

## КАНОНИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ ИНИЦИИИ ТРАНСЛЯЦИИ У ЭУКАРИОТ: РАЗБОР МОДЕЛИ СКАНИРОВАНИЯ

©2012 г. О. М. АЛЕХИНА, К. С. ВАСИЛЕНКО

*Институт белка РАН, Пущино, Московская область*

I. Введение. II. Роль 5'-конца мРНК в инициации трансляции. III. Сканирование 5'-НТО мРНК. IV. Модели сканирования. V. Особенности процесса сканирования. VI. Узнавание инициаторного кодона. VII. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Инициация трансляции – это процесс подготовки рибосомы к началу синтеза белковой цепи. Это сложный процесс, который у эукариот состоит из двух главных этапов: формирования так называемого 48S преинициаторного комплекса на малой рибосомной субчастице, в Р-сайте которой инициаторный кодон мРНК спарен с антикодоном инициаторной тРНК, и объединения 48S комплекса с большой рибосомной субчастицей с образованием 80S инициаторного комплекса, готового к началу элонгации. Самым важным является первый этап, поскольку именно на нем осуществляется регуляция экспрессии генов на уровне трансляции у эукариот. На подавляющем большинстве эукариотических мРНК 48S комплексы формируются путем так называемого «сканирующего» механизма. Считается, что такой тип инициации состоит из 3 этапов: (1) присоединение к кэппированному 5'-концу мРНК 43S преинициаторного комплекса, состоящего из 40S рибосомной субъединицы, тройственного комплекса eIF2:ГТФ:Мет-тРНК<sup>мет</sup>; факторов инициации eIF3, eIF1, eIF1A и, возможно, eIF5; (2) сканирование 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) в направлении от 5'- к 3'-концу мРНК в поисках инициаторного кодона при участии факторов eIF4A, eIF4B и eIF4F;

---

*Принятые сокращения:* НТО – нетранслируемая область, eIF – эукариотический фактор инициации трансляции, IRES – сайт внутренней посадки рибосомы.

*Адрес для корреспонденции:* kvassil@vega.protres.ru

Работа выполнена при поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

(3) узнавание инициаторного кодона и образование 48S преинициаторного комплекса [1].

Предложенная много лет назад, эта простая и изящная модель позволила свести воедино большое количество экспериментальных данных и выдержала множество попыток опровержения. Тем не менее, до недавнего времени она оставалась лишь гипотезой. Основными точками приложения усилий исследователей были этапы (1) и (3), т. е. описание процессов формирования 43S и 48S преинициаторных комплексов, которые можно относительно легко выделить и охарактеризовать. Динамический характер второго этапа – сканирования – не позволял локализовать устойчивые промежуточные состояния, доступные для подробного изучения. Также не удавалось точно измерить кинетические параметры сканирования. Лишь недавно были достигнуты заметные успехи в этой области. Были измерены временные параметры инициации и детально охарактеризован процесс сканирования. Также были предложены убедительные физические модели направленного движения иницирующей рибосомной субчастицы. Кроме того, в последнее время было показано, что каноническая модель инициации трансляции является более универсальной, чем считалось ранее, и некоторые альтернативные типы инициации являются лишь вариантами основного клеточного механизма. Все это позволило создать более полную картину эукариотической инициации трансляции.

Данный обзор посвящен краткому изложению экспериментальных данных, накопленных к настоящему моменту, и критическому анализу существующих моделей процесса сканирования. Нами была сделана попытка нарисовать более или менее стройную картину этого важного этапа эукариотической трансляции.

## II. РОЛЬ 5'-КОНЦА мРНК В ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ

### ПРИСОЕДИНЕНИЕ 43S ПРЕИНИЦИАТОРНОГО КОМПЛЕКСА К мРНК

Хотя 43S преинициаторные комплексы способны сами по себе связываться с 5'-концом модельных мРНК с полностью неструктурированными 5'-НТО [2], природные лидерные последовательности обладают достаточно развитой вторичной структурой, поэтому для присоединения к ним 43S комплексов необходимо кооперативное действие факторов инициации eIF4E, eIF4G и eIF4A, являющихся субъединицами фактора eIF4F, и фактора eIF4B (eIF4H). Считается, что связывание комплекса eIF4F/eIF4B/PABP с кэпированным 5'- и полиаденилированным 3'-концами мРНК предшествует связыванию

43S комплекса, расплетая элементы вторичной структуры и подготавливая площадку для его посадки. Кэп-структура матричной РНК узнается фактором инициации eIF4E. Хотя было показано, что eIF4G имеет собственное сродство к РНК [3, 4], именно eIF4E обеспечивает специфическое взаимодействие eIF4F с 5'-концом матрицы. В ряде работ было показано, что связывание eIF4G с eIF4E в составе eIF4F индуцирует структурные изменения, которые существенно усиливают сродство eIF4E к кэпу [5, 6], однако другие исследования не обнаружили существенного изменения сродства [7–9]. Другая субъединица eIF4F – АТФ-зависимая DEAD-бокс РНК-хеликаза eIF4A – расплетает 5'-концевые элементы вторичной структуры, причем фактор eIF4B (или eIF4H) стимулирует хеликазную активность eIF4A, вероятно, препятствуя обратному схлопыванию вторичной структуры РНК. Несмотря на то, что фактор eIF4A в конце концов диссоциирует с мРНК после гидролиза АТФ, eIF4F комплекс остается заякоренным на 5'-конце матрицы посредством взаимодействия eIF4E с кэпом, и цикл расплетания вторичной структуры мРНК может повторяться, поддерживая 5'-проксимальный район в постоянной готовности к присоединению рибосомной субчастицы. Убедительным свидетельством в пользу предварительной посадки eIF4F на 5'-конец мРНК является сохранение взаимодействия этого фактора с мРНК ферритина в условиях блокирования посадки 40S субчастицы 5'-проксимальным IRP/IRE комплексом [10]. Считается, что молекулы РABP, сидящие на полиаденилированном 3'-конце мРНК, взаимодействуют с eIF4G-субъединицей фактора eIF4F, привлекая к себе кэпированный 5'-конец мРНК. В итоге, происходит сближение 5'- и 3'-концов матричной РНК и образуется так называемая «замкнутая петля» мРНК [11]. Методом атомно-силовой микроскопии было прямо показано, что полиаденилированные и кэпированные мРНК *in vitro* образуют кольцевую структуру в присутствии РABP и eIF4F [12].

Существуют логические противоречия, которые не позволяют однозначно принять модель предварительной посадки eIF4F/eIF4B/РABP комплекса. Малая рибосомная субчастица, будучи связанной с факторами eIF1, eIF1A и eIF3, находится в конформации, обеспечивающей, кроме всего прочего, надежность сканирования и предотвращающей сход иницирующего комплекса с мРНК. Это означает, что и посадка субчастицы в такой конформации непосредственно на внутренний участок мРНК должна быть затруднена. Это подтверждается многочисленными независимыми данными, такими как невозможность инициации на кольцевой мРНК [13, 14], участие

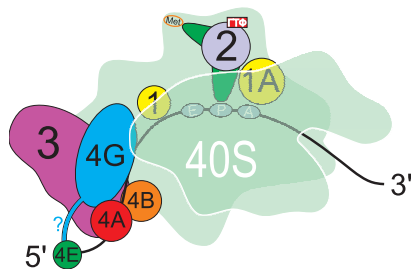


Рис. 1. Схема предполагаемого расположения факторов инициации на 40S рибосомной субчастице.

Вид со стороны головки. Номера соответствуют номенклатуре факторов инициации (eIF). Составлено по данным криоэлектронной микроскопии [71].

5'-конца мРНК в кэп-независимой инициации [15] и т. д. Трудно предположить, что фактор eIF4E, связанный с кэпом, может пройти в канал для мРНК на малой субчастице. Это означает, что в случае предварительно севшего eIF4F/eIF4B/PABP комплекса иницирующая субчастица перед началом сканирования должна связаться с внутренним участком мРНК. Можно предположить, что инициаторный комплекс «размыкается» при взаимодействии с eIF4G, позволяя подобное связывание, однако, в соответствии с большинством существующих моделей, eIF4G входит в иницирующий комплекс в течение всего процесса сканирования, т. е. его присутствие не должно приводить к ослаблению взаимодействия и увеличению вероятности схода рибосомы в процессе инициации. Тот факт, что eIF4G меняет свою конформацию при взаимодействии с eIF4E [5, 16, 17], отчасти снимает это возражение, если допустить, что отсоединение eIF4E от инициаторного комплекса с началом сканирования (см. ниже) приводит к увеличению сродства комплекса к мРНК. Кроме того, было показано, что объединение eIF4G [18] или eIF4E [19] в химерный белок с IRP-1 приводит к внутренней инициации при образовании комплекса с IRE, расположенного между цистронами.

В качестве альтернативы можно предположить, что eIF4F/eIF4B/PABP связан с преинициаторным комплексом до его посадки на мРНК. В этом случае первый акт инициации сводится к «продаванию» кэпированного 5'-конца мРНК в направляющий канал с последующим взаимодействием его с фактором eIF4E (рис. 1). В пользу этого свидетельствует наличие высокого сродства eIF4G к фактору eIF3. В условиях большого избытка фактора eIF3 и 40S субчастиц по отношению к eIF4F в клетке [20, 21] наличие такого взаимодействия в равновесии является более чем вероятным. Кроме того, такая модель делает процесс инициации более универсальным, сглаживая различия между кэпированными и некэпированными мРНК и сводя их просто к уменьшению сродства при сохранении основного механизма.

В случае же предварительного связывания eIF4F/eIF4B/PABP при кэп-зависимой инициации посадка преинициаторного комплекса на некэпированную мРНК должна происходить по существенно отличающемуся механизму. В этой связи важным является вопрос об эффективности трансляции мРНК с короткими лидерами, т. е. о минимальном расстоянии от кэпа до AUG, при котором возможно попадание инициаторного кодона в Р-сайт. Если такое расстояние существует, это будет означать, что при кэп-зависимой инициации взаимное расположение иницирующей рибосомной субчастицы и 5'-конца мРНК строго фиксировано и «продвигание» мРНК во входной рибосомный канал маловероятно. Ранние исследования показали, что эффективность инициации на первом AUG кодоне *in vitro* падает при длине 5'-НТО меньше 12 нуклеотидов [22]. Однако, величина наблюдаемого эффекта была лишь около 50%. Современные данные свидетельствуют в пользу того, что уменьшение эффективности инициации на AUG кодонах, близких к 5'-концу, свидетельствует скорее о диссоциации инициаторного комплекса под действием фактора eIF1, чем о принципиальной невозможности инициации на таких кодонах [2]. Кроме того, была продемонстрирована эффективная кэп-зависимая инициация трансляции на мРНК с очень короткими лидерами (4-5 нуклеотидов) в бесклеточных системах из зародышей пшеницы и клеток млекопитающих [23, 24]. Таким образом, по крайней мере в некоторых случаях 5'-концевые AUG кодоны доступны для инициации, что противоречит необходимости нахождения eIF4E-связанного кэпа с 5'-стороны от иницирующей субчастицы (вне канала выхода) в процессе связывания преинициаторного комплекса с мРНК. Для того чтобы достоверно подтвердить или опровергнуть каждую из этих моделей, необходимо провести кинетические исследования последовательности событий эукариотической инициации, аналогично тому, как это было недавно сделано для изучения инициации трансляции в прокариотах (см. [25]).

Несколько особняком стоит вопрос о возможности и распространенности 5'-концевой кэп- и IRES-независимой инициации трансляции в эукариотах. В реконструированной системе трансляции было прямо показано, что на синтетических мРНК с некэпированными и неструктурированными 5'-НТО возможно формирование 48S преинициаторного комплекса с участием только факторов инициации eIF1, eIF1A, eIF3 и тройственного комплекса [2]. При такой инициации факторы четвертой группы (eIF4F, eIF4A, eIF4B) и АТФ оказываются не нужны. Также была показана возможность эффективной трансляции некэпированной мРНК Tat белка вируса иммунодефицита человека

в лизатах клеток HeLa. Инициация на этой мРНК подавлялась введением как стабильных шпилек, так и дополнительных рамок считывания в 5'-НТО, что свидетельствует в пользу связывания 5'-конца мРНК преинициаторным 43S комплексом с последующим сканированием [15]. Очень интересны данные, говорящие об участии факторов eIF4E и eIF4G в кэп-независимой инициации. Было показано, что обработка фактора eIF4G пикорнавирусной протеазой [26, 27] или добавление в систему его центрального домена [28] существенно стимулируют трансляцию некэппированных мРНК. В обоих случаях из процесса трансляции исключается фактор eIF4E. Поскольку связывание eIF4E вызывает существенную перестройку фактора eIF4G [5, 16, 17], был сделан вывод, что центральный домен eIF4G в отсутствие eIF4E имеет повышенное сродство к 5'-концу мРНК, способствуя связыванию 43S преинициаторного комплекса и началу процесса инициации. В недавней работе Андреева с соавт. [29] был проведен систематический анализ инициации трансляции на некэппированных мРНК с длинными природными 5'-НТО. Оказалось, что степень влияния 5'-концевой кэп-структуры на эффективность инициации *in vivo* существенно отличается для разных лидеров, но при этом отсутствует корреляция с длиной и вторичной структурой 5'-НТО. Было сделано предположение, что эффективная 5'-зависимая инициация трансляции на некэппированных мРНК может определяться специальными 5'-концевыми участками мРНК, аналогичными обнаруженным в 3'-НТО мРНК многих вирусов энхансером кэп-независимой инициации трансляции (CITE). Такие 5'-CITE последовательности должны связывать фактор eIF4F и через него – 43S преинициаторный комплекс, обеспечивая начало сканирования с 5'-конца, как и при обычной кэп-зависимой инициации (см. [30, 31]). Нельзя также исключить возможность того, что стимуляция кэп-независимой инициации, описанная выше, вызывается не изменением сродства eIF4G к мРНК, а удалением кэп-связывающего фактора eIF4E. Если инициация начинается с «нанизывания» 43S преинициаторного комплекса на 5'-конец мРНК, то можно предположить, что eIF4E, находясь возле канала выхода мРНК, будет стерически препятствовать завершению этого процесса, тогда как в случае кэппированной мРНК взаимодействие eIF4E с 5'-концевым m<sup>7</sup>G будет компенсировать этот эффект.

Интересным вопросом является возможность прямого связывания 80S рибосом с 5'-НТО с последующей инициацией трансляции на проксимальном AUG кодоне. Было показано, что в системе трансляции из клеток млекопитающих может происходить бесфакторное

связывание 80S рибосом с безлидерной мРНК с последующей трансляцией целевой кодирующей последовательности [32]. В качестве примера связывания 80S рибосом с достаточно длинными 5'-НТО можно привести  $\Omega$ -лидер из РНК вируса табачной мозаики, для которого было достоверно продемонстрировано связывание двух 80S рибосом, хотя есть свидетельства в пользу того, что этот эффект мог быть вызван абберантной инициацией на АUU кодоне, расположенном вблизи 5'-конца мРНК [14]. В любом случае, эти примеры отражают особые ситуации, редко встречающиеся в природе.

#### НАЧАЛО СКАНИРОВАНИЯ: ПОТЕРЯ СВЯЗИ С КОНЦОМ мРНК

Итак, считается, что эукариотическая инициация начинается со связывания 43S инициаторного комплекса с 5'-концом мРНК через формирование цепочки взаимодействий кэп-eIF4E-eIF4G-eIF3-40S. Следующий этап, так называемое сканирование, обеспечивает поиск инициаторного кодона в последовательности мРНК и подразумевает движение иницирующей 40S субчастицы вдоль 5'-НТО, или, иными словами, протягивание нуклеотидной цепочки через AUG-узнающий центр инициаторного комплекса. При этом выглядит логичным, что цепочка кэп-eIF4E-eIF4G-eIF3-40S должна рваться в каком-либо месте, обеспечивая отсоединение сканирующего комплекса от 5'-конца мРНК и свободное его скольжение в 3'-направлении. Высказанное ранее предположение о потере связи между кэп-структурой и инициаторным комплексом кажется теперь маловероятным, поскольку афинность кэпа к интактному eIF4F комплексу довольно высока и не обнаружено процессов, ее модулирующих. Предполагалось также, что eIF4F/PAVP отрывается целиком от сканирующего инициаторного комплекса, оставаясь связанным с кэпом и 3'-концевой поли(А) последовательностью, что непосредственно обеспечивает возможность нового акта инициации на той же мРНК. Однако такой вариант развития событий противоречит большинству существующих моделей сканирования, которые включают eIF4F в качестве основного мотора, обеспечивающего направленное движение иницирующей субчастицы (см. ниже). Экспериментально было показано, что eIF4F необходим для эффективной инициации на структурированных лидерах [2]. Был сделан вывод, что именно eIF4A хеликаза в составе eIF4F комплекса с помощью eIF4B(4H) обеспечивает свободное движение иницирующего комплекса, расплетая мРНК. Трудно предположить, что eIF4F может выполнять подобную функцию, не будучи связанным со сканирующей рибосомной субчастицей.

На настоящий момент наиболее вероятным считается отсоединение eIF4E-субъединицы комплекса eIF4F, т. е. разрыв связи eIF4E-eIF4G. Обратимая диссоциация eIF4E от eIF4G была показана экспериментально и, более того, является биологически значимой, поскольку лежит в основе одного из главных механизмов регуляции экспрессии генов на уровне трансляции (см. [33]). Можно предположить еще одну специфическую роль фактора eIF4E. Большинство существующих моделей сканирования не подразумевают абсолютного однонаправленного движения рибосомной субчастицы вдоль 5'-НТО, а оперируют, скорее, терминами случайного блуждания с некоторым усредненным преимуществом движения в 3'-направлении. Если исходить из таких моделей, ничего не мешает 43S комплексу при случайном 3'→5' движении соскользнуть со свободного 5'-конца мРНК после разрыва непосредственной связи с кэпом. В этом случае отделившийся от комплекса, но сохраняющий связь с концом мРНК фактор eIF4E может служить своего рода «заглушкой», блокирующей такое обратное движение. Вместе с тем, было показано, что взаимодействие свободного фактора eIF4E с кэпированным концом мРНК является довольно лабильным и не детектируется неравновесными методами анализа. Если исходить из этих данных, eIF4E не может служить постоянной «заглушкой» на 5'-конце мРНК, однако достаточно, чтобы он играл роль такого ограничителя в начальном, критический момент сканирования.

Для того чтобы исключить необходимость разрыва цепочки взаимодействий eIF4E-eIF4G-eIF3-40S, в свое время была предложена модель «петлевого» сканирования, или «эгоистичной мРНК», при котором инициаторный комплекс остается связанным с 5'-концом мРНК в течение всего процесса поиска AUG кодона. В процессе сканирования 5'-НТО мРНК «выпетливается» из инициаторного комплекса, и связь его с 5'-концом матрицы разрушается только после окончательного узнавания инициаторного кодона и присоединения 60S субчастицы. Это позволяет обойти вышеуказанные проблемы целостности инициаторного комплекса и подразумевает нахождение мРНК в постоянной кольцевой конформации, формирование которой было продемонстрировано *in vitro*. Однако, подобная модель вступает в противоречие с некоторыми экспериментальными данными. Поскольку при подобном способе сканирования 5'-конец мРНК постоянно связан, то он недоступен для участия в очередном акте инициации вплоть до окончания предыдущего, то есть на одной молекуле мРНК в каждый момент времени может находиться лишь одна сканирующая субчастица. Если считать, что продолжительность



акта инициации увеличивается при увеличении длины 5'-НТО, то подобное ограничение числа одновременно иницирующих рибосом должно приводить к увеличению промежутка времени между отдельными актами инициации на конкретной мРНК, т. е., иными словами, уменьшать частоту, или эффективность инициации. Это должно отражаться в уменьшении скорости синтеза белка при увеличении длины 5'-НТО. Однако имеющиеся данные, полученные *in vivo*, опровергают это предположение. В клетках дрожжей и млекопитающих синтез белка слабо зависит от длины лидерной последовательности мРНК [34–36]. Более того, в экстрактах из клеток млекопитающих удлинение 5'-НТО без добавления структурных элементов в ряде случаев приводило к увеличению эффективности трансляции [37]. В дрожжевых клетках было показано быстрое формирование полисом высокого порядка на трансфецированной целевой мРНК с очень длинной 5'-НТО [35], что также означает высокую частоту инициации, маловероятную при реализации вышеприведенного механизма. С другой стороны, при трансляции *in vitro* в ряде случаев была продемонстрирована отрицательная зависимость скорости синтеза белка от длины 5'-НТО [24, 35]. Это может свидетельствовать в пользу «петлевой» модели, но чаще объясняется существенной вероятностью схода иницирующей рибосомной субчастицы с мРНК (off-rate). В принципе, неудача попыток визуализации цепочки иницирующих рибосом тоже косвенно говорит в пользу модели одной сканирующей субчастицы. В целом, на данный момент такая модель считается маловероятной, несмотря на отсутствие прямых доказательств ее несостоятельности.

### III. СКАНИРОВАНИЕ 5'-НТО мРНК

После присоединения к мРНК 43S преинициаторные комплексы сканируют нуклеотидную последовательность 5'-НТО в поисках инициаторного кодона. Такая модель впервые была предложена Мэрилин Козак [38, 39] более 30 лет назад и доработана позднее в свете новых экспериментальных данных [1]. Предположение о том, что иницирующая рибосомная субчастица должна двигаться вдоль 5'-НТО в поисках инициаторного кодона, основывалось на нескольких наблюдениях. Так, было показано, что вставка стабильных элементов вторичной структуры в 5'-НТО блокирует трансляцию [22, 40, 41]. Кроме того, была экспериментально продемонстрирована достоверность «правила первого AUG кодона», согласно которому инициация должна происходить на ближайшем к 5'-концу инициа-

торном кодоне. Введение дополнительных AUG кодонов или коротких рамок считывания в 5'-НТО в большинстве случаев приводило к ингибированию инициации трансляции целевого белка на правильном AUG [1, 42, 43].

Несмотря на большое количество косвенных данных, свидетельствующих в пользу существования процесса сканирования, до сих пор не удалось прямо доказать движение рибосомных субчастиц вдоль 5'-НТО, выделить и охарактеризовать промежуточные состояния между актами узнавания 5'-конца мРНК и формирования 48S комплекса на AUG кодоне. Обычно в качестве примера визуализации процесса сканирования приводится классический эксперимент, в котором добавление антибиотика эдеина, блокирующего присоединение большой рибосомной субчастицы на позднем этапе инициации, приводило к связыванию сразу нескольких 40S субчастиц с мРНК [38]. Однако, длина 5'-НТО мРНК, использованной в этих экспериментах, была недостаточна для размещения нескольких сканирующих 40S субчастиц, и сами авторы объяснили свой результат связыванием иницирующих рибосомных комплексов с мРНК внутри рамки считывания. То есть, если говорить в современных терминах, наблюдалась не цепочка сканирующих 43S комплексов, а несколько 48S преинициаторных комплексов, утративших из-за действия антибиотика средство к инициаторному кодону и «проскользнувших» дальше вдоль цепи мРНК. Некоторые свидетельства остановки сканирующей субчастицы в процессе сканирования были получены из данных по защите мРНК от нуклеазного гидролиза при ингибировании инициации стабильными элементами вторичной структуры в 5'-НТО [40]. Можно также упомянуть данные тупринтинга – блокирования связанным рибосомным комплексом обратной транскрипции мРНК – согласно которым в реконструированной системе трансляции в отсутствие факторов инициации eIF1 и eIF1A 40S субчастица не достигает AUG кодона, а застревает в некоем промежуточном положении на 5'-НТО, что также можно было бы интерпретировать как неоконченное сканирование [44]. Однако, эксперименты с конкурентной мРНК показывают, что после добавления факторов инициации eIF1 и eIF1A рибосомная субчастица не может продолжить сканирование с такой промежуточной позиции, а должна предварительно диссоциировать с мРНК и начать инициацию заново [2, 44]. То есть, и этот результат не может служить достоверным примером локализации сканирующей рибосомной субчастицы на 5'-НТО.

Неудачи визуализации процесса сканирования привели к появлению модели, в которой выбор преимущественно 5'-проксималь-

ного AUG кодона определяется не миграцией 40S субчастицы, а 5'→3'-направленностью действия eIF4A хеликазы в составе eIF4F комплекса, которая постепенно расплетает вторичную структуру мРНК, начиная с 5'-конца и вплоть до первого AUG кодона, подготавливая сайт непосредственной посадки иницирующей рибосомной субчастицы [45, 46]. Хотя подобная модель и достойна некоторого внимания, в целом, баланс экспериментальных данных говорит не в ее пользу [47].

Считается, что сканирование состоит из двух взаимосвязанных процессов – расплетания вторичной структуры 5'-нетранслируемой области мРНК и движения рибосомной субчастицы вдоль нее. 43S инициаторные комплексы могут сканировать неструктурированные 5'-НТО без участия белковых факторов, расплетающих мРНК, то есть они сами по себе способны двигаться вдоль матричного полинуклеотида [2, 48]. Однако, отсутствие фактора eIF1A существенно уменьшает эту способность, а недостаток eIF1 почти полностью блокирует ее [2]. Это свидетельствует в пользу того, что для движения 43S преинициаторного комплекса вдоль мРНК необходима специальная, так называемая «открытая» конформация рибосомной субчастицы, которую индуцирует связывание факторов eIF1 и eIF1A [49]. Роль большого белкового комплекса eIF3 в сканировании остается неясной, однако, так как eIF3 взаимодействует с мРНК перед E-сайтом, было высказано предположение, что этот фактор формирует удлинение канала выхода мРНК, что может способствовать процессу сканирования [50]. В пользу этой гипотезы говорит относительно сильная стимуляция дрожжевым фактором eIF3 процесса связывания 43S комплексов с модельными мРНК, имеющими длинную лидерную последовательность перед AUG кодоном, по сравнению с мРНК, имеющими короткие лидеры, но протяженные последовательности после AUG [51]. Для сканирования большинства природных 5'-НТО, даже имеющих слабо развитую вторичную структуру, необходимы АТФ и факторы инициации eIF4A, eIF4G и eIF4B [2], причем потребность в АТФ и eIF4A пропорциональна степени развитости вторичной структуры [52, 53]. Таким образом, факторы eIF4A, eIF4G и eIF4B не только способствуют присоединению 43S преинициаторного комплекса к мРНК, но также участвуют в процессе рибосомного сканирования 5'-нетранслируемой области мРНК в поисках инициаторного кодона.

## КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ СКАНИРОВАНИЯ

При упоминании модели эукариотической инициации, предложенной Мэрилин Козак, всегда подразумевается, что сканирование является систематическим однонаправленным процессивным движением рибосомной субчастицы вдоль 5'-НТО в поисках подходящего инициаторного кодона. Такое механистическое описание является простым и наглядным, но до последнего времени не существовало данных, достоверно подтверждающих его адекватность. Основной причиной этого является упомянутая выше неудача большинства попыток визуализировать процесс сканирования. Более того, до недавнего времени не удавалось измерить временные параметры эукариотической инициации и определить специфический вклад сканирования.

Много лет назад было показано, что инициация трансляции на большинстве природных лидеров является АТФ-зависимым процессом [54], однако механизм, посредством которого полученная энергия преобразовывается в движение иницирующей рибосомной субчастицы, остается неясным. Обычно считается, что АТФ необходима для РНК-хеликаз, которые расплетают шпильки структурированных 5'-НТО и таким образом освобождают дорогу для движущихся субчастиц. Если принять, что действие таких хеликаз является неспецифическим и ненаправленным, то можно прийти к модели поиска инициаторного кодона посредством АТФ-независимой одномерной диффузии сканирующего рибосомального комплекса, так называемого «бесфазного блуждания». Такой механизм изначально был предложен, а позже подтвержден в случае движения прокариотических рибосомных субчастиц вдоль межцистронных нетранслируемых областей в полицистронных матрицах [55, 56]. В пользу подобного механизма в случае сканирования может свидетельствовать отсутствие направленности действия свободной хеликазы eIF4A, которая представлена в клетках в большом избытке по отношению к рибосомам. Возможно, сканирование по механизму полностью случайного блуждания имеет место в случае инициации на мРНК с неструктурированными лидерами в отсутствие факторов четвертой группы. Было показано, что образование 48S инициаторного комплекса на мРНК с искусственными 5'-НТО, не обладающими предсказанной вторичной структурой, не зависит от факторов инициации eIF4F и eIF4A [2]. Этот результат свидетельствует в пользу достаточно свободного «скольжения» 43S инициаторного комплекса вдоль 5'-НТО в отсутствие прочного связывания с мРНК, т. е. взаимодействие сканирующей субчастицы и мРНК имеет стерическую

природу. Диффузионный механизм поиска инициаторного кодона был также предложен для эукариотических рибосомных субчастиц, иницирующих трансляцию на поли(А) лидерах мРНК поксвирусов [48].

Альтернативой случайному блужданию является  $5' \rightarrow 3'$  направленное движение иницирующего рибосомного комплекса вдоль  $5'$ -НТО. Часто считается, что направленное скольжение вдоль неструктурированных (или расплавленных) участков мРНК может происходить практически спонтанно, с минимальными затратами энергии. Это в корне неверно, поскольку для однонаправленного движения энергия требуется сама по себе, независимо от проблемы расплетания вторичной структуры, так как энергетически независимое движение нарушает второй закон термодинамики. Следовательно, направленное движение сканирующей рибосомной субчастицы подразумевает существование специального, энергетически зависимого механизма. Такой механизм может быть реализован на молекулярном уровне с помощью ректификации броуновского движения, или АТФ-зависимого устройства типа Броуновского храповика [57], который был предложен и для других молекулярных машин, таких как миозин, динеин, кинезин, РНК-полимераза (см. [58–60]), а также рибосома в процессе элонгации [61–64]. Особенностью таких молекулярных наномашин является энергетически зависимое ограничение обратных диффузионных движений, тогда как диффузия вперед разрешена.

Различить два описанных выше механизма поиска инициаторного кодона можно, установив взаимосвязь между длиной  $5'$ -нетранслируемой области мРНК и временем, необходимым для ее сканирования. В случае механизма случайного блуждания процесс сканирования можно описать в терминах одномерной диффузии, при которой среднее отклонение от исходной точки пропорционально квадратному корню из прошедшего времени, т. е. среднее время сканирования всей  $5'$ -НТО должно быть пропорционально квадрату ее длины. В случае же поступательного однонаправленного движения эта зависимость должна быть линейной. Вопрос об определении характера сканирования подобным способом поднимался несколько раз, однако доступные экспериментальные подходы оказывались неэффективными. Тем не менее, были получены предварительные данные, свидетельствующие о том, что время инициации трансляции скорее пропорционально длине  $5'$ -НТО, а не квадрату этой длины (S. Grünert и R.J. Jackson, неопубликованные данные, см. [65]).

Прямое измерение продолжительности сканирования, т. е. промежутка времени между посадкой преинициаторного комплекса на мРНК и узнаванием инициаторного кодона, на данный момент

является очень сложной экспериментальной задачей. Достаточно малые предполагаемые значения времени сканирования (десятки секунд) подразумевают использование для этой цели физических методов анализа, в первую очередь флуоресцентных, таких как FRET. Однако прямое использование методик, отработанных на прокариотах, затруднено в случае эукариотических систем. Во-первых, структурные данные, накопленные к настоящему моменту, не позволяют с необходимой точностью определить взаимное расположение функциональных элементов в 43S и 48S комплексах, что необходимо для точной локализации флуоресцентных маркеров. Также методы *in vitro* реконструкции сложных белковых комплексов отработаны гораздо хуже в случае эукариот. Кроме того, в эукариотических белках гораздо больше эндогенных цистеинов, что во многих случаях исключает использование простых генно-инженерных способов специфического введения флуоресцентных меток, опробованных на прокариотических рибосомных белках и факторах трансляции. Однако значительные успехи в определении структуры эукариотических рибосом и рибосомных комплексов методами крио-электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа, достигнутые в последние годы, не оставляют сомнений, что задача прямого определения кинетических параметров эукариотической инициации трансляции будет решена в обозримом будущем.

В качестве альтернативы прямым методам определения продолжительности сканирования временные параметры инициации можно изучать как часть полного эпцикла трансляции белковой цепи. Очевидным является тот факт, что полноразмерный (в случае ферментов – активный) белковый продукт может появиться в системе трансляции не раньше, чем первые проинициировавшие рибосомы терминируют, полностью закончив чтение соответствующей мРНК. Таким образом, время между добавлением мРНК в систему и появлением первых молекул целевого продукта соответствует времени синтеза белковой цепи, или полному времени трансляции как суммы времен инициации, элонгации и терминации [23, 35]. Основная идея данного подхода состоит в том, чтобы отслеживать изменение полного времени трансляции при изменении параметров системы, влияющих исключительно на инициацию. Самым очевидным из таких параметров является длина 5'-НТО мРНК. Действительно, если кодирующая последовательность и 3'-НТО остаются неизменными, разумно предположить, что времена элонгации и терминации будут постоянными, и изменение полного времени трансляции будет опре-

деляться изменением продолжительности процесса инициации, скорее всего – процесса сканирования.

В первой попытке исследовать зависимость времени трансляции от длины 5'-НТО мРНК [35] были использованы дрожжевая система трансляции и мРНК светлячковой люциферазы, несущая в качестве 5'-НТО повторяющиеся копии длинного, слабо структурированного лидера GCN4 [66]. Была проведена приблизительная оценка скорости сканирования, которая составила около 10-ти нуклеотидов в секунду. Для исследования кинетики белкового синтеза и определения времени появления активной люциферазы был использован традиционный метод отбора проб из реакционной смеси с последующим определением активности фермента. Поскольку интервал между временными точками (1 минута) оказался сравним с разницей во временах трансляции для мРНК с разными длинами 5'-НТО, не удалось получить данные, подходящие для точного количественного анализа и определения характера временных зависимостей.

Более успешная попытка изучить влияние длины лидера на продолжительность инициации была предпринята с использованием системы *in situ* мониторинга синтеза белка [67]. Эта система основана на измерении активности вновь синтезированной люциферазы непосредственно в реакционном объеме. Ранее было показано, что сворачивание люциферазы является котрансляционным при синтезе *in vitro* как в эукариотических [67], так и в прокариотических [68] системах. Субстрат люциферин может быть добавлен непосредственно в трансляционную смесь, и накопление активного белка может отслеживаться непрерывно с помощью люминометра. Математический анализ гладких кинетических кривых с высоким соотношением сигнал/шум позволяет определять полное время трансляции с точностью ~5 сек, при максимальной амплитуде наблюдаемых эффектов около 2 минут. В качестве 5'-НТО были использованы делеционные мутанты очень длинного (>900 н.) лидера из мРНК ретротранспозона LINE-1 человека. Получившийся набор 5'-НТО достаточно равномерно перекрывал весь диапазон длин от 5 до 913 нуклеотидов. Оказалось, что полное время трансляции в системах из зародышей пшеницы и клеток асцита мыши увеличивается с увеличением длины 5'-НТО (рис. 2). С помощью двух независимых методов – селективной модуляции скорости элонгации путем изменения концентрации калия и прямого измерения *transit time* (суммарного времени элонгации и терминации) – было подтверждено, что наблюдаемые изменения определяются именно разницей в продолжительности стадии инициации трансляции. Также

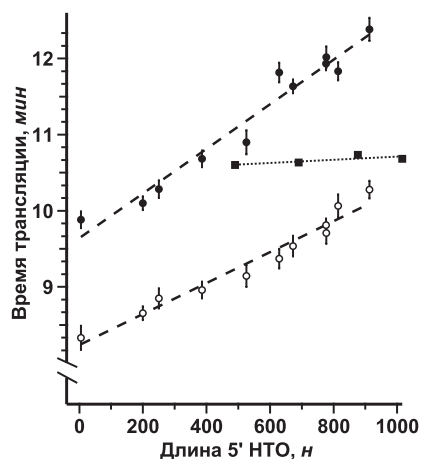


Рис. 2. Линейная зависимость времени трансляции молекул мРНК от длины их 5'-НТО.

Результат анализа кинетических кривых трансляции кэпированных мРНК светлячковой люциферазы в бесклеточных системах из зародышей пшеницы (○) и клеток млекопитающих (●). В качестве 5'-НТО были использованы делеционные мутанты лидера из мРНК ретротранспозона LINE-1 человека. Для сравнения приведены результаты трансляции мРНК, где в 5'-НТО разной длины непосредственно перед AUG кодоном была вставлена IRES-последовательность из вируса энцефаломиокардита человека (■).

Адаптировано из [24].

было показано, что линейная зависимость времени трансляции от длины лидера характерна именно для кэп-зависимой инициации трансляции, так как она исчезала при переключении инициации на внутреннюю путем вставки IRES последовательности из вируса энцефаломиокардита в 5'-нетранслируемую область мРНК.

Делеции, сделанные для создания набора конструкций люциферазы на основе LINE-1 лидера, были практически случайными, и получившиеся в результате 5'-НТО существенно различались по содержанию и стабильности их вторичной структуры. Тем не менее, зависимость полного времени трансляции от длины 5'-НТО мРНК оказалась очень близка к линейной (рис. 2). Полученные данные отражают изменение продолжительности стадии инициации трансляции, в процессе которой только время движения инициаторного комплекса вдоль 5'-НТО может коррелировать с длиной лидера. Таким образом, можно считать, что время сканирования в этих экспериментах зависело главным образом от длины, а не от локальной первичной или вторичной структур 5'-НТО, и эта зависимость являлась линейной, а не квадратичной. Все это позволяет сделать однозначный вывод о том, что миграция сканирующей рибосомной субчастицы вдоль лидерной последовательности мРНК представляет собой однонаправленное движение, а не стохастическое случайное блуждание.



#### IV. МОДЕЛИ СКАНИРОВАНИЯ

Вышеприведенные свидетельства в пользу направленности сканирования не объясняют, каким именно образом расходуется АТФ для обеспечения движения иницирующей рибосомной субчастицы. Весьма привлекательной является модель, состоящая в том, что хеликаза, связанная с фронтальной стороной рибосомной субчастицы, осуществляет плавление спиралей по ходу движения, которые немедленно восстанавливаются за сканирующей субчастицей для того, чтобы предотвратить ее обратную диффузию [69]. В пользу этой модели говорят данные о направленности действия хеликазы eIF4A. Сама по себе эта хеликаза является двунаправленной, однако в составе комплекса eIF4F ее 5'→3'-хеликазная активность увеличивается в 15 раз, а 3'→5' – только в 5 раз [70]. В этом случае энергия затрачивается на создание асимметричного окружения и, соответственно, градиента свободной энергии связывания, который и обеспечивает направленность движения. Очевидным недостатком этой модели является строгая необходимость хорошо развитой вторичной структуры, более или менее равномерно распределенной вдоль 5'-нетранслируемой области мРНК. Кроме того, существующие данные о структуре преинициаторного комплекса, полученные методом криоэлектронной микроскопии, указывают на то, что фактор eIF4F, включающий хеликазу eIF4A, присоединяется возле канала выхода, т. е. *позади* рибосомной субчастицы в терминах их взаимного расположения относительно цепи мРНК [71].

Для того чтобы обойти это серьезное противоречие, была предложена модель сканирования, подразумевающая, что фактор инициации eIF4G может охватывать и канал входа, и канал выхода мРНК на рибосомной субчастице, при этом белок eIF4A располагается возле канала входа для расплетания вторичной структуры мРНК перед рибосомой, тогда как HEAT1 домен фактора eIF4G взаимодействует с матрицей, как только она появится из канала выхода [72]. Согласно этой модели, белок eIF4B (или eIF4H) находится позади eIF4A, но перед рибосомой, для того чтобы предотвращать восстановление структуры расплетенных участков мРНК до тех пор, пока они не попадут в канал входа, обеспечивая таким образом движение сканирующего комплекса в направлении 5'→3'. В этом случае энергия АТФ действительно расходуется перед движущимся 43S преинициаторным комплексом, а расплавленные элементы вторичной структуры должны немедленно восстанавливаться за сканирующей субчастицей, предотвращая ее обратную диффузию. Эта модель также подразумевает, что фактор инициации eIF4F остается связанным с

кэпом, и уже пройденные рибосомой нуклеотиды 5'-НТО образуют петлю между комплексом кэп-eIF4F и 40S субчастицей, которая увеличивается в ходе сканирования. В пользу такой модели говорят данные малоуглового рентгеновского рассеяния, показывающие образование вытянутой жесткой структуры при взаимодействии фрагмента фактора eIF4G с фактором eIF4A [73]. Длины получившегося комплекса (~220Å) должно с избытком хватить для перекрытия расстояния примерно в 50Å между каналами входа и выхода. Однако эта модель вступает в противоречие с другими экспериментальными данными. Прежде всего, предполагаемое в этой модели расположение HEAT-1 домена фактора eIF4G на малой рибосомной субчастице существенно отличается от его положения, определенного методами криоэлектронной микроскопии [71] и защиты от гидролиза гидроксил радикалами. Кроме того, данные тупринтинга [44, 51] и защиты от нуклеаз [74, 75] говорят о том, что последовательность мРНК скорее всего прикрыта белковыми комплексами с 5'-, а не с 3'-стороны от связанной 40S субчастицы.

В качестве альтернативной модели было высказано предположение, что роль фактора инициации eIF4F состоит, главным образом, в предотвращении обратного соскальзывания сканирующего инициаторного комплекса в направлении 3'→5', а не в расплетании вторичной структуры перед рибосомой [71]. Эта идея была доработана А.С.Спириним, который предложил модель сканирования, состоящую в том, что факторы инициации eIF4A и eIF4B осуществляют циклы связывания и диссоциации с участка мРНК, расположенного непосредственно позади движущегося инициаторного комплекса, и таким образом определяют 5'→3' однонаправленность процесса сканирования [76]. Согласно этой гипотезе, фактор eIF4G должен перемещаться вместе со сканирующей субчастицей благодаря его взаимодействию с eIF3 и обеспечивать связывание комплекса eIF4B-eIF4A•АТФ с одноцепочечными участками мРНК, появляющимися из канала выхода. Гидролиз АТФ освобождает фактор eIF4A с мРНК, но eIF4B остается связанным еще некоторое время, блокируя обратное движение освобожденного инициаторного комплекса. После того как рибосома продвинется вдоль цепи мРНК в 3'-направлении, этот цикл может повториться (рис. 3). Если описывать такой механизм в терминах броуновского храповика [57], то белок eIF4B выступает в роли «собачки», а энергия АТФ расходуется фактором eIF4A, выполняющим функцию «пружины». Эта модель хорошо согласуется со многими экспериментальными данными, хотя было показано, что делеция гена eIF4B не летальна для дрожжей, а лишь вызывает замед-

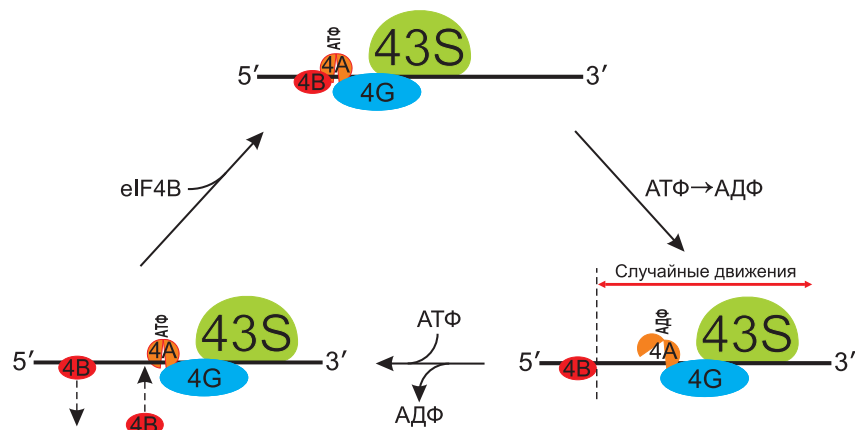


Рис. 3. Модель сканирования, основанная на предотвращении обратного движения инициаторного комплекса путем циклического связывания фактора eIF4B с мРНК.

Адаптировано из [63].

ление роста клеток [77, 78]. Кроме того, спорным местом данной модели является относительно слабое взаимодействие eIF4B с мРНК в отсутствие eIF4A [79].

## V. ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССА СКАНИРОВАНИЯ

### НАПРАВЛЕННОСТЬ СКАНИРОВАНИЯ

Важным вопросом является однонаправленность процесса сканирования, т. е. является ли сканирование движением вперед шаг за шагом или возможны случайные стохастические движения в обратном направлении? Общепринятая точка зрения склоняется к первому варианту, т. е. считается, что сканирование – это поступательное движение в 5'→3' направлении. Казалось бы, полученные линейные зависимости времени сканирования от длины 5'-НТО свидетельствуют в пользу именно такой модели. Однако, теоретически было показано, что при случайном блуждании достаточно всего лишь 10-ти процентного превышения вероятности движения в прямом направлении над вероятностью обратного движения, чтобы форму такой зависимости было невозможно отличить от линейной в пределах экспериментальной ошибки [35]. Поскольку все пространственные перемещения частиц с размерами уровня рибосомы вызываются

тепловым (Броуновским) движением, они должны быть стохастическими. Характерные примеры преимущественно однонаправленного движения (смещенного Броуновского движения) со случайными обратными шагами были продемонстрированы в прямых экспериментах с помощью методов детекции отдельных молекул для случаев перемещения кинезина вдоль фибриллы микротрубочки [80] и шагания головок миозина вдоль актиновых филаментов [81]. Существуют интересные данные, указывающие на то, что сканирование может прерываться периодическими «возвратными движениями» на расстояние 15 нуклеотидов или меньше в 3'→5' направлении. Так, было обнаружено, что добавочный AUG кодон, расположенный на расстоянии в 15 нуклеотидов от 5'-проксимального инициаторного кодона в мРНК вируса желтой мозаики турнепса (TYMV), уменьшает частоту инициации трансляции на основном AUG триплете, находящемся не в самом оптимальном контекстном окружении. На основании этих данных было высказано предположение, что часть рибосом, пропустивших первый AUG кодон из-за плохого контекста, имеет второй шанс натолкнуться на него в результате обратного движения, и вероятность этого события уменьшается, если второй AUG триплет находится на небольшом расстоянии в более выгодном контекстном окружении [82]. Схожие выводы были сделаны ранее при анализе инициации на двух близких AUG кодонах в NA/NB мРНК вируса гриппа В [83].

#### ПРОЦЕССИВНОСТЬ СКАНИРОВАНИЯ

Другим интересным вопросом является надежность сканирования. Классическая модель инициации подразумевает, что сканирование является процессивным, т. е. все рибосомные субчастицы, связавшиеся с 5'-концом мРНК, должны закончить процесс инициации на AUG кодоне. Это, в частности, означает, что даже если инициация не произошла на правильном инициаторном кодоне, она должна завершиться на одном из следующих AUG кодонов. То есть, уменьшение частоты инициации на 5'-проксимальном инициаторном кодоне (например, из-за изменения контекста) должно быть точно компенсировано инициацией на последующих AUG триплетях. Было показано, что это условие выполняется как в случае близко расположенных [84, 85], так и в случае находящихся на некотором расстоянии друг от друга [86] AUG кодонов. Вместе с тем, в ряде случаев это предположение не подтвердилось [87]. Кроме того, было обнаружено, что эффективность инициации в эукариотических *in vitro* системах [24, 35] может существенно уменьшаться с увеличением

длины 5'-НТО, что может быть результатом схода сканирующих рибосомных субчастиц с мРНК. Несмотря на то, что *in vivo* зависимость эффективности инициации от длины лидера выражена гораздо слабее [34, 36], эти данные свидетельствуют о возможности разрыва связи инициаторного комплекса с мРНК в процессе сканирования в определенных условиях.

#### ВЛИЯНИЕ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ мРНК НА СКАНИРОВАНИЕ

Важным условием для эффективной инициации трансляции является отсутствие стабильных элементов вторичной структуры внутри 5'-НТО, так как они могут сильно замедлять или даже блокировать продвижение 43S инициаторного комплекса вдоль цепи мРНК в поисках стартового кодона [41, 88]. Однако было показано, что фактор инициации eIF4F совместно с фактором eIF4B(eIF4H) обеспечивает эффективное сканирование лидеров, имеющих вторичную структуру умеренной стабильности [2]. Известно, что вставка даже относительно стабильной GC-богатой шпильки в 13 пар оснований ( $\Delta G \approx -30$  кКал/моль) в середину 5'-НТО не ингибирует инициацию трансляции в COS клетках млекопитающих [88], а также в экстрактах из клеток Krebs-2 и зародышей пшеницы [24]. Подавляющее большинство 5'-НТО в дрожжевых мРНК содержит избыток адениловых остатков и, следовательно, несклонно к образованию развитой вторичной структуры. И действительно, трансляция в дрожжах гораздо сильнее ингибируется структурными элементами в 5'-НТО, чем в клетках млекопитающих, причем шпильками меньшей стабильности [36, 89–91].

Важно упомянуть также, что какая-либо достоверная информация о реальном состоянии вторичной структуры мРНК в эукариотических клетках и в клеточных экстрактах отсутствует. Есть все основания утверждать, что присутствие различных РНК-хеликаз и РНК-связывающих белков делает вторичную структуру мРНК расплавленной в большей или меньшей степени, или, по крайней мере, она существенно отличается от структур, предсказанных для изолированных матриц. Следовательно, нельзя исключить, что в цитоплазме шпильки и другие локальные элементы вторичной структуры мРНК умеренной стабильности на самом деле не существуют, а скорее всего полностью или частично расплавлены.

Есть множество данных, свидетельствующих о том, что кроме eIF4A и eIF4B в эукариотических клетках существуют дополнительные хеликазы, способные стимулировать процесс сканирования структурированных 5'-НТО. Так, например, дрожжевая DEAD-бокс хеликаза Ded1 участвует в инициации на подавляющем большинстве

дрожжевых мРНК как *in vivo*, так и *in vitro* [92–94]. Ded1 проявляет даже большую хеликазную активность, чем eIF4A, и было высказано предположение, что функции этих двух белков не перекрываются, то есть фактор инициации eIF4A, в основном, стимулирует присоединение рибосомы к мРНК, тогда как хеликаза Ded1 способствует процессу сканирования, в особенности на длинных и структурированных 5'-НТО [95, 96]. Участие в процессе инициации DEAD-бокс белка 3 (DDX3) – близкого гомолога Ded1 у млекопитающих – является более спорным. Также были получены данные, свидетельствующие о том, что делеция гена *ddx3*, кодирующего DEAD-бокс белок 3 (DDX3) – гомолог Ded1 у млекопитающих – специфически влияет на трансляцию мРНК с длинными структурированными лидерами [97].

Недавно была обнаружена другая DEAD-бокс хеликаза – DHX29, которая функционирует синергично с факторами инициации группы eIF4 в реконструированных системах из млекопитающих и стимулирует сборку 48S инициаторного комплекса в присутствии стабильных шпилек в 5'-НТО [69]. Отсутствие белка DHX29 ухудшает также трансляцию *in vivo*, приводя к распаду полисом и накоплению свободных 80S рибосом [98]. Было предположено, что хеликаза DHX29 увеличивает процессивность сканирования путем изменения конформации мРНК-связывающего канала в области входа мРНК [69].

Ни DHX29, ни Ded1, видимо, неспособны (в отличие от eIF4F) стимулировать присоединение 43S комплексов к мРНК. Можно предположить, что хеликазы DHX29 и Ded1 специфически стимулируют сканирование через стабильные элементы вторичной структуры мРНК, тогда как факторы eIF4 осуществляют как присоединение 43S преинициаторного комплекса к мРНК, так и сканирование, но с меньшей эффективностью [99].

Было обнаружено, что в отсутствие хеликаз DHX29/Ded1 очень стабильные шпильки, которые не расплетаются факторами инициации группы eIF4, проходят в канал входа мРНК, но застревают в канале выхода в сканирующем преинициаторном комплексе. При этом мРНК, возможно, продолжает заходить в рибосому и «выпелливается» из декодирующего центра до тех пор, пока инициаторный AUG кодон матрицы не попадет в Р-сайт [99]. Это может привести к формированию стабильного 48S преинициаторного комплекса только в отсутствие фактора инициации eIF1. При добавлении хеликаз DHX29 или Ded1 происходит предварительное расплетание стабильной шпильки, и мРНК заходит в канал входа рибосомной субчастицы в одноцепочечной форме. Имеются данные, указывающие на то, что DHX29 связывается вблизи спирали h16 в рибосомальной 18S РНК,

т. е. вблизи открытого канала входа мРНК, что хорошо согласуется с ее ролью в расплетании спиралей РНК перед сканирующим преинициаторным комплексом. Поскольку оказалось, что ДНХ29 может разрушать разные абберантные комплексы, а не только вызванные стабильными элементами вторичной структуры мРНК, было предположено, что он способен каким-то образом вызывать структурные перестройки в преинициаторном комплексе. Так как АТФазная активность ДНХ29 стимулируется в большей степени инициаторным комплексом, а не матричной РНК, обсуждалось, что этот белок дестабилизирует шпильки путем стимуляции открывания и закрывания канала входа мРНК, таким образом способствуя попаданию в канал нуклеотидов из расплавленных одноцепочечных участков в основании шпильки. Хеликаза Ded1 не способна стабильно связываться с 40S субчастицей, поэтому считается, что она функционирует по иному, пока еще неизвестному механизму [99].

## VI. УЗНАВАНИЕ ИНИЦИАТОРНОГО КОДОНА

Согласно классической модели М. Козак, в процессе движения инициаторный комплекс сканирует последовательность мРНК до тех пор, пока не встретит первый AUG кодон, узнаваемый антикодоном связанной метиониловой тРНК [100]. И действительно, в большинстве эукариотических мРНК именно первый AUG триплет от 5'-конца используется как инициаторный кодон и устанавливает открытую рамку считывания нуклеотидной последовательности [42]. В то же время известно немало случаев, когда первый AUG триплет не является инициаторным кодоном, а инициация происходит на втором, третьем или последующих AUG, которые не обязательно находятся в рамке с предыдущими. Такой вид инициации, получивший название «сканирование с протечкой» (*leaky scanning*), может объясняться тем, что сканирующие рибосомные субчастицы могут не узнавать некоторые AUG триплеты, находящиеся в неподходящем структурном окружении. В частности, фланкирующие последовательности могут определять эффективность, с которой первый AUG кодон узнается как стоп сигнал на стадии сканирования. М. Козак определила, что в мРНК позвоночных инициаторный сайт обычно соответствует или близок последовательности 5'-GCCGCC(A/G)CCAUGG-3' [100]. Мутации, затрагивающие наиболее консервативный нуклеотид A<sup>-3</sup>, сильно подавляют инициацию трансляции как *in vivo*, так и *in vitro* [101]. Также было показано существенное влияние G<sup>+4</sup> на эффективность инициации трансляции [102]. Более современные данные согла-

суются с этими утверждениями с той лишь оговоркой, что высоко консервативными являются лишь 5 нуклеотидов перед стартовым кодоном. Согласно статистическим данным, 5'-нетранслируемые последовательности в мРНК млекопитающих являются G/C-богатыми на протяжении примерно 100 нуклеотидов перед AUG кодоном, за исключением сильного преимущества А в положении  $-3$ . При этом в положениях  $-1$ ,  $-2$  и  $-4$  преобладает С и практически полностью отсутствует U в положениях с  $-1$  по  $-5$  [103]. В отличие от млекопитающих, 5'-нетранслируемые области дрожжевых мРНК содержат преимущественно А в положениях от  $-1$  до  $-30$ , однако наиболее консервативным также является адениловый остаток в положении  $-3$ , хотя мутации по этому положению ингибируют трансляцию в меньшей степени, чем это было обнаружено у млекопитающих [104, 105].

До сих пор точно неизвестно, как узнается консенсусная последовательность и как она функционирует. Однако, необходимость А в положении  $-3$  как у дрожжей, так и у млекопитающих свидетельствует о том, что этот консервативный остаток, возможно, участвует во взаимодействии с неким фактором инициации или рибосомной субчастицей вблизи Е-сайта, что способствует стабилизации 48S инициаторного комплекса. Есть данные, что пурины в положениях  $-3$  и  $+4$  относительно AUG кодона могут влиять на выбор инициаторного кодона посредством стабилизации конформационных изменений, которые происходят при кодон-антикодоновом спаривании, взаимодействуя с  $\alpha$ -субъединицей фактора инициации eIF2 и нуклеотидами AA<sub>1818-1819</sub> в спирали h44 рибосомальной 18S РНК, которые формируют часть А-сайта [106].

Основным инициаторным кодоном, способным взаимодействовать с антикодоном Met-тРНК<sup>мет</sup>, в эукариотических матричных РНК служит триплет AUG. Большинство родственных триплетов, образованных в результате точечных замен в AUG кодоне, могут выступать в качестве инициаторных с частотой 1–10% от частоты узнавания AUG в зависимости от типа гена, кроме триплетов AAG и AGG, которые в этом смысле нефункциональны [107–109].

Для того чтобы обеспечивать точность инициации, сканирующие рибосомные комплексы должны иметь механизм дискриминации, который предотвращает неточное спаривание триплетов в 5'-НТО мРНК с антикодоном Met-тРНК<sup>мет</sup> и стимулирует узнавание правильного инициаторного кодона. Ключевую роль в поддержании точности инициации играет фактор eIF1, который позволяет сканирующим 43S инициаторным комплексам игнорировать не-AUG кодоны, а также AUG, находящиеся в плохом контекстном окружении или слишком



близко к 5'-концу мРНК. В отсутствие фактора eIF1 стабильность 48S преинициаторных комплексов повышается, в результате могут формироваться комплексы с неточным кодон-антикодоновым спариванием, которые участвуют в дальнейших стадиях трансляции. Однако при добавлении eIF1 такие комплексы не способны сохранять свою конформацию, и неправильно спаренная тРНК, по всей видимости, удаляется из рибосомы [2, 44, 106].

Согласно принятой на настоящий момент модели, фактор инициации eIF1 совместно с eIF1A стимулирует образование «открытой» конформации 43S преинициаторного комплекса, способной к сканированию [49]. Вместе с тем, при установлении стабильного кодон-антикодонового взаимодействия рибосомные комплексы должны подвергаться конформационным превращениям, которым фактор eIF1 противодействует. Показано, что правильное кодон-антикодоновое спаривание сопровождается напряжением eIF1A-40S взаимодействия [110] и удалением фактора инициации eIF1 от рибосомального Р-сайта [111–113], что приводит к фиксации инициаторного комплекса на мРНК путем перехода его в «закрытую» конформацию. Это подтверждается способностью дрожжевых мутантных eIF1, которые быстро диссоциируют из 48S преинициаторных комплексов, увеличивать частоту инициации на не-AUG кодонах [114]. N- и C-концевые «хвосты» фактора инициации eIF1A, которые взаимодействуют с Р-сайтом [115], оказывают прямо противоположное действие на выбор стартового кодона: С-концевой «хвост» повышает точность узнавания, стабилизируя «открытую» конформацию сканирующих комплексов, тогда как N-концевой «хвост» снижает точность инициации и стимулирует «закрытую» конформацию комплексов [116].

С узнаванием правильного AUG кодона процесс сканирования завершается и инициация переходит в свою последнюю стадию – блокирование инициаторного комплекса на инициаторном кодоне и присоединение 60S субчастицы. В результате формируется 80S рибосомный комплекс, готовый начать элонгацию полипептидной цепи.

## **VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Изучение канонического механизма инициации трансляции пережило свои падения и взлеты. После нескольких крупных прорывов восьмидесятых годов наступил некоторый спад, когда внимание исследователей переключилось на другие задачи, такие как исследование инициации по IRES-зависимому механизму и определение

путей регуляции инициации при заболеваниях и стрессе. Считалось, что исследование подобных процессов, являющихся по сути исключениями из правил, позволит глубже понять отдельные аспекты функционирования белок-синтезирующего аппарата клетки. Но постепенно пришло осознание того, что наше понимание даже самых общих аспектов эукариотической инициации очень ограничено, и это вызвало новый всплеск интереса к изучению и проверке канонических механизмов. Сильный толчок в этом направлении дало развитие новых методов исследований, таких как реконструированные системы трансляции, тупринтинг, криоэлектронная микроскопия, изучение одномолекулярных процессов и т. д. В результате, за последние годы было получено огромное количество новых данных и был пролит свет на многие явления, остававшиеся доселе неизученными. Понимание процесса инициации стало более детальным, что, в свою очередь, позволило приступить к решению смежных проблем на совершенно новом уровне. Вместе с тем, оказалось, что основные гипотезы и предположения, сделанные четверть века назад, в основном подтвердились, и классическая модель эукариотической инициации трансляции блестяще выдержала проверку временем.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Kozak, M. (1989) *J Cell Biol*, **108**, 229–241.
2. Pestova, T.V., Kolupaeva, V.G. (2002) *Genes Dev*, **16**, 2906–2922.
3. Kaye, N.M., Emmett, K.J., Merrick, W.C., Jankowsky, E. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 17742–17750.
4. Yanagiya, A., Svitkin, Y.V., Shibata, S., Mikami, S., Imataka, H., Sonenberg, N. (2009) *Mol. Cell. Biol.*, **29**, 1661–1669.
5. Gross, J.D., Moerke, N.J., von der Haar, T., Lugovskoy, A.A., Sachs, A.B., McCarthy, J.E., Wagner, G. (2003) *Cell*, **115**, 739–750.
6. Volpon, L., Osborne, M.J., Topisirovic, I., Siddiqui, N., Borden, K.L. (2006) *EMBO J.*, **25**, 5138–5149.
7. Goss, D.J., Carberry, S.E., Dever, T.E., Merrick, W.C., Rhoads, R.E. (1990) *Biochemistry*, **29**, 5008–5012.
8. Niedzwiecka, A., Marcotrigiano, J., Stepinski, J., Jankowska-Anyszka, M., Wyslouch-Cieszyńska, A., Dadlez, M., Gingras, A.C., Mak, P., Darzynkiewicz, E., Sonenberg, N. et al. (2002) *J. Mol. Biol.*, **319**, 615–635.
9. Slepnev, S.V., Korneeva, N.L., Rhoads, R.E. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 25227–25237.
10. Muckenthaler, M., Gray, N.K., Hentze, M.W. (1998) *Mol. Cell*, **2**, 383–388.
11. Jacobson, A. (1996) *Translational Control*. / Eds: J.W.B.Hershey, M.B.Mathews, N.Sonenberg. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 451–480.
12. Wells, S.E., Hillner, P.E., Vale, R.D., Sachs, A.B. (1998) *Mol. Cell*, **2**, 135–140.
13. Kozak, M. (1979) *Nature*, **280**, 82–85.

14. Konarska, M., Filipowicz, W., Domdey, H., Gross, H.J. (1981) *Eur. J. Biochem.*, **114**, 221–227.
15. Gunnery, S., Maivali, U., Mathews, M.B. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 21642–21646.
16. Ohlmann, T., Pain, V.M., Wood, W., Rau, M., Morley, S.J. (1997) *EMBO J.*, **16**, 844–855.
17. Hershey, P.E., McWhirter, S.M., Gross, J.D., Wagner, G., Alber, T., Sachs, A.B. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 21297–21304.
18. De Gregorio, E., Preiss, T., Hentze, M.W. (1999) *EMBO J.*, **18**, 4865–4874.
19. De Gregorio, E., Baron, J., Preiss, T., Hentze, M.W. (2001) *RNA*, **7**, 106–113.
20. von der Haar, T., McCarthy, J.E. (2002) *Mol Microbiol*, **46**, 531–544.
21. Browning, K.S., Humphreys, J., Hobbs, W., Smith, G.B., Ravel, J.M. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 17967–17973.
22. Kozak, M. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 19867–19870.
23. Alekhina, O.M., Vassilenko, K.S., Spirin, A.S. (2007) *Nucleic Acids Res.*, **35**, 6547–6559.
24. Vassilenko, K.S., Alekhina, O.M., Dmitriev, S.E., Shatsky, I.N., Spirin, A.S. (2011) *Nucleic Acids Res.*, **39**, 5555–5567.
25. Petrov, A., Kornberg, G., O’Leary, S., Tsai, A., Uemura, S., Puglisi, J.D. (2011) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **21**, 137–145.
26. Ohlmann, T., Rau, M., Morley, S.J., Pain, V.M. (1995) *Nucleic Acids Res.*, **23**, 334–340.
27. Ohlmann, T., Rau, M., Pain, V.M., Morley, S.J. (1996) *EMBO J.*, **15**, 1371–1382.
28. De Gregorio, E., Preiss, T., Hentze, M.W. (1998) *RNA*, **4**, 828–836.
29. Andreev, D.E., Dmitriev, S.E., Terenin, I.M., Prassolov, V.S., Merrick, W.C., Shatsky, I.N. (2009) *Nucleic Acids Res.*, **37**, 6135–6147.
30. Shatsky, I.N., Dmitriev, S.E., Terenin, I.M., Andreev, D.E. (2010) *Mol. Cells*, **30**, 285–293.
31. Gilbert, W.V. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 29033–29038.
32. Andreev, D.E., Terenin, I.M., Dunaevsky, Y.E., Dmitriev, S.E., Shatsky, I.N. (2006) *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 3164–3169.
33. Robert, F., Pelletier, J. (2009) *Expert Opin. Ther. Targets*, **13**, 1279–1293.
34. Dmitriev, S.E., Andreev, D.E., Terenin, I.M., Olovnikov, I.A., Prassolov, V.S., Merrick, W.C., Shatsky, I.N. (2007) *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 4685–4697.
35. Berthelot, K., Muldoon, M., Rajkowitsch, L., Hughes, J., McCarthy, J.E. (2004) *Mol. Microbiol.*, **51**, 987–1001.
36. Baim, S.B., Sherman, F. (1988) *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 1591–1601.
37. Kozak, M. (1991) *Gene Expr.*, **1**, 117–125.
38. Kozak, M., Shatkin, A.J. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 6568–6577.
39. Kozak, M. (1978) *Cell*, **15**, 1109–1123.
40. Kozak, M. (1989) *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 5134–5142.
41. Pelletier, J., Sonenberg, N. (1985) *Cell*, **40**, 515–526.
42. Kozak, M. (1984) *Nucleic Acids Res.*, **12**, 3873–3893.
43. Kozak, M. (1983) *Cell*, **34**, 971–978.
44. Pestova, T.V., Borukhov, S.I., Hellen, C.U. (1998) *Nature*, **394**, 854–859.
45. Sonenberg, N. (1991) *Trends Genet.*, **7**, 105–106.
46. Sonenberg, N. (1993) *Gene Expr.*, **3**, 317–323.
47. Jackson, R.J. (1996) *Translational control*. / Eds: J.W.B.Hershey, M.B.Mathews, N.Sonenberg. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 71–112.
48. Shirokikh, N.E., Spirin, A.S. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 10738–10743.

49. *Passmore, L.A., Schmeing, T.M., Maag, D., Applefield, D.J., Acker, M.G., Algire, M.A., Lorsch, J.R., Ramakrishnan, V.* (2007) *Mol. Cell*, **26**, 41–50.
50. *Pisarev, A.V., Kolupaeva, V.G., Yusupov, M.M., Hellen, C.U., Pestova, T.V.* (2008) *EMBO J.*, **27**, 1609–1621.
51. *Mitchell, S.F., Walker, S.E., Algire, M.A., Park, E.H., Hinnebusch, A.G., Lorsch, J.R.* (2010) *Mol. Cell*, **39**, 950–962.
52. *Jackson, R.J.* (1991) *Eur. J. Biochem.*, **200**, 285–294.
53. *Svitkin, Y.V., Pause, A., Haghghat, A., Pyronnet, S., Witherell, G., Belsham, G.J., Sonenberg, N.* (2001) *RNA*, **7**, 382–394.
54. *Kozak, M.* (1980) *Cell*, **22**, 459–467.
55. *Sarabhai, A., Brenner, S.* (1967) *J. Mol. Biol.*, **27**, 145–162.
56. *Adhin, M.R., van Duin, J.* (1990) *J. Mol. Biol.*, **213**, 811–818.
57. *Feynman, R., Leighton, R., Sands, M.* (1963) *The Feynman Lectures on Physics*. Reading, MA: Addison-Wesley Publishing Company.
58. *Cordova, N.J., Ermentrout, B., Oster, G.F.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 339–343.
59. *Gelles, J., Landick, R.* (1998) *Cell*, **93**, 13–16.
60. *Yanagida, T., Ueda, M., Murata, T., Esaki, S., Ishii, Y.* (2007) *Biosystems*, **88**, 228–242.
61. *Spirin, A.S.* (2002) *FEBS Lett.*, **514**, 2–10.
62. *Spirin, A.S.* (2004) *RNA Biol.*, **1**, 3–9.
63. *Spirin, A.S.* (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 21103–21119.
64. *Spirin, A.S., Finkelstein, A.F.* (2011) *Molecular Machines in Biology: Workshop of the Cell.* / Ed: J.Frank. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 158–190.
65. *Jackson, R.J.* (2000) *Translational Control of Gene Expression.* / Eds: N.Sonenberg, J.W.B.Hershey, M.B.Mathews. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 127–183.
66. *Hinnebusch, A.G.* (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 21661–21664.
67. *Kolb, V.A., Makeyev, E.V., Spirin, A.S.* (1994) *EMBO J.*, **13**, 3631–3637.
68. *Kolb, V.A., Makeyev, E.V., Spirin, A.S.* (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 16597–16601.
69. *Pisareva, V.P., Pisarev, A.V., Komar, A.A., Hellen, C.U., Pestova, T.V.* (2008) *Cell*, **135**, 1237–1250.
70. *Rozen, F., Edery, I., Meerovitch, K., Dever, T.E., Merrick, W.C., Sonenberg, N.* (1990) *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 1134–1144.
71. *Siridechadilok, B., Fraser, C.S., Hall, R.J., Doudna, J.A., Nogales, E.* (2005) *Science*, **310**, 1513–1515.
72. *Marintchev, A., Edmonds, K.A., Marintcheva, B., Hendrickson, E., Oberer, M., Suzuki, C., Herdy, B., Sonenberg, N., Wagner, G.* (2009) *Cell*, **136**, 447–460.
73. *Nielsen, K.H., Behrens, M.A., He, Y., Oliveira, C.L., Jensen, L.S., Hoffmann, S.V., Pedersen, J.S., Andersen, G.R.* (2011) *Nucleic Acids. Res.*, **39**, 2678–2689.
74. *Kozak, M., Shatkin, A.J.* (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 6895–6908.
75. *Kozak, M.* (1977) *Nature*, **269**, 391–394.
76. *Spirin, A.S.* (2009) *Biochemistry*, **48**, 10688–10692.
77. *Altmann, M., Muller, P.P., Wittmer, B., Ruchti, F., Lanker, S., Trachsel, H.* (1993) *EMBO J.*, **12**, 3997–4003.
78. *Coppolecchia, R., Buser, P., Stotz, A., Linder, P.* (1993) *EMBO J.*, **12**, 4005–4011.
79. *Abramson, R.D., Dever, T.E., Lawson, T.G., Ray, B.K., Thach, R.E., Merrick, W.C.* (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 3826–3832.
80. *Nishiyama, M., Higuchi, H., Ishii, Y., Taniguchi, Y., Yanagida, T.* (2003) *Biosystems*, **71**, 145–156.

81. Kitamura, K., Yanagida, T. (2003) *Biosystems*, **71**, 101–110.
82. Matsuda, D., Dreher, T.W. (2006) *RNA*, **12**, 1338–1349.
83. Williams, M.A., Lamb, R.A. (1989) *J. Virol.*, **63**, 28–35.
84. Kozak, M. (1989) *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 5073–5080.
85. Kozak, M. (1991) *Gene Expr.*, **1**, 111–115.
86. Kozak, M. (1998) *Nucleic Acids. Res.*, **26**, 4853–4859.
87. Boeck, R., Curran, J., Matsuoka, Y., Compans, R., Kolakofsky, D. (1992) *J. Virol.*, **66**, 1765–1768.
88. Kozak, M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2850–2854.
89. Cigan, A.M., Donahue, T.F. (1987) *Gene*, **59**, 1–18.
90. Oliveira, C.C., van den Heuvel, J.J., McCarthy, J.E. (1993) *Mol. Microbiol.*, **9**, 521–532.
91. Vega Laso, M.R., Zhu, D., Sagliocco, F., Brown, A.J., Tuite, M.F., McCarthy, J.E. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 6453–6462.
92. Chuang, R.Y., Weaver, P.L., Liu, Z., Chang, T.H. (1997) *Science*, **275**, 1468–1471.
93. Iost, I., Dreyfus, M., Linder, P. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 17677–17683.
94. Yang, Q., Jankowsky, E. (2005) *Biochemistry*, **44**, 13591–13601.
95. de la Cruz, J., Iost, I., Kressler, D., Linder, P. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5201–5206.
96. Marsden, S., Nardelli, M., Linder, P., McCarthy, J.E. (2006) *J. Mol. Biol.*, **361**, 327–335.
97. Tarn, W.Y., Chang, T.H. (2009) *RNA Biol.*, **6**, 17–20.
98. Parsyan, A., Shahbazian, D., Martineau, Y., Petroulakis, E., Alain, T., Larsson, O., Mathonnet, G., Tettweiler, G., Hellen, C.U., Pestova, T.V. et al. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 22217–22222.
99. Abaeva, I.S., Marintchev, A., Pisareva, V.P., Hellen, C.U., Pestova, T.V. (2011) *EMBO J.*, **30**, 115–129.
100. Kozak, M. (1987) *Nucleic Acids. Res.*, **15**, 8125–8148.
101. Kozak, M. (1986) *Cell*, **44**, 283–292.
102. Kozak, M. (1997) *EMBO J.*, **16**, 2482–2492.
103. Shabalina, S.A., Ogurtsov, A.Y., Rogozin, I.B., Koonin, E.V., Lipman, D.J. (2004) *Nucleic Acids. Res.*, **32**, 1774–1782.
104. Cigan, A.M., Pabich, E.K., Donahue, T.F. (1988) *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 2964–2975.
105. Yun, D.F., Laz, T.M., Clements, J.M., Sherman, F. (1996) *Mol. Microbiol.*, **19**, 1225–1239.
106. Pisarev, A.V., Kolupaeva, V.G., Pisareva, V.P., Merrick, W.C., Hellen, C.U., Pestova, T.V. (2006) *Genes Dev.*, **20**, 624–636.
107. Chen, S.J., Lin, G., Chang, K.J., Yeh, L.S., Wang, C.C. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 3173–3180.
108. Clements, J.M., Laz, T.M., Sherman, F. (1988) *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 4533–4536.
109. Peabody, D.S. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 5031–5035.
110. Maag, D., Algire, M.A., Lorsch, J.R. (2006) *J. Mol. Biol.*, **356**, 724–737.
111. Unbehaun, A., Borukhov, S.I., Hellen, C.U., Pestova, T.V. (2004) *Genes Dev.*, **18**, 3078–3093.
112. Lomakin, I.B., Kolupaeva, V.G., Marintchev, A., Wagner, G., Pestova, T.V. (2003) *Genes Dev.*, **17**, 2786–2797.
113. Maag, D., Fekete, C.A., Gryczynski, Z., Lorsch, J.R. (2005) *Mol. Cell*, **17**, 265–275.
114. Cheung, Y.N., Maag, D., Mitchell, S.F., Fekete, C.A., Algire, M.A., Takacs, J.E., Shirokikh, N., Pestova, T., Lorsch, J.R., Hinnebusch, A.G. (2007) *Genes Dev.*, **21**, 1217–1230.

- 
115. Yu, Y., Marintchev, A., Kolupaeva, V.G., Unbehaun, A., Veryasova, T., Lai, S.C., Hong, P., Wagner, G., Hellen, C.U., Pestova, T.V. (2009) *Nucleic Acids. Res.*, **37**, 5167–5182.
116. Fekete, C.A., Mitchell, S.F., Cherkasova, V.A., Applefield, D., Algire, M.A., Maag, D., Saini, A.K., Lorsch, J.R., Hinnebusch, A.G. (2007) *EMBO J.*, **26**, 1602–1614.