

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Рубцова Мария Петровна

**Свойства 5'-нетранслируемой области мРНК белка теплового шока человека
HSP70**

02.00.10 - биоорганическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва - 2004

Работа выполнена на кафедре химии природных соединений Химического факультета Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: д.х.н., гл.н.сотр. Шатский Иван Николаевич

Официальные оппоненты: д.х.н., проф. Карпова Галина Георгиевна
к.б.н., ст.н.сотр. Скулачев Максим Владимирович

Ведущая организация: Институт биоорганической химии
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Защита состоится 24 февраля 2004 г. в 15⁰⁰ на заседании Диссертационного совета Д 501.001.41 по химическим наукам при Московском Государственном Университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, ГСП-2, Москва, Ленинские горы, Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Химического факультета МГУ им.М.В.Ломоносова.

Автореферат разослан 22 января 2004 года.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат химических наук

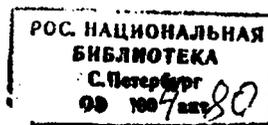


Смирнова И.Г.

Актуальность проблемы

Современная модель инициации трансляции эукариотических мРНК предполагает, что 40S рибосомная субчастица совместно с факторами инициации связывает 5'-конец мРНК. Это связывание происходит за счет специфического взаимодействия фактора инициации eIF4E с кеп-структурой (7-метилгуанозин, соединенный с 5'-концевым нуклеозидом 5'-5'-трифосфатной связью) мРНК. Затем 40S рибосомная субчастица "сканирует" мРНК до первого, находящегося в благоприятном нуклеотидном контексте, AUG-кодона. Расплетание вторичной структуры 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) мРНК при этом производят факторы инициации eIF4A, eIF4B и eIF4G. После нахождения нужного инициаторного кодона к малой рибосомной субчастице присоединяется 60S субчастица, и образовавшийся 80S комплекс начинает синтез белка.

Описанная модель предъявляет определенные требования к структуре мРНК. Подавляющее большинство эукариотических мРНК кепированы, моноцистронны и содержат относительно короткие (50-100 нуклеотидов) и слабо структурированные 5'-НТО. Инициация трансляции таких мРНК происходит обычно на ближайшем к 5'-концу инициаторном AUG-кодоне. Такой механизм инициации называется кеп-зависимым. Оказалось, что к ряду мРНК этот механизм инициации трансляции неприменим в силу иного строения их 5'-НТО. Для таких мРНК была предложена модель внутренней (кеп-независимой) инициации трансляции. В соответствии с этой моделью 40S рибосомная субчастица связывается непосредственно с внутренним участком 5'-НТО мРНК, так называемым участком внутреннего связывания рибосомы, или IRES (internal ribosome entry site)-элементом. Впервые подобный механизм инициации трансляции был предложен для мРНК пикорнавирусов, 5'-НТО которых не кепированы, весьма протяженны, сильно структурированы и содержат до 11 AUG-триплетов, предшествующих истинному инициаторному кодону.



Впоследствии IRES-элементы обнаружили и в мРНК вирусов других групп. Синтез белка на вирусных мРНК обеспечивается трансляционным аппаратом инфицированной клетки млекопитающих, при этом используются канонические факторы инициации. Это послужило основанием для предположения, что некоторые клеточные мРНК также способны к внутренней инициации. Список мРНК млекопитающих, содержащих IRES-элементы, постоянно увеличивается и в настоящее время включает мРНК 50-60 белков, важных для роста, дифференцировки и функционирования клетки. Тем не менее, молекулярные механизмы внутренней инициации трансляции на IRES-элементах клеточных мРНК до сих пор не известны. Поиск новых IRES-элементов, а также изучение их строения и функционирования необходимы для выяснения механизмов внутренней инициации трансляции в целом.

Цель работы

Синтез белков теплового шока в клетках млекопитающих активируется при кратковременном повышении температуры до 42°C. При этом происходит снижение общего уровня белкового синтеза за счет инактивации кеп-связывающего фактора инициации трансляции eIF4E. В этих условиях эффективность синтеза белков теплового шока не только не снижается, а наоборот, возрастает и остается повышенной в течение некоторого времени после возврата к нормальной температуре. Цель настоящей работы — изучение механизма инициации трансляции мРНК одного из белков теплового шока, HSP70, а также определение участков 5'-НТО мРНК *HSP70*, важных для взаимодействия с трансляционным аппаратом клетки.

Научная новизна и практическая ценность

В настоящей работе впервые показано, что мРНК *HSP70* содержит IRES-элемент, активность которого в 4-5 раз выше активности IRES-элемента риновируса и сравнима с активностью IRES-элементов пикорнавирусов. Определены границы участка внутреннего связывания рибосомы и важные для инициации трансляции районы в самом IRES-элементе. Полученные результаты имеют важное значение для

понимания молекулярных механизмов инициации трансляции мРНК млекопитающих. Накопление данных об IRES-элементах мРНК млекопитающих позволит понять механистические аспекты регуляции инициации белкового синтеза в клетках эукариот.

Публикации и апробация работы

По материалам диссертации опубликовано 5 научных работ, в том числе 3 статьи в отечественных и международных журналах. Результаты работы докладывались на международных конференциях "The Dynamics of Ribosome Structure and Function" (Queenstown, New Zealand. 27th January - 1st February, 2002), "8th Annual Meeting of the RNA Society" (Vienna, Austria. July 1 - July 6, 2003), III съезде Биохимического общества (Санкт-Петербург, июнь-июль 2002), "The 5th International Engelhardt Conference on Molecular Biology" (Moscow, June 21-26, 2001).

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 111 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, результатов и обсуждения, экспериментальной части, выводов и списка литературы. Содержит 22 рисунков. Список литературы включает 150 источников.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Свойства 5'-нетранслируемой области мРНК белка теплового шока человека

HSP70

Исследование способности мРНК HSP70 к внутренней инициации трансляции

При повышении температуры в клетках млекопитающих, происходит фосфорилирование кеп-связывающего фактора инициации трансляции eIF4E. Фосфорилирование затрагивает аминокислотные остатки находящиеся в районе взаимодействия этого фактора с фактором eIF4G, который служит своеобразным

мостиком между 4E и группой факторов, связывающих мРНК. Кроме того происходит активация белков, связывающих и инактивирующих фактор инициации eIF4E (4E-BP). Оба эти события приводят к подавлению белкового синтеза в клетке. В то же время существует немногочисленный класс белков, эффективность синтеза которых при и после теплового шока не только не падает, а резко возрастает. Эти белки, названные белками теплового шока (HSP), являются типичными шаперонами - они возвращают белкам, изменившим свою конформацию под действием тепловой денатурации, активную форму, а также способствуют ускоренной деградации дефектных белков.

Очевидно, что инициация синтеза белков теплового шока (и, в частности, HSP70) в гораздо меньшей степени зависит от кэпа, чем инициация трансляции других клеточных матриц. Этот вывод подтверждается тем фактом, что мРНК белков теплового шока активно транслируются в системах с искусственно пониженным содержанием инициаторного фактора eIF4E. Еще одним доводом в пользу наличия IRES-элемента в мРНК *HSP70* является способность к внутренней инициации мРНК белка VIP - близкого гомолога HSP70, сходного с ним как по строению, так и по функции. Этот белок также относится к шаперонам, и его синтез активируется в условиях стресса.

Для исследования способности какой-либо нуклеотидной последовательности к внутренней посадке 40S рибосомной субчастицы применяют метод бицистронных конструкций (Pelletier J. et al. 1988, Jang S.K. et al. 1988). Схема этого метода приведена на рис. 1. В бицистронной конструкции две нуклеотидные последовательности, кодирующие разные репортерные белки, разделены нетранслируемым спейсером. В соответствии со сканирующей моделью инициации белкового синтеза у эукариот трансляция второго цистрона может осуществляться только по механизму реинициации ("проскок" рибосомы, присоединившей факторы инициации, с первого цистрона), т.е. такая трансляция должна быть крайне неэффективной (рис. 1А). В том случае, когда между двумя цистронами находится нуклеотидная последовательность, содержащая участок внутреннего связывания рибосомы, эффективность трансляции второго цистрона резко усиливается (рис. 1Б) и становится совершенно независимой

от трансляции первого цистрона (рис. 1B). Этот подход широко использовали при доказательстве наличия IRES-элементов в РНК пикорнавирусов. При трансфекции в клетки млекопитающих или при трансляции *in vitro* контрольных плазмид (рис. 1A), трансляция второго - цистрона крайне неэффективна. Однако, когда между двумя цистронами находилась 5'-НТО пикорнавирусной РНК (рис. 1B), экспрессия второго цистрона становилась высокоэффективной. При появлении в последней конструкции перед первым цистроном стабильной шпилечной структуры, трудно поддающейся сканированию, трансляция первого цистрона практически полностью прекращалась, в то время как экспрессия второго цистрона оставалась на прежнем уровне (рис. 1B).

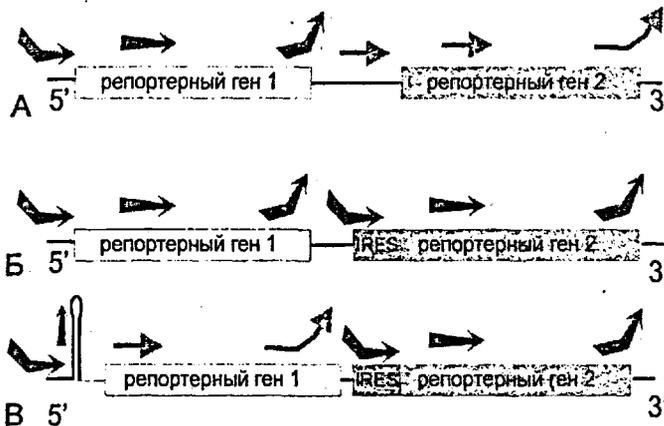
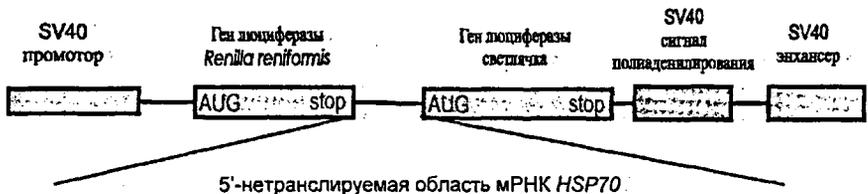


Рис. 1. Схематическое изображение метода бицистронных конструкций. А – первый и второй цистроны разделены нетранслируемым спейсером, не способным к внутренней инициации, Б – в межцистронной области находится IRES-элемент, В – бицистронная конструкция содержит IRES-элемент между репортерными генами и шпилечную структуру перед первым из них. Стрелками показано направление движения 40S рибосомных субчастиц по мРНК. Толщина стрелок отражает эффективность трансляции.

Для доказательства наличия в мРНК *HSP70* участка внутреннего связывания рибосомы мы использовали бицистронную конструкцию на основе плазмиды pGL3R, содержащую гены люциферазы *Renilla reiformis* и люциферазы светлячка (*Photinus pyralis*), разделенные межцистронным спейсером (рис. 2). В межцистронную область

поместили фрагмент ДНК, соответствующий 5'-НТО мРНК *HSP70*. Контрольные конструкции содержали в межцистронной области полилинкер вектора (вектор), а также IRES-элемент РНК - вируса энцефаломиокардита, не содержащий -участок связывания фактора инициации eIF4G (EMCN/мут). Такой мутантный IRES-элемент неспособен к внутренней инициации трансляции. Эти конструкции использовали в качестве контроля фоновой трансляции второго цистрона. Положительным контролем служила конструкция/ содержащая IRES-элемент. РНК риновируса человека (HRV). Плазмиды трансфицировали кальций-фосфатным методом в клетки двух различных линий: 293Т - клетки эмбриональной почки человека, трансформированные аденовирусом, и TE 671 - клетки саркомы поперечно-полосатых мышц. Через 48 часов после трансфекции клетки собирали и лизировали, после чего измеряли активность люцифераз.



ataacggctagcctgaggaggctgctgcgacagctccactaccttttcgagagtgactcccgtgtgcccaaggctcccagagcg
aacctgtgaggctgcaggcaccggccgctcgagttccggcgtccggaaggaccgagctctctcgcggatccagtggtccggttc
cagcccccaatctcagagccgagccgacagagagcaggggaaccggc**ATGg**

Рис. 2. Схематическое изображение бицистронной конструкции pGL3R, используемой в работе, и нуклеотидная последовательность 5'-нетранслируемой области мРНК *HSP70* человека.

Активность люциферазы светлячка (второй цистрон) нормировали к активности люциферазы *Renilla reniformis* (первый цистрон), что позволило сравнивать эффективность внутренней инициации независимо от эффективности трансфекции клеток. Степень трансфекции проверяли, измеряя активность р-галактозидазы, синтез

которой обеспечивался плазмидой (pCMVpGal), котрансфицированной с изучаемыми конструкциями. Эффективность внутренней инициации трансляции в случае 5'-НТО мРНК *HSP70* оказалась в 4-5 раз выше, чем в случае IRES-элемента РНК риновируса независимо от типа клеток, и в 60-100 раз выше фоновой трансляции второго цистрона (рис. 3). Помимо присутствия IRES-элемента в межцистронной области существуют и другие возможные причины трансляции второго цистрона. Эффективный синтез люциферазы светлячка может происходить в случае реинициации трансляции на инициаторном кодоне второго цистрона, наличия криптического промотора в 5'-НТО, альтернативного сплайсинга или деградации мРНК. Для того чтобы исключить эти возможности, мы создали следующие конструкции: конструкцию, содержащую стабильную шпилечную структуру перед первым цистроном (*hsp70h*) (см. рис. 1) и конструкцию, не содержащую промотора, необходимого для транскрипции бицистронной мРНК в клетке (*dSV40promoter*). Эти конструкции трансфицировали в клетки 293Т и измеряли в них активности люцифераз.

Активность второго цистрона осталась прежней, а активность первого уменьшилась в 2,5 раза в случае введения шпилечной структуры перед первым геном (рис. 4). Таким образом, синтез люциферазы светлячка не обусловлен реинициацией трансляции.

В клетках, трансфицированных конструкцией, не содержащей промотор, активность обеих люцифераз отсутствовала (рис. 4). Это свидетельствует о том, что экспрессия второго цистрона обусловлена присутствием в межцистронной области IRES-элемента, а не связана с функционированием криптического промотора, приводящего к образованию моноцистронной мРНК, кодирующей *Fluc*.

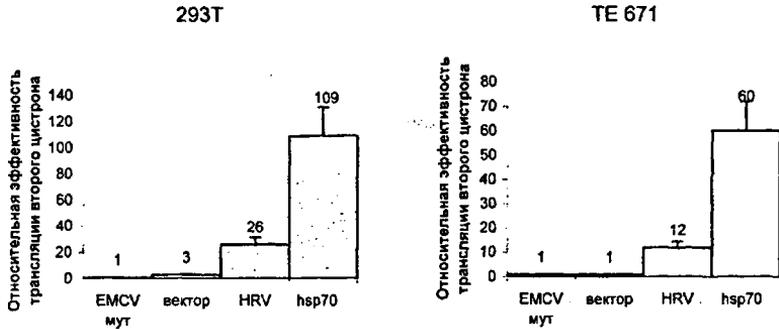


Рис. 3. Сравнение эффективности экспрессии второго цистрона в составе конструкций с разной структурой межцистронной области: EMCVмут содержит IRES-элемент РНК вируса энцефаломиокардита (принята за единицу), в состав которого не входит участок связывания eIF4G, вектор -- полилинкер, HRV -- IRES-элемент РНК риновируса, hsp70 -- 5'-НТО мРНК HSP70. Приведено среднее значение эффективности трансляции, измеренной в трех независимых экспериментах.

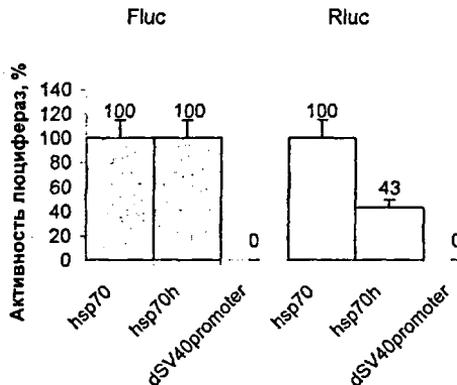


Рис. 4. Экспрессия первого и второго цистронов в присутствии шпилечной структуры (конструкция hsp70h) и в отсутствие промотора (конструкция dSV40promoter). Активность люцифераз в конструкции pGL3Rhs70 принята за 100%. Приведено среднее значение эффективности трансляции, измеренной в трех независимых экспериментах.

Третьей возможной причиной эффективной экспрессии второго цистрона может быть деградация в клетках бицистронной мРНК или альтернативный сплайсинг, в результате которого образуется одноцистронная матрица. Данное предположение проверяли с использованием метода защиты от рибонуклеаз (рис. 5). Синтезировали радиоактивно меченный зонд, комплементарный участку, содержащему концевую область первого цистрона (288 нуклеотидов), межцистронную область (216 нуклеотидов) и начало второго цистрона (122 нуклеотида). На концах зонда располагались дополнительные нуклеотидные последовательности, не комплементарные анализируемой РНК. Общая длина зонда составляла 728 нуклеотидов.

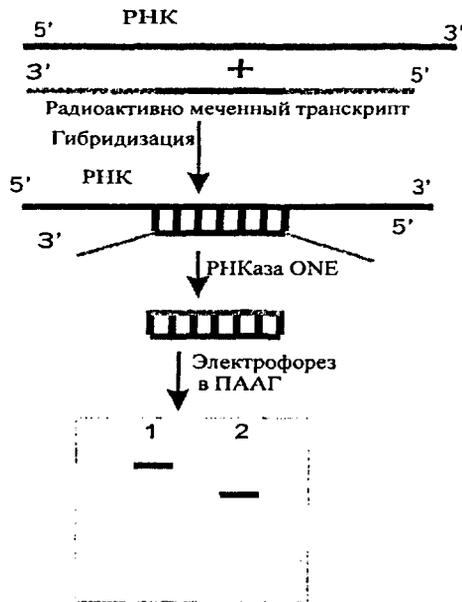


Рис. 5. Схема метода защиты от рибонуклеаз.

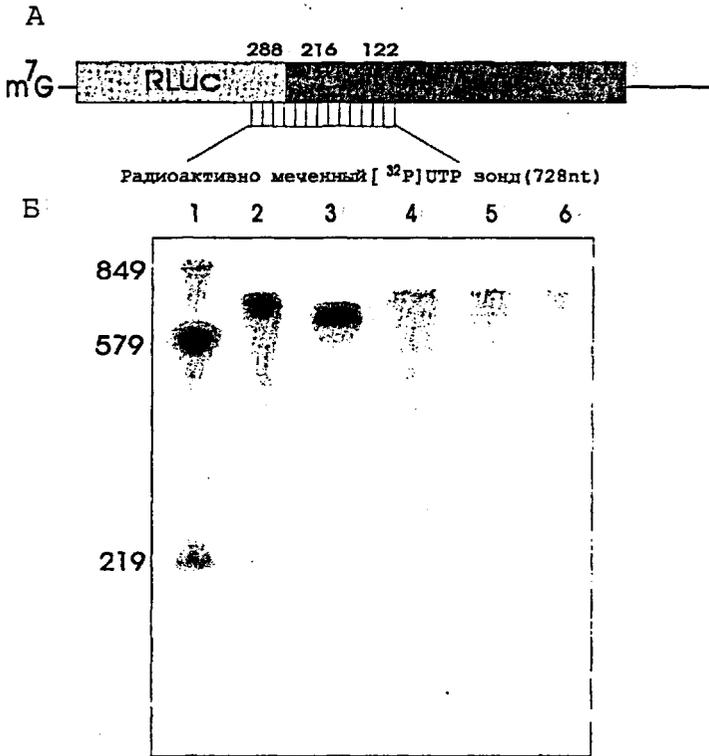


Рис. 6. Проверка целостности бицистронной мРНК методом защиты от РНКазы.

А – схематическое изображение бицистронной мРНК и меченого РНК-зонда.

Б – радиоавтограмма полиакриламидного геля после разделения продуктов гидролиза РНКазой РНК-РНК-дуплексов. Дорожка М соответствует маркерам молекулярных масс; 1 – радиоактивный РНК-зонд; 2 – зонд, гибридизованный с РНК из клеток, трансфицированных рGL3Rhsr70, и обработанный РНКазой ONE; 3 – зонд, гибридизованный с РНК из нетрансфицированных клеток и обработанный рибонуклеазой (контроль); 4 – зонд, гибридизованный с тРНК из печени теленка (контроль); 5 – РНК-зонд, гидролизированный РНКазой ONE (контроль).

Из результатов опыта, приведенных на рис. 6, следует, что бицистронная мРНК в клетках сохраняет свою целостность. Суммарную РНК, выделенную из клеток, гибридизовали с полученным зондом и обрабатывали РНКазой, гидролизующей одноцепочечную РНК, после чего полученный дуплекс денатурировали и проводили электрофорез в лолиакриламидном геле (ПААГ)- На радиоавтографе зонд образует зоны, соответствующие фрагментам, защищенным мРНК от деградации рибонуклеазами. Если бицистронная мРНК в клетках не расщепляется, то на радиоавтографе будет одна зона (рис. 5, дорожка 1), равная по длине области комплементарности мРНК и зонда (в нашем случае 626 нуклеотидов), если же мРНК деградировала, то в соответствующей дорожке должны появляться фрагмент(ы) меньшей длины (рис. 5, дорожка 2).

Таким образом, эффективный синтез белка со второго цистрона обусловлен не реинициацией трансляции, не образованием моноцистронной РНК и не наличием критического промотора или альтернативного сплайсинга мРНК. Единственная возможность - способность 5'-НТО мРНК *HSP70* к внутренней инициации трансляции. Из приведенных данных можно заключить, что мРНК *HSP70* содержит IRES-элемент, активность которого сопоставима с активностью IRES-элементов пикорнавирусов.

Определение границ IRES-элемента мРНК *HSP70*

Для того чтобы локализовать IRES-элемент внутри 5'-НТО мРНК *HSP70*, мы создали набор бицистронных конструкций, содержащих в межцистронном участке фрагменты 5'-НТО, укороченные с 5'-конца или содержащие внутренние делеции. На рис. 7 схематически показаны положения и размеры делеций участков 5'-НТО мРНК *HSP70*. Все эти конструкции трансфицировали в клетки линии 293Т и измеряли активность люциферазы в лизатах этих клеток.

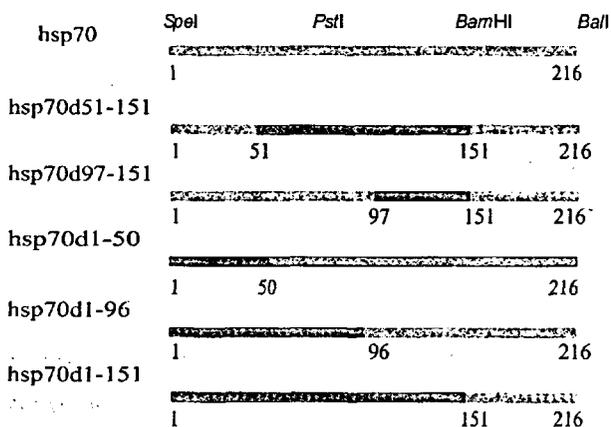


Рис. 7. Схематическое изображение 5'-НТО мРНК *HSP70* и делеций в ней, используемых для определения границ IRES-элемента. Участки делеций выделены темным.

Результаты анализа представлены на рис. 8. Как видно из рисунка, ни одна из полученных конструкций не обеспечивала эффективную внутреннюю инициацию трансляции. Независимо от того, в какой части 5-НТО находилась делеция, эффективность трансляции второго цистрона резко падала. Минимальное 7-8-кратное падение уровня экспрессии второго цистрона наблюдается в случае удаления 50 5'-концевых нуклеотидов (вариант hsp70d1-50). Все другие варианты делеций подавляют эффективность трансляции второго цистрона в еще большей степени. Показано, что вся 5'-НТО мРНК *HSP70* необходима и для эффективной трансляции моноцистронных конструкций (Vivinus et. al. 2001). Удаление разных участков (di-123, d1-53, d54-213, (J124-213, d184-213) 5'НТО мРНК *HSP70* приводило к полной инактивации трансляции этой матрицы в разных типах клеток, а при тепловом шоке наиболее эффективная трансляция наблюдалась в случае всей 5'-НТО. В этой работе проводили опыты по определению способности к внутренней инициации мРНК *HSP70*, и, как следует из наших данных, пришли к ошибочному выводу, что IRES-элемент в ней отсутствует. Тем не менее, примечательно, что для эффективной трансляции

мРНК *HSP70* в составе как моноцистронной, так и бицистронной конструкций необходимы одни и те же участки.

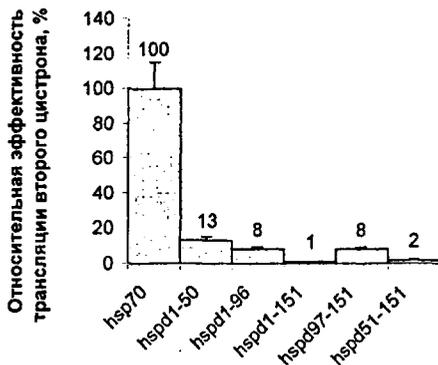


Рис. 8. Влияние делеций разных участков 5'-НТО мРНК *HSP70* на эффективность внутренней инициации трансляции. Приведено среднее значение эффективности трансляции, вычисленное по результатам трех независимых экспериментов.

Удаление больших участков 5'-НТО мРНК без знания ее вторичной структуры может приводить к образованию совершенно новых 5'-НТО, не имеющих ничего общего с исходной природной структурой. Делеции небольших участков (20 нуклеотидов) также могут сказываться на структуре РНК, но, скорее всего, этот вклад будет меньшим, чем в первом случае. С целью более подробного анализа структуры IRES-элемента мРНК *HSP70* и характеристики функциональных центров в пределах участка внутреннего связывания рибосомы был получен набор бицистронных конструкций с делециями 20-30 нуклеотидов, перекрывающими практически всю 5'-НТО мРНК *HSP70*. Схема таких делеционных вариантов приведена на рис. 9.

	SpeI	PstI	BamHI	BalI	
hsp70					
	1			216	
hsp70d1-23					
	1	23		216	
hsp70d33-50					
	1	33	50	216	
hsp70d49-68					
	1	49	68	216	
hsp70d72-95					
	1	72	95	216	
hsp70d96-117					
	1	96	117	216	
hsp70d118-140					
	1		118	140	216
hsp70d152-176					
	1		152	176	216
hsp70d177-206					
	1			177	206

Рис. 9. Схематическое изображение 5'-НТО мРНК *HSP70* и делеций в ней, используемых для выявления функционально важных участков IRES-элемента. Участки делеций выделены темным.

Результаты определения люциферазной активности после трансфекции представлены на рис. 10. Из рис. 10 видно, что для проявления максимальной активности участка внутреннего связывания рибосом и эффективной экспрессии второго цистрона необходима полная 5'-НТО мРНК *HSP70*. Делеции даже небольших участков 5'-НТО негативно влияют на внутреннюю инициацию. Степень подавления трансляции второго цистрона варьирует довольно сильно в зависимости от положения делеции. Так, почти все 5'-концевые делеции, за исключением d33-50, оказывали незначительное влияние на синтез белка, а 3'-концевые, наоборот, сильно подавляли трансляцию, вплоть до ее практически полной инактивации в случае делеции d151-176. Исходя из суммы полученных данных, можно предположить, что для эффективной работы участка внутреннего связывания рибосом мРНК *HSP70*

необходима полная или почти полная 5'-НТО с неравномерным распределением по ее длине функционально важных участков.

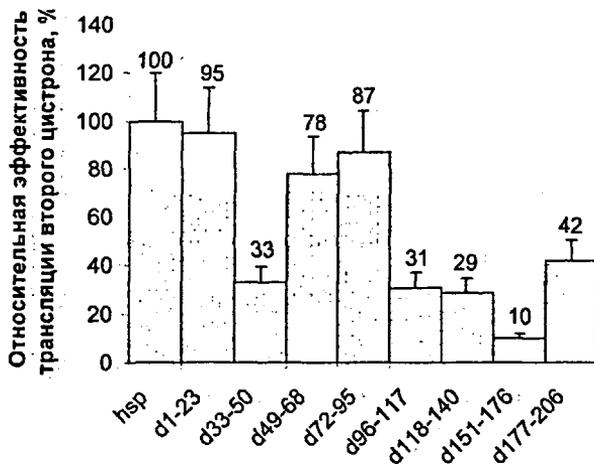


Рис. 10. Влияние делеций коротких участков IRES-элемента мРНК *HSP70* на эффективность внутренней инициации трансляции. Приведено среднее значение эффективности трансляции, вычисленное по результатам трех независимых экспериментов.

В работе (Yuen et. al., 2000) был изучен механизм инициации трансляции на мРНК *HSP70* и трехчастного лидера аденовируса. Авторы пришли к выводу, что мРНК *HSP70* не способна к внутренней инициации трансляции, а инициация на ней происходит по механизму шунтирования, и наиболее важную роль играют участки 96-102 и 194-205 нуклеотидов. По мнению авторов, эти участки могут быть вовлечены в комплементарные взаимодействия с 18S рибосомной. РНК. По нашим данным делеции d96-117 и d177-206, которые захватывают эти участки, также сильно снижают эффективность трансляции и являются важными элементами участка внутреннего связывания рибосом, наряду со многими другими районами 5'НТО мРНК *HSP70*.

Обсуждая, однако, результаты широко используемого делеционного анализа, необходимо учитывать возможное влияние делеций на вторичную структуру мРНК. Негативные последствия делеции могут быть обусловлены не отсутствием какого-то

важного района, отвечающего за взаимодействие мРНК с трансляционным аппаратом, в частности с 40S рибосомной субчастицей, а нарушением вторичной структуры, необходимой для формирования IRES-элемента.

Суммируя полученные данные, можно высказать предположение о структурных особенностях IRES-элемента мРНК *HSP70* и предложить возможную модель взаимодействия этой мРНК с аппаратом трансляции, альтернативную шунтирующей модели (Yuen et. al. 2000). Классические вирусные IRES-элементы имеют жесткую вторичную структуру и содержат отдельные и - сильно структурированные домены. В состав этих доменов входят высокоспецифичные участки связывания канонических факторов инициации трансляции, мРНК-связывающих белков или 40S рибосомной субчастицы. Хорошо изучен пример трехмерного узнавания фактором eIF4A участка, окружающего инициаторный AUG-кодон IRES-элемента EMCV. В случае этого IRES'a факторы инициации eIF4F, eIF4B, eIF3 имеют строго фиксированные специфические места связывания и не могут присоединиться к мРНК в каких-либо других участках. IRES-элемент EMCV, по-видимому, имеет специфическую трехмерную конфигурацию, которая позволяет найти инициаторный триплет только в случае открытого "стартового окна". Именно поэтому удаление небольших участков, а иногда и точечные мутации в разных частях IRES-элементов пикорнавирусов полностью инактивируют их трансляцию. Как видно из наших данных, IRES-элемент мРНК *HSP70* не относится к числу таких строго детерминированных структур. В этом случае только делеция участка 151-176 приводит к почти полной инактивации трансляции, - а небольшие делеции других участков оказывают не столь значительный эффект. Можно предположить, что структура IRES-элемента мРНК *HSP70* является не такой жесткой, как в случае вирусных IRES-элементов, а довольно лабильной и содержит избыточное количество мест связывания компонентов инициации трансляции. Тем не менее, мы выдвигаем гипотезу, что 5-НТО мРНК *HSP70* способна к трехмерному (а не линейному, как в сканирующей модели Козак) узнаванию инициаторного кодона. Это предположение иллюстрирует модель, представленная на рис. 11. Согласно этой

модели трансляционный аппарат связывает 5'-НТО мРНК *HSP70* одновременно в ее 5'- и 3'-концевых участках, являющихся важными элементами структуры. Основным принципиальным моментом этого взаимодействия является трехмерная конфигурация 5'-НТО, благодаря которой происходит сближение инициаторного кодона и компонентов трансляции. Это предположение подтверждается эффектами, наблюдаемыми при удалении больших участков 5'-НТО. Их удаление может нарушать не только участки связывания аппарата-трансляции, но и влиять на пространственную конфигурацию IRES-элемента.

Следует специально подчеркнуть, что кеп-зависимый механизм инициации трансляции не исключает возможность трехмерного узнавания района инициации для мРНК, содержащей IRES-элемент. В этом случае, вероятно, взаимодействие с кепом необходимо для первоначального привлечения мРНК на рибосому, за которым следует узнавание пространственной структуры IRES-элемента и локализация инициаторного AUG-кодона.

Предлагаемая нами модель отличается от механизма шунтирования (см. выше). Согласно механизму шунтирования, первичное взаимодействие мРНК с аппаратом - инициации трансляции происходит посредством связывания кеп-фактором eIF4E, после чего необходимо сканирование 5'-концевой части 5-НТО мРНК и последующее "перепрыгивание" в направлении инициаторного кодона. В случае IRES-элемента мРНК *HSP70* наличие кеп-фактора необязательно, а сканирование последовательности, обогащенной остатками G и C на 62%, должно быть сильно затруднено. Предлагаемая модель позволяет также объединить кеп-зависимый и независимый механизмы инициации трансляции. В условиях, благоприятных для кеп-зависимой инициации трансляции, связывание мРНК с 40S-рибосомной субчастицей происходит за счет первичного взаимодействия eIF4E с кеп-структурой, в результате чего может увеличиваться скорость образования инициаторного комплекса. В условиях инактивации eIF4E возможно прямое взаимодействие с eIF4G или какими-то другими компонентами, имеющими повышенное сродство к внутренним участкам 5-НТО этой матрицы.

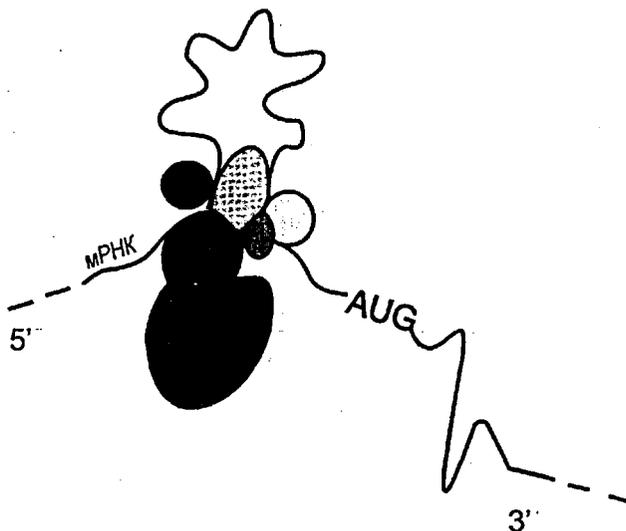


Рис. 11. Схема предложенной кап-независимой модели выбора стартового AUG-кодона при инициации трансляции мРНК *HSP70*.

Выводы

1. При помощи метода бицистронных конструкций впервые показано, что 5'-нетранслируемая область мРНК *HSP70* способна обеспечивать внутреннюю инициацию трансляции, то есть содержит IRES-элемент.
2. Определены границы IRES-элемента мРНК *HSP70*. Показано, что для максимальной эффективности внутренней инициации трансляции необходима полная 5'-нетранслируемая область мРНК.
3. Проведен делеционный анализ IRES-элемента *HSP70*. Показано, что 5'-концевые делеции в меньшей степени подавляют инициацию трансляции, чем 3'-концевые.
4. На основе полученных данных предложена трехмерная модель узнавания инициаторного кодона при инициации трансляции на 5'-НТО мРНК *HSP70*.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Rubtsova M.P., Sizova D.V., Dmitriev S.E., Ivanov D.S., Prassolov V.S., Shatsky I.N. (2003) Distinctive properties of the 5'-untranslated region of human hsp70 mRNA. *J. Biol. Chem.*, V. 278, N. 25. P. 22350-22536.
2. Dmitriev S.E., Pisarev A.V., Rubtsova M.P., Dunaevsky Y.E., Shatsky I.N. (2003) Conversion of 48S translation preinitiation complexes into 80S initiation complexes as revealed by toeprinting. *FEBS Lett.*, V. 533, N. 1-3, P. 99-104.
3. Дмитриев С.Е., Теренин И.М., Рубцова М.П., Шатский И.Н. (2003) Незначительные вариации вторичной структуры 5'-нетранслируемой мРНК В-глобина изменяют требования к концентрации фактора инициации eIF2. *Молекулярная биология*, Т. 37, N 3. С. 494-504.
4. Rubtsova M.P., Sizova D.V., Ivanov D.S., Prassolov V.S., Merrick W., Shatsky I.N. Identification and location of the internal ribosome entry site in the 5' noncoding region of the HSP70 mRNA. *The Dynamics of Ribosome Structure and Function*. Queenstown, New Zealand. 27th January - 1st February, 2002. Abstracts, p. 175.
5. Rubtsova M.P., Ivanov D.S., Prassolov V.S., Shatsky I.N. Distinctive properties of the 5'-untranslated region of human hsp70 mRNA. *RNA* 2003. 8th Annual Meeting of the RNA Society. Vienna, Austria. July 1 - July 6, 2003. Program & Abstracts, p. 406.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Rubtsova' followed by a flourish.

№ - 1995

РНБ Русский фонд

2004-4

20054