестны функции большинства членов этого семейства. И даже для относительно хорошо изученного представителя семейства, белка CspA *E. coli*, пока не до конца ясны механизмы, регулирующие его продукцию после понижения температуры, так же как и не известна функция этого белка в

клетках, растущих при оптимальной температуре. Более драматична ситуация с CSD-белками эукариот. Многие реакции, в которых они участвуют, особенно такие, как транскрипция или трансляция, требуют строгой регуляции активности этих белков. Тем не менее, до сих пор имеются очень скудные сведения как о ковалентных модификациях, которые могли бы регулировать их активность, так и о механизмах, запускающих или ингибирующих их синтез в клетке. Практически ничего неизвестно о регуляции времени жизни CSD-белков в клетке. Эти вопросы требуют скорейшего решения, особенно в связи с их значением для понимания роли CSD-белков в таких важнейших процессах, как рак, эмбриональное развитие, дифференцировка клеток и т.д.

Авторы благодарят Н.С.Богатыреву за помощь в подготовке рисунков и Е.В.Сереброву за внимательное прочтение и тщательную корректировку текста обзора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ansari, S.A., Safak, M., Gallia, G.L., Sawaya, B.E., Amini, S., Khalili, K. (1999) *J. Gen. Virol.*, **80** (Pt 10), 2629–2638.
2. Aoki, M., Blazek, E., Vogt, P.K. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 136–141.
3. Ashizuka, M., Fukuda, T., Nakamura, T., Shirasuna, K., Iwai, K., Izumi, H., Kohno, K., Kuwano, M., Uchiyumi, T. (2002) *Mol. Cell Biol.*, **22**, 6375–6383.
4. Auerbach, S., Pederson, T. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**, 149–156.
5. Bader, A.G., Felts, K.A., Jiang, N., Chang, H.W., Vogt, P.K. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 12384–12389.
6. Bae, W., Xia, B., Inouye, M., Severinov, K. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 7784–7789.
7. Balda, M.S., Matter, K. (2000) *EMBO J.*, **19**, 2024–2033.
8. Balda, M.S., Garrett, M.D., Matter, K. (2003) *J. Cell Biol.*, **160**, 423–432.
9. Bargou, R.C., Jurchott, K., Wagener, C., Bergmann, S., Metzner, S., Bommert, K., Mapara, M.Y., Winzer, K.J., Dietel, M., Dorken, B., Royer, H.D. (1997) *Nat. Med.*, **3**, 447–450.
10. Beran, R.K., Simons, R.W. (2001) *Mol. Microbiol.*, **39**, 112–125.
11. Blobel, G. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 88–95.
12. Bouvet, P., Wolffe, A.P. (1994) *Cell*, **77**, 931–941.
13. Bouvet, P., Matsumoto, K., Wolffe, A.P. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 28297–28303.
14. Brandi, A., Pietroni, P., Gualerzi, C.O., Pon, C.L. (1996) *Mol. Microbiol.*, **19**, 231–240.
15. Brandi, A., Spurio, R., Gualerzi, C.O., Pon, C.L. (1999) *EMBO J.*, **18**, 1653–1659.
16. Brazil, D.P., Park, J., Hemmings, B.A. (2002) *Cell*, **111**, 293–303.
17. Broeze, R.J., Solomon, C.J., Pope, D.H. (1978) *J. Bacteriol.*, **134**, 861–874.
18. Bult, C.J., White, O., Olsen, G.J., Zhou, L., Fleischmann, R.D., Sutton, G.G., Blake, J.A., FitzGerald, L.M., Clayton, R.A., Gocayne, J.D., Kerlavage, A.R., Dougherty, B.A., Tomb, J.F., Adams, M.D., Reich, C.I., Overbeek, R., Kirkness, E.F., Weinstock, K.G., Merrick, J.M., Glodek, A., Scott,

- J.L., Geoghagen, N.S., Venter, J.C.* (1996) *Science*, **273**, 1058–1073.
19. *Bycroft, M., Hubbard, T.J., Proctor, M., Freund, S.M., Murzin, A.G.* (1997) *Cell*, **88**, 235–242.
 20. *Capowski, E.E., Esnault, S., Bhattacharya, S., Malter, J.S.* (2001) *J. Immunol.*, **167**, 5970–5976.
 21. *Chansky, H.A., Hu, M., Hickstein, D.D., Yang, L.* (2001) *Cancer Res.*, **61**, 3586–3590.
 22. *Chen, C.Y., Gherzi, R., Andersen, J.S., Gaietta, G., Jurchott, K., Royer, H.D., Mann, M., Karin, M.* (2000) *Genes Dev.*, **14**, 1236–1248.
 23. *Cleavinger, P.J., Shin, B.A., Kandala, J.C., Nambiar, A., Swamynathan, S.K., Guntaka, R.V.* (1996) *Virology*, **222**, 133–143.
 24. *Coburn, G.A., Mackie, G.A.* (1999) *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.*, **62**, 55–108.
 25. *Cohen, I., Reynolds, W.F.* (1991) *Nucleic Acids Res.*, **19**, 4753–4759.
 26. *Coles, L.S., Diamond, P., Occhiodoro, F., Vadas, M.A., Shannon, M.F.* (1996) *Nucleic Acids Res.*, **24**, 2311–2317.
 27. *Coles, L.S., Diamond, P., Occhiodoro, F., Vadas, M.A., Shannon, M.F.* (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 14482–14493.
 28. *Coles, L.S., Diamond, P., Lambrusco, L., Hunter, J., Burrows, J., Vadas, M.A., Goodall, G.J.* (2002) *Nucleic Acids Res.*, **30**, 4845–4854.
 29. *Cummings, A., Sommerville, J.* (1988) *J. Cell Biol.*, **107**, 45–56.
 30. *Darnbrough, C.H., Ford, P.J.* (1981) *Eur. J. Biochem.*, **113**, 415–424.
 31. *Davies, H.G., Giorgini, F., Fajardo, M.A., Braun, R.E.* (2000) *Dev. Biol.*, **221**, 87–100.
 32. *Davydova, E.K., Evdokimova, V.M., Ovchinnikov, L.P., Hershey, J.W.* (1997) *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2911–2916.
 33. *Dearsly, A.L., Johnson, R.M., Barrett, P., Sommerville, J.* (1985) *Eur. J. Biochem.*, **150**, 95–103.
 34. *Decker, C.J., Parker, R.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 12512–12514.
 35. *Dersch, P., Kneip, S., Bremer, E.* (1994) *Mol. Gen. Genet.*, **245**, 255–259.
 36. *Deschamps, S., Viel, A., Garrigos, M., Denis, H., le Maire, M.* (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 13799–13802.
 37. *Deschamps, S., Jacquemin-Sablon, H., Triqueneaux, G., Mulner-Lorillon, O., Potier, M., Le Caer, J.P., Dautry, F., le Maire, M.* (1997) *FEBS Lett.*, **412**, 495–500.
 38. *Didier, D.K., Schiffenbauer, J., Woulfe, S.L., Zacheis, M., Schwartz, B.D.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7322–7326.
 39. *Doniger, J., Landsman, D., Gonda, M.A., Wistow, G.* (1992) *New Biol.*, **4**, 389–395.
 40. *Ermolenko, D.N., Makhataдзе, G.I.* (2002) *Cell. Mol. Life Sci.*, **59**, 1902–1913.
 41. *Evdokimova, V., Ruzanov, P., Imataka, H., Raught, B., Svitkin, Y., Ovchinnikov, L.P., Sonenberg, N.* (2001) *EMBO J.*, **20**, 5491–5502.
 42. *Evdokimova, V.M., Wei, C.L., Sitikov, A.S., Simonenko, P.N., Lazarev, O.A., Vasilenko, K.S., Ustinov, V.A., Hershey, J.W., Ovchinnikov, L.P.* (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 3186–3192.
 43. *Evdokimova, V.M., Kovrigina, E.A., Nashchekin, D.V., Davydova, E.K., Hershey, J.W., Ovchinnikov, L.P.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 3574–3581.
 44. *Evdokimova, V.M., Ovchinnikov, L.P.* (1999) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **31**, 139–149.
 45. *Falsone, S.F., Weichel, M., Cramer, R., Breitenbach, M., Kungl, A.J.* (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 16512–16516.

46. Fang, L., Jiang, W., Bae, W., Inouye, M. (1997) *Mol. Microbiol.*, **23**, 355–364.
47. Feng, Y., Huang, H., Liao, J., Cohen, S.N. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 31651–31656.
48. Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., et al. (1995) *Science*, **269**, 496–512.
49. Ford, P.J., Mathieson, T., Rosbash, M. (1977) *Dev. Biol.*, **57**, 417–426.
50. Frank-Kamenetskii, M.D., Mirkin, S.M. (1995) *Annu. Rev. Biochem.*, **64**, 65–95.
51. Fraser, C.M., Gocayne, J.D., White, O., Adams, M.D., Clayton, R.A., Fleischmann, R.D., Bult, C.J., Kerlavage, A.R., Sutton, G., Kelley, J.M., et al. (1995) *Science*, **270**, 397–403.
52. Friedman, H., Lu, P., Rich, A. (1971) *J. Mol. Biol.*, **61**, 105–121.
53. Fukada, T., Tonks, N.K. (2003) *EMBO J.*, **22**, 479–493.
54. Gaudreault, I., Guay, D., Lebel, M. (2004) *Nucleic Acids Res.*, **32**, 316–327.
55. Giorgini, F., Davies, H.G., Braun, R.E. (2001) *Mol. Cell Biol.*, **21**, 7010–7019.
56. Goldenberg, D., Azar, I., Oppenheim, A.B. (1996) *Mol. Microbiol.*, **19**, 241–248.
57. Goldenberg, D., Azar, I., Oppenheim, A.B., Brandi, A., Pon, C.L., Gualerzi, C.O. (1997) *Mol. Gen. Genet.*, **256**, 282–290.
58. Goldsmith, M.E., Madden, M.J., Morrow, C.S., Cowan, K.H. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 5856–5860.
59. Goldstein, J., Pollitt, N.S., Inouye, M. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 283–287.
60. Gonda, K., Fowler, J., Katoku-Kikyo, N., Haroldson, J., Wudel, J., Kikyo, N. (2003) *Nat. Cell Biol.*, **5**, 205–210.
61. Grant, C.E., Deeley, R.G. (1993) *Mol. Cell Biol.*, **13**, 4186–4196.
62. Graumann, P., Marahiel, M.A. (1994) *FEBS Lett.*, **338**, 157–160.
63. Graumann, P., Wendrich, T.M., Weber, M.H., Schroder, K., Marahiel, M.A. (1997) *Mol. Microbiol.*, **25**, 741–756.
64. Graumann, P.L., Marahiel, M.A. (1998) *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 286–290.
65. Gu, C., Oyama, T., Osaki, T., Kohno, K., Yasumoto, K. (2001) *Anticancer Res.*, **21**, 2357–2362.
66. Gu, W., Tekur, S., Reinbold, R., Eppig, J.J., Choi, Y.C., Zheng, J.Z., Murray, M.T., Hecht, N.B. (1998) *Biol. Reprod.*, **59**, 1266–1274.
67. Gualerzi, C.O., Pon, C.L. (1990) *Biochemistry*, **29**, 5881–5889.
68. Gualerzi, C.O., Giuliadori, A.M., Pon, C.L. (2003) *J. Mol. Biol.*, **331**, 527–539.
69. Gurdon, J.B., Brown, D.D. (1965) *J. Mol. Biol.*, **12**, 27–35.
70. Hanna, M.M., Liu, K. (1998) *J. Mol. Biol.*, **282**, 227–239.
71. Hasegawa, S.L., Doetsch, P.W., Hamilton, K.K., Martin, A.M., Okenquist, S.A., Lenz, J., Boss, J.M. (1991) *Nucleic Acids Res.*, **19**, 4915–4920.
72. Hayman, M.L., Read, L.K. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 12067–12074.
73. Hellen, C.U., Sarnow, P. (2001) *Genes Dev.*, **15**, 1593–1612.
74. Herbert, T.P., Hecht, N.B. (1999) *Nucleic Acids Res.*, **27**, 1747–1753.
75. Higashi, K., Inagaki, Y., Fujimori, K., Nakao, A., Kaneko, H., Nakatsuka, I. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 43470–43479.
76. Hillier, B.J., Rodriguez, H.M., Gregoret, L.M. (1998) *Fold Des.*, **3**, 87–93.

77. Himmelreich, R., Hilbert, H., Plagens, H., Pirkl, E., Li, B.C., Herrmann, R. (1996) *Nucleic Acids Res.*, **24**, 4420–4449.
78. Holm, P.S., Bergmann, S., Jurchott, K., Lage, H., Brand, K., Ladhoff, A., Mantwill, K., Curiel, D.T., Dobbelsstein, M., Dietel, M., Gansbacher, B., Royer, H.D. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 10427–10434.
79. Horwitz, E.M., Maloney, K.A., Ley, T.J. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 14130–14139.
80. Hu, K.H., Liu, E., Dean, K., Gingras, M., DeGraff, W., Trun, N.J. (1996) *Genetics*, **143**, 1521–1532.
81. Hunt, S.L., Hsuan, J.J., Totty, N., Jackson, R.J. (1999) *Genes Dev.*, **13**, 437–448.
82. Irwin, D., Kumar, A., Malt, R.A. (1975) *Cell*, **4**, 157–165.
83. Ise, T., Nagatani, G., Imamura, T., Kato, K., Takano, H., Nomoto, M., Izumi, H., Ohmori, H., Okamoto, T., Ohga, T., Uchiumi, T., Kuwano, M., Kohno, K. (1999) *Cancer Res.*, **59**, 342–346.
84. Ito, K., Tsutsumi, K., Kuzumaki, T., Gomez, P.F., Otsu, K., Ishikawa, K. (1994) *Nucleic Acids Res.*, **22**, 2036–2041.
85. Izumi, H., Imamura, T., Nagatani, G., Ise, T., Murakami, T., Uramoto, H., Torigoe, T., Ishiguchi, H., Yoshida, Y., Nomoto, M., Okamoto, T., Uchiumi, T., Kuwano, M., Funa, K., Kohno, K. (2001) *Nucleic Acids Res.*, **29**, 1200–1207.
86. Jain, S.K., Pluskal, M.G., Sarkar, S. (1979) *FEBS Lett.*, **97**, 84–90.
87. Janz, M., Harbeck, N., Dettmar, P., Berger, U., Schmidt, A., Jurchott, K., Schmitt, M., Royer, H.D. (2002) *Int. J. Cancer*, **97**, 278–282.
88. Jiang, W., Fang, L., Inouye, M. (1996) *Genes Cells*, **1**, 965–976.
89. Jiang, W., Hou, Y., Inouye, M. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 196–202.
90. Jones, P.G., VanBogelen, R.A., Neidhardt, F.C. (1987) *J. Bacteriol.*, **169**, 2092–2095.
91. Jones, P.G., Krah, R., Tafuri, S.R., Wolffe, A.P. (1992) *J. Bacteriol.*, **174**, 5798–5802.
92. Jones, P.G., Inouye, M. (1994) *Mol. Microbiol.*, **11**, 811–818.
93. Juan, G., Pan, W., Darzynkiewicz, Z. (1996) *Exp. Cell Res.*, **227**, 197–202.
94. Jurchott, K., Bergmann, S., Stein, U., Walther, W., Janz, M., Manni, I., Piaggio, G., Fietze, E., Dietel, M., Royer, H.D. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 27988–27996.
95. Kamura, T., Yahata, H., Amada, S., Ogawa, S., Sonoda, T., Kobayashi, H., Mitsumoto, M., Kohno, K., Kuwano, M., Nakano, H. (1999) *Cancer*, **85**, 2450–2454.
96. Kandala, J.C., Guntaka, R.V. (1994) *Virology*, **198**, 514–523.
97. Kandrор, K.V., Stepanov, A.S. (1984) *FEBS Lett.*, **170**, 33–37.
98. Karlson, D., Imai, R. (2003) *Plant. Physiol.*, **131**, 12–15.
99. Katsu, Y., Yamashita, M., Nagahama, Y. (1997) *Eur. J. Biochem.*, **249**, 854–861.
100. Kick, D., Barrett, P., Cummings, A., Sommerville, J. (1987) *Nucleic Acids Res.*, **15**, 4099–4109.
101. Kloks, C.P., Spronk, C.A., Lasonder, E., Hoffmann, A., Vuister, G.W., Grzesiek, S., Hilbers, C.W. (2002) *J. Mol. Biol.*, **316**, 317–326.
102. Kohno, K., Izumi, H., Uchiumi, T., Ashizuka, M., Kuwano, M. (2003) *Bioessays*, **25**, 691–698.
103. Kohwi-Shigematsu, T., Kohwi, Y. (1985) *Cell*, **43**, 199–206.

104. Koike, K., Uchiumi, T., Ohga, T., Toh, S., Wada, M., Kohno, K., Kuwano, M. (1997) FEBS Lett., **417**, 390–394.
105. Kolluri, R., Kinniburgh, A.J. (1991) Nucleic Acids Res., **19**, 4771.
106. Kolluri, R., Torrey, T.A., Kinniburgh, A.J. (1992) Nucleic Acids Res., **20**, 111–116.
107. Kremer, W., Schuler, B., Harrieder, S., Geyer, M., Gronwald, W., Welker, C., Jaenicke, R., Kalbitzer, H.R. (2001) Eur. J. Biochem., **268**, 2527–2539.
108. Kudo, S., Mattei, M.G., Fukuda, M. (1995) Eur. J. Biochem., **231**, 72–82.
109. Kumar, A., Pederson, T. (1975) J. Mol. Biol., **96**, 353–365.
110. Kwon, Y.K., Murray, M.T., Hecht, N.B. (1993) Dev. Biol., **158**, 99–100.
111. La Teana, A., Brandi, A., Falconi, M., Spurio, R., Pon, C.L., Gualerzi, C.O. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**, 10907–10911.
112. Lodomery, M., Sommerville, J. (1994) Nucleic Acids Res., **22**, 5582–5589.
113. Landsman, D. (1992) Nucleic Acids Res., **20**, 2861–2864.
114. Lasham, A., Lindridge, E., Rudert, F., Onrust, R., Watson, J. (2000) Gene, **252**, 1–13.
115. Lasham, A., Moloney, S., Hale, T., Homer, C., Zhang, Y.F., Murison, J.G., Braithwaite, A.W., Watson, J. (2003) J. Biol. Chem., **278**, 35516–35523.
116. Lee, S.J., Xie, A., Jiang, W., Etcheagaray, J.P., Jones, P.G., Inouye, M. (1994) Mol. Microbiol., **11**, 833–839.
117. Lenz, J., Okenquist, S.A., LoSardo, J.E., Hamilton, K.K., Doetsch, P.W. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**, 3396–3400.
118. Levine, A.J. (1997) Cell, **88**, 323–331.
119. Li, J., Hawkins, I.C., Harvey, C.D., Jennings, J.L., Link, A.J., Patton, J.G. (2003) Mol. Cell Biol., **23**, 7437–7447.
120. Li, W.W., Hsiung, Y., Wong, V., Galvin, K., Zhou, Y., Shi, Y., Lee, A.S. (1997) Mol. Cell Biol., **17**, 61–68.
121. Lindberg, U., Sundquist, B. (1974) J. Mol. Biol., **86**, 451–468.
122. Lloberas, J., Maki, R.A., Celada, A. (1995) Mol. Cell Biol., **15**, 5092–5099.
123. Lopez, M.M., Yutani, K., Makhatadze, G.I. (1999) J. Biol. Chem., **274**, 33601–33608.
124. Lopez, M.M., Makhatadze, G.I. (2000) Biochim. Biophys. Acta., **1479**, 196–202.
125. Lopez, M.M., Yutani, K., Makhatadze, G.I. (2001) J. Biol. Chem., **276**, 15511–15518.
126. MacDonald, G.H., Itoh-Lindstrom, Y., Ting, J.P. (1995) J. Biol. Chem., **270**, 3527–3533.
127. Makino, Y., Ohga, T., Toh, S., Koike, K., Okumura, K., Wada, M., Kuwano, M., Kohno, K. (1996) Nucleic Acids Res., **24**, 1873–1878.
128. Manival, X., Ghisolfi-Nieto, L., Joseph, G., Bouvet, P., Erard, M. (2001) Nucleic Acids Res., **29**, 2223–2233.
129. Mansfield, J.H., Wilhelm, J.E., Hatzelrigg, T. (2002) Development, **129**, 197–209.
130. Marello, K., LaRovere, J., Sommerville, J. (1992) Nucleic Acids Res., **20**, 5593–5600.
131. Marenstein, D.R., Ocampo, M.T., Chan, M.K., Altamirano, A., Basu, A.K., Boorstein, R.J., Cunningham, R.P., Teebor, G.W. (2001) J. Biol. Chem., **276**, 21242–21249.
132. Matsumoto, K., Meric, F., Wolffe, A.P. (1996) J. Biol. Chem., **271**, 22706–22712.

133. *Matsumoto, K., Wolffe, A.P.* (1998(B)) Trends Cell Biol., **8**, 318–323.
134. *Meric, F., Matsumoto, K., Wolffe, A.P.* (1997) J. Biol. Chem., **272**, 12840–12846.
135. *Mertens, P.R., Harendza, S., Pollock, A.S., Lovett, D.H.* (1997) J. Biol. Chem., **272**, 22905–22912.
136. *Mertens, P.R., Steinmann, K., Alfonso-Jaume, M.A., En-Nia, A., Sun, Y., Lovett, D.H.* (2002) J. Biol. Chem., **277**, 24875–24882.
137. *Minich, W.B., Ovchinnikov, L.P.* (1992) Biochimie, **74**, 477–483.
138. *Minich, W.B., Maidebura, I.P., Ovchinnikov, L.P.* (1993) Eur. J. Biochem., **212**, 633–638.
139. *Mitchell, S.A., Spriggs, K.A., Coldwell, M.J., Jackson, R.J., Willis, A.E.* (2003) Mol. Cell, **11**, 757–771.
140. *Mitta, M., Fang, L., Inouye, M.* (1997) Mol. Microbiol., **26**, 321–335.
141. *Morel, C., Kayibanda, B., Scherrer, K.* (1971) FEBS Lett., **18**, 84–88.
142. *Morel, C., Gander, E.S., Herzberg, M., Dubochet, J., Scherrer, K.* (1973) Eur. J. Biochem., **36**, 455–464.
143. *Moss, E.G., Lee, R.C., Ambros, V.* (1997) Cell, **88**, 637–646.
144. *Mueller, U., Perl, D., Schmid, F.X., Heinemann, U.* (2000) J. Mol. Biol., **297**, 975–988.
145. *Murray, M.T., Krohne, G., Franke, W.W.* (1991) J. Cell. Biol., **112**, 1–11.
146. *Murray, M.T., Schiller, D.L., Franke, W.W.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 11–15.
147. *Murray, M.T.* (1994) Biochemistry, **33**, 13910–13917.
148. *Murzin, A.G.* (1993) EMBO J., **12**, 861–867.
149. *Nakashima, K., Kanamaru, K., Mizuno, T., Horikoshi, K.* (1996) J. Bacteriol., **178**, 2994–2997.
150. *Nekrasov, M.P., Ivshina, M.P., Chernov, K.G., Kovrigina, E.A., Evdokimova, V.M., Thomas, A.A., Hershey, J.W., Ovchinnikov, L.P.* (2003) J. Biol. Chem., **278**, 13936–13943.
151. *Neuhaus, K., Rapposch, S., Francis, K.P., Scherer, S.* (2000) J. Bacteriol., **182**, 3285–3288.
152. *Newkirk, K., Feng, W., Jiang, W., Tejero, R., Emerson, S.D., Inouye, M., Montelione, G.T.* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 5114–5118.
153. *Ng, H., Ingraham, J.L., Marr, A.G.* (1962) J. Bacteriol., **84**, 331–339.
154. *Obokata, J., Ohme, M., Hayashida, N.* (1991) Plant Mol. Biol., **17**, 953–955.
155. *Oda, Y., Sakamoto, A., Shinohara, N., Ohga, T., Uchiumi, T., Kohno, K., Tsuneyoshi, M., Kuwano, M., Iwamoto, Y.* (1998) Clin. Cancer Res., **4**, 2273–2277.
156. *Oda, Y., Ohishi, Y., Saito, T., Hino-shita, E., Uchiumi, T., Kinukawa, N., Iwamoto, Y., Kohno, K., Kuwano, M., Tsuneyoshi, M.* (2003) J. Pathol., **199**, 251–258.
157. *Ohga, T., Koike, K., Ono, M., Makino, Y., Itagaki, Y., Tanimoto, M., Kuwano, M., Kohno, K.* (1996) Cancer Res., **56**, 4224–4228.
158. *Ohga, T., Uchiumi, T., Makino, Y., Koike, K., Wada, M., Kuwano, M., Kohno, K.* (1998) J. Biol. Chem., **273**, 5997–6000.
159. *Ohmori, M., Shimura, H., Shimura, Y., Kohn, L.D.* (1996) Mol. Endocrinol., **10**, 76–89.
160. *Okamoto, T., Izumi, H., Imamura, T., Takano, H., Ise, T., Uchiumi, T., Kuwano, M., Kohno, K.* (2000) Oncogene, **19**, 6194–6202.

161. *Ovchinnikov, L.P., Skabkin, M.A., Ruzanov, P.V., Evdokimova, V.M.* (2001) *Mol. Biol. (Mosk)*, **35**, 548–558.
162. *Ozer, J., Faber, M., Chalkley, R., Sealy, L.* (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 22143–22152.
163. *Pelletier, M., Xu, Y., Wang, X., Zahariev, S., Pongor, S., Aletta, J.M., Read, L.K.* (2001) *Mol. Biochem. Parasitol.*, **118**, 49–59.
164. *Pelletier, M., Read, L.K.* (2003) *RNA*, **9**, 457–468.
165. *Phadtare, S., Inouye, M.* (1999) *Mol. Microbiol.*, **33**, 1004–1014.
166. *Phadtare, S., Inouye, M., Severinov, K.* (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 7239–7245.
167. *Phadtare, S., Tyagi, S., Inouye, M., Severinov, K.* (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 46706–46711.
168. *Pisarev, A.V., Skabkin, M.A., Thomas, A.A., Merrick, W.C., Ovchinnikov, L.P., Shatsky, I.N.* (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 15445–15451.
169. *Preobrazhensky, A.A., Spirin, A.S.* (1978) *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, **21**, 1–38.
170. *Raffetseder, U., Frye, B., Rauen, T., Jurchott, K., Royer, H.D., Jansen, P.L., Mertens, P.R.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 18241–18248.
171. *Raj, G.V., Safak, M., MacDonald, G.H., Khalili, K.* (1996) *J. Virol.*, **70**, 5944–5953.
172. *Ranjan, M., Tafuri, S.R., Wolffe, A.P.* (1993) *Genes Dev.*, **7**, 1725–1736.
173. *Rapp, T.B., Yang, L., Conrad, E.U., 3rd, Mandahl, N., Chansky, H.A.* (2002) *J. Orthop. Res.*, **20**, 723–729.
174. *Reid, K.L., Rodriguez, H.M., Hillier, B.J., Gregoret, L.M.* (1998) *Protein Sci.*, **7**, 470–479.
175. *Richter, J.D., Smith, L.D.* (1984) *Nature*, **309**, 378–380.
176. *Rodriguez, H.M., Vu, D.M., Gregoret, L.M.* (2000) *Protein Sci.*, **9**, 1993–2000.
177. *Ruzanov, P.V., Evdokimova, V.M., Korneeva, N.L., Hershey, J.W., Ovchinnikov, L.P.* (1999) *J. Cell Sci.*, **112**, 3487–3496.
178. *Safak, M., Gallia, G.L., Khalili, K.* (1999(A)) *Mol. Cell Biol.*, **19**, 2712–2723.
179. *Safak, M., Gallia, G.L., Ansari, S.A., Khalili, K.* (1999(B)) *J. Virol.*, **73**, 10146–10157.
180. *Safak, M., Khalili, K.* (2001) *J. Neurovirol.*, **7**, 288–292.
181. *Saji, H., Toi, M., Saji, S., Koike, M., Kohno, K., Kuwano, M.* (2003) *Cancer Lett.*, **190**, 191–197.
182. *Sakura, H., Maekawa, T., Imamoto, F., Yasuda, K., Ishii, S.* (1988) *Gene*, **73**, 499–507.
183. *Salvetti, A., Batistoni, R., Deri, P., Rossi, L., Sommerville, J.* (1998) *Dev. Biol.*, **201**, 217–229.
184. *Sands, J.F., Regnier, P., Cummings, H.S., Grunberg-Manago, M., Hershey, J.W.* (1988) *Nucleic Acids Res.*, **16**, 10803–10816.
185. *Sapru, M.K., Gao, J.P., Walke, W., Burmeister, M., Goldman, D.* (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 7203–7211.
186. *Sawaya, B.E., Khalili, K., Amini, S.* (1998) *J. Gen. Virol.*, **79 (Pt 2)**, 239–246.
187. *Schindelin, H., Marahiel, M.A., Heinemann, U.* (1993) *Nature*, **364**, 164–168.
188. *Schindelin, H., Jiang, W., Inouye, M., Heinemann, U.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5119–5123.
189. *Schindler, T., Herrler, M., Marahiel, M.A., Schmid, F.X.* (1995) *Nat. Struct. Biol.*, **2**, 663–673.

190. Schindler, T., Perl, D., Graumann, P., Sieber, V., Marahiel, M.A., Schmid, F.X. (1998) *Proteins*, **30**, 401–406.
191. Schindler, T., Graumann, P.L., Perl, D., Ma, S., Schmid, F.X., Marahiel, M.A. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 3407–3413.
192. Schnuchel, A., Wilscheck, R., Czisch, M., Herrler, M., Willimsky, G., Graumann, P., Marahiel, M.A., Holak, T.A. (1993) *Nature*, **364**, 169–171.
193. Schroder, K., Graumann, P., Schnuchel, A., Holak, T.A., Marahiel, M.A. (1995) *Mol. Microbiol.*, **16**, 699–708.
194. Shannon, M.F., Coles, L.S., Attema, J., Diamond, P. (2001) *J. Leukoc. Biol.*, **69**, 21–32.
195. Shaw, M.K., Ingraham, J.L. (1967) *J. Bacteriol.*, **94**, 157–164.
196. Shibahara, K., Sugio, K., Osaki, T., Uchiumi, T., Maehara, Y., Kohno, K., Yasumoto, K., Sugimachi, K., Kuwano, M. (2001) *Clin. Cancer Res.*, **7**, 3151–3155.
197. Shiba, K., Takano, H., Nakayama, Y., Okazaki, K., Nagata, N., Izumi, H., Uchiumi, T., Kuwano, M., Kohno, K., Itoh, H. (1999) *Int. J. Cancer*, **83**, 732–737.
198. Shnyreva, M., Schullery, D.S., Suzuki, H., Higaki, Y., Bomszyk, K. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 15498–15503.
199. Skabkin, M.A., Evdokimova, V., Thomas, A.A., Ovchinnikov, L.P. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 44841–44847.
200. Skabkina, O.V., Skabkin, M.A., Popova, N.V., Lyabin, D.N., Penalva, L.O., Ovchinnikov, L.P. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 18191–18198.
201. Sommerville, J. (1990) *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **42**, 225–233.
202. Sommerville, J., Baird, J., Turner, B.M. (1993) *J. Cell Biol.*, **120**, 277–290.
203. Sommerville, J., Lodomery, M. (1996) *FASEB J.*, **10**, 435–443.
204. Soop, T., Nashchekin, D., Zhao, J., Sun, X., Alzhanova-Ericsson, A.T., Bjorkroth, B., Ovchinnikov, L., Daneholt, B. (2003) *J. Cell Sci.*, **116**, 1493–1503.
205. Spitkovsky, D.D., Royer-Pokora, B., Delius, H., Kissel'jov, F., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Royer, H.D. (1992) *Nucleic Acids Res.*, **20**, 797–803.
206. Stein, U., Jurchott, K., Walther, W., Bergmann, S., Schlag, P.M., Royer, H.D. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 28562–28569.
207. Stenina, O.I., Poptic, E.J., DiCorleto, P.E. (2000) *J. Clin. Invest.*, **106**, 579–587.
208. Stenina, O.I., Shaneyfelt, K.M., DiCorleto, P.E. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 7277–7282.
209. Stickeler, E., Fraser, S.D., Honig, A., Chen, A.L., Berget, S.M., Cooper, T.A. (2001) *EMBO J.*, **20**, 3821–3830.
210. Svitkin, Y.V., Ovchinnikov, L.P., Dreyfuss, G., Sonenberg, N. (1996) *EMBO J.*, **15**, 7147–7155.
211. Swamynathan, S.K., Nambiar, A., Guntaka, R.V. (1997) *J. Virol.*, **71**, 2873–2880.
212. Swamynathan, S.K., Nambiar, A., Guntaka, R.V. (1998) *FASEB J.*, **12**, 515–522.
213. Tafuri, S.R., Wolffe, A.P. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 9028–9032.
214. Tafuri, S.R., Wolffe, A.P. (1992) *New Biol.*, **4**, 349–359.
215. Tafuri, S.R., Familiar, M., Wolffe, A.P. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 12213–12220.
216. Tafuri, S.R., Wolffe, A.P. (1993) *Trends Cell Biol.*, **3**, 94–98.
217. Tanabe, H., Goldstein, J., Yang, M., Inouye, M. (1992) *J. Bacteriol.*, **174**, 3867–3873.

218. Tanaka, T., Kondo, S., Iwasa, Y., Hiai, H., Toyokuni, S. (2000) *Am. J. Pathol.*, **156**, 2149–2157.
219. Thieringer, H.A., Jones, P.G., Inouye, M. (1998) *Bioessays*, **20**, 49–57.
220. Ting, J.P., Painter, A., Zeleznik-Le, N.J., MacDonald, G., Moore, T.M., Brown, A., Schwartz, B.D. (1994) *J. Exp. Med.*, **179**, 1605–1611.
221. Toh, S., Nakamura, T., Ohga, T., Koike, K., Uchiumi, T., Wada, M., Kuwano, M., Kohno, K. (1998) *Gene*, **206**, 93–97.
222. Tomb, J.F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E.F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H.G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzgerald, L.M., Lee, N., Adams, M.D., Venter, J.C., et al. (1997) *Nature*, **388**, 539–547.
223. Triqueneaux, G., Velten, M., Franzon, P., Dautry, F., Jacquemin-Sablon, H. (1999) *Nucleic Acids Res.*, **27**, 1926–1934.
224. Uchiumi, T., Kohno, K., Tanimura, H., Matsuo, K., Sato, S., Uchida, Y., Kuwano, M. (1993) *Cell Growth Differ.*, **4**, 147–157.
225. Uramoto, H., Izumi, H., Ise, T., Tada, M., Uchiumi, T., Kuwano, M., Yasumoto, K., Funa, K., Kohno, K. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 31694–31702.
226. van Venrooij, W.J., van Eekelen, C.A., Jansen, R.T., Princen, J.M. (1977) *Nature*, **270**, 189–191.
227. Wang, N., Yamanaka, K., Inouye, M. (1999) *J. Bacteriol.*, **181**, 1603–1609.
228. Wang, N., Yamanaka, K., Inouye, M. (2000) *Mol. Microbiol.*, **38**, 526–534.
229. Weber, M.H., Beckering, C.L., Marahiel, M.A. (2001) *J. Bacteriol.*, **183**, 7381–7386.
230. Willmsky, G., Bang, H., Fischer, G., Marahiel, M.A. (1992) *J. Bacteriol.*, **174**, 6326–6335.
231. Wistow, G. (1990) *Nature*, **344**, 823–824.
232. Wolffe, A.P., Tafuri, S., Ranjan, M., Familiar, M. (1992) *New Biol.*, **4**, 290–298.
233. Wolffe, A.P. (1994) *Bioessays*, **16**, 245–251.
234. Wolffe, A.P., Meric, F. (1996) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **28**, 247–257.
235. Xia, B., Etchegaray, J.P., Inouye, M. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 35581–35588.
236. Xia, B., Ke, H., Inouye, M. (2001) *Mol. Microbiol.*, **40**, 179–188.
237. Xia, B., Ke, H., Jiang, W., Inouye, M. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 6005–6011.
238. Yamanaka, K., Mitani, T., Ogura, T., Niki, H., Hiraga, S. (1994) *Mol. Microbiol.*, **13**, 301–312.
239. Yamanaka, K., Inouye, M. (1997) *J. Bacteriol.*, **179**, 5126–5130.
240. Yamanaka, K., Fang, L., Inouye, M. (1998) *Mol. Microbiol.*, **27**, 247–255.
241. Yamanaka, K., Inouye, M. (2001) *J. Bacteriol.*, **183**, 2808–2816.
242. Yamanaka, K., Inouye, M. (2001) *Genes Cells*, **6**, 279–290.
243. Yamanaka, K., Zheng, W., Crooke, E., Wang, Y.H., Inouye, M. (2001) *Mol. Microbiol.*, **39**, 1572–1584.
244. Yan, C., Tamm, I. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 144–148.
245. Yokoyama, H., Harigae, H., Takahashi, S., Furuyama, K., Kaku, M., Yamamoto, M., Sasaki, T. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **303**, 140–145.
246. Yu, J., Hecht, N.B., Schultz, R.M. (2001) *Biol. Reprod.*, **65**, 1260–1270.

247. Yu, J., Hecht, N.B., Schultz, R.M. (2002) *Biol. Reprod.*, **67**, 1093–1098.
248. Zangrossi, S., Briani, F., Ghisotti, D., Regonesi, M.E., Tortora, P., Deho, G. (2000) *Mol. Microbiol.*, **36**, 1470–1480.
249. Zasedateleva, O.A., Krylov, A.S., Prokopenko, D.V., Skabkin, M.A., Ovchinnikov, L.P., Kolchinsky, A., Mirzabekov, A.D. (2002) *J. Mol. Biol.*, **324**, 73–87.
250. Zeeb, M., Balbach, J. (2003) *Protein Sci.*, **12**, 112–123.
251. Zhang, Y.F., Homer, C., Edwards, S.J., Hananeia, L., Lasham, A., Royds, J., Sheard, P., Braithwaite, A.W. (2003) *Oncogene*, **22**, 2782–2794.