

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

ПИСАРЕВ Андрей Владимирович

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ НЕКАНОНИЧЕСКИХ БЕЛКОВЫХ ФАКТОРОВ
p50 и PTB 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 подъём 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 инициирующих 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 инициирующих 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

РОС. НАЦИОНАЛЬНАЯ
БИБЛИОТЕКА
С.Петербург 447
09 3003 акт

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 мРНП, 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 мРНП.

РТВ, La-автоантиген, ипг, ⁷поли(С)-связывающие белки РСВР1 и РСВР2, 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. РТВ, в частности, требуется для образования 48S комплекса с IRES-элементами РНК ряда пикорнавирусов и с клеточной мРНК Araf-1, продукт которой вовлечён в регуляцию клеточного апоптоза.

Обладая навыками реконструкции инициирующих комплексов из очищенных и охарактеризованных компонентов в сочетании с техникой тоупrintа, мы поставили своей целью в данной работе исследовать по одному примеру неканонического фактора того и другого класса (р50 и РТВ) 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 РТВ 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 остояву, предпочитая участки с

полностью неспаренными нуклеотидными основаниями, согласно нашим данным химического зондирования.

Вторая часть работы была посвящена исследованию неканонического белкового фактора PTB в инициации трансляции у млекопитающих. Нами впервые показано, что PTB 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, PTV-1. Стимуляция сборки на РНК ВЭМК обусловлена влиянием PTB 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 аprobирована 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

I. 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 p50 в инициации трансляции был поставлен ряд экспериментов по его влиянию на сборку 48S предынициаторного комплекса на β -Glo 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 p50. Сборку проводили при избыточных количествах факторов над матрицей и варьировали количество p50 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 тоупrinta 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 p50 над матрицей было обнаружено приблизительно 50%-ингибиование сборки 48S-комплекса, тогда как вплоть до 30-кратного избытка никаких изменений в сборке по сравнению с контролем без p50 обнаружено не было (данные не показаны). В данном эксперименте не удалось обнаружить активирующего влияния p50 на сборку 48S-комплекса. Было выдвинуто предположение, что избыточное количество факторов инициации не позволило обнаружить регулирующего механизма p50. В то же время данный эксперимент выявил ингибирующий эффект p50 на сборку. Так как ингибиование, причём незначительное, наблюдается лишь при гораздо больших избытках p50 по сравнению с остальными факторами, то на данном этапе исследований вполне правомерно можно отбросить выдвигаемую в литературе гипотезу о том, что p50 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 p50 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 p50 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 тоупrintа к суммарной радиоактивности в данной дорожке; таким образом исключаются любые позитивные и негативные эффекты p50 на саму реакцию обратной транскрипции, используемой при тоупринте).

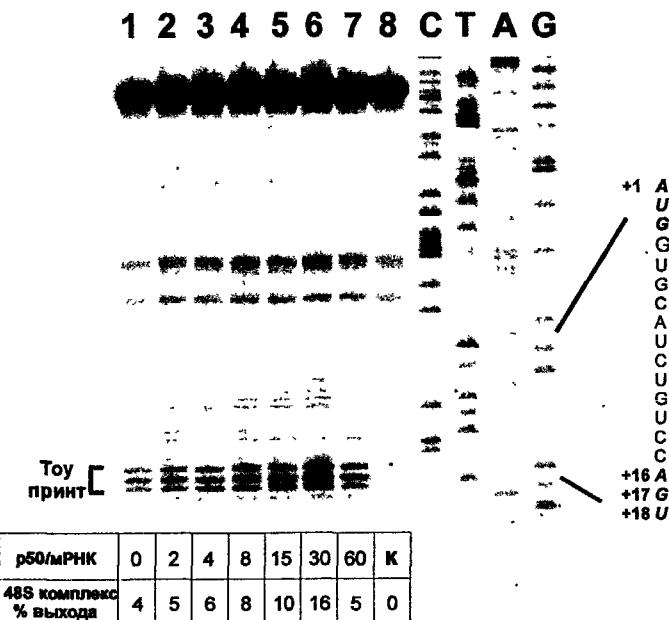


Рис.1 Влияние p50 на реконструкцию 48S прединициаторного комплекса на β -глобиновой мРНК. В подписи указано молярное соотношение p50/мРНК. К- контрольный эксперимент, в котором опущен eIF2. Положение инициаторного AUG кодона показано в правой части рисунка. Выход 48S комплекса рассчитывали с помощью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

Уже на данном этапе исследований можно было сделать вывод, что p50 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 p50 в инициации трансляции. В следующем эксперименте решено было сохранить условия ограничения по факторам инициации, но при этом расширить диапазон концентраций p50, чтобы попытаться обнаружить оба эффекта и активации, и ингибирования в одном опыте. По сравнению с предыдущим экспериментом, к избыточным количествам p50 над матрицей было добавлено 2 новые точки: 60- и 100-кратный молярный избыток p50 над матрицей.

Полученные в этом опыте результаты полностью соответствовали данным двух предыдущих экспериментов. Вплоть до 30-кратного избытка p50 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 p50 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 p50 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 p50.

Наиболее правдоподобная гипотеза механизма действия p50, подтверждаемая полученными экспериментальными данными, предполагает, что неспецифическое сродство p50 к РНК и присутствие многих копий p50 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 p50 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 p50 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 остатку матрицы. Вытесненные с матрицы белком p50 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 p50 к матрице вплоть до 30 молекул на молекулу мРНК.

При больших концентрациях в системе p50 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 удается наблюдать в данных экспериментах.

Таким образом, логично предположить, что при высоких концентрациях p50 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 p50 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 p50 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 p50 над матрицей.

1 2 3 4 5 6 7 8

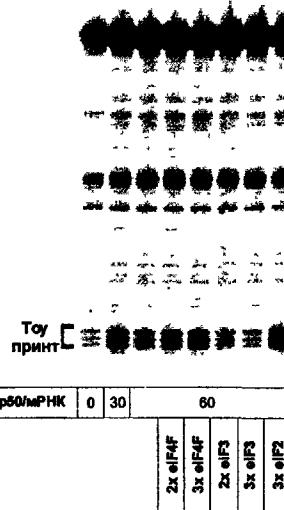


Рис.2 eIF2 и eIF4F обращают ингибирование образования 48S комплекса при высоких соотношениях p50/мРНК. Дорожки 1-3 содержат стандартные концентрации факторов. Концентрация факторов eIF2, eIF3 или eIF4F в дорожках 4-8 была в 2-3 раза больше, чем в стандартном протоколе сборки.

Появление в системе избыточного количества фактора eIF2 резко усиливало сигнал 48S предициаторного комплекса. Увеличение интенсивности достигало значения, наблюдаемого в опыте с 30-кратным избытком p50 над мРНК. Система оказалась очень чувствительной к концентрации фактора eIF2. Сильное увеличение сигнала сборки и полное обращение ингибирующего эффекта p50 ещё раз подтвердили правомерность предполагаемой гипотезы о механизме функционирования p50.

2. p50 способен стимулировать образование аберрантного 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 аберрантного инициаторного комплекса на самом 5'-конце мРНК. Для образования подобного аберрантного комплекса необходимы все другие факторы инициации трансляции, включая инициаторную мет-tРНК. 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 p50: 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 p50 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 аберрантного 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 p50 в систему с аберрантным комплексом (вплоть до 30-кратного молярного избытка по отношению к матрице) приводит к пропорциональному нарастанию количества последнего. Дальнейшее увеличение p50 в системе до 60-кратного молярного избытка приводит уже к ингибирующему эффекту, по аналогии с реконструкцией функционального 48S инициаторного комплекса (см. выше).

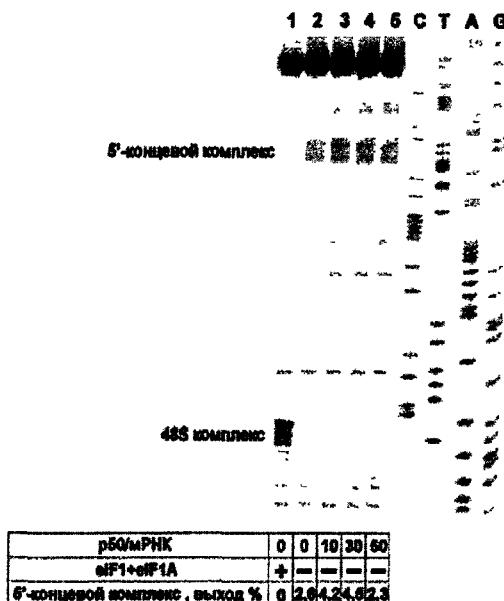


Рис.3 Влияние p50 на реконструкцию 5'-концевого аберрантного комплекса 40S*β-глобиновая мРНК, образующегося при отсутствии факторов инициации eIF1 и eIF1A.

Таким образом, поставленный эксперимент позволяет сделать вывод, что стимулирующий эффект p50 не основан на участии белка в сканирующем процессе 5'-лидера β -глобиновой мРНК.

3. p50 связывается с сахаро-фосфатным остовом мРНК, проявляя предпочтение к последовательностям, содержащим полностью неспаренные нуклеотидные основания.

Опубликованные ранее результаты (Evdochimova, 1995) позволяют предположить, что p50 не узнаёт нуклеотидные основания мРНК. Проведённое нами химическое зондирование комплекса p50/ β -глобиновая мРНК подтвердило это предположение. При обработке бинарного комплекса p50/mРНК реактивами DMS (A и C нуклеотидные остатки) и СМСТ (U остатки) защит нуклеотидных оснований выявлено не было.

При соотношении p50/mРНК около 30, сайты защиты белком p50 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 p50 с различными участками мРНК. P50, как известно, имеет намного большую аффинность к одноцепочечным, чем двуцепочечным нуклеиновым кислотам.

Рисунок 4 представляет очевидную иллюстрацию данного утверждения. В показанном эксперименте эффект p50 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)₁₉CACCAUUGG..., которая составляет всего 1/10 от длины целой мРНК и не имеет поли(A) 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 тоупrintа наблюдается уже при 10-кратном соотношении p50/mРНК (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 p50/mРНК напротив наблюдается стимулирующий, а не ингибирующий эффект.

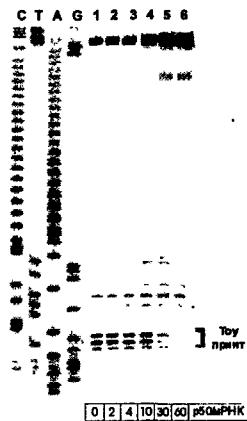


Рис.4 Влияние p50 на сборку 48S предынициаторного комплекса на (CAA)_n-β-глобиновой мРНК.

Приведённые данные представляют убедительное доказательство о значительном предпочтении белком p50 последовательных участков из неспаренных нуклеотидов. Молекулы p50, связываясь с (CAA)_n-мРНК, концентрируются, прежде всего, в пределах её неструктурированного 5'-лидера и, таким образом, обеспечивают локальный ингибирующий эффект (см. рис.6). С этой точки зрения неудивительно, что мы не наблюдали стимуляции белком p50 образования 48S комплекса с (CAA)_n-лидером при отношениях p50/мРНК меньших, чем 10. В данном случае, эффект стимуляции нивелировался конкурентным по отношению к факторам инициации связыванием p50 с (CAA)_n-лидером.

4. Связывание всего нескольких молекул p50 на молекулу β-глобиновой мРНК достаточно для стимуляции образования 48S предынициаторного комплекса.

Для подтверждения той или иной идеи о механизме действия p50 на образование 48S комплекса необходимо знать сколько молекул белка достаточно для связывания с мРНК, чтобы наблюдать эффект.

Экспериментальные условия для сборки 48S комплекса включают добавление огромного избытка незаряженной tРНК, которая не принимает участия в процессе реконструкции. Хотя tРНК имеет очень низкую аффинность к p50, её высокая концентрация может севвестрировать некоторое количество белка.

Поэтому необходимо было оценить реальное количество молекул p50, связанных с β-глобиновой мРНК в присутствии большого избытка tРНК. Для этого ³²P-меченную β-глобиновую мРНК с известной удельной активностью проинкубировали в буфере для реконструкции с p50 в присутствии всех

компонентов инициации трансляции, необходимых для сборки 48S предиинициаторного комплекса. Было выбрано соотношение p50/mРНК равное 30. Комплекс мРНК*p50 был отделён от несвязавшихся p50 и тРНК центрифугированием в сахарозном градиенте, и количество мРНК в пике мРНП определили по методу Черенкова. Аликовты из трёх разных фракций пика мРНП с уже известными количествами РНК далее анализировали электрофорезом по Лэмли параллельно с серией взятого в известных количествах p50. После переноса белков на нитроцеллюлозную мембрану, соответствующие полосы проявляли, используя коммерческий препарат для вестерн-блоттинга (рис.5В).

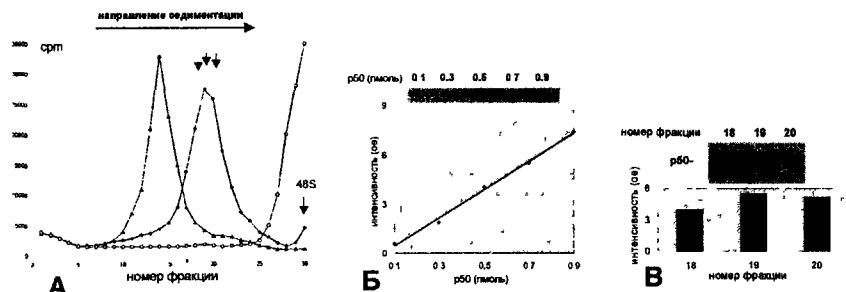


Рис.5 Количествоное определение p50 иммуноблоттингом в комплексе p50* β -глобиновая мРНК. Комплекс p50* β -глобиновая мРНК собирали в условиях 30-кратного молярного избытка белка над матрицей в присутствии 48S комплекса и отделяли от несвязавшегося p50 центрифугированием в сахарозном градиенте. (А) показывает профиль сахарозного градиента комплекса p50* β -глобиновая мРНК в присутствии большого избытка тРНК (заштрихованные квадраты) и в его отсутствии (полые кружки). Стрелками показаны фракции, использовавшиеся для определения соотношения p50/мРНК в пике мРНП. Седиментация свободной β -глобиновой мРНК показана заштрихованными треугольниками. (Б) показывает иммунный ответ разных количеств p50 на антитела и соответствующий калибровочный график. (С) показывает иммунный ответ антител на 60мкл аликовты из трех разных фракций пика мРНП, изображённого на рис 5А. Каждая 60мкл аликовта из фракций 19-21 содержала около 20нг (~0,1пмоль) β -глобиновой мРНК.

В серии независимых экспериментов соотношение p50/мРНК в пике мРНП варьировало в диапазоне 6-8. Эти значения показывают среднее количество молекул p50, связанных с β -глобиновой мРНК при пороговом значении соотношения мРНК и p50 в исходной смеси (p50/мРНК~30), при котором сборка 48S предиинициаторного комплекса максимальна.

5. P50-“менеджер” мРНК-белковых взаимодействий в мРНП млекопитающих.

В проделанных экспериментах нам удалось подтвердить, что p50 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 p50 связано с одной молекулой размера кроличьей β -глобиновой мРНК (589 нуклеотидов без поли(A)-хвоста). Стимуляция уже наблюдается при много меньших соотношениях p50/mРНК (см. рис.1), и, таким образом, можно утверждать, что при таких соотношениях среднее расстояние между связанными молекулами p50 составляет более 100 нуклеотидов.

Нуклеотидные основания не принимают участия в связывании p50 с мРНК. P50 связывается с сахаро-фосфатным оставом 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 p50 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 оству РНК, p50 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 p50 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 p50 как основного организатора РНК-белковых взаимодействий в мРНП.

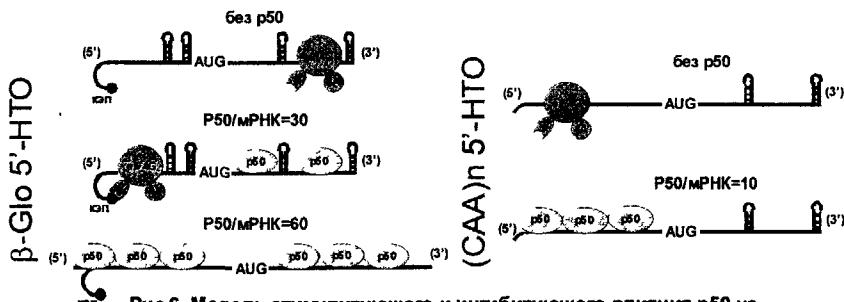


Рис.6 Модель стимулирующего и ингибирующего влияния p50 на образование 48S комплекса. Модель показывает как p50 может вытеснять eIF4F и другие основные факторы с несоответствующими местами на мРНК, оставляя, таким образом, их свободными для инициации трансляции на 5'-конце мРНК, а также, как p50 в результате конкуренции на 5'-конце разных мРНК ингибирует инициацию трансляции 4Е 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 p50. Из эксперимента, представленного на рисунке 4, возможно предположение, что такой путь может дифференциаль но влиять на экспрессию мРНК с неструктуризованными и высоко организованными 5'-нетранслируемыми областями.

II. PTB- активный участник инициации трансляции на IRES-элементе РНК вириуса 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 IRESом. Классическим примером IRES- элементов являются специфические участки связывания рибосом РНК пикорнавирусов, к которым относится и мышиный 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 инициирующих 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 вириуса Тейлера (Pilipenko, 2000). IRES-элементы вириусов полиомиелита и риновирусов требуют в дополнение к PTB еще белков upg и PCBP (poly(C)-binding protein) (Belsham, 2000), а IRES-элемент вириуса 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 инициирующих 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-, афто-, 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).

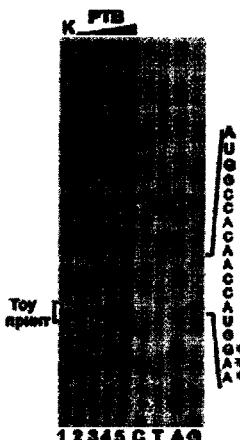


Рис.7 Влияние PTB на образование 48S иницирующего комплекса с IRES-элементом РНК ВЭМК. Дорожка "K" (контроль) показывает тоупринт инкубационной смеси, где не был добавлен фактор eIF2 и инициаторная тРНК. Молярное соотношение PTB/РНК в дорожках 3-5 равно 2, 6 и 20, соответственно. В дорожке 2 PTB отсутствует. Справа от дорожек с тоупринтом показан синтаксис 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+PTB+РНК ВЭМК (с различной концентрацией PTB) (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 PTB 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 PTB, и в случае 20-кратного молярного избытка PTB над матрицей полоса U780 полностью исчезает. Эти данные позволили сделать предположение, что PTB каким-то образом влияет на взаимодействие eIF4F с доменом J-K IRES-элемента РНК ВЭМК.

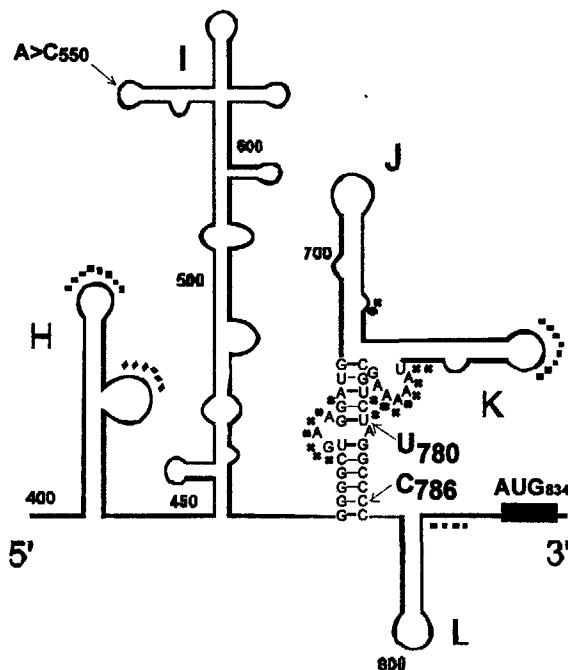


Рис.8 Схематическое изображение IRES-элемента РНК ВЭМК. Домены вторичной структуры элемента обозначены латинскими буквами. Участки, защищаемые фактором eIF4F или PTB от химической или ферментативной модификации, отмечены чёрными крестиками и квадратиками, соответственно. Стрелками указаны места остановки 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 инициирующих факторов с РНК ВЭМК. Для этого РНК метили в системе T7-транскрипции [32 P] UTP, инкубировали со смесью факторов и PTB 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 IRESe.

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

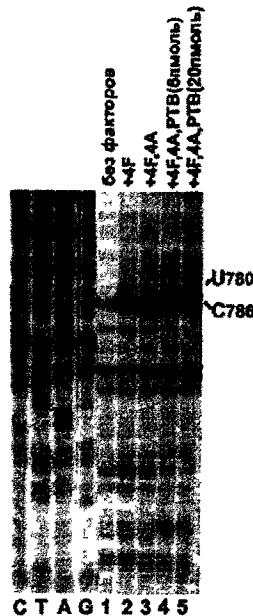


Рис.9 Влияние PTB на остановку обратной транскрипции на комплексе IRES-элемента с факторами eIF4F и eIF4F+eIF4A. В скобках указаны количества PTB, добавленные в инкубационную смесь, в расчёте на 1нмоль РНК. Положения U780 и C786 соответствуют специфическим для комплексов местам остановки обратной транскрипции.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

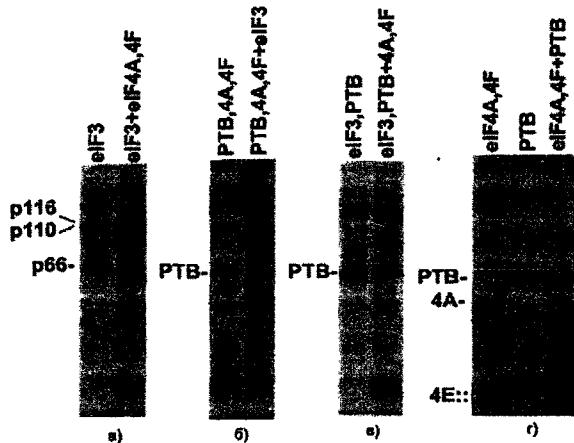


Рис.10 УФ-сшивание различных комбинаций eIF3, eIF4F+eIF4A и PTB с [³²P]-меченым IRES-элементом РНК ВЭМК. Обозначения p116, p110 и p66 слева от геля (а) соответствуют субъединицам фактора eIF3.

пришивку eIF3 (рис.10а), о чём свидетельствует увеличение интенсивности полос, соответствующих положению субъединиц p66, p100 и p116 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 слитый 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 инициирующих факторов, взаимодействующих с фактором eIF4G и принимающих участие в узнавании инициирующего кодона.

Однако в экспериментах по химическому зондированию нам не удалось обнаружить изменений во вторичной структуре IRESа РНК ВЭМК при его взаимодействии с PTB (хотя nPTB- гомолог PTB из нейронов- способен расплетать довольно протяженный участок IRESа мРНК 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.

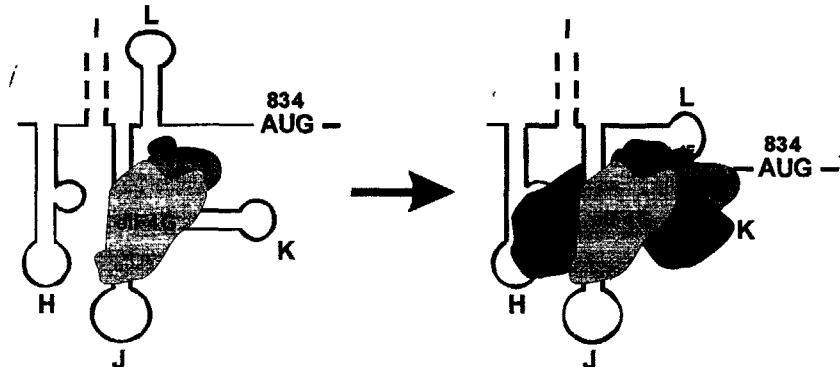


Рис.11 Схема иллюстрирует влияние РТВ на характер взаимодействия фактора eIF4F с IRES-элементом РНК ВЭМК. Домены IRES_a обозначены латинскими буквами. Для домена L показано только его основание. РТВ, как полагают, функционирует в форме димера, взаимодействуя одновременно с доменами H, J/K и L (Колупаева,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

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

Своими экспериментами мы обобщили необходимость РТВ для трансляции всех известных пикорнавирусов. Но это не означает, что и новые семейства пикорнавирусов будут требовать РТВ для трансляции. А также не означает, что РТВ необходим вообще для любых IRESов. Чтобы это проверить, нами был поставлен опыт по сборке 48S инициаторного комплекса из очищенных компонентов в присутствии и отсутствии РТВ 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 IRES_a РНК PTV-1, мы определили минимальный набор факторов инициации трансляции, достаточный для реконструкции 48S предиинициаторного 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 тоупринга, нами было

показано, что для сборки 48S предиинициаторного комплекса из очищенных компонентов на IRESe РНК PTV-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 PTV-1, а обнаружив дополнительные полосы в области IRESa в эксперименте футпринтинга бинарного комплекса eIF3*IRES PTV-1, доказали возможность прямого взаимодействия фактора eIF3 с IRESом PTV-1 (данные не показаны). Таким образом, можно утверждать, что IRES PTV-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 PTV-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 PTV-1 и HCV, flavивируса. 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 направлять взаимодействовать с рибосомой по кэп-независимому механизму.

Вернёмся к эксперименту по сборке 48S инициаторного комплекса из очищенных компонентов на РНК PTV-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 тоупrinta (можно высказать предположение, что РТВ работает на РНК PTV-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.

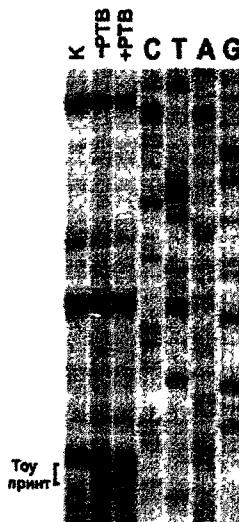


Рис.12 Влияние PTB на образование 48S инициирующего комплекса с IRES-элементом РНК PTV-1 из минимального набора компонентов.

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

Полученных экспериментальных данных достаточно, чтобы утверждать о необходимости PTB для инициации трансляции на РНК кардио-, энtero-, рино- и афтовирусов и о ненадобности PTB для инициации трансляции на РНК PTV-1, являющегося представителем другого класса семейства пикорнавирусов. Следовательно, можно смело утверждать, что функция PTB в инициации трансляции не распространяется на все семейства пикорнавирусов.

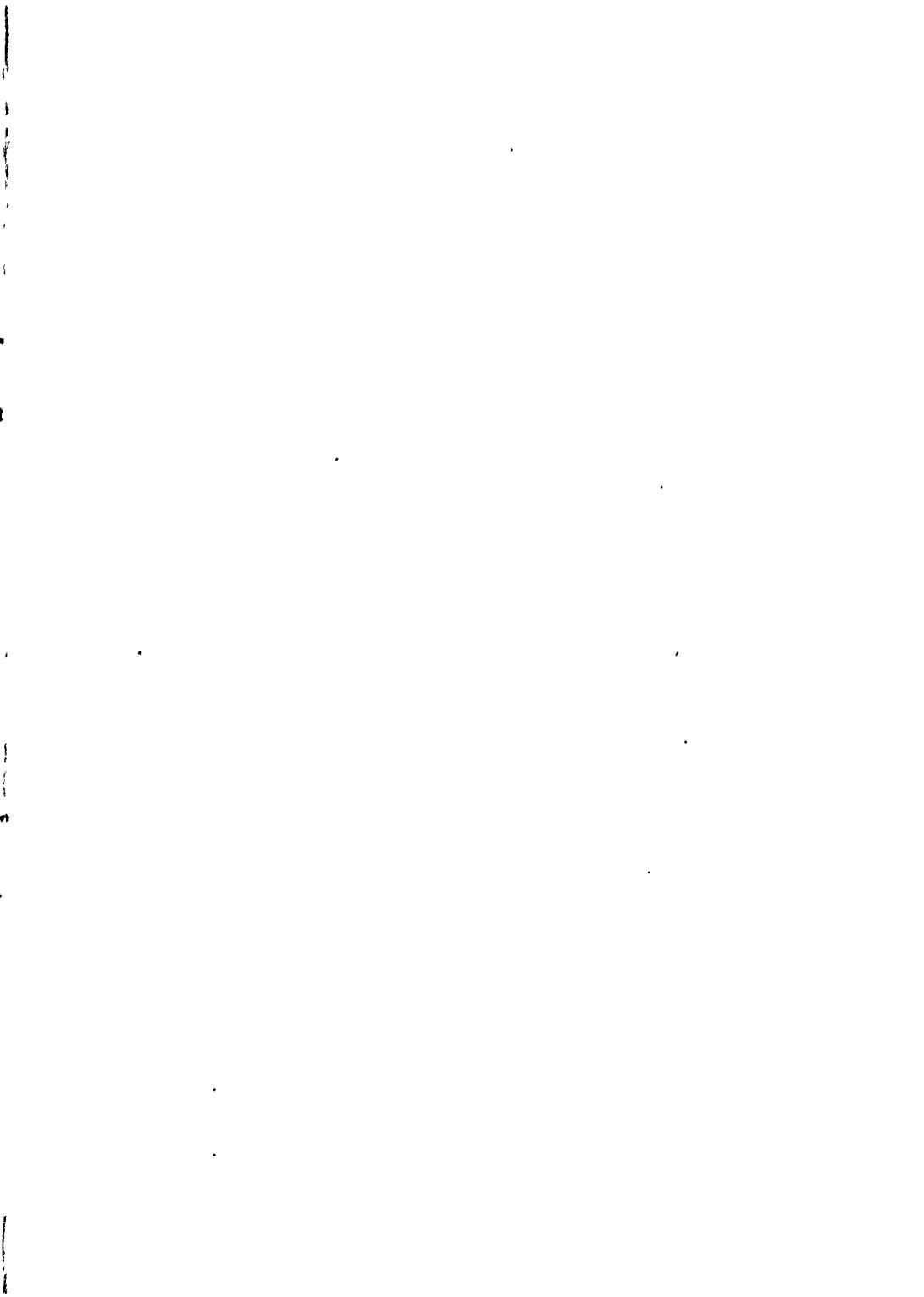
ВЫВОДЫ

1. На основании результатов химического зондирования показано, что p50 связывается с мРНК по сахаро-фосфатному оству, предпочитая участки с полностью неспаренными нуклеотидными основаниями.
2. При низких концентрациях p50 активирует, а при высоких - ингибирует сборку 48S предынициаторного комплекса из очищенных компонентов *in vitro*.
3. Максимальная стимуляция сборки 48S предынициаторного комплекса соответствует связыванию 6-8 молекул p50 на молекулу β -глобиновой мРНК.
4. p50 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 p50 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 предынициаторного комплекса из очищенных компонентов на РНК ВЭМК и практически не оказывает влияния на аналогичную сборку с другим представителем пикорнавирусов, РТВ-1.
7. Методом тоупримта 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.

ООП Физ ф-та МГУ Зак 101-80-03



2003-A

18669

* 18669