

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

ПИСАРЕВ Андрей Владимирович

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ НЕКАНОНИЧЕСКИХ БЕЛКОВЫХ ФАКТОРОВ
p50 и РТВ в инициации трансляции у млекопитающих**

02.00.10 – Биоорганическая химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва - 2003

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

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор

Иван Николаевич Шатский

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор

Борис Павлович Готтих

доктор биологических наук, профессор

Алексей Анатольевич Аграновский

Ведущая организация:

Новосибирский институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Защита состоится " 23 " декабря 2003 г. в 16⁰⁰ на заседании Диссертационного совета Д.501.001.41 при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119899, Москва, Воробьевы Горы, МГУ, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского.

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

Автореферат разослан " 21 " ноября 2003 года.

Ученый секретарь

Диссертационного совета,

кандидат химических наук



И.Г. Смирнова

2003-А
18669

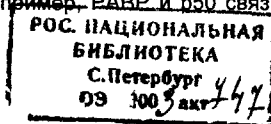
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В последнее время наблюдается значительный подъем интереса к вопросам регуляции трансляции у млекопитающих. Следует подчеркнуть, что основная регуляция трансляции происходит на стадии инициации. Исследование механизмов инициации трансляции очень актуально на сегодняшний день, так как они точно установлены лишь для простых матриц с короткими и слабоструктурированными 5'-НТО и ряда вирусов с IRES-зависимой инициацией трансляции.

Безусловно, одним из наиболее перспективных методов в изучении инициации трансляции является реконструкция иницирующих комплексов из очищенных и охарактеризованных компонентов. Его сочетание с техникой тоупринта, применяемой для визуализации комплексов, позволяет убедиться не только в их наличии, но и в "правильности" положения рибосомы на стартовом AUG-кодоне (при седиментации в сахарозном градиенте нельзя установить "правильность" комплекса, так как метод позволяет определить лишь коэффициент седиментации). По интенсивности сигнала тоупринта в сравнении с суммарной интенсивностью сигналов в дорожке можно оценивать эффективность сборки инициаторного комплекса. А точно известный набор используемых в сборке факторов дает возможность исследовать механизмы инициации трансляции. Метод реконструкции иницирующих комплексов помимо перечисленных преимуществ ещё и совершенно незаменим при исследовании трансляционного аппарата млекопитающих, поскольку в данном случае использование генетических методов крайне затруднено.

Помимо канонических факторов инициации трансляции, для активности ряда матриц в трансляции необходимы дополнительные белковые факторы, которые регулируют клеточную активность в развитии клетки, делении и апоптозе. Такие неканонические факторы инициации трансляции специфичны в трансляции на определённой стадии клеточного цикла, специфичны для клеток тех или иных тканей, а также отвечают на характерный стресс. Есть лишь общие соображения, касающиеся функциональной роли таких белков в клетке при трансляции, механизм же их действия доподлинно не известен. Многообразие и загадочность поведения в трансляции ставят по важности исследования неканонических факторов инициации трансляции в один ряд с каноническими.

По направленности действия в инициации трансляции есть специфические и общие неканонические белковые факторы. Например, PABP и p50 связываются с



большинством или даже со всеми видами мРНК и в целом контролируют белковый синтез. Р50 является наиболее широко представленным белком и неактивных, и активных полисомальных глобиновых мРНК, хотя последние содержат его в два раза меньше в расчёте на молекулу РНК. Переходы мРНК из неактивного в активное состояние и обратно сопровождаются изменением содержания р50 в составе мРНК.

PTB, La-аутоантиген, ипг, ³поли(С)-связывающие белки PCBP1 и PCBP2, hnRNPK и другие, в отличие от р50, являются специфическими неканоническими белковыми факторами, и их функциональная роль в инициации трансляции проявляется лишь для ряда определённых матриц. PTB, в частности, требуется для образования 48S комплекса с IRES-элементами РНК ряда пикорнавирусов и с клеточной мРНК Араф-1, продукт которой вовлечён в регуляцию клеточного апоптоза.

Обладая навыками реконструкции иницирующих комплексов из очищенных и охарактеризованных компонентов в сочетании с техникой тоупринта, мы поставили своей целью в данной работе исследовать по одному примеру неканонического фактора того и другого класса (р50 и PTB) и выявить их функциональную роль и механизм действия в инициации трансляции у млекопитающих.

Цели исследования.

1. Определение условий активации и ингибирования неканоническим белковым фактором р50 образования 48S предынициаторного комплекса.
2. Изучение влияния неканонического белкового фактора PTB на характер взаимодействия IRES-элемента РНК ВЭМК с компонентами трансляционного аппарата клетки.

Научная новизна и практическая значимость работы. В ходе данной работы было показано, что неканонический белковый фактор р50 при низких концентрациях активирует, а при высоких- ингибирует образование 48S предынициаторного комплекса из очищенных компонентов *in vitro*. Мы определили, что р50 стимулирует сборку 48S комплекса на стадии связывания 40S субчастицы с 5'-концом матрицы и, по-видимому, не оказывает влияния на процесс сканирования. Экспериментально найдено, что механизм стимуляции сборки заключается в эффективной конкуренции р50 с факторами инициации трансляции eIF2 и eIF4F за неспецифические места связывания и существенно меньшей конкуренцией за функциональные для последних участки взаимодействия на мРНК. При этом р50 связывается с мРНК по сахаро-фосфатному остову, предпочитая участки с

полностью неспаренными нуклеотидными основаниями, согласно нашим данным химического зондирования.

Вторая часть работы была посвящена исследованию неканонического белкового фактора РТВ в инициации трансляции у млекопитающих. Нами впервые показано, что РТВ значительно активирует сборку 48S предынициаторного комплекса из очищенных компонентов *in vitro* на РНК ВЭМК и практически не оказывает влияния на аналогичную сборку с другим представителем пикорнавирусов, РТВ-1. Стимуляция сборки на РНК ВЭМК обусловлена влиянием РТВ на характер взаимодействия IRES-элемента РНК ВЭМК с одним из основных факторов инициации трансляции eIF4G, о чём свидетельствуют наши эксперименты по тоупринту и УФ-сшивкам.

Полученные результаты представляют несомненную значимость, так как проливают свет на механизм действия двух представителей неканонических белковых факторов в инициации трансляции млекопитающих на молекулярном уровне, что абсолютно необходимо для дальнейшего изучения регуляции инициации трансляции мРНК в целом.

Апробация работы. Диссертация была апробирована на заседании кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ 23 мая 2003. Материалы работы докладывались на международной конференции "Translational control", Колд Спринг Харбор, США 2000г.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 2 печатные работы.

Структура и объём работы. Диссертационная работа изложена на 102 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, результаты и обсуждение, материалы и методы, выводы, список литературы. Материал иллюстрирован 21 рисунком. Библиографический указатель включает 236 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Р50 в инициации трансляции

1. р50 влияет на связывание 40S рибосомной субчастицы с инициаторным кодоном в сборке 48S предынициаторного комплекса из очищенных компонентов *in vitro*.

Для выявления роли р50 в инициации трансляции был поставлен ряд экспериментов по его влиянию на сборку 48S предынициаторного комплекса на β -Glob мРНК. При сборке комплекса использовали очищенные и охарактеризованные

нативные и рекомбинантные факторы инициации трансляции (eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3, eIF4F, eIF4A и eIF4B), ретикулоцитные 40S рибосомные субчастицы, суммарную тРНК из печени телёнка, в которой только инициаторная тРНК была заряжена метионином; нативную глобиновую мРНК (β -Glo мРНК) и рекомбинантный р50. Сборку проводили при избыточных количествах факторов над матрицей и варьировали количество р50 в интервале 6-100 молекул белка на молекулу мРНК. В качестве контроля сборки 48S предынициаторного комплекса использовали весь набор компонентов за исключением инициаторной метиониновой-тРНК. При её отсутствии 48S-комплекс не собирается, и это позволяет судить о нулевом сигнале сборки. При сборке 48S предынициаторного комплекса в районе +16 - +18 открытой рамки считывания от AUG-кодона появляется сигнал тоупринта из трёх полос приблизительно одинаковой интенсивности. Именно по суммарной интенсивности тройного сигнала и судят об эффективности сборки 48S-комплекса.

При сборке 48S-комплекса в условиях избытка по факторам инициации трансляции лишь при 100-кратном избытке р50 над матрицей было обнаружено приблизительно 50%-ингибирование сборки 48S-комплекса, тогда как вплоть до 30-кратного избытка никаких изменений в сборке по сравнению с контролем без р50 обнаружено не было (данные не показаны). В данном эксперименте не удалось обнаружить активирующего влияния р50 на сборку 48S-комплекса. Было выдвинуто предположение, что избыточное количество факторов инициации не позволило обнаружить регулирующего механизма р50. В то же время данный эксперимент выявил ингибирующий эффект р50 на сборку. Так как ингибирование, причём незначительное, наблюдается лишь при гораздо больших избытках р50 по сравнению с остальными факторами, то на данном этапе исследований вполне правомерно можно отбросить выдвигаемую в литературе гипотезу о том, что р50 воздействует на инициацию трансляции путём прямого взаимодействия с факторами инициации трансляции (Evdokimova, 1998).

Полученные на предыдущем этапе исследований данные не смогли пролить свет на вопрос о позитивном влиянии р50 на инициацию трансляции, поэтому в последующих экспериментах было решено понизить количество факторов инициации трансляции по сравнению с матрицей. В частности, заметно понизить (в 3 раза) количества ключевых мРНК-связывающих факторов инициации трансляции- eIF2, eIF3 и eIF4F- до 7, 1,8 и 0,8 пмоль, соответственно, на 1 пмоль мРНК.

При сборке 48S предынициаторного комплекса в этих условиях также решено было поставить контроль на функциональность всех используемых факторов в отсутствие р50 при сборке 48S-комплекса (все факторы инициации трансляции без

p50) и контроль на отсутствие сборки 48S-комплекса при исключении одного из факторов (исключали eIF2).

В систему с лимитирующими количествами факторов добавляли p50 в интервале 2-30-кратного молярного избытка по сравнению с матрицей. Полученные данные позволяют судить, что по мере увеличения количества p50 над матрицей растёт интенсивность сигнала сборки 48S-комплекса. Причём наблюдается равномерный рост интенсивности сборки, без каких-либо скачков. Уже при 4-кратном избытке p50 над матрицей собирается на 20% больше комплекса по сравнению с контролем без p50. При 15-кратном избытке p50 сигнал вырастает в 2, а при 30-кратном избытке – в 4 раза (все данные – по сравнению с контролем без белка) (рис.1). (Следует заметить, что выход 48S комплекса оценивался как процент суммарной радиоактивности полос тоупринта к суммарной радиоактивности в данной дорожке; таким образом исключаются любые позитивные и негативные эффекты p50 на саму реакцию обратной транскрипции, используемой при тоупринте).

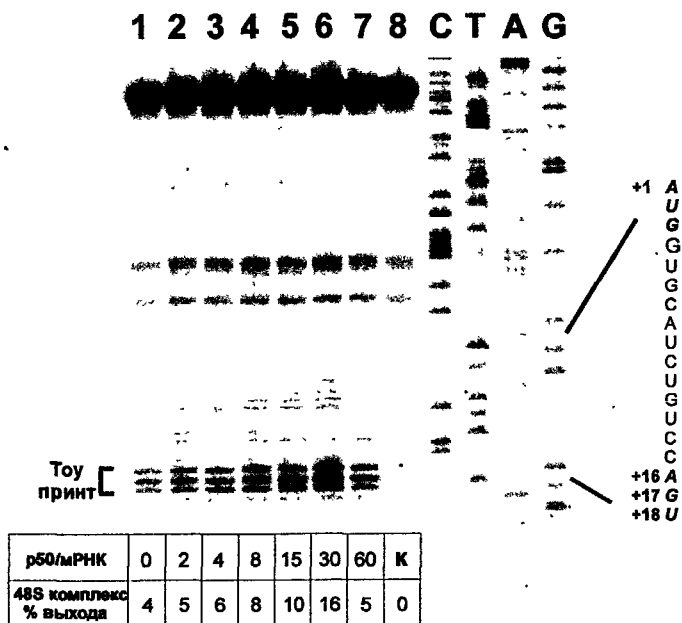


Рис.1 Влияние p50 на реконструкцию 48S прединициаторного комплекса на β -глобиновой мРНК. В подписи указано молярное соотношение p50/мРНК. К- контрольный эксперимент, в котором опущен eIF2. Положение инициаторного AUG кодона показано в правой части рисунка. Выход 48S комплекса рассчитывали с помощью фосфоримиджера.

Уже на данном этапе исследований можно было сделать вывод, что р50 участвует в инициации трансляции не на стадии присоединения 60S-субчастицы к 48S предынициаторному комплексу. Эффект проявляется на более раннем этапе инициации трансляции- на этапе сборки 48S предынициаторного комплекса.

Данные, полученные в предыдущих экспериментах, обнаружили в одном случае лишь ингибирующий эффект, в другом – лишь активирующий эффект р50 в инициации трансляции. В следующем эксперименте решено было сохранить условия ограничения по факторам инициации, но при этом расширить диапазон концентраций р50, чтобы попытаться обнаружить оба эффекта и активации, и ингибирования в одном опыте. По сравнению с предыдущим экспериментом, к избыточным количествам р50 над матрицей было добавлено 2 новые точки: 60- и 100-кратный молярный избыток р50 над матрицей.

Полученные в этом опыте результаты полностью соответствовали данным двух предыдущих экспериментов. Вплоть до 30-кратного избытка р50 над матрицей наблюдался равномерный рост сигнала сборки 48S предынициаторного комплекса, после чего, однако, при 60-кратном избытке белка интенсивность сигнала сборки резко уменьшилась и составила лишь 125% от сигнала в случае отсутствия р50 в системе (см. рис.1), а при 100-кратном избытке белка уже 51%.

Из данного эксперимента можно сделать вывод, что в зависимости от количественного отношения р50 к мРНК, он может выступать в роли как активатора, так и ингибитора стадии инициации трансляции. При этом химическая природа белка в обоих случаях одинакова, и переход комплекса из активированного состояния в репрессированное никак не связан с посттрансляционной модификацией р50.

Наиболее правдоподобная гипотеза механизма действия р50, подтверждаемая полученными экспериментальными данными, предполагает, что неспецифическое сродство р50 к РНК и присутствие многих копий р50 на матрице может защищать матрицу от неспецифического связывания с факторами инициации трансляции по всей длине матрицы, таким образом, внося вклад в их функциональное связывание с 5'-нетранслируемой областью мРНК. Действительно, можно предположить, что по мере увеличения количества р50 над матрицей, поступающие в систему молекулы белка неспецифически, а поэтому более менее равномерно, количественно связываются вдоль всей молекулы мРНК, вытесняя с матрицы сидящие не на своих местах и также неспецифически связанные факторы инициации трансляции. Подобная тенденция наблюдается вплоть до 30-кратного

избытка р50 над матрицей, когда, по-видимому, все факторы инициации трансляции вытеснены из мест неспецифического связывания с матрицей.

РНК-связывающую способность любого фактора можно условно разделить на две составляющие: специфическую составляющую и неспецифическую составляющую. Специфическая составляющая отвечает за взаимодействие фактора с определённой нуклеотидной последовательностью или третичной структурой матрицы в акте инициации трансляции. Неспецифическая составляющая отвечает за связывание фактора по сахаро-фосфатному остову матрицы. Вытесненные с матрицы белком р50 факторы инициации трансляции не могут далее конкурировать за неспецифическую составляющую связывания, что неизбежно ведёт к увеличению доли специфического, а значит функционального связывания факторов. Именно этим может объясняться рост интенсивности сигнала сборки 48S предынициаторного комплекса по мере увеличения отношения количества р50 к матрице вплоть до 30 молекул на молекулу мРНК.

При больших концентрациях в системе р50 становится способен конкурировать и за места связывания с РНК, являющиеся функциональными для факторов инициации. Такая конкуренция упрощается при ограниченных концентрациях факторов инициации в системе, что и удаётся наблюдать в данных экспериментах.

Таким образом, логично предположить, что при высоких концентрациях р50 в системе конкуренция за места связывания, являющиеся функциональными для факторов инициации трансляции, идёт по закону действующих масс. Согласно этому предположению, добавление в систему РНК-связывающих факторов в условиях ингибирующего эффекта р50 на сборку 48S предынициаторного комплекса, должно возвращать систему в состояние с максимальным сигналом сборки 48S-комплекса. Поэтому в следующем эксперименте в систему с 48S-комплексом в присутствии 60-кратного количественного избытка р50 над матрицей поочерёдно добавляли разные количества РНК-связывающих факторов. В частности, увеличивали в 2-3 раза количества следующих факторов: eIF2, eIF3 и eIF4F (рис.2).

Введение в систему избытка фактора eIF4F привело к ожидаемому эффекту. Появление дополнительного количества eIF4F обеспечило повышение конкурентной способности этого фактора за свой функциональный сайт на матрице (5'-конец), следствием чего явилось увеличение интенсивности сигнала сборки 48S предынициаторного комплекса. Но всё же сигнал не был столь интенсивен, как в опыте с 30-кратным избытком р50 над матрицей.

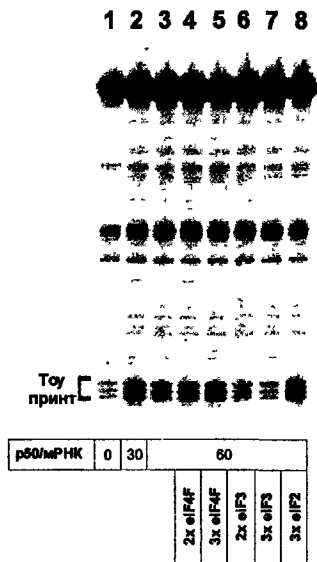


Рис.2 eIF2 и eIF4F обращают ингибирование образования 48S комплекса при высоких соотношениях р50/мРНК. Дорожки 1-3 содержат стандартные концентрации факторов. Концентрация факторов eIF2, eIF3 или eIF4F в дорожках 4-8 была в 2-3 раза больше, чем в стандартном протоколе сборки.

Появление в системе избыточного количества фактора eIF2 резко усиливало сигнал сборки 48S предынициаторного комплекса. Увеличение интенсивности достигало значения, наблюдаемого в опыте с 30-кратным избытком р50 над мРНК. Система оказалась очень чувствительной к концентрации фактора eIF2. Сильное увеличение сигнала сборки и полное обращение ингибирующего эффекта р50 ещё раз подтвердили правомерность предполагаемой гипотезы о механизме функционирования р50.

2. р50 способен стимулировать образование aberrантного 48S комплекса на 5'-конце мРНК.

Пестовой и др. ранее было показано, что исключение инициаторных факторов eIF1 и eIF1A из реконструкционной смеси приводит к образованию aberrантного инициаторного комплекса на самом 5'-конце мРНК. Для образования подобного aberrантного комплекса необходимы все другие факторы инициации трансляции, включая инициаторную мет-тРНК. Хотя такой комплекс не является промежуточным в образовании функционального инициаторного 48S комплекса, по его образованию и динамике можно судить о стадии, на которой в инициации трансляции функционирует р50: стимулирование связывания рибосомы с матрицей, или он необходим для сканирования 5'-НТО матрицы в поисках стартового кодона. В

частности, обладая расплетающей активностью (Skabkin, 2001), участвует ли р50 в расплетании вторичной структуры 5'-лидера β -глобиновой мРНК в ходе сканирующего процесса?

Для ответа на поставленный вопрос нами был проделан эксперимент по реконструкции 48S инициаторного комплекса из очищенных компонентов по описанной выше методике, причём в конечную смесь не добавляли лишь факторы первой группы: eIF1 и eIF1A. В такой системе можно наблюдать образование aberrантного 48S комплекса на 5'-конце β -глобиновой мРНК (рис.3). В присутствии же факторов первой группы собирается функциональный 48S инициаторный комплекс на AUG кодоне. Добавление р50 в систему с aberrантным комплексом (вплоть до 30-кратного молярного избытка по отношению к матрице) приводит к пропорциональному нарастанию количества последнего. Дальнейшее увеличение р50 в системе до 60-кратного молярного избытка приводит уже к ингибирующему эффекту, по аналогии с реконструкцией функционального 48S инициаторного комплекса (см. выше).



Рис.3 Влияние р50 на реконструкцию 5'-концевого aberrантного комплекса 40S β -глобиновая мРНК, образующегося при отсутствии факторов инициации eIF1 и eIF1A.

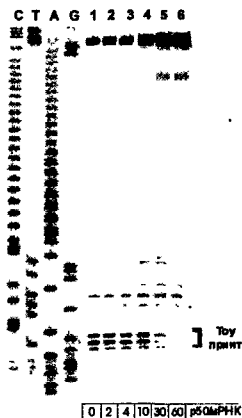
Таким образом, поставленный эксперимент позволяет сделать вывод, что стимулирующий эффект р50 не основан на участии белка в сканирующем процессе 5'-лидера β-глобиновой мРНК.

3. р50 связывается с сахаро-фосфатным остовом мРНК, проявляя предпочтение к последовательностям, содержащим полностью неспаренные нуклеотидные основания.

Опубликованные ранее результаты (Evdokimova, 1995) позволяют предположить, что р50 не узнаёт нуклеотидные основания мРНК. Проведённое нами химическое зондирование комплекса р50/β-глобиновая мРНК подтвердило это предположение. При обработке бинарного комплекса р50/мРНК реактивами DMS (А и С нуклеотидные остатки) и СМСТ (U остатки) защит нуклеотидных оснований выявлено не было.

При соотношении р50/мРНК около 30, сайты защиты белком р50 сахаро-фосфатного остова оказались распределены по всей длине β-глобиновой мРНК с предпочтением к некоторым последовательностям мРНК (данные не показаны). Такое предпочтение может быть объяснено различным потенциалом разных нуклеотидных последовательностей к спариванию оснований. В свою очередь, это может приводить к разной силе связывания р50 с различными участками мРНК. Р50, как известно, имеет намного большую аффинность к одноцепочечным, чем двуцепочечным нуклеиновым кислотам.

Рисунок 4 представляет очевидную иллюстрацию данного утверждения. В показанном эксперименте эффект р50 на сборку 48S комплекса изучался на (CAA)_n-β-глобиновой мРНК. Эта мРНК отличается от природной β-глобиновой мРНК только 5'-нетранслируемой областью, CAAGAA(CAA)₁₉CACCAUGG....., которая составляет всего 1/10 от длины целой мРНК и не имеет поли(А) хвоста. (CAA)_n-лидер на все 100% находится в одноцепочечной конформации (Tzareva, 1994). Такая особенность лидера понижает требования к некоторым факторам инициации и делает матрицу очень эффективной в образовании 48S комплекса. С (CAA)_n-β-глобиновой гибридной мРНК заметное ингибирование тоупринта наблюдается уже при 10-кратном соотношении р50/мРНК (рис.4, дорожка 4), что в 6 раз меньше соотношения, при котором ингибируется сборка 48S комплекса в случае β-глобиновой матрицы (сравн. с рис.1 и 2). Для природной β-глобиновой матрицы при 10-кратном соотношении р50/мРНК напротив наблюдается стимулирующий, а не ингибирующий эффект.



компонентов инициации трансляции, необходимых для сборки 48S прединициаторного комплекса. Было выбрано соотношение р50/мРНК равное 30. Комплекс мРНК*р50 был отделён от несвязавшихся р50 и тРНК центрифугированием в сахарозном градиенте, и количество мРНК в пике мРНК определили по методу Черенкова. Аликвоты из трёх разных фракций пика мРНК с уже известными количествами РНК далее анализировали электрофорезом по Лэмли параллельно с серией взятого в известных количествах р50. После переноса белков на нитроцеллюлозную мембрану, соответствующие полосы проявляли, используя коммерческий препарат для вестерн-блоттинга (рис.5В).

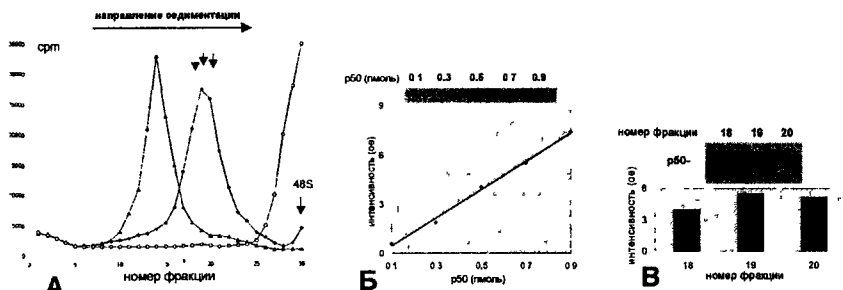


Рис.5 Количественное определение р50 иммуноблоттингом в комплексе р50*β-глобиновая мРНК. Комплекс р50*β-глобиновая мРНК собирали в условиях 30-кратного молярного избытка белка над матрицей в присутствии всех компонентов трансляции, необходимых для реконструкции 48S комплекса и отделяли от несвязавшегося р50 центрифугированием в сахарозном градиенте. (А) показывает профиль сахарозного градиента комплекса р50*β-глобиновая мРНК в присутствии большого избытка тРНК (заштрихованные квадраты) и в его отсутствии (полные кружки). Стрелками показаны фракции, использовавшиеся для определения соотношения р50/мРНК в пике мРНК. Седimentация свободной β-глобиновой мРНК показана заштрихованными треугольниками. (Б) показывает иммунный ответ разных количеств р50 на антитела и соответствующий калибровочный график. (С) показывает иммунный ответ антител на 60мкл аликвоты из трех разных фракций пика мРНК, изображенного на рис 5А. Каждая 60мкл аликвота из фракций 19-21 содержала около 20нг (~0,1пмоль) β-глобиновой мРНК.

В серии независимых экспериментов соотношение р50/мРНК в пике мРНК варьировало в диапазоне 6-8. Эти значения показывают среднее количество молекул р50, связанных с β-глобиновой мРНК при пороговом значении соотношения мРНК и р50 в исходной смеси (р50/мРНК~30), при котором сборка 48S прединициаторного комплекса максимальна.

5. Р50- "менеджер" мРНК-белковых взаимодействий в мРНК млекопитающих.

В проделанных экспериментах нам удалось подтвердить, что р50 играет не только негативную, но и позитивную роль в трансляции, и что такой позитивный эффект проявляется на стадии инициации трансляции. Стимуляция достигает

своего максимума, когда менее чем 10 молекул р50 связано с одной молекулой размера кроличьей β -глобиновой мРНК (589 нуклеотидов без поли(А)-хвоста). Стимуляция уже наблюдается при много меньших соотношениях р50/мРНК (см. рис.1), и, таким образом, можно утверждать, что при таких соотношениях среднее расстояние между связанными молекулами р50 составляет более 100 нуклеотидов.

Нуклеотидные основания не принимают участия в связывании р50 с мРНК. Р50 связывается с сахаро-фосфатным остовом и не имеет предпочтения к определённым нуклеотидным мотивам мРНК. Тем не менее, он имеет большое предпочтение к последовательностям с неспаренными или, возможно, слабоспаренными нуклеотидными основаниями. Можно спекулировать, что такие свойства делают мишенью р50 в первую очередь наиболее неструктурированные участки молекулы мРНК, которые, возможно, также являются предпочтительными местами для аберрантного связывания факторов инициации трансляции или других мРНК-связывающих белков. Так как неспецифические РНК-белковые взаимодействия протекают по сахаро-фосфатному остову РНК, р50 эффективно вытесняет другие белки из несоответствующих сайтов связывания, не оказывая конкурентного влияния (при невысоких его концентрациях) за функциональные участки взаимодействия, в которые, как правило, вовлечены нуклеотидные основания. Отсюда можно легко вообразить, почему всего нескольких молекул р50 достаточно для стимулирования инициации трансляции, процесса, который заключён в довольно ограниченном участке нуклеотидной последовательности мРНК (5'-НТО).

Предложенная нами модель ("конкурирующая модель") (рис.6) описывает р50 как основного организатора РНК-белковых взаимодействий в мРНК.

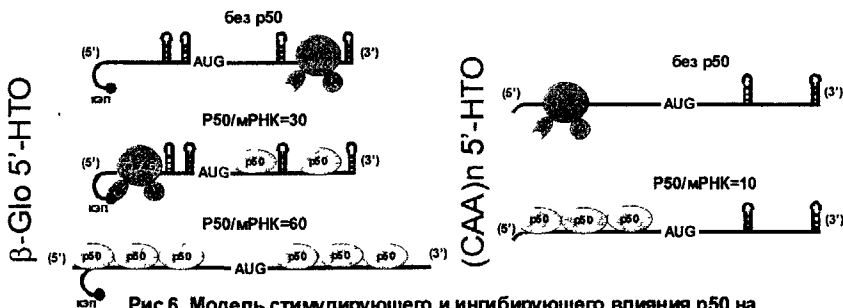


Рис.6 Модель стимулирующего и ингибирующего влияния р50 на образование 48S комплекса. Модель показывает как р50 может вытеснять eIF4F и другие основные факторы с несоответствующих мест на мРНК, оставляя, таким образом, их свободными для инициации трансляции на 5'-конце мРНК, а также, как р50 в результате конкуренции на 5'-конце разных мРНК ингибирует инициацию трансляции 4E означает eIF4E; 4A- eIF4A.

Интригующее предположение заключается в том, что некоторые или все типы клеток млекопитающих могут регулировать общий уровень белкового синтеза простым изменением внутриклеточной концентрации р50. Из эксперимента, представленного на рисунке 4, возможно предположение, что такой путь может дифференциально влиять на экспрессию мРНК с неструктурированными и высоко организованными 5'-нетранспируемыми областями.

II. PTB- активный участник инициации трансляции на IRES-элементах РНК вируса энцефаломиокардита.

В настоящее время известны три основных пути связывания мРНК с 40S субчастицей рибосом у эукариот: классический кэп-зависимый путь, шунтирующий механизм и IRES- зависимый способ инициации трансляции. При IRES-зависимом способе, 40S субчастица связывается не с 5'-концом мРНК, а со специфическим внутренним участком ее 5'-НТО, иначе IRESom. Классическим примером IRES-элементов являются специфические участки связывания рибосом РНК пикорнавирусов, к которым относится и мышинный вирус энцефаломиокардита (ВЭМК, группа кардиовирусов). Известно, что IRES-элементы пикорнавирусов используют те же канонические факторы инициации трансляции, что и кэп-зависимые мРНК, но, в отличие от последних, главным компонентом, узнающим IRES-элемент, является не кэп-связывающая субъединица (eIF4E) фактора инициации eIF4F, а его большая субъединица (eIF4G), обладающая РНК-связывающими свойствами.

Помимо канонических иницирующих факторов трансляции, инициация на IRES- элементах пикорнавирусов требует также специальных вспомогательных мРНК-связывающих белков. Белок PTB требуется для образования 48S комплекса с IRES-элементом РНК вируса Тейлера (Pilipenko, 2000). IRES-элементы вирусов полиомиелита и риновирусов требуют в дополнение к PTB еще белков upf и PCBP (poly(C)-binding protein) (Belsham, 2000), а IRES-элемент вируса ящура – PTB и т.наз. ITAF 45 (Pilipenko, 2000). Функциональная роль этих белков и, в частности, PTB не известна. По поводу требования PTB для образования 48S комплекса на IRES-элементе РНК ВЭМК в литературе имеются противоречивые сведения. В данной работе мы представляем убедительные доказательства того, что PTB обладает очень сильным эффектом при сборке 48S комплекса на IRES-элементе РНК ВЭМК дикого типа. Мы также получили некоторые важные данные о функциональной роли этого загадочного белка в образовании 48S комплекса на РНК ВЭМК и, возможно, других пикорнавирусных РНК, имеющих сходный с РНК ВЭМК тип строения IRES-элемента.

1. РТВ значительно усиливает сборку 48S инициаторного комплекса на РНК ВЭМК из очищенных компонентов *in vitro*.

Для выявления роли РТВ в инициации трансляции был поставлен ряд экспериментов по его влиянию на сборку 48S предынициаторного комплекса. В качестве матрицы использовали транскрипт, синтезированный в Т7-полимеразной системе. Транскрипт покрывал последовательность 315-846 IRES-элемента РНК ВЭМК, сцепленную с начальным участком кодирующей части мРНК люциферазы светлячка. При сборке комплекса использовали очищенные и охарактеризованные нативные (eIF2, eIF3, eIF4F, eIF4A и eIF4B) и рекомбинантные (eIF1, eIF1A) факторы инициации трансляции, асцитные и выделенные из клеток HeLa 40S рибосомные субчастицы, и, соответственно, РТВ. Вместо суммарной тРНК в систему добавляли искусственно синтезированную (Т7 полимеразной транскрипцией) инициаторную метиониновую тРНК, заряженную метионином. В предыдущей работе по р50 мы использовали суммарную тРНК, так как на тот момент не было известно, что возможна замена последней на искусственно синтезированную тРНК с сохранением её функциональной активности в сборке 48S комплекса (Pestova, 2001).

Сборку проводили при насыщающих количествах канонических факторов над матрицей и варьировали количество РТВ в интервале 2-20 молекул белка на молекулу мРНК. В результате мы подтвердили, что из канонических иницирующих факторов IRES РНК ВЭМК строго требует только eIF2, eIF3, eIF4F (последний может быть заменен на eIF4G + eIF4A) и избытка свободного eIF4A. Добавление рекомбинантного белка РТВ в возрастающих количествах к системе реконструкции 48S комплекса приводило к прогрессивному возрастанию выхода 48S комплекса. Максимальная стимуляция, оцененная с помощью фосфоримиджера, составляла от 5 до 6 раз (рис.7). Стимулирующий эффект наблюдался уже при 2-х кратном молярном избытке РТВ над матрицей.

Проделанные эксперименты позволяют нам полагать, что в споре о необходимости РТВ для инициации трансляции на РНК ВЭМК можно наконец-то поставить точку: РТВ необходим для инициации трансляции на всех изученных к настоящему моменту IRES-элементах РНК для групп кардио-, апто-, рино- и полиовирусов, хотя его отсутствие сказывается на образовании 48S комплекса с РНК ВЭМК не столь фатальным образом, как в случае других пикорнавирусов.

2. РТВ проявляет свойства РНК-шаперона.

Согласно литературным данным (Pestova, 1996), фактор инициации eIF4F, вернее его субъединица eIF4G, с высокой константой связывания взаимодействует с районом основания J-K домена IRESa ВЭМК (рис.8). Образование такого

бинарного комплекса стабилизирует GC-богатый стебель у основания домена J-K, что в свою очередь приводит к резкому усилению остановки обратной транскрипции в положении C786 в комплексах IRES-eIF4F(4G) (см. рис.8).

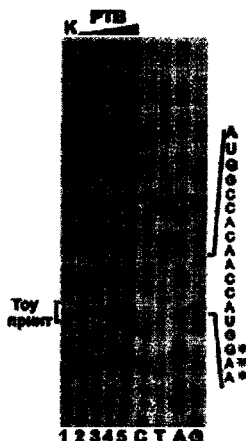


Рис.7 Влияние РТВ на образование 48S иницирующего комплекса с IRES-элементом РНК ВЭМК. Дорожка "К" (контроль) показывает тоупринт инкубационной смеси, где не был добавлен фактор eIF2 и инициаторная тРНК. Молярное соотношение РТВ/РНК в дорожках 3-5 равно 2, 6 и 20, соответственно. В дорожке 2 РТВ отсутствует. Справа от дорожек с тоупринтом показан сиквентс того же участка нуклеотидной последовательности, полученный с той же затравкой для соответствующей кДНК.

Нами был успешно повторен такой эксперимент, при этом для большей ясности картины мы поставили ряд дополнительных контролей, в частности, помимо бинарного комплекса eIF4F+РНК ВЭМК тоупринтом анализировали комплексы eIF4F+eIF4A+РНК ВЭМК и eIF4F+eIF4A+РТВ+РНК ВЭМК (с различной концентрацией РТВ) (рис.9). Оказалось, что добавление в дополнение к eIF4F избытка eIF4A приводит к появлению ранее никем не замеченной дополнительной полосы в положении U780.

Ещё одним интересным наблюдением в нашем эксперименте оказалось то, что добавление РТВ к комплексу eIF4F+eIF4A+РНК ВЭМК приводит к резкому ослаблению полосы в положении U780, но не оказывает отрицательного влияния на интенсивность полосы в положении C786. Причём эффект "прямо пропорционален количеству добавленного РТВ, и в случае 20-кратного молярного избытка РТВ над матрицей полоса U780 полностью исчезает. Эти данные позволили сделать предположение, что РТВ каким-то образом влияет на взаимодействие eIF4F с доменом J-K IRES-элемента РНК ВЭМК.

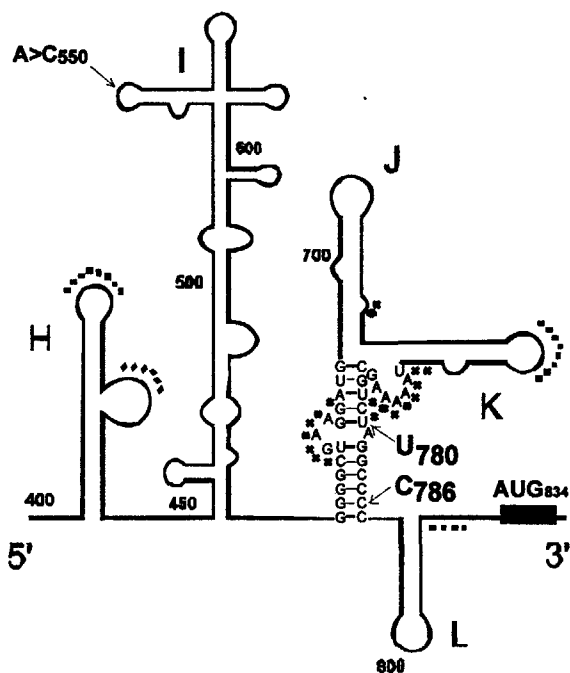


Рис.8 Схематическое изображение IRES-элемента РНК ВЭМК. Домены вторичной структуры элемента обозначены латинскими буквами. Участки, защищаемые фактором eIF4F или РТВ от химической или ферментативной модификации, отмечены чёрными крестиками и квадратиками, соответственно. Стрелками указаны места остановки ревертазы при обратной транскрипции комплексов IRES-элемента с eIF4F (положение 786) и с eIF4F+eIF4A (780 и 786). Положение иницирующего кодона показано чёрным прямоугольником. A>C550- положение мутации, исследованной в работе (см. результаты и обсуждение).

Подтверждение этому предположению было получено в опытах по УФ-сшиванию комплексов иницирующих факторов с РНК ВЭМК. Для этого РНК метили в системе Т7-транскрипции [^{32}P] УТР, инкубировали со смесью факторов и РТВ в буфере для реконструкции 48S комплексов и облучали УФ-светом с длиной волны 257 нм. Для снятия фона от неспецифических РНК-белковых взаимодействий в смесь также добавляли 10-кратный весовой избыток однотяжевой РНК, которая представляла собой кодирующую часть РНК ВЭМК. Таким образом, из игры выводилась кодирующая часть РНК ВЭМК, а наблюдавшиеся сшивки отражали взаимодействия, происходящие лишь на IRESе.

Рисунок 10 наглядно демонстрирует взаимное влияние факторов и РТВ при взаимодействии с IRES-элементом РНК ВЭМК. Фактор инициации eIF4F усиливает

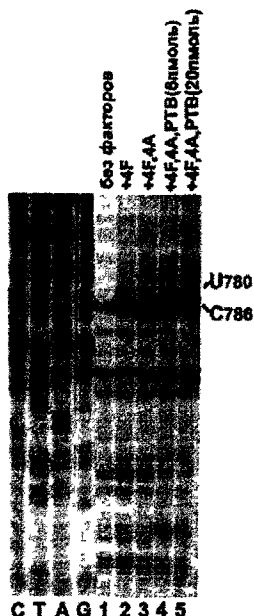


Рис.9 Влияние РТВ на остановку обратной транскрипции на комплексе IRES-элемента с факторами eIF4F и eIF4F+eIF4A. В скобках указаны количества РТВ, добавленные в инкубационную смесь, в расчёте на 1пмоль РНК. Положения U780 и C786 соответствуют специфическим для комплексов местам остановки обратной транскрипции. Сиквенс соответствующего участка РНК ВЭМК приведён слева.

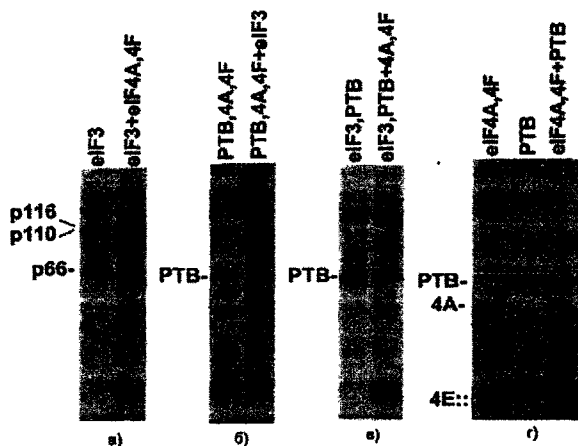


Рис.10 УФ-сшивание различных комбинаций eIF3, eIF4F+eIF4A и РТВ с [³²P]-меченным IRES-элементом РНК ВЭМК. Обозначения p116, p110 и p66 слева от геля (а) соответствуют субъединицам фактора eIF3.

пришивку eIF3 (рис.10а), о чём свидетельствует увеличение интенсивности полос, соответствующих положению субъединиц р66, р100 и р116 фактора eIF3. И это естественно. Поскольку eIF4G взаимодействует с J-K доменом, а центральный участок фактора- с eIF3, тем самым повышается константа связывания фактора eIF3 с IRESом. В свою очередь eIF3 стимулирует пришивку PTB (рис.10б), а eIF4F + eIF4A ее снижают (рис.10в). Пришивание eIF4A никак не меняется при различных комбинациях остальных белков. Отсутствие на представленных гелях полосы для пришитого eIF4G не удивительно. Во-первых, это очень большой белок (подвижность в геле как 220 кДа) и его сшитый комплекс плохо входит в гель. Во-вторых, в участке связывания eIF4G почти нет неспаренных остатков U, которые в наших экспериментах несли [³²P] метку.

Однако самым замечательным наблюдением, сделанным в этом эксперименте, является появление интенсивной полосы пришивки фактора eIF4E (он обычно представлен дублетом, вероятно вследствие частичного фосфорилирования или существования его изоформ), обусловленной присоединением PTB к IRES-элементу (рис.10г). Само по себе взаимодействие eIF4E с РНК ВЭМК вряд ли имеет какое-нибудь функциональное значение, поскольку достоверно известно (см. выше), что кэп-связывающая субъединица eIF4E не нужна для взаимодействия eIF4F (вернее его большой субъединицы eIF4G) с IRES-элементом РНК ВЭМК.

По нашему мнению, резкое усиление его пришивки говорит о том, что под действием PTB район eIF4G, прилежащий к участку связывания eIF4E, входит в контакт с каким-то участком IRES-элемента РНК ВЭМК (рис.11). В результате такой конформационной перестройки IRES-элемента и/или фактора eIF4G, последний, вероятно, переходит из менее в более компетентное состояние для развития дальнейшего процесса инициации трансляции на РНК ВЭМК. Например, можно предположить, что при этом корректируются контакты с РНК других иницирующих факторов, взаимодействующих с фактором eIF4G и принимающих участие в узнавании иницирующего кодона.

Однако в экспериментах по химическому зондированию нам не удалось обнаружить изменений во вторичной структуре IRESa РНК ВЭМК при его взаимодействии с PTB (хотя nPTB- гомолог PTB из нейронов- способен расплетать довольно протяженный участок IRESa mРНК Apaf-1 (Mitchell, 2003)).

В любом случае полученные результаты впервые дают наглядное экспериментальное обоснование существующего мнения, что PTB модифицирует РНК-белковые взаимодействия, то есть обладает свойствами РНК-шаперона.

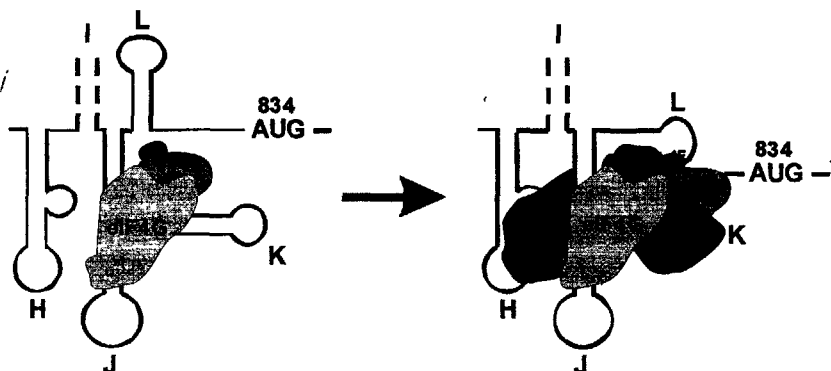


Рис.11 Схема иллюстрирует влияние PTB на характер взаимодействия фактора eIF4F с IRES-элементом РНК ВЗМК. Домены IRESa обозначены латинскими буквами. Для домена I показано только его основание. PTB, как полагают, функционирует в форме димера, взаимодействуя одновременно с доменами H, J/K и L (Kolyupava, 1996).

3. Функция PTB в IRES-опосредованной инициации трансляции на РНК ряда пикорнавирусов специфична, но не распространяется на все пикорнавирусы.

Своими экспериментами мы обобщили необходимость PTB для трансляции всех известных пикорнавирусов. Но это не означает, что и новые семейства пикорнавирусов будут требовать PTB для трансляции. А также не означает, что PTB необходим вообще для любых IRESов. Чтобы это проверить, нами был поставлен опыт по сборке 48S инициаторного комплекса из очищенных компонентов в присутствии и отсутствии PTB по уже описанной выше методике, однако в качестве контрольной пикорнавирусной матрицы мы использовали РНК PTV-1 (от англ. porcine teschovirus-1 Talfan) - представителя недавно открытого нового класса тешовирусов семейства пикорнавирусов.

Здесь уместно несколько слов сказать о самом вирусе. Совместно с группой Белшама (Великобритания), которая предоставила нам РНК данного вируса и локализовала минимальный участок 5'-НТО, сохраняющий свойства IRESa РНК PTV-1, мы определили минимальный набор факторов инициации трансляции, достаточный для реконструкции 48S предынициаторного комплекса на РНК PTV-1. Вспомним, что IRES-элементы пикорнавирусов содержат порядка 450 нуклеотидов и для трансляции используют большинство клеточных канонических факторов инициации. Группа Белшама показала, что 280 нуклеотидов 5'-нетранслируемой области РНК PTV-1 достаточно для эффективной внутренней инициации трансляции как *in vitro*, так и *in vivo*. Используя метод тоупринта, нами было

показано, что для сборки 48S прединициаторного комплекса из очищенных компонентов на IRESe РНК РТВ-1 достаточно только 40S рибосомной субъединицы, фактора eIF2 и инициаторной метиониновой тРНК, заряженной метионином.

Далее, методом центрифугирования в сахарозном градиенте мы показали возможность образования бинарного комплекса 40S*IRES РТВ-1, а обнаружив дополнительные полосы в области IRESa в эксперименте футпринтинга бинарного комплекса eIF3*IRES РТВ-1, доказали возможность прямого взаимодействия фактора eIF3 с IRESom РТВ-1 (данные не показаны). Таким образом, можно утверждать, что IRES РТВ-1 обладает свойствами, полностью отличными от других пикорнавирусных IRES-элементов, но сильно напоминающими свойства IRESa HCV (вируса гепатита С) (от англ. hepatitis C virus).

Сравнение нуклеотидных последовательностей IRESов РТВ-1 и HCV (с помощью компьютерных программ) выявило существование островков высокой гомологии, соответствующих областям, необходимым для взаимодействий IRESa HCV с 40S рибосомной субъединицей и фактором eIF3. К тому же были найдены схожие элементы вторичной структуры, в частности, псевдоузел, расположенный непосредственно перед инициаторным AUG-кодоном, который абсолютно необходим для эффективного функционирования IRES-элемента HCV.

Таким образом, можно смело утверждать, что существует высокая степень функционального и структурного сходства между IRES-элементами из пикорнавируса РТВ-1 и HCV, флавивируса. Факт существования такого сходства между вирусами из двух разных вирусных семейств кажется нам довольно значимым. Мы предполагаем, что либо имел место генетический обмен данного элемента между вирусными семействами, либо существует очень ограниченное число путей, с помощью которых исключительно цитоплазматические РНК могут напрямую взаимодействовать с рибосомой по кэп-независимому механизму.

Вернёмся к эксперименту по сборке 48S инициаторного комплекса из очищенных компонентов на РНК РТВ-1. Для сборки комплекса на этой матрице необходимо и достаточно, как было установлено нами ранее, трёх компонентов: 40S рибосомной субъединицы, фактора eIF2 и инициаторной метиониновой тРНК, заряженной метионином. Добавление в такую систему РТВ в 20-кратном молярном избытке над матрицей лишь слабо усиливало интенсивность сигнала тоупринта (можно высказать предположение, что РТВ работает на РНК РТВ-1 неспецифически) (рис.12). Тогда как добавление РТВ в избытке аналогичной кратности над матрицей в систему сборки 48S инициаторного комплекса из

очищенных компонентов на РНК ВЭМК приводило к эффекту 6-кратного усиления интенсивности сигнала тоупринта.

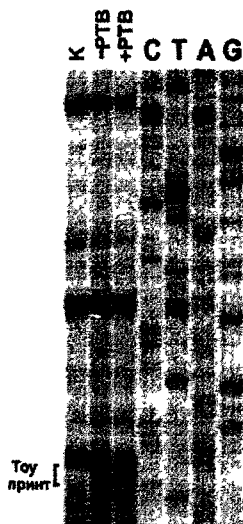


Рис.12 Влияние РТВ на образование 48S иницирующего комплекса с IRES-элементом РНК РТВ-1 из минимального набора компонентов.

Дорожка "К" (контроль) показывает тоупринт инкубационной смеси, где не был добавлен фактор eIF2 и инициаторная тРНК. РТВ добавлен в 20-кратном молярном избытке над матрицей.

Полученных экспериментальных данных достаточно, чтобы утверждать о необходимости РТВ для инициации трансляции на РНК кардио-, энтеро-, рино- и афтовирuсов и о ненaдобности РТВ для инициации трансляции на РНК РТВ-1, являющегося представителем другого класса семейства пикорнавирусов. Следовательно, можно смело утверждать, что функция РТВ в инициации трансляции не распространяется на все семейства пикорнавирусов.

ВЫВОДЫ

1. На основании результатов химического зондирования показано, что р50 связывается с мРНК по сахаро-фосфатному остову, предпочитая участки с полностью неспаренными нуклеотидными основаниями.
2. При низких концентрациях р50 активирует, а при высоких- ингибирует сборку 48S прединициаторного комплекса из очищенных компонентов *in vitro*.
3. Максимальная стимуляция сборки 48S прединициаторного комплекса , соответствует связыванию 6-8 молекул р50 на молекулу β -глобиновой мРНК.
4. р50 стимулирует сборку 48S комплекса на стадии связывания 40S субчастицы с 5'-концом матрицы и, по-видимому, не оказывает влияние на процесс сканирования.
5. При низких концентрациях р50 эффективно конкурирует с факторами инициации трансляции eIF2 и eIF4F за неспецифические места связывания, проявляя существенно меньшую конкуренцию за функциональные для них участки взаимодействия.
6. РТВ значительно активирует сборку 48S прединициаторного комплекса из очищенных компонентов на РНК ВЭМК и практически не оказывает влияния на аналогичную сборку с другим представителем пикорнавирусов, РТВ-1.
7. Методом тоупринта и УФ-сшивок показано влияние РТВ на характер взаимодействия IRES-элемента РНК ВЭМК с одним из основных факторов инициации трансляции eIF4G.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. A.V. Pisarev, M.A. Skabkin, A.A. Thomas, L.P. Ovchinnikov, I.N. Shatsky (2000) The major core protein of messenger ribonucleoprotein particles (p50) increases specificity of mRNA-protein interactions. *Translation control. Cold Spring Harbor, New York. Abstract book*, p.262.
2. A.V Pisarev, M.A. Skabkin, A.A. Thomas, W.C. Merrick, L.P. Ovchinnikov, I.N. Shatsky (2002) Positive and negative effects of the major mammalian messenger ribonucleoprotein p50 on binding of 40S ribosomal subunits to the initiation codon of beta-globin mRNA. *J Biol Chem*, **277**, 15445-15451.
3. S.E. Dmitriev, A.V. Pisarev, M.P. Rubtsova, Y.E. Dunaevsky, I.N. Shatsky (2003) Conversion of 48S translation preinitiation complexes into 80S initiation complexes as revealed by toeprinting. *FEBS Lett*, **533**, 99 -104.

2003-A

18669

18669