

ТРАНСЛЯЦИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ В РАННЕМ РАЗВИТИИ

© 2002 г.

А. С. ВОРОНИНА

Институт биохимии им. А. Н. Баха, РАН, Москва

I. Введение. II. Общие механизмы трансляционной регуляции в развитии. III. Регуляция синтеза белков, участвующих в созревании ооцитов. IV. Временная регуляция трансляции в оогенезе и эмбриогенезе. V. Регуляция синтеза рибосомных белков и факторов трансляции. VI. Регуляция трансляции локализованных мРНК. VII. Тканеспецифическая регуляция трансляции. VIII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Концепция трансляционной регуляции экспрессии генов, ответственных за раннее эмбриональное развитие, сформировалась в 60-ые годы в основном в результате работ А.С. Спирина с соавторами [2, 8, 9, 10, 77, 78] и работы К.А. Кафиани и М.Я. Тимофеевой [5]. Стало ясно, что синтез белка, активирующийся после оплодотворения, может происходить только на запасенных матрицах, ибо синтез мРНК начинается гораздо позже. Открытие информосом, в которых обнаруживается большая часть мРНК, синтезированных на стадии гастрюлы, указывало на то, что маскирование-демаскирование мРНК играет важную роль и в дальнейшем развитии эмбрионов. Было высказано предположение, что именно периодическое демаскирование определенных мРНК и является причиной наблюдаемой А.А. Нейфахом [6] периодичности морфогенетической функции ядер. Однако, лишь через два десятилетия стали постепенно накапливаться экспериментальные данные по конкретным механизмам регуляции активности индивидуальных мРНК в оогенезе и эмбриогенезе. В последнее десятилетие количество таких исследований бурно растет и многие авторы уже называют роль трансляционной регуляции «решающей в эмбриональном развитии».

Работа финансировалась грантом РФФИ № 00-04-48025

Адрес для корреспонденции: e-mail: voronina_a@mail.ru

II. ОБЩИЕ МЕХАНИЗМЫ ТРАНСЛЯЦИОННОЙ РЕГУЛЯЦИИ В РАЗВИТИИ

Регуляция экспрессии генов на уровне трансляции включает в себя репрессию—дерепрессию собственно трансляции, а также стабилизацию—дестабилизацию мРНК. Если мРНК накапливается после транскрипции для регулируемого запуска их в трансляцию, как это часто имеет место в оогенезе и эмбриогенезе, то такие матрицы должны быть защищены от действия РНКаз. Инактивацию и стабилизацию материнских мРНК в ооцитах *Xenopus* обеспечивает белок FRGY2 [51]. Это Y-box белок, гомологичный белку р50 кролика, являющегося основным белком информосом [7]. Недавно открыт еще один белок, связывающийся в большом количестве с мРНК в ооцитах *Xenopus* [50]. Этот белок назван xCIR2 (cold-inducible RNA-binding protein), по аналогии с гомологичным белком млекопитающих. После того, как на данной мРНК завершился акт синтеза белка, она либо распадается под действием нуклеаз, либо стабилизируется и сохраняется до следующего цикла трансляционной активности. Есть еще и третий вариант, на который пока не очень обращают внимание, но который логически следует из самого принципа пространственной регуляции трансляции. Речь идет о распаде мРНК, так и не участвовавшей в трансляции.

Большинство исследований на сегодняшний день сосредоточены на выявлении тех последовательностей в нетранслируемых областях мРНК (3'UTR и 5'UTR), которые необходимы для репрессии или активации трансляции, для стабилизации — дестабилизации мРНК и для ее локализации в клетке. Такие последовательности называют цис-элементами. Иногда важна не сама последовательность нуклеотидов, а тот элемент вторичной структуры, который эта последовательность создает. Кроме того, идет активный поиск белков (транс-факторов), связывающихся с этими последовательностями мРНК и осуществляющими вышеперечисленные функции. В таблице приведены названия и функции некоторых цис-элементов и транс-факторов. Много работ посвящено регуляции полиаденилирования и деаденилирования мРНК, так как цитоплазматическое полиаденилирование во многих случаях запускает трансляцию на маскированных матрицах. Цитоплазматическое полиаденилирование осуществляется во всех исследованных эукариотах и является крайне консервативным механизмом регуляции функционирования мРНК на ранних стадиях развития. [86]. Полиаденилирование осуществляется поли(А)-полимеразами (РАР), одна из которых находится в ядре, а другая локализована в цитоплазме [57]. В регуляции цитоплазматического полиаденилирования задействованы два цис-элемента: СРЕ (cytoplasmic polyade-

nilation element) и HN (hexanucleotide) и соответственно два белковых фактора: CPEB (CPE-binding protein) и CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor). Описаны и другие элементы, необходимые для полиаденилирования, в том числе специфичные для эмбрионов (см. таблицу). С поли(А) хвостами связывается белок PABP (poly(A)-binding protein), а также коровый белок информосом – p50 [7]. Считается, что белок, связывающий поли(А), реагирует с кэп-связывающим инициаторным комплексом eIF4F, включающим в себя кэп-узнающую субъединицу - eIF4E, и тем самым инициирует трансляцию [1, 7, 11]. Было обнаружено, что для стимуляции трансляции необходимо связывание PABP с eIF4G [32, 56, 84]. По данным Грея с соавт. PABP стимулирует трансляцию, будучи привязан к 3'UTR и в отсутствие поли(А) хвоста [32]. Моделируют PABP-зависимую стимуляцию трансляции и белки Paip (PABP-interacting protein) [80].

В свою очередь, деаденилирование вызывает репрессию трансляции. Описано несколько систем, отвечающих за деаденилирование. Цис-элемент TGE (tandemly repeated element) найден в *C.elegans* (mRNA tra-2), в яйцах *Xenopus* и в человеческом онкогене GLI [83]. Показано, что TGE репрессирует трансляцию в зародышах только тех мРНК, которые имеют поли(А) хвосты. Деаденилирование таких матриц приводит к их стабилизации. Транс-фактором, реагирующим с TGE, является белок GLD-1 (germ line deadenylation), член семейства STAR [36, 83]. Аналогичная система, репрессирующая трансляцию через деаденилирование — это цис-элемент ARE (AU-rich element) и белок семейства ELAV — Hu R. [27, 87]. После оплодотворения в зародышах *Xenopus* происходит деаденилирование и инактивация ряда матриц, содержащих в 3'UTR последовательность EDEN (embryo deadenylation element) [62]. Однако деаденилирование может быть также и первым этапом распада определенных мРНК. Интересная модель регуляции трансляции и деградции мРНК приводится в обзоре Митчела и Толлерева [56]. Модель основана на данных, полученных на дрожжах. При выходе из ядра в цитоплазму часть белков ядерных РНП остается в связи с мРНК до первого акта трансляции. К таким белкам относится и ядерный кэп-связывающий комплекс (CBC), реагирующий с eIF4G и запускающий трансляцию. В результате первого цикла трансляции ядерные белки уходят с мРНК и поли(А) связывается через PABP с eIF4G, замыкая кольцо, что и активирует дальнейшую трансляцию. Нарушение в этом первом цикле приводит к быстрой деградции мРНК, начинающейся с отрезания кэпа. Такое нарушение можно вызвать, например, введением терминирующего кодона перед местом стыка интронов. С этим местом предположительно связан ядерный белок, участвующий в сплайсинге

Таблица
Цис- и транс- элементы, регулирующие трансляцию мРНК

1	2	3	4	5	6
Название цис-элемента	Последовательность нуклеотидов	Название транс-фактора	Свойства транс-фактора, основные домены	Функции	Источник
Поли(А)	Poly(A)	1. РАРВ (poly(A)-binding protein) 2. РАРN, РАН (члены семейства РНКазD)	1. М = 70 kD, 4 РНК-связывающих домена с RNP1 и RNP2 2. Поли(А)-специфичные РНКазы, в цитоплазме М = 62 kD, в ядре М = 74 kD	1. Активация трансляции 2. Деаденилирование	[7, 32] [20]
CPE (cytoplasmic polyadenylation element)	UUUUUAAU	CPEB (CPE-binding protein) Фосфорилированный CPEB	RRM (RNA-recognition motif), Zink finger	Репрессия полиаденилирования Активация полиаденилирования	[14, 33, 53, 57, 67, 73, 86]
eCPE (embryonic CPE)	(U) ₁₂₋₂₇	ElrA (член семейства ELAV)	РНК-связывающий	Активация полиаденилирования	[67]
C motif	(C) ₁₄	α-CP2/hmRNP-E2	РНК-связывающий, КН-домены	Активация полиаденилирования	[61]
HN (hexanucleotide), NPE (nuclear polyadenylation element)	AAUAAA	HNBP (HN-binding protein), CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor)	Комплекс из четырёх полипептидов	Ядерное полиаденилирование. Участие в цитоплазматическом полиаденилировании	[53]
ARE (AU-rich element)	AUUUA	ELAV-семейство: HuR, Hel-X1	РНК-связывающие 3 RRM	Деаденилирование	[27, 87]
TGE (tandemly repeated element)		GLD-1, germ line deadenylation (член семейства STAR)	РНК-связывающий КН, QUA-1 и QUA-2	Деаденилирование	[36, 83]

см. продолжение табл.

		окончание табл.			
1	2	3	4	5	6
EDEN (embryo deadenylation element)	Core U(A/G) repeat	EDEN-VP (EDEN-binding protein), Bruno L-2	P53/p55 дуплет; 3 RRM, в каждом RNP1 и RNP2	Деаденилирование	[62]
SL (stem-loop)		SLBP1 и SLBP2	РНК-связывающий	1 - маскирует мРНК гистонов, 2 - активирует синтез гистонов	[90]
TCE (translational control element)	1. 90 нуклеотидов 2. 340 нуклеотидов	1. Smaug	1. РНК-связывающий, M = 120 kD 2. M = 38 kD	1. Репрессор трансляции мРНК <i>nanos</i> 2. Репрессия трансляции белка Vg1	[16, 45] [92]
BRE (Bruno-response element)	U(G/A)U(A/G)U(G/A)U	Bruno (аналог ELAV)	RRM, M = 80 kD	Репрессия трансляции мРНК <i>oskar</i>	[43, 45]
NRE (Nanos response element)	GUUGU-5b-AUUGUA	Pumilio + Nanos	Zink-fingers (Nanos) РНК-связывающий (Pum)	Репрессия трансляции мРНК <i>bicoid</i> и <i>hunchback</i>	[45, 75]
VLE (localization element mRNA Vg1)	340 нуклеотидов; содержит повторы: E1, E2, E3, E4.	1. Vg1/VgRBP 2. VgRBP60 (гомолог hnRNP1) 3. Prtp	1. 4 КН домена, RRM, RA (reticulum association) домен. 3. РНК-связывающий, пролин-богатый	Локализация транскрипта Vg1	[12, 21, 24, 25, 31, 34, 72, 95]
5'TOP (terminal oligopirimidin)		1. Гомолог La антигена, 2. CNBP (cellular nucleic acid binding protein)	1. РНК-связывающий 3 RRM, M = 57 kD 2. РНК-связывающий	1. Активация трансляции рибосомных белков 2. Инактивация трансляции рибосомных белков	[17, 22, 47, 49, 63, 84]

и выходящий вместе с мРНК в цитоплазму. Терминация трансляции без «слушивания» этого белка приводит к исчезновению мРНК.

Саму реакцию деаденилирования производит фермент PARN, относящийся к семейству РНКаз D [20]. Количество PARN нарастает в ооцитах *Xenopus* с III–IV стадии роста и далее после оплодотворения, достигая максимума на стадии гастрюлы. Видимо этот фермент необходим для предотвращения неконтролируемого полиаденилирования и запуска в трансляцию тех матриц, которые в ооцитах и зародышах должны быть маскированы.

III. РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА БЕЛКОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В СОЗРЕВАНИИ ООЦИТОВ

В закончивших рост ооцитах *Xenopus laevis* только 20% мРНК находится в полисомах, а 80% материнских мРНК маскированы [93]. Под действием прогестерона в ооцитах запускается протеин киназный каскад, первым звеном которого является падение уровня циклической АМФ и активация киназы Eg2, а последним – активация MPF (maturation – promoting factor), (рис. 1). MPF посредством пока неясных механизмов включает растворение зародышевого пузырька и мейоз [67]. Сам MPF состоит из регуляторной субъединицы – циклина и протеин киназы cdc2. Оказалось, что в этом киназном каскаде наряду с этапами активации определенных киназ за счет фосфорилирования наблюдается также и специфическая активация синтеза на запасенных матрицах некоторых белков – участников этого каскада [67, 94] (рис. 1). Для активации синтеза ряда белков необходим синтез или существенное удлинение поли(А) на 3' конце мРНК [74]. Так мРНКи для Eg2, Eg5, cdc2, циклинов A1, B1, B2 и Mos киназы (*c-mos*) в 3'UTR содержат элемент СРЕ [14, 67, 73]. СРЕ-связывающий белок (СРЕВ) связан с белком маскином, который имеет еще и eIF4E-связывающий домен [33]. В таком комплексе мРНК маскирована. Киназа Eg2 фосфорилирует СРЕВ, что приводит как к диссоциации маскина от кэп-связывающей субъединицы eIF4E, так и к стимуляции полиаденилирование *c-mos* [33, 53]. Образовавшиеся полиА хвосты связывают РАВР, который в свою очередь, связывает фактор инициации eIF4G-1 [32, 38]. Далее происходит каскад взаимодействий различных факторов трансляции, 5'САР-конца мРНК и рибосомы, приводящий к синтезу белка на данных матрицах. В свою очередь MAPK (mitogen-activated protein kinase), также стимулирует полиаденилирование мРНК *c-mos*, образуя кольцо обратной положительной регуляции [35] (рис. 1). Активация же синтеза циклина В, но не Mos, происходит и в отсутствие полиаденилирования (несмотря

на присутствие СРЕ в 3'UTR) и не зависит от MAPK активности [29, 35], что говорит о разных механизмах регуляции трансляции этих двух мРНК. Японскими авторами описан белок XPut (гомолог белка Pumilio в дрозофиле), который связывается с UGUA-последовательностью в 3'UTR мРНК циклина В1 и, кроме того, связывается с СРЕВ [58]. Авторы предполагают, что XPut может контролировать СРЕВ/maskin направляемое маскирование и демаскирование мРНК циклина В1. Интересно отметить, что белки СРЕВ и маскин колокализированы с тубулином в центросомах и веретене [33].

Белок Wee1, синтезирующийся на стадии оогенеза I, постепенно исчезает из ооцита и вновь обнаруживается лишь во время второго мейотического деления. Отсутствие этого белка в первом мейотическом делении важно для исключения интерфазы перед вторым мейотическим делением [59]. Однако, мРНК для этого белка присутствует в ооците на всех стадиях роста и созревания. Это указывает на то, что синтез и этого белка регулируется на уровне трансляции. В мРНК XеWee1 обнаружен СРЕ элемент, участвующий в репрессии трансляции Wee1 [59].

Трансляционной регуляции подвержены также мРНК ядерного белка lamin B1 [68]. Эта мРНК содержит на 3'UTR как СРЕ-подобный элемент, так и NPE (nuclear polyadenylation element). В ооцитах эта мРНК зарепрессирована, при созревании стимулируется полиаденилирование и активация трансляции. После оплодотворения синтез lamin B1 продолжается вплоть до средней бластулы, но этот синтез уже не зависит от СРЕ.

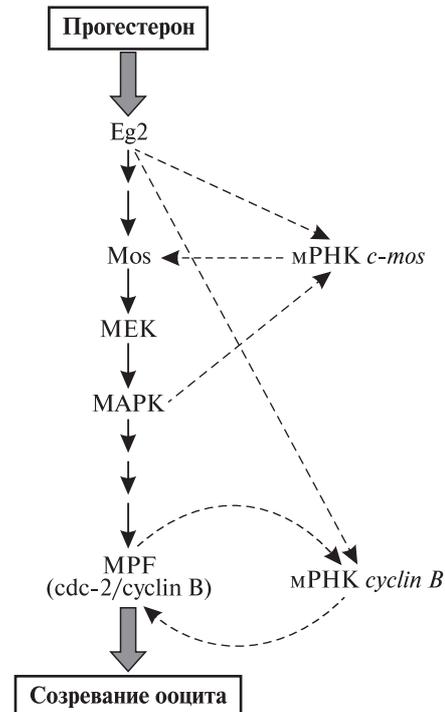


Рис. 1. Схема фосфокиназного каскада, усиленного синтезом Mos-киназы и циклина В на запасённых матрицах.

—> фосфорилирование,
 - - -> стимуляция трансляции.

В ооцитах моллюска *Spisula solidissima* найден функциональный и структурный гомолог белка СРЕВ – р82. После оплодотворения р82 подвергается быстрому *cdc2*-зависимому фосфорилированию и при первых делениях дробления деградирует [55, 89]. Авторы предполагают, что этот белок, как и его аналог в ооцитах *Xenopus*, отвечает за маскирование материнских мРНК, а его фосфорилирование приводит к демаскированию.

После оплодотворения происходит специфическое деаденилирование мРНК *Eg2*, *Eg5* и *c-mos* [62]. За это деаденилирование отвечает цис-элемент на 3'UTR, называемый EDEN, и транс-фактор EDEN-VP (см. таблицу). Во время дробления происходит последовательная активация–инактивация MPF за счет синтеза–распада циклина В и дефосфорилирования–фосфорилирования *cdc-2*. Существует связь между этой циклической активностью MPF и двумя сократительными поверхностными волнами, происходящими во время каждого митоза. Эти волны распространяются от анимального полюса к вегетативному и сопровождаются кортикальными цитоскелетными перестройками [64].

Иной механизм регуляции активности наблюдается у гистоновых мРНК [90]. Как известно, гистоновые мРНК не имеют полиА хвостов, но имеют 3'UTR. На стадии II оогенеза происходит активный синтез гистонов. В это время 3'UTR гистоновой мРНК связан с белком SLBP1 (step-loop binding protein), участвующим в процессинге, но обнаруженном также и в цитоплазме. Постепенно SLBP 1 замещается на SLBP 2, специфический для ооцитов, и мРНК маскируется. При созревании происходит замена SLBP2 на SLBP1 и активируется трансляция. Этот процесс продолжается и после оплодотворения вплоть до средней бластулы.

IV. ВРЕМЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ В ООГЕНЕЗЕ И ЭМБРИОГЕНЕЗЕ

Запуск трансляции после оплодотворения не происходит одновременно на всех материнских мРНК. Время начала трансляции регулируется для каждой матрицы (или группы матриц) индивидуально. В наших работах показано, что синтезированные в зародышах *Xenopus laevis* или *Rana temporaria* на средней бластуле мРНК *Xbra*, *chordin*, *Xnot* и *Xvent-1* находятся в неактивной форме (в информосомах) до стадии средней гастрюлы [3, 4]. Переход матриц *chordin* и *Xwnt-11* в полирибосомы происходит на стадии средней гастрюлы и вплоть до выклева эти мРНК обнаруживаются только в полирибосомах. Матрицы *Xnot* активно транслируются со стадии средней гастрюлы до конца гастрюляции, затем опять накапливаются в неактивной

форме вплоть до выклева. Матрицы *Xvent-2* преимущественно находятся в информосомах на всех стадиях до выклева. Видимо транслируется лишь незначительная часть этих мРНК, что также указывает на наличие трансляционной регуляции. В работе Фритца и Шитса [30] показано, что материнские мРНК, кодирующие разные белки, участвующие в создании BMP-сигнальной системы *Xenopus* (bone morphogenetic protein pathway), переходят в полисомы в разное время. Время активации трансляции каждой матрицы совпадает с ее полиаденилированием (увеличением длины поли(А) хвоста). Матрицы для Smad1 и ALK-2 начинают транслироваться во время созревания ооцитов, BMP-7 и ХСТК-9 – на ранних стадиях эмбриогенеза, а ALK-3 – после активации зиготного генома, практически только на ранней гастреле. Полиаденилирование необходимо для активации трансляции, однако, цис-элементы, регулирующие полиаденилирование, видимо, в разных матрицах разные. В 3'UTR ALK-2 мРНК есть элемент CRE, а в 3'UTR BMP-7 – нет ни обычного CRE, ни эмбрионального CRE, ни недавно описанного Ц-богатого элемента [61]. Для BMP-7 и ALK-2 показано, что активация трансляции происходит одинаково в разных частях зародышей *Xenopus*, то есть эти матрицы не подвержены пространственной регуляции.

В. РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ И ФАКТОРОВ ТРАНСЛЯЦИИ

В ранних работах Амалди с сотр. показано, что мРНК для рибосомных белков и фактора трансляции EF-1a в эмбрионах *Xenopus* начинают накапливаться на стадии 10 в постполисомных мРНК. Сами же белки появляются лишь со стадии 26 и к стадии 31 больше половины этих матриц обнаруживаются в полирибосомах [46,47,65]. Это указывало на наличие трансляционной регуляции в синтезе рибосомных белков. В дальнейших исследованиях этой лаборатории было выяснено, что за координированную регуляцию синтеза рибосомных белков и других факторов, так или иначе связанных с процессом трансляции, отвечает олигопиримидиновая последовательность (5'-TOP). Она находится на 5'-конце мРНК в непосредственной близости к кэпу [17, 47, 49]. 5'TOP присутствует в 20% всех мРНК позвоночных. В *Xenopus* с этой последовательностью связаны два белка: гомолог человеческого La-аутоантигена и CNBP (celular nucleic acid binding protein). CNBP связывается еще и с последующей за 5'TOP последовательностью, причем в виде димера [22, 63]. Связывание 5'UTR с La приводит к активации трансляции, а связывание с димером CNBP – к инактивации. La-белок связывается с 5'TOP, а

CNBP и с последующей за 5'TOP последовательностью, только в присутствии специфического РНП, содержащего аутоантиген Ro60 [63]. Замечено, что трансляционная регуляция TOP мРНК зависит от интенсивности роста клеток. Чем активнее растут клетки, тем большая часть этих мРНК находится в полисомах. Представляют интерес данные о том, что киназа p70^{S6K} активирует трансляцию на матрицах, содержащих 5'TOP. Падение активности p70^{S6K} уменьшает трансляцию gp-mRNA и разрешает трансляцию мРНК, не содержащих 5'TOP (например *c-mos*), что и происходит при созревании ооцитов [71]. Падение активности киназы p70^{S6K} связано с ее фосфорилированием киназой p90^{RSK}.

Есть указание, что синтез фактора инициации eIF4E также подвержен трансляционной регуляции за счет 5'UTR. Эта 5'UTR приводит к репрессии синтеза репортерной РНК в ооцитах и активации трансляции в оплодотворенных яйцах *Xenopus* [88].

VI. РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ ЛОКАЛИЗОВАННЫХ мРНК

Первые данные по специфической локализации конкретных матриц в клетках появились полтора десятилетия назад. Накопленные на сегодня данные приведены в обзорах Янсена [37] и Липшица и Смиберта [45]. Транспортировка мРНК к месту локализации осуществляется с помощью активного цитоскелетного транспорта. Транспорт транскриптов на большие расстояния в крупных клетках, таких как ооциты, или в длинных отростках нервных клеток, осуществляется по микротрубочкам. Транспорт же на малые расстояния – по микрофиламентам. Сигналы для локализации, репрессии и активации таких матриц находятся в основном в 3'UTR. Локализационные элементы образуют сильно спирализованную вторичную структуру [26]. Часто в 3'UTR локализованных матриц находят несколько локализационных элементов, отвечающих за более раннюю и более позднюю локализацию. Локализация мРНК приводит к синтезу определенного белка в нужном месте, что крайне необходимо в оогенезе и эмбриогенезе для создания разного биохимического статуса в дочерних клетках, в частности для создания градиента морфогенов. Наиболее изучена пространственная регуляция синтеза белков в ооцитах и ранних зародышах дрозофилы. Градиент белка Bicoid, нисходящий от переднего полюса к заднему, определяется локализацией мРНК *bicoid* на переднем полюсе яйца. Градиент белка Oskar, нисходящий от заднего полюса к переднему, определяется локализацией мРНК *oskar* на заднем полюсе. Следует отметить, что только 18% всей мРНК *oskar* локализована, а основная масса этой мРНК распределена

по цитоплазме равномерно [16]. Обе эти мРНК во время движения к месту локализации трансляционно не активны. За репрессию мРНК *oskar* отвечают белки Bruno, Arontic (реагирующий как с 3'UTR, так и с белком Bruno), Bicaudal-C и РНК-связывающий белок p50. Активирует трансляцию *oskar* белок Staufен, связывающийся с 3'UTR. Этот белок содержит несколько доменов, связывающих двуспиральную РНК. Домен dsRBD3 необходим для локализации мРНК *oskar* и *bicoid*, домен dsRBD2 – посредник в микротрубочковом транспорте, а домен dsRBD5 – отвечает за дерепрессию трансляции мРНК *oskar* после локализации [54]. Похожая, но не идентичная, регуляция трансляции наблюдается у мРНК *gurken* (белок, подобный трансформирующему фактору роста). Эта мРНК локализуется в передне-дорсальной стороне ооцита дрозофилы. В репрессии трансляции во время транспортировки участвует как белок Bruno, так и ядерные белки Squid A, B и S, обеспечивающие переход мРНК из ядра в цитоплазму. Эти белки имеют места посадки на 3'UTR мРНК *gurken*. В активации трансляции локализованной *gurken* мРНК задействован цис-элемент в 5'UTR, называемый GLE2 (*gurken* localization element 2). Транс-фактор к нему пока не найден. Мутационный анализ выявил еще ряд белков, участвующих в этой активации [45]. Необходимо ли полиаденилирование мРНК *oskar* и *gurken* для активации трансляции пока неясно. Данные по этому вопросу противоречивы [43, 45]. Мутации в гене *orb*, кодирующем белок, аналогичный СРЕВ *Xenopus*, подавляет синтез белков Oskar и Gurken. Однако СРЕВ в *Xenopus* может активировать трансляцию и без полиаденилирования [29]. Кроме того, белок РАРР обнаруживается с помощью моноклональных антител только в фолликулярных клетках, но не в самих яйцах дрозофилы [43]. Активация трансляции мРНК *bicoid* происходит после откладки яиц. Первым этапом этой активации является цитоплазматическое полиаденилирование [84].

Белки *Bicoid* и *Oskar* сами оказались трансляционными регуляторами. *Bicoid* связывается с 3'UTR мРНК *caudal*, распределенной равномерно по зародышу, и блокирует трансляцию этих матриц. В результате образуется градиент белка *Caudal* с максимумом на заднем полюсе. Белок *Oskar* синтезируется еще в яйце и принимает участие в активации трансляции мРНК *nanos*. Эта мРНК распределена равномерно как в яйцах, так и в ранних зародышах [16]. Однако небольшая часть (около 1%) локализована в кортексе на заднем полюсе. Именно эта мРНК подвергается трансляционной активации. В этой активации трансляции кроме *Oskar* участвуют белки *Vasa* и *Tudor*. В результате образуется градиент белка *Nanos*, нисходящий от заднего полюса к переднему. В яйце и в ранних эмбрионах репрессия нелокализо-

ванных мРНК *nanos* осуществляется РНК-связывающим белком Smaug и еще каким-то неидентифицированным белком. Оба белка имеют свои определенные места связывания на 3'UTR мРНК *nanos*. Локализация на заднем полюсе и активация трансляции локализованных мРНК *nanos* осуществляется белком Oskar, непосредственно реагирующим с белком Smaug, хотя он может и сам связываться с РНК [45]. Сообщается, что РНК-связывающий домен в Smaug находится в том же районе, что и Oskar-связывающий домен [23]. Таким образом происходит смещение репрессора трансляции локализационным механизмом. В работе Бергстин и Гавис [16] также установлено, что последовательность из 180 нуклеотидов в 3'UTR *nanos* мРНК, являющаяся локализационным сигналом, включает в себя трансляционный контрольный элемент (ТСЕ), содержащий 90 нуклеотидов. Введение в мРНК лишнего ТСЕ приводит к тому, что несмотря на локализацию матрицы синтеза белка не происходит. Авторы объясняют это тем, что локализационный механизм вытесняет репрессор конкурируя за место посадки на 3'UTR. Лишний же репрессор вытесниться не может.

Локализация не только активирует трансляцию, но и предохраняет мРНК от деградации [15,45]. Так мРНК *nanos* и *Hsp83* распределены равномерно по яйцу дрозофилы. После оплодотворения 99% мРНК *nanos* и 95% мРНК *Hsp83* деградируют в первые 2 часа. Оставшаяся мРНК оказывается локализованной на заднем полюсе. За нестабильность *Hsp83* и *nanos* мРНК отвечает цис-элемент в 3'UTR, за предохранение от деградации локализованных мРНК отвечает другой цис-элемент. Аналогичный механизм специфической деградации мРНК работает и в зародышах *Xenopus* [15].

Белок Nanos в свою очередь является трансляционным репрессором мРНК *hunchback*, равномерно распределенной по зародышу. Вместе с белками Pumilio и Brain Tumor он образует мРНК комплекс с этой мРНК [13, 18, 75, 76]. В результате образуется градиент белка *hunchback* с максимумом на переднем полюсе. Интересно, что элемент NRE (nanos response element) имеется как в 3'UTR мРНК *hunchback*, так и в 3'UTR мРНК *bicoid*, хотя белок Nanos с мРНК *bicoid* находятся на разных полюсах зародышей. Возможно, что Nanos участвует не в репрессии трансляции *bicoid*, а в деградации этой матрицы. Кстати, мРНК *hunchback* тоже быстро распадается, видимо не без участия Nanos.

Сам факт локализации мРНК оказался необходимым, но не достаточным условием для активации трансляции. Процесс этот очень сложный, в нем участвуют различные транс-факторы, реагирующие с 3'UTR, а иногда и с 5'UTR локализованных мРНК. Вероятно, в

ближайшее время будут открыты и другие факторы, участвующие в этом процессе, и появится большая ясность, как работает весь механизм трансляционной регуляции локализованных матриц. Следует подчеркнуть, что если градиент белка Bicoid определяется градиентом соответствующих мРНК, то градиент Oskar, Caudal, Nanos и Hunchback определяется градиентом самой трансляции и этот градиент трансляции зависит не от количества мРНК, а от количества активатора или репрессора. Поскольку белок Nanos синтезируется лишь на заднем полюсе, основная масса запасенной в оогенезе мРНК распадается так и не участвуя в трансляции.

Похжие механизмы регуляции активности локализованных матриц наблюдаются и у позвоночных. В ооцитах *Xenopus* в анимальной полусфере локализованы транскрипты мРНК *PABP*, *An1*, *An2*, *An3*, *An4a*, *xlan4*, а в вегетативной — *Vg1*, *VegT*, *Xcat-2*, *Xcat-3*, *Xwnt-11*, *Xdazl*, *Xpat*, *Xsirts* и *fatvg* (ссылки приведены в статье Чана с соавт. [19]) и *xBicC* [91]. Особый интерес представляют мРНК, локализованные на вегетативном полюсе ооцитов, так как этот район участвует в создании презумптивной мезодермы, образовании дорсовентральной оси зародыша и закладке зародышевой плазмы. Механизмы, определяющие движение матриц от ядра к вегетативному полюсу ооцитов *Xenopus*, описаны в обзоре Клока и Эткина [41].

Белок Vg1 является членом семейства трансформирующих факторов роста — TGF β . Он участвует в индукции мезодермы. Разными авторами найдены разные белки, связывающиеся с 340-нуклеотидным локализационным элементом (LE) в 3'UTR мРНК *Vg1*. Возможно, что они связываются с различными участками LE. В составе этого локализационного элемента найдены четыре типа повторяющихся последовательностей: UUUCUA (E1), UUCAC (E2), UGCACAGAG (E3), CUGUUA (E4) [24, 25, 31, 34]. Для некоторых из этих повторов показано их участие в связывании с белками и в локализации мРНК *Vg1*. мРНК *Vg1* появляется в ооците на стадии I-II и транспортируется по микротрубочкам к вегетативному полюсу. За связь с микротрубочками отвечает белок с молекулярным весом 69 кДа, специфически связывающийся с цис-элементом на 3'UTR мРНК *Vg1*, названным VLE [72]. Этот белок оказался трансформирующим фактором В3 [66], что следует из идентичности нуклеотидной последовательности в мРНК. Он включает в себя четыре KH и один RRM РНК-связывающих домена [34]. Другие авторы назвали этот белок Vera (Vg1-binding and ER association) и обнаружили в нем домен связывания с эндоплазматическим ретикуломом [24]. Таким образом не исключено, что *Vg1* транскрипт переходит на эндоплазматический ретикулум, где и происходит синтез секреторных белков. Интересно, что белок Vera

гомологичен белку ZDP-1 (zip-code binding protein1), связывающемуся с 54-нуклеотидной последовательностью в 3'UTR мРНК β -актина и участвующему в локализации этих мРНК на актиновых микрофиламентах [69]. Кроме того, Vga гомологичен семейству белков IMP, связывающихся с 5'UTR мРНК инсулин-подобного фактора роста (см. ниже). Другой белок VgRBP60, гомологичный человеческому белку ядерного процессинга и ядерно-цитоплазматического транспорта (hnRNP1), также принимает участие в локализации мРНК *Vg1*, связываясь с цис-элементом в 3'UTR [21]. К концу стадии IV происходит заякоривание транскриптов *Vg1* в кортексе с помощью микрофиламентов и цитокератиновых промежуточных филаментов [12]. Фактор, связывающийся с LE *Vg1* на стадии IV - это пролин богатый РНК-связывающий белок - Pgr [95]. Пролин-богатый домен этого белка связывается с белком профилином, который активирует полимеризацию актина. Кроме того, в заякоривании принимает участие нетранслируемый транскрипт *Xlsirt* [40]. При созревании ооцитов мРНК *Vg1* переходит из кортекса в цитоплазму. [24]. Синтезированный белок Vg1 обнаруживается в ооцитах только на стадии роста IV, когда матрицы уже локализованы. До этого мРНК *Vg1* трансляционно не активна. За репрессию отвечает белок с молекулярным весом 38 кДа [92]. Этот белок связывается с цис-элементом трансляционного контроля (ТСЕ). В отличие от *nanos* и *oskar* мРНК, в мРНК *Vg1* локализационный элемент и ТСЕ не перекрываются. ТСЕ необходим и достаточен для репрессии трансляции. Репрессионный механизм расположен во всем объеме ооцита. Для активации трансляции нужен фактор, локализованный на вегетативном полюсе.

Xwnt11 – дорсализующий фактор. Это секреторный белок, связывающийся с межклеточным матриксом. Транскрипт *Wnt11* в оогенезе локализуется так же, как мРНК *Vg1* [42]. После оплодотворения и цитоплазматической ротации происходит детерминирование дорсо-вентральной оси. Как показано в работе Шредера с соавт. [70], мРНК *Xwnt11* полиаденилируется и образует полисомы только в дорсальной стороне зародыша. Остальная мРНК в вегетативном полушарии видимо остается зарепрессированной. Цитоплазматическую ротацию можно нарушить действием агентов, вызывающих нарушения в сборке микротрубочек. К таким агентам относится мягкое ультрафиолетовое облучение вегетативной части зародышей. Оказалось, что при облучении ультрафиолетом нарушается полиаденилирование *Xwnt11* мРНК. Если в таких зародышах вызвать ротацию гравитационным методом, то полиаденилирование мРНК *Xwnt11* восстанавливается. Авторы делают вывод, что именно ротация

цитоплазмы является механизмом, запускающим трансляцию мРНК *Xwnt11* через полиаденилирование.

На стадии поздней бластулы *Xwnt11* мРНК находится в дорсальной маргинальной зоне, а во время гаструляции появляется также в латеральной и вентральной маргинальной зоне зародыша. В дальнейшем этот транскрипт виден в сомитах и в первой жаберной дуге. Интересно, что при дроблении зародыша мРНК *Xwnt11* не должна бы попадать в клетки, образующие маргинальную зону. Такой вывод можно сделать при внимательном рассмотрении результатов гибридизации *in situ*, приведенных в статье Ку и Мелтона [42]. Следовательно, транскрипт, который там виден начиная с поздней бластулы, синтезирован на зиготном геноме на стадии средней бластулы. Материнский транскрипт к стадии поздней бластулы из вегетативной части зародыша исчезает. По нашим данным [3,4] подавляющая часть транскриптов *Xwnt11* на стадии ранней гаструлы находится в информосомах, то есть в неактивном состоянии. Во время гаструляции происходит переход этих матриц в полирибосомы. Таким образом, после оплодотворения происходит пространственная регуляция трансляции материнских мРНК *Xwnt11*, на стадии средней бластулы регулируется транскрипция новых мРНК, а во время гаструляции происходит регуляция во времени запуска трансляции на этих матрицах.

XVic-C – РНК-связывающий белок, аналог *Vicaudal-C* дрозофилы. Он участвует в индукции энтодермы. Материнские мРНК *xVic-C* в ооцитах создают градиент от вегетативного полюса к анимальному. При ротации эта мРНК, подобно мРНК *Xwnt11*, сдвигается вместе с желтком в сторону будущей дорсальной стороны и претерпевает полиаденилирование, которое ингибируется ультрафиолетом [91]. Экспрессия *xVic-C* необходима для образования дорсальной энтодермы. Для этой активности необходимы РНК-связывающие КН-домены в белке *xVic-C*. Следует напомнить, что в дрозофиле белок *Vic-C* является репрессором трансляции *oskar* мРНК. Видимо и в *Xenopus* *xVic-C* является трансляционным репрессором эктодермальных детерминант или активатором энтодермальных детерминант.

Xcat-2 – РНК-связывающий белок, аналог *Nanos* в дрозофиле. Этот белок является компонентом зародышевой плазмы. Зародышевая плазма, являющаяся детерминантой презумптивных зародышевых клеток, представляет из себя островки в кортикальном районе, состоящие из РНК-белковых комплексов, окруженных митохондриями. Связь островков с кортексом осуществляется на стадии II роста ооцитов. Транскрипт *Xcat-2* обнаруживается в митохондриальном «облаке» со стадии I и далее колокализован с митохондриями в зародышевой плазме [28]. Для этой локализации необходимы

элемент из 228 нуклеотидов — MCLE (mitochondrial cloud localization element) и элемент из 146 нуклеотидов — GGLE (germinal granules localization element) [39,96]. Локализация *Xcat-2* осуществляется совершенно другими механизмами, чем локализация *Vg1* и *Wnt11*. На эту локализацию не влияет ни *Xlsirt*, ни разрушающие цитоскелет яды [12,40,88]. Репрессия трансляции мРНК *Xcat2* не зависит от 3'UTR [48]. Активация синтеза белка *Xcat2* происходит только в зародышах и строго на вегетативном полюсе.

Пространственная регуляция в одной клетке — ооците — осуществляется с помощью цитоскелетного транспорта и закоривания мРНК. Локализованные матрицы транслируются, а не локализованные — деградируют. Так создается градиент морфогенов. Однако градиент морфогенов существует и в многоклеточных зародышах. Регулируется ли он только дифференциальной активностью генов, или также и на уровне трансляции? По сравнению с ооцитом ситуация в зародышах принципиально другая, ибо ни мРНК, ни белки не могут проникать сквозь клеточные стенки. Телеман с сотрудниками [81] предлагают две модели установления градиента морфогенов. Первая предполагает пиноцитоз, движение пузырьков через клетку и секреция морфогенов с другого конца. Вторая предполагает диффузию морфогенов по межклеточному матриксу. Сами авторы признают, что доказательств обеих этих моделей пока не найдено. Возможно, что в многоклеточном зародыше установление градиента морфогенов происходит за счет градиента трансляции на соответствующих мРНК. Первичным сигналом, запускающим цепь событий, приводящих к активации трансляции, могут быть низкомолекулярные вещества, либо проникающие в клетку, либо реагирующие с рецептором на клеточной поверхности. Аналог такой модели наблюдается при стимуляции прогестероном созревания ооцита. Второй способ дифференциальной активации трансляции в разных клетках может осуществляться за счет разных механических напряжений, приводящих к цитоскелетным перестройкам. Такая модель реализуется при запуске трансляции *Xwnt11* и *XBic-C* вследствие ротации цитоплазмы после оплодотворения. При этом место ротации и синтеза этих белков задается местом вхождения сперматозоида. Большая часть запасенных в вегетативном полушарии матриц *Xwnt11* и *XBic-C* распадается, так и не приняв участия в трансляции. Возможно, что большой избыток информосома, содержащих мРНК *Xvent-2*, наблюдаемый нами в ранних зародышах *Xenopus* и *Rana*, объясняется тем, что лишь часть матриц участвует в трансляции, и только в тех клетках, где есть соответствующий сигнал. Таким образом, можно постулировать, что в зародышах транскрипция генов, отвечающих за последующие этапы дифференцировки, происходит в более широкой области зародыша

(в большем числе клеток), чем последующая трансляция. Иными словами, дифференциальная активность генов корректируется на уровне трансляции. Можно предположить, что эмбриональная компетенция клеток не в последнюю очередь определяется набором мРНК для ряда белков, определяющих возможные пути дифференцировки. Эмбриональная детерминация наступает тогда, когда происходит синтез белка на одних матрицах из этого набора и деградация других (рис. 2).

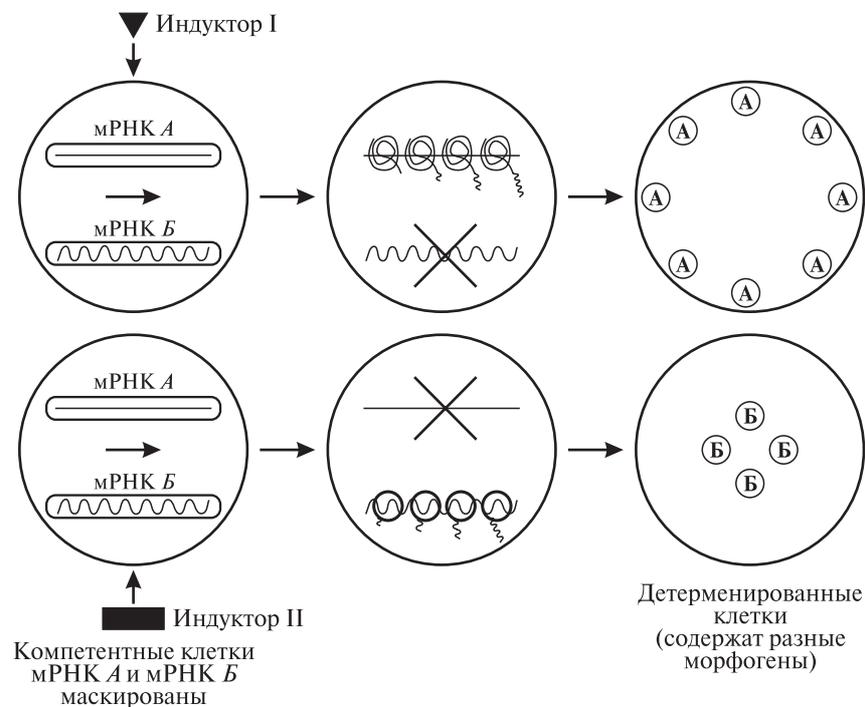


Рис. 2. Схема, поясняющая гипотезу возникновения детерминированных клеток за счет избирательной трансляции на маскированных мРНК.

VII. ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ

Около 5–10% эукариотических мРНК имеют протяженную и сложно устроенную 5'нетранслируемую лидерную последовательность. Роль 5'UTR в регуляции трансляции подробно рассмотрена в обзоре ван дер Велдена и Тома [84]. Поэтому остановимся лишь на некоторых общих выводах и наиболее интересных примерах. Распро-

страненной структурной особенностью протяженных 5'UTR является наличие нескольких небольших открытых рамок считывания, иногда перекрывающихся, иногда следующих друг за другом последовательно, и находящихся перед основной рамкой считывания. Такие рамки считывания называют uORFs (upstream open reading frames). Наличие uORFs репрессирует трансляцию с основной ORF, причем эта репрессия различна в разных тканях, и даже в разных клетках. Так в мРНК репрессора ретиноевой кислоты БЕТА2 (RAR- β 2) в 461-нуклеотидном 5'UTR находятся пять uORFs. Эти 5'UTR консервативны у мыши и человека. Зиммер с сотр. изучали синтез репортерного белка (β -галактозидазы) в трансгенных мышцах, которым введен ген LacZ, содержащий 5'UTR RAR- β 2 или он же с мутациями в разных инициаторных или терминирующих кодонах uORFs [97]. Сравнение исходной (дикого типа) и мутантных конструкций показало, что трансляция с мутантных матриц увеличивается, причем тканеизбирательно, в сердце и в мозге. Это увеличение выражается в вовлечение в трансляцию большего количества клеток.

Ген инсулин-подобного фактора II (IGF-II) генерирует множественные мРНК, различающиеся по 5'UTR. В человеческих рабдомиосаркомных клетках эти мРНК транслируются по-разному: мРНК с лидерной последовательностью №3 транслируется конститутивно, а мРНК с лидерной последовательностью № 4 — запасается в 100S-частицах и транслируется только в растущих клетках. Мышиный гомолог IGF-II-лидер3-мРНК в эмбриональном развитии выключается из трансляции между стадиями E11,5 и E12,5. Найден транс-фактор, который связывается с лидерной последовательностью № 3 и не связывается с лидерной последовательностью № 4. Он относится к семейству РНК-связывающих белков IMPs (IGF II mRNA-binding proteins), гомологичных белку Vega в *Xenopus*, имеющих два RRM и 4 КН домена. Этот белок имеет клеточно-специфичную и зависящую от клеточных контактов цитоплазматическую локализацию [60]. Лидерная последовательность № 1 в 5'UTR IGF-II, содержащая одну URF и стабильную шпилечную с петлей структуру, в зародышах *Xenopus* репрессирует трансляцию репортерного гена вплоть до средней бластулы [85]. Описаны и другие белки, синтез которых регулируется в развитии во времени или тканеспецифически с помощью uORFs-содержащих 5'UTR [44, 52, 85].

Интересно, что мРНК *s-mos*, экспрессия которой регулируется при созревании ооцитов с помощью 3'UTR, подвержена трансляционной репрессии и с помощью 5'UTR. В семенниках мышей в мРНК *s-mos* имеется 300-нуклеотидный, с четырьмя uORFs, 5'UTR, в отличие от 80-нуклеотидного в ооцитах. Видимо благодаря этому в сперматогенезе мРНК *s-mos* зарепрессирована более жестко [79].

Тканеспецифическая регуляция трансляции наблюдается и у мРНК, содержащих внутренний сайт посадки рибосом – IRES (internal ribosomal entry site). IRES представляют собой определенные протяженные последовательности на 3' конце 5'UTR, создающие сложную вторичную структуру [84]. Трансляция таких мРНК кэп-независима. С IRES связываются разнообразные РНК-связывающие белки, так называемые IRES-специфические факторы (ITAF), набор которых в разных тканях различен. [1]. Тканеспецифической регуляцией инициации трансляции на IRES объясняется и тканевая специфичность поражения пикорнавирусами.

Интересно отметить, что многие белки, синтез которых репрессируется с помощью 5'UTR, являются протоонкогенами. Видимо нарушение репрессии и синтез избыточного количества этих белков может приводить к малигнизации.

Описан пример тканеспецифической регуляции синтеза белка за счет разных 3'UTR и разных белковых факторов, с ними взаимодействующих [82]. мРНК для липоксигеназы-15 существуют в тканях кролика в двух видах: с 3'UTR размером 2,6kb (РНК1) и с 3'UTR размером 3,6kb (РНК2). РНК1 присутствует только в эритроидных клетках, а РНК2 – во всех исследованных тканях, кроме ретикулоцитов. В 3'UTR РНК1 находятся 10 ЦУ-богатых повторов по 19 нуклеотидов в каждом, а в 3'UTR РНК2 - дополнительно еще 8 ЦУ-богатых повторов по 23 нуклеотида. Показано, что *in vitro* с 3'UTR РНК1 связываются человеческие hnRNP – белки К и Е1 и репрессируют синтез LOX-15. В неэритроидных тканях присутствуют РНК-связывающие белки с молекулярной массой 55 кДа и 93 кДа, которые связываются с 3'UTR РНК2, но не с 3'UTR1. Белок 93 кДа при этом снимает репрессию, вызванную белком Е1.

VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Активное изучение молекулярных механизмов регуляции морфогенеза привело к пониманию того, что одной только дифференциальной активностью генов и взаимодействием белков эти механизмы не ограничиваются. Важную роль играет и регуляция синтеза белков на запасенных матрицах, то есть трансляционная регуляция. Многие классические морфогены, такие как *bicoid*, *oskar*, *nanos*, *staufer*, *smaug*, оказались РНК-связывающими белками и трансляционными регуляторами. Градиенты морфогенов в яйце, а возможно и в зародышах на всех стадиях развития, определяются градиентом трансляции их мРНК. Выяснилось, что регуляция трансляции во времени и пространстве каждой мРНК происходит индивидуально.

Нарушение интенсивности трансляции определенных мРНК может приводить к дефектам развития и к малигнизации дифференцированных тканей.

Как известно, в информосомах содержится 75–80% белка и только 20–25% РНК. Неудивительно, что на схемах, приводимых в обзорах, мРНК становится все более «одета» белками [45, 56]. Происходит как бы виртуальная сборка информосом. И функции этих белков именно такие, какие были предсказаны А.С.Спириным для информосом: стабилизация, трансляционная регуляция, транспорт мРНК.

Приношу искреннюю благодарность всем коллегам, приславшим мне свои статьи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агол В.И. // Мол. биол. 2000. Т. 35. С. 691–701.
2. Белицина Н.В., Гаврилова Л.П., Нейфах А.А., Спиринов А.С. // Докл. АН СССР. 1963. Т. 153. С. 1204–1206.
3. Воронина А.С., Потехина Е.С. // Онтогенез. 1999. Т. 30. С. 83–90.
4. Воронина А.С., Шатилов Д.В. // II Международный симпозиум «Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии». Дубна 2001. С. 68.
5. Кафиани К.А., Тимофеева М.Я. // Докл. АН СССР. 1964. Т. 154. С. 721–724.
6. Нейфах А.А. // Журн. общ. биологии. 1961. Т. 22. С. 42–57.
7. Овчинников Л.П., Скабкин М.А., Рузанов П.В., Евдокимова В.М. // Мол. Биол. 2001. Т. 35. С. 548–558.
8. Спиринов А.С., Белицина Н.В., Айтхожин М.А. // Журн. общ. биол. 1964. Т. 25. С. 321–338.
9. Спиринов А.С., Белицина Н.В. // Успехи совр. биол. 1965. Т. 59. С. 187–204.
10. Спиринов А.С. // Журн. эволюц. биох. физиол. 1966. Т. 2. С. 285–292.
11. Спиринов А.С. // Успехи биол. хим. 1996. Т. 36. С. 3–48.
12. Alarcon V.B., Elinson R.P. // J. Cell Sci. 2001. V. 114. P. 1731–1741.
13. Arrizabalaga G., Lehmann R. // Gen. 1999. V. 153. P. 1825–1838.
14. Barkoff A.F., Dickson K.S., Gray N.K., Wickens M. // Dev. Biol. 2000. V. 220. P. 97–109.
15. Bashirullah A., Haisell S.R., Cooperstock R.L., Fisher W.W., Fu W., Hamilton J.K., Etkin L.D., Lipshitz H.D. // EMBO J. 1999. V. 18. P. 2610–2620.
16. Bergsten S.E., Gavis E.R. // Dev. 1999. V. 126. P. 659–669.
17. Cardinali B., Cristina M.D., Pierandrei-Amaldi P. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 2301–2308.
18. Chagnovich D., Lehmann R. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2001. V. 98. P. 11359–11364.
19. Chan A.P., Kloc M., Etkin L.D. // Dev. 1999. V. 126. P. 4943–4953.
20. Copeland P.R., Wormington M. // RNA. 2001. V. 7. P. 875–886.
21. Cote C.A., Gautreau D., Donegre J.M., Kress T.L., Terry N.A., Mowry K.L. // Mol. Cell. 1999. V. 4. P. 431–437.
22. Crosio C., Boyl P.P., Loreni F., Pierandrei-Amaldi P., Amaldi F. // Nucl. Acids Res. 2000. V. 28. P. 2927–2934.
23. Dahanukar A., Walker J.A., Wharton R.P. // Mol. Cell. 1999. V. 4. P. 209–218.
24. Deshler J.O., Highett M.I., Schnapp B.J. // Sci. 1997. V. 276. P. 1128–1131.
25. Deshler J.O., Highett M.I., Abramson T., Schnapp B.J. // Cur. Biol. 1998. V. 8. P. 489–496.

26. Ferrandon D., Elphick L., Nusslein-Volhard C., Johnston D.S. // *Cell*. 1994. V. 79. P. 1221–1232.
27. Ford L.P., Watson J., Keene J., Wilusz J. // *Genes Dev*. 1999. V. 13. P. 188–201.
28. Forristall C., Pondel M., Chen L., King M.L. // *Dev*. 1995. V. 121. P. 201–208.
29. Frank-Vaillant M., Jessus C., Ozon R., Maller J.L., Haccard O. // *Mol. Biol. Cell*. 1999. V. 10. P. 3279–3288.
30. Fritz B.R., Sheets M.D. // *Dev. Biol*. 2001. V. 236. P. 230–243.
31. Gautreau D., Cote C.A., Mowry K.L. // *Dev*. 1997. V. 124. P. 5013–5020.
32. Gray N.K., Collier J.M., Dickson K.S., Wickens M. // *EMBO J*. 2000. V. 19. P. 4723–4733.
33. Groisman I., Huang Y.S., Mendez R., Cao Q., Theurkauf W., Richter J.D. // *Cell*. 2000. V. 103. P. 435–447.
34. Havin L., Git A., Elisha Z., Oberman F., Yaniv K., Schwartz S.P., Standart N., Yisraeli J.K. // *Gen. Dev*. 1998. V. 12. P. 1593–1598.
35. Howard E.L., Charlesworth A., Welk J. MacNicol A.M. // *Mol. Cell Biol*. 1999. V. 19. P. 1990–1999.
36. Jan E., Montzny C.K., Graves L.E., Goodwin E.B. // *EMBO J*. 1999. V. 18. P. 258–269.
37. Jansen R-P. // *FASEB J*. 1999. V. 13. P. 455–466.
38. Keiper B.D., Rhoads R.E. // *Dev. Biol*. 1999. V. 206. P. 1–14.
39. Kloc M., Bilinski S., Chan A.P-Y., Etkin L.D. // *Dev. Biol*. 2000. V. 217. P. 221–229.
40. Kloc M., Etkin L.D. // *Sci*. 1994. V. 265. P. 1101–1103.
41. Kloc M., Etkin L.D. // *Dev*. 1995. V. 121. P. 287–397.
42. Ku M., Melton D. // *Dev*. 1993. V. 119. P. 1161–1173.
43. Lie Y.S., Macdonald P.M. // *Dev*. 1999. V. 126. P. 4986–4996.
44. Lincoln A.J., Monczak Y., Williams S.C., Johnson P.F. // *J. Biol. Chem*. 1998. V. 273. P. 9552–9560.
45. Lipshitz H.D., Smibert C.A. // *Cur. Opin. Gen. Dev*. 2000. V. 10. P. 476–488.
46. Loreni F., Francesconi A., Jappelli R., Amaldi F. // *Nucl. Acids Res*. 1992. V. 20. P. 1859–1863.
47. Loreni F., Francesconi A., Amaldi F. // *Nucl. Acids Res*. 1993. V. 21. P. 4721–4725.
48. MacArthur H., Bubunenko M., Houston D.W., King M.L. // *Mech. Dev*. 1999. V. 84. P. 75–88.
49. Mariottini P., Amaldi F. // *Mol. Cell Biol*. 1990. V. 10. P. 816–822.
50. Matsumoto K., Aoki K., Dohmae N., Takio K., Tsujimoto M. // *Nucl. Acids Res*. 2000. V. 28. P. 4689–4697.
51. Matsumoto K., Wolffe A.P. // *Trends Cell Biol*. 1998. V. 8. P. 318–323.
52. Meijer H.A., Dictus W.J.A.J., Keuning E.D., Thomas A.A.M. // *J. Biol. Chem*. 2000. V. 275. P. 30787–30793.
53. Micklem D.R., Adams J., Grunert S., Johnston D.S. // *EMBO J*. 2000. V. 19. P. 1366–1377.
54. Mendez R., Hake L.E., Andresson T., Littlepage L.E., Ruderman J.V., Richter J.D. // *Nature*. 2000. V. 404. P. 302–307.
55. Minshall N., Walker J., Dale M., Standart N. // *RNA*. 1999. V. 5. P. 27–38.
56. Mitchell P., Tollervey D. // *Cur. Opin. Cell Biol*. 2001. V. 13. P. 320–325.
57. Nakahata S., Mita K., Katsu Y., Nagahama Y., Yamashita M. // *Zool. Sci*. 2001. V. 18. P. 337–343.
58. Nakahata S., Katsu Y., Mita K., Inoue K., Nagahama Y., Yamashita M. // *J. Biol. Chem*. 2001. V. 276. P. 20945–20953.
59. Nakajo N., Yoshitome S., Iwashita J., Iida M., Uto K., Ueno S., Okamoto K., Sagata N. // *Genes Dev*. 2000. V. 14. P. 328–338.
60. Nielson J., Christiansen J., Lykke-Andersen J., Johnsen A.H., Wewer U.M., Nielsen F.C. // *Mol. Cell Biol*. 1999. V. 19. P. 1262–1270.
61. Paillard L., Maniey D., Lachaume P., Legagneux V., Osborne H.B. // *Mech. Dev*. 2000. V. 93. P. 117–125.

62. Paillard L., Omilli., Legagneux V., Bassez T., Maniey D., Osborne H.B. // EMBO J. 1998. V. 17. P. 278–287.
63. Pellizzoni L., Lotti F., Rutjes S.A., Pierandrei-Amaldi P. // J. Mol. Biol. 1998. V. 281. P. 593–608.
64. Perez-Momgiovì D., Chang P., Houlis-ton E. // J. Cell Sci. 1998. V. 111. P. 385–393.
65. Pierandrei-Amaldi P., Campioni N., Beccari E., Bozzoni I., Amaldi F. // Cell 1982. V. 30. P. 163–171.
66. Pfaff S.L., Taylor W.L. // Dev. Biol. 1992. V. 151. P. 306–316.
67. Richter J.D. // Microb. Molec. Biol. Rev. 1999. V. 63. P. 446–456.
68. Ralle T., Gremmels D., Stick R. // Mech. Dev. 1999. V. 84. P. 89–101.
69. Ross A.F., Oleynikov Y., Kislauskis E.H., Taneja K.L., Singer R.H. // Mol. Cell Biol. 1997. V. 17. P. 2158–2165.
70. Schroeder K.E., Condic M.L., Eisen-berg L.M., Yost H.J. // Dev. Biol. 1999. V. 214. P. 288–297.
71. Schwab M.S., Kim S.H., Terada N., Edfall C., Kozma S.C., Thomas G., Maller J.L. // Mol. Cell Biol. 1999. V. 19. P. 2485–2494.
72. Schwartz S.P., Aisenthal L., Elisha Z., Oberman F., Yisraeli J.K. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1992. V. 89. P. 11895–11899.
73. Seydoux G. // Curr. Opin. Gen. Dev. 1996. V. 6. P. 555–561.
74. Sheets M.D., Fox C.A., Hant T., Woude G.V., Wickens M. // Genes Dev. 1994. V. 8. P. 926–938.
75. Sonoda J., Wharton R.P. // Genes Dev. 1999. V. 13. P. 2704–2712.
76. Sonoda J., Wharton R.P. // Genes Dev. 2001. V. 15. P. 762–773.
77. Spirin A.S. // Europ. J. Biochem. 1969. V. 10. P. 20–35.
78. Spirin A.S., Nemer M. // Sci. 1965. V. 150. P. 214–217.
79. Steel L.F., Telly D.L., Leonard J., Rice B.A., Monks B., Sawicki J.A. // Cell Growth Diff. 1996. V. 7. P. 1415–1424.
80. Svitkin Y.V. // Protein synthesis Inter-national conference in honour of Alexander Spirin. 2001. P. 37.
81. Teleman A.A., Strigini M., Cohen S.M. // Cell. 2001. V. 105. P. 559–562.
82. Thiele B.-J., Berger M., Huth A., Rei-mann I., Schwarz K., Thiele H. // Nucl. Acids Res. 1999. V. 27. P. 1828–1836.
83. Thompson S.R., Goodwin E.B., Wic-kens M. // Mol. Cell Biol. 2000. V. 20. P. 2129–2137.
84. Van der Velden A.W., Thomas A.A.M. // Int. J. Biochem. Cell Biol. 1999. V. 31. P. 87–106.
85. Van der Velden A.W., Destree O.H.J., Voorma H.O., Thomas A.A. // Int. J. Dev. Biol. 2000. V. 44. P. 843–850.
86. Verrotti A.C., Thompson S.R., Wreden C., Strickland S., Wickens M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 9027–9032.
87. Voeltz G.K., Stritz J.A. // Mol. Cell Biol. 1998. V. 18. P. 7537–7545.
88. Wakiyama M., Saigoh M., Ikeda K., Suzuki A., Miura K. // Biosci. Biotech-nol. Biochem. 2001. V. 65. P. 229–231.
89. Walker J., Minshall N., Hake L., Richter J., Standart N. // RNA. 1999. V. 5. P. 14–26.
90. Wang Z.-F., Ingledue T.C., Dominski Z., Sanchez R., Marzluff W.F. // Mol. Cell Biol. 1999. V. 19. P. 835–845.
91. Wessely O., De Robertis E.M. // Dev. 2000. V. 127. P. 2053–2062.
92. Wilhelm J.E., Vale R.D., Hegde R.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2000. V. 97. P. 13132–13137.
93. Woodland H.R. // Dev. Biol. 1974. V. 40. P. 90–101.
94. Yamashita M. // Zool. Sci. 2000. V. 17. P. 841–851.
95. Zhao W.M., Jiang C., Kroll T.T., Huber P.W. // EMBO J. 2001. V. 20. P. 2315–2325.
96. Zhou Y., King M.L. // Dev. 1996. V. 122. P. 2947–2953.
97. Zimmer A., Zimmer A.M., Reynolds K. // J. Cell Biol. 1994. V. 127. P. 1111–1119.