

СОДЕРЖАНИЕ

Том 86, выпуск 9, 2021

Специальный выпуск, посвященный 90-летию А.С. Спирина

Часть 2

Информосомы, Восток и Запад <i>T. Pederson</i>	1251
Путешествие информосом во времени: ранняя концепция мРНК в контексте современных представлений об мРНК (обзор) <i>П.В. Иванов</i>	1254
Исследуя структурную организацию полирибосом с Александром Спириным <i>B.P. Klaholz</i>	1265
Неканонические механизмы инициации трансляции мРНК вирусов эукариот (обзор) <i>И.И. Сорокин, К.С. Василенко, И.М. Теренин, Н.О. Калинина, В.И. Агол, С.Е. Дмитриев</i>	1273
Модификации рибосомного профайлинга, позволяющие получить новые данные о регуляции трансляции (обзор) <i>Д.Е. Андреев, В.В. Смирнова, И.Н. Шатский</i>	1314
Различия и сходство процессов терминации трансляции и спасения рибосомы в бактериальных клетках и в митохондриях и цитоплазме эукариотических клеток (обзор) <i>А.А. Коростелев</i>	1328
Роль факторов терминации в гидролизе сложноэфирной связи пептидил-тРНК у бактерий (мини-обзор) <i>С.М. Баласаняни, Е.В. Александрова, Ю.С. Поликанов</i>	1345
Vpg вируса PVY и кэп-связывающие факторы семейства eIF4E картофеля: избирательность взаимодействия и его предполагаемый механизм <i>М.В. Лебедева, Е.Ю. Никонова, А.А. Терентьев, В.В. Таранов, А.В. Бабаков, О.С. Никонов</i>	1352
Мал, да удал. Разнообразие функций малых белков и пептидов – продуктов трансляции коротких рамок считывания (обзор) <i>П.В. Сергиев, М.П. Рубцова</i>	1366
Трансляционный активатор Mss51p дрожжей и белок ZMYND17 человека – общность происхождения, различие функций <i>М.В. Балева, У.Е. Пиунова, И.В. Чичерин, Д.Г. Красавина, С.А. Левицкий, П.А. Каменский</i>	1380

CONTENTS

Vol. 86, Publ. 9, 2021

Special Issue, Part II
Dedicated to the Anniversary of Academician A. S. Spirin

Informosomes, East and West <i>T. Pederson</i>	1251
Informosomes Travel in Time: An Early mRNA Concept in the Current mRNP Landscape (Review) <i>P. Ivanov</i>	1254
Studying the Structural Organization of Polyribosomes with Alexander S. Spirin <i>Bruno P. Klaholz</i>	1265
Non-Canonical Translation Initiation Mechanisms Employed by Eukaryotic Viral mRNAs (Review) <i>I. I. Sorokin, K. S. Vassilenko, I. M. Terenin, N. O. Kalinina, V. I. Agol, and S. E. Dmitriev</i>	1273
Modifications of the Ribosome Profiling that Provide New Data on the Regulation of Translation (Review) <i>D. E. Andreev, V. V. Smirnova, and I. N. Shatsky</i>	1314
Diversity and Similarity of Termination and Ribosome Rescue in Bacterial, Mitochondrial, and Cytoplasmic Translation (Review) <i>A. A. Korostelev</i>	1328
The Role of Release Factors in Hydrolysis of Ester Bond of Peptidyl-tRNA (Mini-Review) <i>S. M. Balasanyants, E. V. Aleksandrova, and Y. S. Polikanov</i>	1345
VPg of PVY and Potato Cap-Binding eIF4E Factors: Selective Interaction and Its Supposed Mechanism <i>M. V. Lebedeva, E. Y. Nikonova, A. A. Terentiev, V. V. Taranov, A. V. Babakov, and O. S. Nikonov</i>	1352
Little but Loud. The Diversity of Functions of Small Proteins and Peptides – Translational Products of Short Reading Frames (Review) <i>P. V. Sergiev and M. P. Rubtsova</i>	1366
Yeast Translational Activator Mss51p and Human ZMYND17 – Two Proteins with a Common Origin, but Different Functions <i>M. V. Baleva, U. Piunova, I. Chicherin, D. Krasavina, S. Levitskii, and P. Kamenski</i>	1380

УДК 577.217.35

ИНФОРМОСОМЫ, ВОСТОК И ЗАПАД

© 2021 Т. Pederson

Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, University of Massachusetts Medical School,
Worcester, MA 01605 USA; e-mail: thoru.pederson@umassmed.edu

Поступила в редакцию 18.04.2021

После доработки 18.04.2021

Принята к публикации 22.04.2021

Хотя Александр Спирин был наиболее известен своими исследованиями рибосом, его более ранние исследования синтеза РНК во время эмбриогенеза позвоночных также были новаторскими. В них он сформулировал идею о том, что информационная РНК существует в виде комплекса с белками. Он назвал эти частицы «информосомами» в основном из-за содержащихся в них видов РНК, намекая на то, что эта форма рибонуклеопротеина может обеспечивать контроль трансляции мРНК. Хотя представление о том, что мРНК образует комплекс с белками, выглядело тогда полностью правдоподобным и было подкреплено значительными данными, тем не менее в некоторых кругах оно было воспринято скептически. Настоящий краткий обзор посвящён этим ранним научным исследованиям Спирина, в нём я излагаю свои представления и предположения, почему результаты этой работы необоснованно долго не принимались.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: информационный РНП, материнская мРНК, регуляция трансляции.

DOI: 10.31857/S0320972521090013

ВВЕДЕНИЕ

Ранние работы Александра Спирина были посвящены изучению синтеза РНК в эмбрионах рыб. Хотя особенно широкую известность получили его более поздние работы с рибосомами, эти ранние исследования также были плодотворными. В то время большинство работ в этой области проводилось на эмбрионах морского ежа, и, хотя эта система была продуктивной [1], все ведущие деятели эмбриологии признавали её филетическую ограниченность. Их восхищала работа Спирина [2], о которой они были хорошо информированы и в которой основное внимание уделялось оперативности развёртывания сохраненной и новой мРНК во время эмбриогенеза костистых рыб *Misgurnus fossilis* [3, 4].

В ходе этой работы Спирин и его коллеги получили доказательства того, что вновь синтезированная цитоплазматическая РНК была связана с белками. (Попутно они показали, что новые рибосомы строятся только на более поздних стадиях эмбриогенеза, что исключило возможность того, что их меченая РНК могла быть рибосомной РНК.) Рибонуклеопротеиновый статус меченой РНК был подтверждён тремя наблюдениями. Во-первых, эта меченая РНК седиментировала в градиенте сахарозы быстрее, чем депротенинизированная РНК (но медленнее, чем рибосомная, что отслеживалось по УФ-поглощению). Во-вторых, радиоактивная аминокислотная метка соосаждалась совместно с мече-

ной РНК. В-третьих, если предполагаемые частицы цитоплазматических экстрактов подвергались фиксации формальдегидом, меченая РНК имела плотность в градиентах плотности хлорида цезия, соответствующую комплексу РНК–белок, а не свободной РНК.

Спирин и его коллеги опубликовали результаты этой работы в 1964 г. [3, 4], и к тому времени эта идея была подхвачена на Западе [5, 6], и действительно, Спирин приехал в Филадельфию (США), чтобы в 1964–1965 гг. практически проверить свою концепцию информосомы на эмбрионах морских ежей и подтвердить её [7]. Но всего лишь через несколько месяцев после этого была опубликована работа, показавшая, что депротенинизированная РНК, добавленная в экстракт клеток HeLa, связывалась с белком [8], что вызвало скептицизм по поводу любых заявлений об эндогенных комплексах РНК–белок.

Спирин и его коллеги немедленно исследовали это в своей системе и сделали ряд важных выводов. Они обнаружили, что рибосомная РНК *E. coli*, добавленная к цитоплазматическим экстрактам из эмбрионов *M. fossilis*, действительно связалась с белком. Далее они центрифугировали эти комплексы в градиенте сахарозы, фиксировали их формальдегидом с последующим центрифугированием в градиентах плотности CsCl. Тем самым они показали, что «искусственные» комплексы потеряли большую часть своего белка, будучи отделёнными (в градиенте сахарозы) от пула цитоплазматических белков,



Полувековая история мРНК. Нахум Зоненберг и Александр Спирин, симпозиум по количественной биологии: Рибосома. Колд Спринг Харбор, 2001. Представлено с разрешения архива лаборатории в Колд Спринг Харбор

которые не связались с РНК. Когда же они провели аналогичные эксперименты с эндогенными частицами (информосома), то такой нестабильности они не наблюдали. Эти критические эксперименты, среди прочего, были подробно описаны в статье, основанной на Второй лекции имени сэра Ганса Кребса, которую Спирин прочитал на 6-м конгрессе Федерации европейских биохимических обществ в Мадриде [9]. Эту статью я рекомендую всем, кто хочет ознакомиться с более подробным содержанием его работ в этой области. Весьма почетное приглашение прочитать кребсовскую лекцию отразило растущее признание работы Спирина в области информосом ещё до того, как сложилась его репутация лидера в области изучения рибосом.

В течение 1971–1975 гг. информационные РНП были обнаружены во многих других системах [10–23], а затем произошёл ключевой, все проясняющий методологический прорыв, а именно, использование УФ-кросслинкинга для фиксации комплексов мРНК–белок в живых клетках [24]. И, как следствие, все сомнения бы-

ли устранены или, по крайней мере, в значительной степени сведены к минимуму. Тем временем начала развиваться и расширяться область трансляционного контроля.

ЛИЧНАЯ ТОЧКА ЗРЕНИЯ

Уход из жизни Александра Спирина побудил меня спустя много лет задуматься о его работах по информосомам (тема, из которой я ушёл) с ещё большим восхищением, хотя восхищение они вызывали у меня и раньше. Теперь, оглядываясь назад, я понимаю, как сложилось «дихотомическое» восприятие концепции информосомы. Для эмбриологов представление о том, что часть мРНК «замаскирована» и, таким образом, сохраняется для дальнейшего использования, было очень привлекательным. Но для некоторых ученых на Западе, работавших с клетками HeLa и другими быстро растущими клетками, не содержащими неактивную мРНК, эта концепция была менее актуальна и находилась вне их основного внимания. А у тех молекулярных биологов, которые открыли мРНК в 1961 г. и продолжали анализировать её активность, связанную с рибосомами, не было концептуальной необходимости искать белки, ассоциированные с мРНК. Третью точку зрения я сначала решил не упоминать, но всё же должен это сделать, и это никого не удивит. Даже в 1960-е годы, когда эта работа развивалась, на Западе было много ученых, которые с подозрением относились к работам из России. Тем, кто так не думал, и я в их числе, было больно все это наблюдать. И сейчас мне больно осознавать, что некоторые в моей стране так думали.

Я счастлив, что Александр Сергеевич Спирин приобрёл уважение в моей стране и во всём мире. В этом номере другие коллеги ярко описывают всё то, что он сделал в области изучения рибосом и для развития молекулярной биологии в Пушкино, Москве, в своей стране и за её пределами. В последний раз я встречался с ним на симпозиуме в Колд Спринг Харборе в 2001 г., где мы с удовольствием делились воспоминаниями об эре информосом/мРНК. Я и все мы всегда будем помнить Александра Сергеевича Спирина за его широту, дальновидность и всестороннюю научную проницательность.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии какого-либо конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Эта статья не содержит описания исследований с участием людей или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Pederson, T. (2006) The sea urchin's siren, *Dev. Biol.*, **300**, 9-14, doi: 10.1016/j.ydbio.2006.10.006.
- Davidson, E. H. (1968) *Gene Activity in Early Development*, Academic Press, New York.
- Ajtkhozhin, M. A., Belitsina, N. V., and Spirin, A. S. (1964) Nucleic acids in the early developmental stages of fish embryos (based on the loach *Misgurnis fossilis*), *Biochemistry (Moscow)*, **29**, 169-175.
- Belitsina, N. V., Ajtkhozhin, M. A., Gavrilova, L. P., and Spirin, A. S. (1964) Messenger RNA of differentiating animals cells, *Biochemistry (Moscow)*, **29**, 363-374.
- Henshaw, E. C., Revel, M., and Hiatt, H. H. (1965) A cytoplasmic particle bearing messenger ribonucleic acid in rat liver, *J. Mol. Biol.*, **4**, 241-256, doi: 10.1016/s0022-2836(65)80233-3.
- McConkey, E. H., and Hopkins, J. W. (1965) Subribosomal particles and the transport of messenger RNA in HeLa cells, *J. Mol. Biol.*, **14**, 257-270, doi: 10.1016/s0022-2836(65)80245-5.
- Spirin, A. S., and Nemer, M. (1965) Messenger RNA in early sea-urchin embryos: cytoplasmic particles, *Science (Washington)*, **150**, 214-217, doi: 10.1126/science.150.3693.214.
- Girard, M., and Baltimore, D. (1966) The effect of HeLa cell cytoplasm on the rate of sedimentation of RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **56**, 999-1002, doi: 10.1073/pnas.56.3.999.
- Spirin, A. S. (1969) The second Hans Krebs lecture: informosomes, *Eur. J. Biochem.*, **10**, 20-35, doi: 10.1111/j.1432-1033.1969.tb00651.x.
- Perry, R. P., and Kelley, D. E. (1968) Messenger RNA-protein complexes and newly synthesized ribosomal subunits: analysis of free particles and components of polyribosomes, *J. Mol. Biol.*, **35**, 37-59, doi: 10.1016/S0022-2836(68)80035-X.
- Burny, A., Huez, G., Marbaix, G., and Chantrenne, H. (1969) On a messenger ribonucleoprotein complex from rabbit reticulocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, **190**, 228-231, doi: 10.1016/0005-2787(69)90176-2.
- Cartouzou, G., Poirée, J. C., and Lissitzky, S. (1969) Rapidly-labelled ribonucleic acid-protein complexes of the thyroid tissue, *Eur. J. Biochem.*, **8**, 357-359, doi: 10.1111/j.1432-1033.1969.tb00536.x.
- Lebleu, B., Marbaix, G., Huez, G., Temmerman, J., Burny, A., and Chantrenne, H. (1971) Characterization of the messenger ribonucleoprotein released from reticulocyte polyribosomes by EDTA treatment, *Eur. J. Biochem.*, **19**, 264-269, doi: 10.1111/j.143201033.1971.tb01313.x.
- Morel, C., Kayibanda, B., and Scherrer, K. (1971) Proteins associated with globin messenger RNA in avian erythroblasts: isolation and comparison with the proteins bound to nuclear messenger-like RNA, *FEBS Lett.*, **18**, 84-88, doi: 10.1016/0014-5793(71)80413-1.
- Blobel, G. (1972) Protein tightly bound to globin mRNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 88-95, doi: 10.1016/s0006-291x(72)80014-7.
- Kumar, A., and Lindberg, U. (1972) Characterization of messenger ribonucleoprotein and messenger RNA from KB cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 681-685, doi: 10.1073/pnas.69.3.681.
- Kwan, S.-W., and Brawerman, G. (1972) A particle associated with the polyadenylate segment in mammalian messenger RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 3247-3250, doi: 10.1073/pna.69.11.3247.
- Blobel, G. (1973) A protein of molecular weight 78,000 bound to the polyadenylate region of eukaryotic messenger RNAs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 924-928, doi: 10.1073/pnas.70.3.924.
- Bryan, R. N., and Hayashi, M. (1973) Two proteins are bound to most species of polysomal mRNA, *Nat. New Biol.*, **244**, 271-274, doi: 10.1038/newbio244271a0.
- Lindberg, U., and Sundquist, B. (1974) Isolation of messenger ribonucleoproteins from mammalian cells, *J. Mol. Biol.*, **86**, 451-468, doi: 10.1016/0022-2836(74)90030-8.
- Auerbach, S., and Pederson, T. (1975) Phosphorylation of messenger RNA-bound proteins in HeLa cells, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **63**, 149-156, doi: 10.1016/0304-4165(75)90351-7.
- Auerbach, S., and Pederson, T. (1975) Metabolic stability of messenger ribonucleoprotein in HeLa cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **395**, 388-391, doi: 10.1016/0005-2787(75)90211-7.
- Kumar, A., and Pederson, T. (1975) Comparison of proteins bound to heterogeneous nuclear RNA and messenger RNA in HeLa cells, *J. Mol. Biol.*, **96**, 353-365, doi: 10.1016/0022-2836(75)90165-5.
- Wagenmakers, A. J. M., Reinders, R. J., and Van Venrooij, W. J. (1980) Cross-linking of mRNA to proteins by irradiation of intact cells with ultraviolet light, *Eur. J. Biochem.*, **112**, 323-330, doi: 10.1111/j.1432-1033.1980.tb04780.x.

INFORMOSOMES, EAST AND WEST

T. Pederson

Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01605 USA, E-mail: thoru.pederson@umassmed.edu

Although Alexander Spirin was most known for his ribosome work, his earlier research on RNA synthesis during vertebrate embryogenesis was also pioneering. There he introduced the idea that messenger RNA exists as a complex with proteins. He named these particles "informosomes", mainly for the RNA species they contained but also hinting that this ribonucleoprotein form might underlie control of the mRNA's translation. Although the notion that mRNA is complexed with proteins was entirely plausible and had considerable supporting data, it was received with skepticism in some quarters. Here I briefly summarize this phase of Spirin's early work and offer my perspectives and speculations on why its acceptance was unduly delayed.

Keywords: messenger RNP, maternal mRNA, translational control

УДК 577.1

ПУТЕШЕСТВИЕ ИНФОРМОСОМ ВО ВРЕМЕНИ: РАННЯЯ КОНЦЕПЦИЯ мРНК В КОНТЕКСТЕ СОВРЕМЕННЫХ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ ОБ мРНП

Обзор

© 2021 П.В. Иванов^{1,2,3}

¹ Division of Rheumatology, Inflammation, and Immunity, Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts, 02115 USA; e-mail: pivanov@rics.bwh.harvard.edu

² Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, 02115 USA

³ Harvard Medical School Initiative for RNA Medicine, Harvard University, Boston, Massachusetts, 02115 USA

Поступила в редакцию 27.05.2021

После доработки 09.07.2021

Принята к публикации 12.07.2021

На всём протяжении своего жизненного цикла матричная РНК (мРНК) существует в составе комплексов с белками. Впервые мРНК-содержащие частицы нерибосомной природы, называемые информосомами, были обнаружены в цитоплазматическом экстракте эмбрионов рыб сотрудниками лаборатории Александра Спирина, а позднее эти частицы были описаны и в живых клетках. Со временем были открыты и охарактеризованы и другие цитоплазматические, а также ядерные, мРНК-содержащие рибонуклеопротеины (мРНП). Несмотря на различия во внутриклеточной локализации, структуре и функциях, эти мРНП тем не менее обладают многими общими чертами, характерными также для информосом. В настоящем мини-обзоре рассматривается история открытия информосом, их характеристики и предполагаемые функции, а также их возможное родство с другими мРНП.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: информосомы, мРНК, рибонуклеопротеины, мРНП, РНК-гранулы, биосинтез белка.

DOI: 10.31857/S0320972521090025

ВВЕДЕНИЕ: ТИПИЧНЫЙ ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ мРНК

Эукариотические информационные (матричные) РНК (мРНК) транскрибируются в ядре с помощью РНК-полимеразы II. В процессе транскрипции эти nascentные (растущие) транскрипты окружаются набором разнообразных РНК-связывающих белков (RBPs, RNA-binding proteins), которые активно участвуют в превращении молекул-предшественников мРНК (пре-мРНК) в молекулы зрелых мРНК. Созревание мРНК включает три основных этапа, а именно: сплайсинг РНК, экпирование 5'-конца и отщепление/полиаденилирование 3'-конца (см. обзор [1]). По завершении этих процессов стандартная молекула мРНК состоит из открытой рамки считывания (ORF, open reading frame), кодирующей последовательность белка, окру-

Принятые сокращения: мРНП – нуклеопротеиновые частицы на основе матричной (информационной) РНК; PBs – процессирующие тельца (processing bodies); RBPs – РНК-связывающие белки (RNA-binding proteins); SGs – стрессовые гранулы (stress granules).

жённой нетранслируемыми участками (UTRs, untranslated regions) – 5'- и 3'-UTRs соответственно. В свою очередь, UTRs имеют характерные признаки, такие как присутствие 7-метилгуанозина на 5'-конце мРНК (кэп) и последовательность из остатков аденина (A) на 3'-конце, образующая поли(А)-хвост. Созревание молекулы мРНК происходит в результате скоординированного действия множества ферментов и ассоциированных с ними ядерных белков, многие из которых являются РНК-связывающими белками [2]. Кроме того, другие RBPs, не участвующие в созревании ядерной мРНК, распознают последовательности и/или структуры, входящие в UTRs (*cis*-элементы) и участвуют в ряде процессов, определяющих судьбу мРНК [3]. В результате формируются различные нуклеопротеиновые частицы на основе матричной РНК (мРНП), отличающиеся по белковому составу и общей структуре [4].

По завершении процесса формирования мРНП в зависимости от состава частицы, мРНП могут быстро экспортироваться из ядра в цитоплазму, где могут быть сразу использованы для

трансляции мРНК, или же они могут оставаться в ядре как «молчащие» мРНК-содержащие частицы [5]. Некоторые мРНК транспортируются для трансляции в определенные участки клетки, например, в синапсы нейронов для продукции нейромедиаторов. Эти процессы сопровождаются активным ремоделингом мРНК путем связывания с цитоплазматическими РНК-связывающими белками [6]. Следует отметить, что в активно растущих клетках наблюдается более высокий уровень трансляции в сравнении с некоторыми специализированными клетками (такими как ооциты), в которых обычно происходит накопление мРНК, которые позднее используются для трансляции мРНК только на специфических стадиях развития этих клеток. Как активно транслируемые, так и нетранслируемые мРНК в итоге подвергаются процессу деградации, который завершает их жизненный цикл [7]. Общей особенностью метаболизма всех мРНК является невозможность их существования без взаимодействия с белковыми партнерами.

ОТКРЫТИЕ ИНФОРМОСОМ

Несмотря на то что в настоящее время общеизвестно, что молекулы мРНК не могут существовать в «обнаженном» виде, и на всех этапах своего жизненного цикла они взаимодействуют с белками, образуя различные мРНК, в начале 1960-х гг. предположение, что новосинтезированные молекулы мРНК находятся в комплексе с белками и могут существовать в свободном от рибосом состоянии, было довольно провокационным. Эта идея казалась тогда не имеющей смысла, т.к. основной функцией мРНК считалось их участие в синтезе белка в ассоциированном с рибосомами состоянии.

В 1964 г. Спирин и его коллеги предположили, что матричные РНК эукариотических клеток, находящиеся в цитоплазме и временно не подвергающиеся трансляции, существуют в комплексе с неизвестными белками, не имеющими отношения к рибосомам [8, 9]. Такие выводы были основаны на результатах исследования эмбрионов *Misgurnus fossilis* (вьюн обыкновенный) на поздних стадиях развития бластулы, которые подвергались предварительной инкубации с [¹⁴C]-аденином или [¹⁴C]-уридином, способными эффективно включаться в насцентные транскрипты [9]. С помощью центрифугирования экстрактов цитоплазмы эмбрионов в градиенте сахарозы было обнаружено, что вновь синтезированные транскрипты осаждаются после 80S рибосом (в промежутке между 20S и 75S). К удивлению исследователей, тот же подход, при-

мененный к цитоплазматическим экстрактам из эмбрионов, преинкубированных с радиоактивно мечеными аминокислотами, показал очень сходную картину седиментации. Принимая во внимание тот факт, что в эмбрионах *M. fossilis* новые рибосомы (или рибосомные РНК) не синтезируются вплоть до завершения гастроляции [8], было высказано предположение, что новосинтезированные молекулы РНК, оседающие в пострибосомной зоне, представляют собой молекулы мРНК в комплексах с белками [9].

В продолжение этого исследования Спирин с соавт. использовали метод, основанный на фиксации РНК в формальдегиде, который способствует эффективной перекрестной сшивке РНК-белковых комплексов [10]. Благодаря такой стабилизации стало возможным проанализировать распределение перекрестно-сшитых компонентов в градиенте плотности CsCl [11]. Было очевидно, что эти фиксированные формальдегидом пострибосомные комплексы содержат радиоактивно меченые аминокислоты и РНК, седиментирующие в один регион плотности. Исследуемые РНК также определенно отличались от рибосом/их субъединиц и свободной РНК, т.к. обладали низким значением плавучей плотности ~1,40–1,45 г/см³, находящимся между значениями, характерными для свободного белка и РНК [12]. Кроме того, значения плавучей плотности указывали на то, что в этих комплексах белок доминирует над РНК в соотношении ~3 : 1. В пострибосомной зоне было обнаружено семь таких РНК-белковых комплексов с коэффициентами седиментации, равными 20S, 30S, 40S, 50S, 55S, 65S и 75S, что указывало на воспроизводимость полученного результата [12]. Кроме того, эти комплексы могли быть количественно абсорбированы на нитроцеллюлозных мембранах, что было невозможно для свободной РНК или белков. Изучаемые комплексы также подвергались деградации проназой (неспецифическая протеаза из *Streptomyces griseus*) и рибонуклеазой, что исключало возможность существования ДНК в их составе [12]. Более того, высвобожденные в результате депротенизации и центрифугирования в градиенте плотности сахарозы радиоактивно меченые РНК-компоненты пострибосомных РНК имели коэффициенты седиментации, значительно отличающиеся от значений 18S и 28S, характерных для рибосомной РНК [12]. Данный факт говорит о том, что молекулы РНК в этих РНК не имели отношения к рибосомной РНК [13].

Важно отметить, что схожие РНК были также обнаружены в эмбрионах морского ежа [14] и в клетках HeLa, инфицированных вирусом ос-

повакцины [15]. В эмбрионах морского ежа радиоактивно меченые РНК, выделенные из пострибосомных РНП, количественно гибридизовались с ДНК, что указывало на их мРНК-подобную природу [14, 16]. В клетках HeLa, инфицированных вирусом осповакцины, в которых высоко экспрессируется только один транскрипт, а именно вирусная мРНК, также обнаруживались пострибосомные РНП [17, 18], содержащие ново-синтезированную вирусную мРНК [15].

В целом приведенные выше данные позволили предположить, что исследуемые пострибосомные рибонуклеопротеины с характерным низким значением плавучей плотности состоят из мРНК и белков, и при этом не содержат ни целых рибосом, ни их субъединиц. Эти мРНП получили название информосомы, отражающее тот факт, что РНК-составляющая этих частиц несет информацию (причём имеется в виду не только матрица, кодирующая последовательность белка), а также то, что белковый компонент частицы принимает активное участие в определении судьбы мРНК.

РАЗВИТИЕ КОНЦЕПЦИИ ИНФОРМОСОМЫ

Вскоре после открытия информосом они были обнаружены и в ряде других экспериментальных моделей, таких как неинфицированные клетки HeLa [19], пролиферирующие клетки эпидермиса гигантского шелкопряда [20], клетки печени крыс [21], культивируемые фибробласты мыши (L-клетки) [22], L-клетки, инфицированные вирусом Менго [23], а также клетки асцитной опухоли Эрлиха, инфицированные вирусом Сендай [24]. Все обнаруженные информосомы отличались друг от друга по размеру, однако сохраняли ключевые характеристики пострибосомных информосом. Интересно, что в двух ранних работах по анализу мРНП из пострибосомной зоны в нормальных клетках HeLa [19] и клетках печени крысы [21] было продемонстрировано образование 45S частиц, которые могли быть как информосомами, так и комплексами мРНК с 40S субъединицами рибосомы [21, 25]. Важно отметить, что анализ инфицированных вирусом клеток позволил идентифицировать специфические типы информосом, целиком ассоциированных с вирусной мРНК. Такие вирус-специфичные 45S информосомы были выделены и охарактеризованы [23, 24].

Еще одно важное наблюдение заключается в том, что при седиментации расположение информосом не ограничивается пострибосомной

зоной — они также могут быть обнаружены и в прерибосомной зоне [12, 26]. При центрифугировании в градиенте сахарозы цитоплазматических экстрактов эмбрионов вьюна ново-синтезированные радиоактивно меченые мРНК обнаруживались еще до пика, характерного для 80S рибосом, а именно в составе РНП с коэффициентами седиментации, равными 90S, 100S и 110S [12]. Эти мРНК не могли быть составными частями полисом, т.к. даже димер 80S рибосомы имел бы коэффициент седиментации, равный ~120S. Принимая во внимание тот факт, что плавучая плотность прерибосомных 90S и 110S компонентов схожа с плавучей плотностью пострибосомных 50S–75S компонентов (~1,39 г/см³), был сделан вывод, что пострибосомные мРНП в действительности являются информосомами [12]. Таким образом, стало возможным выделить две крупные субпопуляции информосом: пострибосомные (20S–75S) и прерибосомные (90S–110S). Поскольку обнаруженные информосомы различались по размеру, было логично предположить, что они также отличаются друг от друга по составу белков и мРНК [12].

Один из аспектов исследований, не удостоенный достаточным вниманием, заключается в существовании информосом, обладающих высоким коэффициентом седиментации, хоть и не таких многочисленных, как описанные ранее прерибосомные информосомы. Возможно, они представляют собой отдельные крупные частицы или же агрегацию меньших по размеру информосом, ведущую к формированию более крупного мРНП [13]. Биологическое значение таких высокомолекулярных частиц пока остаётся под вопросом, однако их функция может быть связана с процессами сборки РНК-содержащих гранул (см. ниже).

После обнаружения информосом в цитоплазме было высказано предположение о возможном существовании их аналогов в клеточном ядре. И действительно, несколькими исследователями группами было продемонстрировано существование мРНП, аналогичных цитоплазматическим информосомам, в ядерных экстрактах [27–32]. Ядерные мРНП отличаются по размеру, однако имеют сходные с цитоплазматическими коэффициенты плавучей плотности (~1,4 г/см³) [30, 31]. Белковый состав ядерных мРНП отличается от цитоплазматического, что свидетельствует в пользу того, что во время экспорта из ядра молекулы мРНК могут менять своих белковых партнеров.

И все же оставался один важный вопрос, существуют ли на самом деле информосомы *in vivo* или же их формирование является лишь арте-

фактом, сопровождающим разрушение и/или гомогенизацию клеток. Вначале было обнаружено, что добавление свободных, не связанных с белками, молекул РНК в цитоплазматические экстракты, полученные из клеток различных моделей, приводило к образованию искусственных информосоноподобных частиц, о чём можно было судить по их поведению в градиенте плотности CsCl [33, 34]. Эти частицы были гомогенными, и их формирование не зависело от природы добавляемых свободных РНК (ни от длины, ни от происхождения РНК, в частности, в большинстве экспериментов использовали рРНК из *E. coli*). Единственным ограничением при формировании таких комплексов было количество добавляемой РНК – её должно было быть немного, избыток молекул РНК не включался в состав РНП [34]. Данный факт свидетельствовал о том, что в клеточных экстрактах содержится титруемый и ограниченный по количеству «фактор загрузки», доступный для ассоциации с добавляемой свободной РНК [34]. На основе результатов других экспериментов [35, 36, 38] был сделан вывод, что этот «фактор загрузки» имеет белковую природу (является белком или группой белков), большой молекулярный вес, составляет примерно 0,3% от общей растворимой фракции экстракта и легко вступает в реакцию с введенной экзогенной РНК. Согласно результатам этих экспериментов, всё ещё оставалась вероятность того, что свободные эндогенные мРНК взаимодействуют с высвободившимися «факторами загрузки» с образованием искусственных информосом в процессе разрушения/гомогенизации клеток, что свидетельствовало бы против существования естественных информосом, формирующихся *in vivo*.

В целях поиска ответа на этот вопрос Спирин и его коллеги провели несколько экспериментов по гомогенизации эмбрионов вьюна в присутствии избытка свободной экзогенной РНК [35]. Полагали, что если информосомы образуются в результате ассоциации свободных эндогенных мРНК с «фактором загрузки» в процессе гомогенизации, то следовало бы ожидать, что экзогенная РНК может выступать в качестве эффективного конкурента, снижая уровень формирования информосом. Тем не менее результаты такого эксперимента по конкуренции между РНК ясно свидетельствовали в пользу того, что информосомы действительно существуют в живых клетках – до их разрушения, гомогенизации и фракционирования, т.к. добавление избытка экзогенной РНК не влияло на профили седиментации/распределения информосом и характерные для них значения плавучей плотности [35].

Способность различных экзогенных РНК индуцировать образование информосоноподобных частиц подняла другие важные вопросы. Что такое «фактор загрузки»? Это один белок или группа белков, которые кооперативно связываются с РНК? Обладает ли «фактор загрузки» какой-либо специфичностью связывания, зависимой от последовательности или структуры РНК? Несмотря на то что ответы на часть этих вопросов до сих пор отсутствуют, в ходе попыток идентифицировать/выделить «фактор загрузки» был получен важный результат, свидетельствующий о различной стабильности естественных и искусственных информосом. Фракционирование этих комплексов в градиенте плотности сахарозы в присутствии или в отсутствие формальдегида (со сшивками или без них) и последующий седиментационный анализ в градиенте плотности CsCl однозначно продемонстрировали эти различия. В отличие от искусственных информосоноподобных РНП, которые характеризовались нестабильностью и чьё образование было обратимо, процесс формирования естественных информосом был необратим и приводил к образованию стабильных во всех протестированных условиях частиц [36]. Еще одна интересная находка заключалась в том, что добавление эндогенных изолированных из эмбрионов вьюна РНК приводило к формированию значительно более стабильных информосоноподобных частиц по сравнению с добавлением экзогенных РНК [36].

Поиск «фактора загрузки» оказал важное влияние на развитие биологии РНК, в частности в области биосинтеза белка и регуляции трансляции. Анализ различных цитоплазматических информосом (например, «маскированных» и свободных), выделенных из спящих или активно делящихся клеток, показал, что в этих мРНК-содержащих комплексах присутствуют два основных белка и большое количество различных минорных белков. В отличие от рибосомных частиц, эти комплексы демонстрировали характерную устойчивость к удалению Mg^{2+} (например, при добавлении ЭДТА), который всё же мог быть удален из препарата информосом путём последовательного повышения концентрации хелатирующей соли [37]. Основные белки комплексов характеризовались значениями молекулярного веса, равными 50–55 кДа (р50) и 70–80 кДа (р70), которые были определены по их электрофоретической подвижности в денатурирующих гелях [38–43]. Результаты проведенного позднее биохимического анализа позволили предположить, что белок р70 обладает повышенным сродством к поли(А)-последовательности; впоследствии он получил название по-

ли(А)-связывающий белок (PABP, poly(A)-binding protein) [39, 43]. Белки р50 были позднее охарактеризованы как ДНК-связывающие факторы транскрипции, стимулирующие синтез мРНК с промоторов Y-бокса, при этом Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1 или YBX1) являлся универсальным для всех комплексов и был охарактеризован лучше других [44]. В состав этого белка входит большое число остатков пролина и аланина, он демонстрирует аномальную в сравнении с предсказанной электрофоретическую подвижность (36 кДа), характеризуется высоким значением изоэлектрической точки ($pI > 9$) и универсальным сродством к различным гетерогенным последовательностям молекул мРНК [45]. Оба белка, YB-1 и PABP, широко распространены и обладают характеристиками, подходящими для «фактора загрузки», такими как способность PABP связываться с поли(А)-хвостами и способность белка YB-1 связываться с большим количеством разнообразных последовательностей и структур РНК.

Следует отметить, что в процессе поиска «фактора загрузки» было также сделано несколько других важных открытий. Так, было показано, что многие РНК-связывающие белки, обнаруженные в свободных информосомах, присутствуют в их составе лишь в качестве минорных белков в ассоциированных с полисомами информосомах (см. ниже и рисунок). Данное наблюдение позволяет предположить, что во время ассоциации информосом с полисомами происходит их активный ремоделинг [37]. Позднее многие из этих РНК-связывающих белков были охарактеризованы как факторы инициации и элонгации трансляции. Аналогичным образом был обнаружен ряд новых РНК-связывающих белков, специфически связывающихся с 5'- или 3'-UTR, распознавая при этом определенные *cis*-элементы, такие как мотивы TOP (5'-концевые олигопиримидиновые мотивы [46]) или ARE (AU-rich elements [47], обогащенные остатками аденина и урацила элементы). Таким образом, физиологическая роль таких взаимодействий между РНК-связывающими белками и *cis*-элементами была продемонстрирована в контексте регуляции трансляции, метаболизма и определения локализации транскриптов, а также их роли в развитии патологических состояний.

СВЯЗЬ МЕЖДУ ИНФОРМОСОМАМИ И БИОСИНТЕЗОМ БЕЛКА

Многие из ранних работ в области исследования информосом были сделаны на эмбрионах

рыб и морского ежа, клетки которых значительно отличаются от активно пролиферирующих клеток, в которых биосинтез белка и его регуляция находятся под сильным влиянием экзогенных стимулов, таких как доступность питательных веществ и кислорода. Эмбриональное развитие, напротив, контролируется внутренними факторами, которые совместно именуют «часовым» механизмом. Одной из особенностей регуляции трансляции в раннем эмбриогенезе является то, что уникальные паттерны развития отражены в пространственно-временной регуляции трансляции мРНК [48, 49]. После транскрипции новосинтезированные мРНК экспортируются из ядра в цитоплазму, где они «хранятся» в молчащей («маскированной») форме вплоть до определенного времени на «часах развития», когда в нужный момент они станут доступными для трансляции. Существует значительный временной разрыв между моментом их экспорта в цитоплазму и действительным вовлечением в процесс биосинтеза белка. Например, такой временной разрыв ярко продемонстрирован в ходе развития эмбриона вьюна, у которого транскрипция ядерной информации происходит на стадии поздней гастрюлы, а ее реализация — только после гастрюляции [50].

Спирин и его коллеги предположили, что существование «маскированных» форм молекул мРНК можно объяснить существованием информосом (см. подробное обсуждение в [13]), а именно тем, что белковый компонент этих мРНК предположительно играет регуляторную роль в принятии решения о том, будут ли мРНК накапливаться и «молчать», или же они будут доступны для ассоциации с рибосомами. Используя для этой цели эмбрионы вьюна, преинкубированные с радиоактивно мечеными аминокислотами (для детекции *de novo* транслированных полипептидов) или [¹⁴C]-уридином (для детекции новосинтезированных РНК), они получили цитоплазматические экстракты клеток эмбрионов одной и той же стадии развития (поздняя гастрюла). Затем экстракты смешали друг с другом и подвергли фракционированию путем центрифугирования в градиенте сахарозы, что привело к выявлению дифференциального распределения меченых мРНК и полипептидов между пострибосомными фракциями, моносомами и полисомами [25, 51]. Результаты этого эксперимента продемонстрировали, что биосинтез белка в полисомах идет на ранее синтезированных мРНК, в то время как новосинтезированные мРНК локализируются в трансляционно неактивных фракциях. На основе результатов центрифугирования в градиенте плотности CsCl было показано, что почти вся новосин-

тезированная мРНК (> 80%) присутствует в информосомах (плотность $\sim 1,40$ г/см³), в полисомах находится лишь небольшая часть мРНК ($\sim 1,51$ г/см³), а в 80S моносомах ничего обнаружено не было ($\sim 1,55$ г/см³) [25]. Эти биохимические данные согласуются с наблюдаемой задержкой трансляции новосинтезированных мРНК в эмбрионах ввиду образования «маскированных» мРНП [13].

Неожиданный результат показал анализ распределения мРНК информосом, 80S рибосом и полисом — значение плавучей плотности мРНК-фракции полисом было ниже соответствующего значения для моносом, что указывает на присутствие в полисомах компонентов, обладающих меньшей по сравнению с РНК плотностью, таких как дополнительные связанные белки [25]. Более того, диссоциация выделенных полисом на моносомы (при добавлении ЭДТА) сопровождалась высвобождением гетерогенных по коэффициенту седиментации мРНП, не свободных от мРНК, что также позволило предположить, что информосомы стабильны даже в присутствии ЭДТА [21, 25]. Поскольку комплексы обладали сходной плавучей плотностью ($\sim 1,4$ г/см³), эти результаты свидетельствовали о том, что высвобожденные мРНП являются информосомами [51]. Таким образом, было показано, что информосомы способны к ассоциации с транслирующими рибосомами, и мРНК в живой клетке не существует в «обнаженном» виде, независимо от того, транслируется она в данный момент или нет.

ИНФОРМОСОМЫ В СЛОЖНОМ МИРЕ мРНП

Основываясь на доступных экспериментальных данных, Спирин с соавт. предложили следующую концепцию взаимосвязей между мРНК и информосомами [52]:

1. эукариотические мРНК не существуют в свободном виде и в условиях *in vivo* всегда находятся в комплексе с белками;

2. мРНП нерибосомной природы являются информосомами;

3. многие эукариотические белки, участвующие в метаболизме РНК, обладают РНК-связывающей активностью;

4. отдельные белковые компоненты информосом (и других РНП) являются РНК-связывающими белками.

Еще в 1969 г. было сделано несколько прогнозов, основанных на предположениях, вытекающих из этой концепции [13]. Во-первых, было высказано предположение, что экспорт мРНК

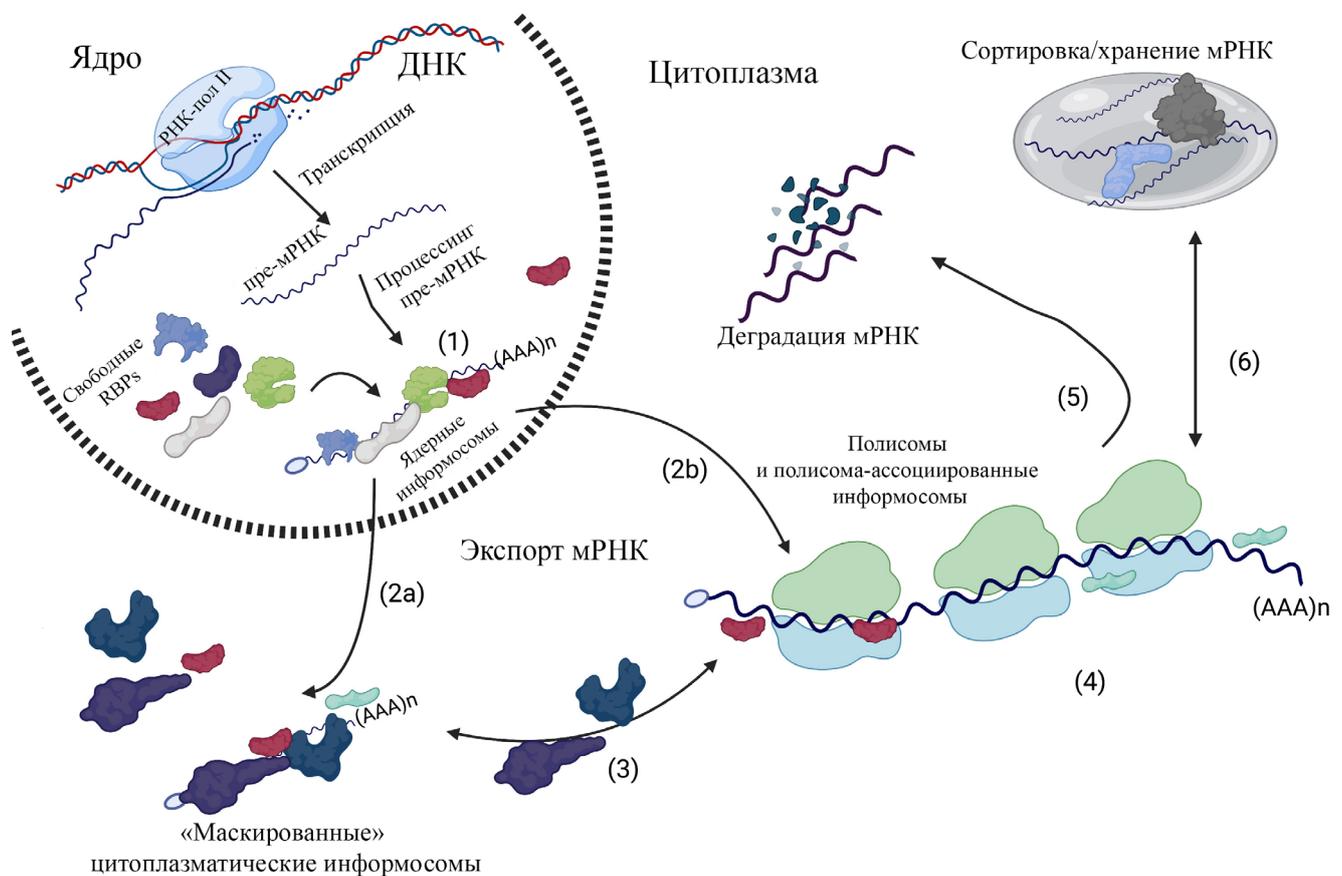
из ядра в цитоплазму происходит в виде информосом, в составе которых они могут быть немедленно транспортированы к транслирующим полисомам или же поступить на хранение в виде «маскированных» мРНП. Некоторые белки информосом могут содействовать такому транспорту, при этом неясно, меняется ли белковый состав информосом в процессе их транспорта из ядра в цитоплазму. «Прикрепление» информосом к транслирующим рибосомам ассоциировано с рядом изменений в информосомах или входящих в их состав белках [13]. Во-вторых, информосомы представляют собой форму мРНП, которая служит для защиты и стабилизации мРНК от дальнейшего процессинга, например, от действия таких ферментов как нуклеазы. Действительно, информосомы намного более устойчивы к действию рибонуклеаз в сравнении со свободной РНК, и белки информосом играют «защитную роль» [13]. В-третьих, информосомы являются составной частью механизма регуляции биосинтеза белка. Белковые компоненты информосом могут служить в качестве модуляторов трансляции, например, как репрессор трансляции [13]. Еще более интересным является то, что белки в составе информосом могут напрямую регулировать динамику ассоциации и диссоциации информосомы с транслирующими рибосомами.

Такие предположения перекликаются с более ранними концептуальными идеями, в которых термин «информационная РНК» использовался для описания промежуточных состояний РНК различного размера, не являющихся ни рибосомной, ни транспортной РНК, и обладающих способностью к гибридизации с ДНК («комплементарная РНК») [53, 54]. Одним из важных следствий такой концепции является то, что каждая «комплементарная РНК» все еще содержит последовательность-специфичную информацию, необходимую для гибридизации с определенной ДНК. Таким образом, в то время как любая мРНК может рассматриваться как «информационная» (матричная; имеется в виду её непосредственная роль в биосинтезе белка), было также высказано предположение о существовании других типов «информационных» РНК, которые не служат непосредственно в качестве источников информации для синтеза белка, но могут иметь, например, регуляторную функцию. Открытие информосом привело к значительному расширению знаний в этой области, продемонстрировав, что белковый компонент различных рибонуклеопротеиновых частиц, не содержащих рибосомы (вирусные РНП/мРНП, ядерные РНП/мРНП, цитоплазматические «маскированные» мРНП), может

активно влиять на их судьбу в клетке, в том числе на их внутриклеточную локализацию, стабильность или ассоциацию с рибосомами. В этом плане термин «информосомы» значительно шире, чем «мРНК», и он скорее служит для объединения различных РНП, которые могут содержать мРНК, а также РНП, в которых мРНК отсутствует (например, комплексы пре-мРНК или компоненты РНК-гранул).

Жесткий контроль определенных стадий метаболизма мРНК, таких как транспорт, деградация и трансляция мРНК, жизненно необходим для регуляции экспрессии генов. Все указанные процессы модулируются путем взаимодействия с РНК-связывающими белками (RBPs), кото-

рые находятся в комплексе с мРНК внутри мРНК. Утверждение, что RBPs играют значительную роль в определении судьбы и функций РНП, основанное на результатах изучения информосом, является фундаментальной основой для понимания структуры и функций рибонуклеопротеинов [55]. В ранних работах по информосомам было постулировано несколько принципов, которые могут быть применимы и к другим мРНК, многие из которых хорошо изучены (рисунок). Например, мРНК часто локализуются в определенных внутриклеточных компартментах [56]. Такая компартиментализация облегчает активацию определенных процессов биогенеза мРНК (процессинг мРНК и др.) как сос-



Информосомы и метаболизм мРНК. С помощью РНК-полимеразы II в ядре в результате транскрипции образуются пре-мРНК, которые затем подвергаются процессингу с образованием зрелых мРНК. Затем процессированные мРНК связываются с РНК-связывающими белками с формированием ядерных информосом (1). Эти ядерные комплексы экспортируются в цитоплазму, в которой они либо находятся в нетранслируемой форме («маскированные» цитоплазматические информосомы) (2а), либо ассоциируются с транслирующими полисомами с образованием полисома-ассоциированных информосом (2б). В процессе экспорта мРНК из ядра некоторые ядерные РНК-связывающие белки (RBPs) заменяются на свои цитоплазматические аналоги. В цитоплазме «маскированные» информосомы могут активироваться под действием внешних или внутренних стимулов и ассоциироваться с рибосомой с образованием полисома-ассоциированных информосом (4). В ходе трансляции мРНК (4) ассоциированные с полисомами информосомы могут отделиться от транслирующих рибосом и вернуться в «маскированную» форму (3), могут быть направлены на деградацию (5) или сортировку с последующим запасанием РНК-гранул, таких как стрессовые гранулы (stress granules) и процессирующие тельца (processing bodies) (6). Этот рисунок был создан на сайте BioRender.com

тавной части программы развития (классические «маскированные» информсомы эмбрионов *вьюна*) или в ответ на изменения условий (например, стресс) [57]. Многие мРНК являются динамичными, что означает возможность их ассоциации с другими РНК (например, обратимое взаимодействие информсомом с транслирующими рибосомами), а также могут менять свой состав в зависимости от изменений микроокружения (например, превращение ядерных информсомом в цитоплазматические в процессе экспорта мРНК).

Важным следствием концепции информсомы стало сопряжение различных связанных с мРНК процессов через взаимодействие мРНК с другими РНК-связывающими белками (рисунок). В настоящее время известно, что после завершения транскрипции и процессинга зрелые мРНК связываются со множеством различных белков (в частности, из семейства гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов (hnРНК), которые оказывают влияние на различных стадиях метаболизма мРНК (транспорт, определение локализации, стабильность)) [55]. По крайней мере некоторые из этих ядерных мРНК являются классическими ядерными информсомами (рисунок). После экспорта мРНК из ядра некоторые ядерные РНК-связывающие белки заменяются на другие, участвующие в регуляции метаболизма мРНК в цитоплазме. Некоторые из этих цитоплазматических белков обладают множественными функциями, т.е. они участвуют в определении локализации, поддержании стабильности или/и трансляции мРНК [58]. Множество мРНК, обнаруженных в специализированных клетках (например, ооциты), по поведению напоминают «маскированные» информсомы из эмбрионов *вьюна*, т.к. содержат белки, участвующие в определении их внутриклеточной локализации и стабилизации [57] (рисунок).

Обнаружение факта взаимодействия информсомом с транслирующими рибосомами открыло путь к изучению молекулярных механизмов регуляции трансляции. Изменение значения плавающей плотности, которое наблюдается у транслирующих полисом относительно 80S рибосом, свидетельствует о том, что произошло связывание дополнительных белков с полирибосомами [51]. В настоящее время стало совершенно ясным, что группы факторов трансляции, в особенности факторы инициации трансляции, в первую очередь взаимодействуют с мРНК, и лишь потом – с рибосомой [59]. Факторы инициации трансляции локализуются вокруг кэп-структуры и способствуют взаимодействию между малой 40S субъединицей рибосомы и

мРНК, а также обеспечению её правильного расположения относительно стартового AUG кодона. В этой связи следует отметить, что в отдельных работах высказывалось предположение, что информсомы возможно регистрировать в виде комплексов мРНК с 40S субъединицами рибосомы (45S информсомы), напоминающими рибосомные комплексы преинициации. При распознавании старт-кодона большая 60S субъединица рибосомы объединяется с т.н. преинициационным 48S комплексом с дальнейшим образованием функциональной 80S рибосомы [59]. В дальнейшем 80S рибосома участвует в процессе элонгации трансляции и синтезе насцентных полипептидов, закодированных в открытой рамке считывания молекул мРНК. После завершения трансляции 80S рибосома снова распадается на 60S и 40S субъединицы. Следует, однако, отметить, что эффективно транслируемые мРНК задействуют для собственной трансляции сразу множество рибосом, а после стадии терминации 40S субъединицы подвергаются рециклизации для участия в следующем раунде инициации трансляции на той же молекуле мРНК [60]. Этому процессу способствует циркуляризация мРНК, опосредованная взаимодействием фактора инициации трансляции eIF4G, связанным с кэп-структурой мРНК (в составе комплекса eIF4F), с поли(А)-связывающим белком (PABP), расположенным на поли(А)-хвосте [61]. Заманчиво предположить, что наблюдаемые информсомы, ассоциированные с полисомами, или высвобождающиеся из полирибосом, являются, по крайней мере, одним из представителей мРНК, ассоциированных с фактором трансляции.

Недавно было показано, что самоорганизация мРНК в различные не окруженные мембранной органеллы, называемые РНК-гранулами, представляет собой эволюционно консервативный феномен, лежащий в основе различных аспектов метаболизма мРНК [62, 63]. Были идентифицированы высокомолекулярные «гигантские» информсомы, которые могут быть продуктом самоагрегации. Таким образом, возможно предположить, что информсомы могут быть частью других мРНК-содержащих РНК-гранул. В контексте метаболизма мРНК лучше других были изучены два класса таких цитоплазматических РНК-гранул [64]. В первый класс входят т.н. процессирующие тельца, или РНК-гранулы, обогащенные деаденированными мРНК и специфическими факторами деградации мРНК, которые, как предполагается, участвуют в распаде и трансляции мРНК [65]. Второй класс мРНК-содержащих гранул составляют т.н. стрессовые гранулы, в которых содержится

мРНК, трансляция которой была приостановлена на уровне инициации [66, 67]. Стрессовые гранулы формируются при различных видах стресса. Полагают, что они оказывают влияние на выживаемость клеток через участие в репрограммировании трансляции [68]. Поскольку эти два типа гранул содержат множество молекул мРНК, связанных с различными РНК-связывающими белками, то классические информомосомы могут входить в состав этих РНК-содержащих гранул.

ВЫВОДЫ

Гипотеза о том, что мРНК всегда находятся в связанном с белками состоянии и существуют в виде информомосомы, более полувека назад носила революционный характер. Информомосомы являются динамичными структурами, и их сборка зависит и от мРНК, и от белков. Согласно модели информомосомы, взаимодействующие с мРНК белки играют не только структурную роль при формировании мРНП, но также участвуют в регуляции метаболизма мРНК. Следует отметить, что провозглашенный Спириным принцип, который звучит как «*omnia mea tecum porto*» («всё своё ношу с собой») [52], не ограничен инфор-

мосомами/мРНП, но также затрагивает другие РНП. Было высказано предположение, что в процессе эволюции РНП было достигнуто оптимальное стехиометрическое и структурное соответствие между РНК и их белковыми партнерами, определяющее их совместное функционирование в качестве рибонуклеопротеиновой частицы [69]. Эти биофизические принципы сборки РНК-содержащих комплексов в настоящее время интенсивно исследуются, т.к. многие из таких комплексов вносят значительный вклад в поддержание здоровья человека, а также играют роль в развитии заболеваний.

Благодарности. Павел Иванов выражает благодарность сотрудникам его лаборатории и доктору Claire Riggs за помощь в редактировании статьи.

Финансирование. Работа не была финансирована какими-либо фондами или проектами.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов, выполненных автором.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bentley, D. L. (2014) Coupling mRNA processing with transcription in time and space, *Nat. Rev. Genet.*, **15**, 163-175, doi: 10.1038/nrg3662.
- Luna, R., Gaillard, H., Gonzalez-Aguilera, C., and Aguilera, A. (2008) Biogenesis of mRNPs: integrating different processes in the eukaryotic nucleus, *Chromosoma*, **117**, 319-331, doi: 10.1007/s00412-008-0158-4.
- Corley, M., Burns, M. C., and Yeo, G. W. (2020) How RNA-binding proteins interact with RNA: molecules and mechanisms, *Mol. Cell*, **78**, 9-29, doi: 10.1016/j.molcel.2020.03.011.
- Khong, A., and Parker, R. (2020) The landscape of eukaryotic mRNPs, *RNA*, **26**, 229-239, doi: 10.1261/rna.073601.119.
- Hershey, J. W. B., Sonenberg, N., and Mathews, M. B. (2019) Principles of translational control, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **11**, doi: 10.1101/cshperspect.a032607.
- Mateu-Regue, A., Nielsen, F. C., and Christiansen, J. (2020) Cytoplasmic mRNPs revisited: singletons and condensates, *Bioessays*, **42**, e2000097, doi: 10.1002/bies.202000097.
- Keene, J. D. (2007) RNA regulons: coordination of post-transcriptional events, *Nat. Rev. Genet.*, **8**, 533-543, doi: 10.1038/nrg2111.
- Aitkhozhin, M. A., Belitsina, N. V., and Spirin, A. S. (1964) Nucleic Acids in the early stages of development of fish embryos (based on the loach *Misgurnus Fossilis*), *Biokhimiia*, **29**, 169-175.
- Belitsina, N. V., Aitkhozhin, M. A., Gavrilo, L. P., and Spirin, A. S. (1964) The messenger ribonucleic acids of differentiating animal cells, *Biokhimiia*, **29**, 363-374.
- Spirin, A. S., Belitsina, N. V., and Lerman, M. I. (1965) Use of formaldehyde fixation for studies of ribonucleoprotein particles by caesium chloride density-gradient centrifugation, *J. Mol. Biol.*, **14**, 611-615, doi: 10.1016/s0022-2836(65)80213-3.
- Spirin, A. S., Belitsina, N. V., and Aitkhozhin, M. A. (1964) Messenger RNA in early embryogenesis, *Zhurn. Obshch. Biol.*, **25**, 321-338.
- Ovchinnikov, L. P., Aitkhozhin, M. A., Bystrova, T. F., and Spirin, A. S. (1969) Newt embryo informosomes: 1. Sedimentation and density parameters, *Mol. Biol. (USSR)*, **3**, 449-464.
- Spirin, A. S. (1969) The Second Sir Hans Krebs Lecture. Informosomes, *Eur. J. Biochem.*, **10**, 20-35.
- Spirin, A. S., and Nemer, M. (1965) Messenger RNA in early sea-urchin embryos: cytoplasmic particles, *Science*, **150**, 214-217, doi: 10.1126/science.150.3693.214.
- Belitsina, N. V., Ovchinnikov, L. P., Spirin, A. S., Gendon, Yu. Z., and Cheros, V. I. (1968) Informosomes of HeLa cells infected with vaccinia virus, *Mol. Biol. (U.S.S.R.)*, **2**.
- Infante, A. A., and Nemer, M. (1968) Heterogeneous ribonucleoprotein particles in the cytoplasm of sea urchin embryos, *J. Mol. Biol.*, **32**, 543-565, doi: 10.1016/0022-2836(68)90342-2.
- Joklik, W. K., and Becker, Y. (1965) Studies on the genesis of polyribosomes. II. The association of nascent messenger RNA with the 40 S subribosomal particle, *J. Mol. Biol.*, **13**, 511-520, doi: 10.1016/s0022-2836(65)80113-9.
- Shatkin, A. J., Sebring, E. D., and Salzman, N. P. (1965) Vaccinia virus directed RNA: its fate in the presence of actinomycin, *Science*, **148**, 87-90, doi: 10.1126/science.148.3666.87.

19. McConkey, E. H., and Hopkins, J. W. (1965) Subribosomal particles and the transport of messenger RNA in HeLa cells, *J. Mol. Biol.*, **14**, 257-270, doi: 10.1016/s0022-2836(65)80245-5.
20. Kafatos, F. C. (1968) Cytoplasmic particles carrying rapidly labeled RNA in developing insect epidermis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **59**, 1251-1258, doi: 10.1073/pnas.59.4.1251.
21. Henshaw, E. C. (1968) Messenger RNA in rat liver polyribosomes: evidence that it exists as ribonucleoprotein particles, *J. Mol. Biol.*, **36**, 401-411, doi: 10.1016/0022-2836(68)90164-2.
22. Perry, R. P., and Kelley, D. E. (1968) Messenger RNA-protein complexes and newly synthesized ribosomal subunits: analysis of free particles and components of polyribosomes, *J. Mol. Biol.*, **35**, 37-59, doi: 10.1016/s0022-2836(68)80035-x.
23. Levy, H. B., and Carter, W. A. (1968) Molecular basis of the action of interferon, *J. Mol. Biol.*, **31**, 561-577, doi: 10.1016/0022-2836(68)90428-2.
24. Volkova, M. Y., Zaides, V. M., and Zaslavsky, V. G. (1969) Slowly sedimenting particles present in cytoplasmic extract of Ehrlich ascites cells infected by Sendai virus, *Mol. Biol. (U.S.S.R.)*, **3**, 4-9.
25. Ovchinnikov, L. P., Belitsina, N. V., Avanesov, A., and Spirin, A. S. (1969) Postribosomal RNA-containing particles of cytoplasm of animal cells according to CsCl density gradient centrifugation data, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **186**, 1202-1205.
26. Neifakh, A. A. (1959) Method of inactivation of nuclei by radiation and its possible applications for the investigation of nuclei functions during early development of fish, *Zhurn. Obshch. Biol. (Russian)*, **20**, 202-207.
27. Samarina, O. P., Asriian, I. S., and Georgiev, G. P. (1965) Isolation of nuclear nucleoproteins containing informational ribonucleic acid, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **163**, 1510-1513.
28. Samarina, O. P., Krichevskaya, A. A., and Georgiev, G. P. (1966) Nuclear ribonucleoprotein particles containing messenger ribonucleic acid, *Nature*, **210**, 1319-1322, doi: 10.1038/2101319a0.
29. Samarina, O. P., Lerman, M. I., Tumanian, V. D., Anan'eva, L. N., and Georgiev, G. P. (1965) Characteristics of chromosomal information RNA, *Biokhimiia*, **30**, 880-893.
30. Samarina, O. P., Lukanidin, E. M., and Georgiev, G. P. (1967) On the structural organization of the nuclear complexes containing messenger RNA, *Biochim. Biophys. Acta*, **142**, 561-564, doi: 10.1016/0005-2787(67)90642-9.
31. Samarina, O. P., Lukanidin, E. M., Molnar, J., and Georgiev, G. P. (1968) Structural organization of nuclear complexes containing DNA-like RNA, *J. Mol. Biol.*, **33**, 251-263, doi: 10.1016/0022-2836(68)90292-1.
32. Samarina, O. P., Molnar, J., Lukanidin, E. M., Bruskov, V. I., Krichevskaya, A. A., and Georgiev, G. P. (1967) Reversible dissociation of nuclear ribonucleoprotein particle containing mRNA into RNA and protein, *J. Mol. Biol.*, **27**, 187-191, doi: 10.1016/0022-2836(67)90359-2.
33. Girard, M., and Baltimore, D. (1966) The effect of HeLa cell cytoplasm on the rate of sedimentation of RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **56**, 999-1002, doi: 10.1073/pnas.56.3.999.
34. Ovchinnikov, L. P., Voronina, A. S., Stepanov, A. S., Belitsina, N. V., and Spirin, A. S. (1968) Informosome-like complexes were formed by RNA adding to animal cell homogenates, *Mol. Biol. (U.S.S.R.)*, **2**, 752-761.
35. Ovchinnikov, L. P., Avanesov, A. C., and Spirin, A. S. (1969) Informosomes from loach embryos, *Molek. Biol. (U.S.S.R.)*, **3**, 465471.
36. Ovchinnikov, L. P. and Avanesov, A. C. (1969) Informosomes of loach embryos. 3. Specificity of interaction of "informosome-forming" protein with RNA, *Mol. Biol. (U.S.S.R.)*, **3**, 5-12.
37. Spirin, A. S. (1994) Storage of messenger RNA in eukaryotes: envelopment with protein, translational barrier at 5' side, or conformational masking by 3' side? *Mol. Reprod. Dev.*, **38**, 107-117, doi: 10.1002/mrd.1080380117.
38. Blobel, G. (1972) Protein tightly bound to globin mRNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 88-95, doi: 10.1016/s0006-291x(72)80014-7.
39. Blobel, G. (1973) A protein of molecular weight 78,000 bound to the polyadenylate region of eukaryotic messenger RNAs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 924-928, doi: 10.1073/pnas.70.3.924.
40. Jain, S. K., Pluskal, M. G., and Sarkar, S. (1979) Thermal chromatography of eukaryotic messenger ribonucleoprotein particles on oligo (dT)-cellulose. Evidence for common mRNA-associated proteins in various cell types, *FEBS Lett.*, **97**, 84-90, doi: 10.1016/0014-5793(79)80058-7.
41. Kumar, A., and Pederson, T. (1975) Comparison of proteins bound to heterogeneous nuclear RNA and messenger RNA in HeLa cells, *J. Mol. Biol.*, **96**, 353-365, doi: 10.1016/0022-2836(75)90165-5.
42. Morel, C., Kayibanda, B., and Scherrer, K. (1971) Proteins associated with globin messenger RNA in avian erythroblasts: isolation and comparison with the proteins bound to nuclear messenger-like RNA, *FEBS Lett.*, **18**, 84-88, doi: 10.1016/0014-5793(71)80413-1.
43. van Venrooij, W. J., van Eekelen, C. A., Jansen, R. T., and Princen, J. M. (1977) Specific poly-A-binding protein of 76,000 molecular weight in polyribosomes is not present on poly A of free cytoplasmic mRNP, *Nature*, **270**, 189-191, doi: 10.1038/270189a0.
44. Minich, W. B., Maidebura, I. P., and Ovchinnikov, L. P. (1993) Purification and characterization of the major 50-kDa repressor protein from cytoplasmic mRNP of rabbit reticulocytes, *Eur. J. Biochem.*, **212**, 633-638, doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17701.x.
45. Mordovkina, D., Lyabin, D. N., Smolin, E. A., Sogorina, E. M., Ovchinnikov, L. P., and Eliseeva, I. (2020) Y-box binding proteins in mRNP assembly, translation, and stability control, *Biomolecules*, **10**, doi: 10.3390/biom10040591.
46. Cockman, E., Anderson, P., and Ivanov, P. (2020) TOP mRNPs: molecular mechanisms and principles of regulation, *Biomolecules*, **10**, doi: 10.3390/biom10070969.
47. Ivanov, P., and Anderson, P. (2013) Post-transcriptional regulatory networks in immunity, *Immunol. Rev.*, **253**, 253-272, doi: 10.1111/imr.12051.
48. Stebbins-Boaz, B., and Richter, J. D. (1997) Translational control during early development, *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, **7**, 73-94, doi: 10.1615/critrevukargeneexpr.v7.i1-2.50.
49. Teixeira, F. K., and Lehmann, R. (2019) Translational control during developmental transitions, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **11**, doi: 10.1101/cshperspect.a032987.
50. Neyfakh, A. A. (1964) Radiation investigation of nucleocytoplasmic interrelations in morphogenesis and biochemical differentiation, *Nature*, **201**, 880-884, doi: 10.1038/201880a0.
51. Ovchinnikov, L. P., Bystrova, T. F., and Spirin, A. S. (1969) Sedimentation and density characteristics of ribosomes and their subunits from embryonic groundlings, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **185**, 210-213.
52. Spirin, A. S. (1978) Eukaryotic messenger RNA and informosomes. Omnia mea mecum porto, *FEBS Lett.*, **88**, 15-17, doi: 10.1016/0014-5793(78)80596-1.
53. Spiegelman, S. (1961) The relation of informational RNA to DNA, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **26**, 75-90, doi: 10.1101/sqb.1961.026.01.013.

54. Spiegelman, S., Hall, B. D., and Storck, R. (1961) The occurrence of natural DNA–RNA complexes in *E. coli* infected with T2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **47**, 1135–1141, doi: 10.1073/pnas.47.8.1135.
55. Bjork, P., and Wieslander, L. (2017) Integration of mRNP formation and export, *Cell. Mol. Life Sci.*, **74**, 2875–2897, doi: 10.1007/s00018-017-2503-3.
56. Fazal, F. M., Han, S., Parker, K. R., Kaewsapsak, P., Xu, J., et al. (2019) Atlas of subcellular RNA localization revealed by APEX-Seq, *Cell*, **178**, 473–490.e426, doi: 10.1016/j.cell.2019.05.027.
57. Kong, J., and Lasko, P. (2012) Translational control in cellular and developmental processes, *Nat. Rev. Genet.*, **13**, 383–394, doi: 10.1038/nrg3184.
58. Singh, G., Pratt, G., Yeo, G. W., and Moore, M. J. (2015) The clothes make the mRNA: past and present trends in mRNP fashion, *Annu. Rev. Biochem.*, **84**, 325–354, doi: 10.1146/annurev-biochem-080111-092106.
59. Jackson, R. J., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 113–127, doi: 10.1038/nrm2838.
60. Hellen, C. U. T. (2018) Translation termination and ribosome recycling in eukaryotes, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **10**, doi: 10.1101/cshperspect.a032656.
61. Wells, S. E., Hillner, P. E., Vale, R. D., and Sachs, A. B. (1998) Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors, *Mol. Cell*, **2**, 135–140, doi: 10.1016/s1097-2765(00)80122-7.
62. Zhang, H., Ji, X., Li, P., Liu, C., Lou, J., et al. (2020) Liquid–liquid phase separation in biology: mechanisms, physiological functions and human diseases, *Sci. China Life Sci.*, **63**, 953–985, doi: 10.1007/s11427-020-1702-x.
63. Hyman, A. A., Weber, C. A., and Julicher, F. (2014) Liquid–liquid phase separation in biology, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **30**, 39–58, doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013325.
64. Ivanov, P., Kedersha, N., and Anderson, P. (2019) Stress granules and processing bodies in translational control, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **11**, doi: 10.1101/cshperspect.a032813.
65. Luo, Y., Na, Z., and Slavoff, S. A. (2018) P-Bodies: composition, properties, and functions, *Biochemistry*, **57**, 2424–2431, doi: 10.1021/acs.biochem.7b01162.
66. Hofmann, S., Kedersha, N., Anderson, P., and Ivanov, P. (2021) Molecular mechanisms of stress granule assembly and disassembly, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1868**, 118876, doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118876.
67. Riggs, C. L., Kedersha, N., Ivanov, P., and Anderson, P. (2020) Mammalian stress granules and P bodies at a glance, *J. Cell Sci.*, **133**, doi: 10.1242/jcs.242487.
68. Advani, V. M., and Ivanov, P. (2019) Translational control under stress: reshaping the translome, *Bioessays*, **41**, e1900009, doi: 10.1002/bies.201900009.
69. Mitchell, S. F., and Parker, R. (2014) Principles and properties of eukaryotic mRNPs, *Mol. Cell*, **54**, 547–558, doi: 10.1016/j.molcel.2014.04.033.

INFORMOSOMES TRAVEL IN TIME: AN EARLY mRNA CONCEPT IN THE CURRENT mRNP LANDSCAPE

Review

P. Ivanov^{1,2,3}

¹ *Division of Rheumatology, Inflammation, and Immunity, Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts, 02115 USA; e-mail: pivanov@rics.bwh.harvard.edu*

² *Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, 02115 USA*

³ *Harvard Medical School Initiative for RNA Medicine, Harvard University, Boston, Massachusetts, 02115 USA*

Messenger RNA is complexed with proteins throughout its life cycle. The first mRNA-containing particles of non-ribosomal nature, named informosomes, were discovered in cytoplasmic extracts of fish embryos by the laboratory of Alexander Spirin, and later described in live cells. Over time, various other nuclear and cytoplasmic mRNA-containing ribonucleoproteins (mRNPs) have been found and characterized. Although these mRNPs are very diverse in their subcellular localization, structure and functions, they share many common characteristics with informosomes. In this mini-review, I will discuss the discovery of informosomes, their characteristics and proposed functions, and their potential relationship to other mRNPs.

Keywords: informosomes, mRNA, ribonucleoproteins, mRNP, RNA granules, protein biosynthesis

УДК 577.3

ИССЛЕДУЯ СТРУКТУРНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ ПОЛИРИБОСОМ С АЛЕКСАНДРОМ СПИРИНЫМ

© 2021 В.Р. Klaholz^{1,2,3,4}

¹ Centre for Integrative Biology (CBI), Department of Integrated Structural Biology, IGBMC (Institute of Genetics and of Molecular and Cellular Biology), 67404 Illkirch, France; e-mail: klaholz@igbmc.fr

² Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 7104, 67404 Illkirch, France

³ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U964, 67404 Illkirch, France

⁴ Université de Strasbourg, 67081 Strasbourg, France

Поступила в редакцию 20.05.2021

После доработки 20.05.2021

Принята к публикации 06.06.2021

«Возможно ли исследовать молекулярные механизмы и структурную организацию полирибосомных комплексов, используя криоэлектронную томографию?» – этим вопросом мы задавались на протяжении всего многолетнего сотрудничества между моей научной группой и командой Александра Сергеевича Спирина. И действительно, это оказалось возможным. Мы обнаружили, что двурядные полисомы могут иметь и циркулярную, и линейную конфигурацию мРНК (Afonina Z.A., et al. (2013) *Biochemistry (Moscow)*); выяснили, как эукариотические рибосомы образуют на мРНК супрамолекулярные левозакрученные спирали (Myasnikov A.G., et al. (2014) *Nat. Commun.*); продемонстрировали, что циркуляризация полирибосом происходит независимо от поли(А)-последовательности и кэп-структуры (Afonina Z.A., et al. (2014) *Nucleic Acids Res.*); показали, что существуют промежуточные полирибосомы с открытыми структурами, представляющие переход из ювенильной фазы к формированию активно транслирующей полисомы среднего размера (Afonina Z.A., et al. (2015) *Nucleic Acids Res.*), впоследствии переходящих в форму плотно упакованных спиральных структур со снижением активности. Таким образом, наши совместные плодотворные исследования привели к значительным достижениям в этой области, которые будут рассмотрены в этой статье с личной и исторической точки зрения в память об Александре Сергеевиче Спирине.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: полирибосомы, полисомы, эукариотические рибосомы, криоэлектронная микроскопия, криоэлектронная томография.

DOI: 10.31857/S0320972521090037

ВВЕДЕНИЕ

«Исследовать и понять структуру трехмерной организации эукариотических полирибосом – станет ли это когда-нибудь возможным?» – такие мысли могли приходить на ум, когда мы только начинали это делать в сотрудничестве с Александром Спириным в 2007 г. Полирибосомы (также называемые полисомами) были впервые визуализированы еще в середине 1960-х гг., в частности в ранней работе Warner [1, 2], в форме спиральных структур [3], но их трехмерная организация оставалась загадкой.

Впервые я встретился с Александром Сергеевичем Спириным на симпозиуме, посвященном его 70-летию, в Пущино в сентябре 2001 г.; казалось бы, достаточно поздно, но на самом де-

ле – не поздно никогда (я находился в то время на позиции постдока). Эта встреча была незабываемой, превосходной – с научной точки зрения, а также впечатляющей тем, как прорывные научные исследования Спирина распространились на множество научных групп, работающих по всему миру, и привели к выявлению молекулярных механизмов, лежащих в основе процесса биосинтеза белка.

Через несколько лет мы снова встретились, теперь уже на семинаре, который Спирин проводил в Институте генетики, молекулярной и клеточной биологии (IGBMC) в Страсбурге (Илькирш, Франция) в октябре 2007 г. (по приглашению Марата Юсупова). Находясь под впечатлением от его последней работы на тему «Поэтапное образование эукариотических двурядных полирибосом и циркулярная трансляция полисомной мРНК» (которая вскоре была опубликована в *Nucleic Acids Res.* [4]), я стал обсуждать со Спириным тему полирибосом. Возможно ли именно увидеть трехмерную структуру эу-

Принятые сокращения: крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия; крио-ЭТ – криоэлектронная томография; SECF – бесклеточная система с непрерывным обменом (continuous-exchange cell-free system).

кариотических полирибосом и ответить на некоторые из фундаментальных вопросов, таких как: каким образом отдельные рибосомы располагаются на молекуле мРНК, взаимодействуют ли они друг с другом, какова общая архитектура эукариотических полисом, как обстоят дела с циркуляризацией мРНК, специфичностью регуляции трансляции у эукариот, локализацией 5'- и 3'-концов, работой факторов трансляции, динамикой сборки рибосом, и др.? Мы обстоятельно всё обсудили и решили, что у нас есть всё необходимое для такой работы: прекрасная биохимия и возможность приготовления транслирующих полирибосом из проростков зародышей пшеницы в различных условиях, а также технические возможности для их визуализации и структурного анализа.

Один из основных путей к пониманию механизма функционирования рибосомы заключается в буквальной визуализации рибосомы в процессе её работы. В то время изучение структуры рибосом в основном сводилось к анализу изолированных рибосом с использованием рентгеновской кристаллографии или криоэлектронной микроскопии с анализом отдельных частиц (крио-ЭМ). Тем не менее поиск ответа на вопрос о том, как работает комплекс рибосом, будучи связанным с молекулой мРНК с формированием цепи, требовал прямой визуализации процесса и реконструкции трехмерной структуры большого макромолекулярного комплекса, состоящего из серии рибосом. Мы обсуждали возможность проведения структурного анализа полисом с помощью метода криоэлектронной томографии (крио-ЭТ), используемого тогда для анализа на клеточном уровне (начиная с первых работ в лаборатории W. Baumeister ([5] и многие другие статьи), но в то время ещё не применявшегося для анализа отдельных частиц или их комплексов (2007 год).

Тогда мы находились в процессе инсталляции первого во Франции криоэлектронного микроскопа высокого разрешения «Polara» производства компании «FEI» (Нидерланды) в недавно отремонтированном здании Европейского центра биологии и структурной геномики (CEBGS – Centre Européen de Biologie et Génomique Structurale), на базе которого была организована новая платформа для исследований в области структурной биологии, что вскоре привело к созданию Центра интегративной биологии (CBI – Centre for Integrative Biology, Илькирш, Франция) в 2014 г., где в настоящее время располагаются инфраструктуры FRISBI, Instruct-ERIC и iNEXT-Discovery, обеспечивающие технологическую поддержку исследований в интегрированной структурной биологии на са-

мом передовом уровне. В этом криоэлектронном микроскопе высокого разрешения была установлена первая трансферная система для загрузки, отбора и анализа нескольких образцов; ПЗС-камера, которая позволила отказаться от утомительной работы с пленкой, облегчив, или скорее, фактически позволив получать томографические данные в автоматическом режиме; а также стабильный гониометр, позволивший проводить съемку угловых серий (гораздо более стабильный, чем классические микроскопы с боковым входом). Вскоре микроскоп «Polara» был модернизирован, в ходе чего в его составе появилась камера первого поколения для прямой детекции электронов («Falcon 1»), которая обладала значительно большей чувствительностью и имела запоминающее устройство, работающее на транзисторах. Кроме того, в ней имелась специальная система держателя образцов, которая позволяла выполнять регистрацию в режиме одно- и двухосевой томографии (с использованием устройства типа флип-флоп для поворота образца в плоскости перед съемкой второй угловой серии). Система обработки изображений позволяла получать реконструкцию трехмерной структуры из серии угловых изображений, полученных для конкретного участка замороженного и гидратированного, и таким образом сохраненного образца (что позволяло преодолеть ограничения, накладываемые методом электронной микроскопии с негативным контрастированием).

Поскольку с помощью крио-ЭМ сложно работать с образцами большой толщины, к тому же не обеспечивающими достаточного контраста при получении изображения, нам необходимо было найти способ приготовления соответствующих образцов, в идеале так, чтобы можно было получать образцы с небольшой толщиной непосредственно в процессе криоохлаждения («замораживания» без образования кристаллов льда, вместо которых формируется прозрачный лед аморфной структуры) решёток для проведения крио-ЭМ, как при анализе отдельных частиц. И это действительно стало возможным – благодаря работе с полисомами, полученными в бесклеточной системе, разработанной Александром Спириным еще несколько десятилетий тому назад [6]. Полисомы получали в системе трансляции из проростков пшеницы – бесклеточной системе с непрерывным обменом (CECF – continuous-exchange cell-free system) [4, 7] с применением конструкции мРНК β-глобина с белком GFP (зеленый флуоресцентный белок), а также конструкций с поли(А)-хвостом, и др. [8]. Полисомы фракционировали путём гель-хроматографии с использованием упаков-

ванной Сефакрилом колонки, вручную с помощью пипетки [9], что обеспечивало нас достаточным количеством продукта для приготовления препарата на решётках для крио-ЭМ, в отличие от фракционирования в градиенте сахарозы, которое вместо этого было использовано для седиментационного анализа и характеристики полисом; позднее мы научились работать непосредственно с клеточными экстрактами, что способствовало получению интактных и более однородных комплексов. Наше сотрудничество привело к ряду важных достижений и получению новых результатов (в обобщенном виде они показаны на рис. 1–4).

В нашей первой совместной работе мы исследовали путь молекулы мРНК внутри эукариотической полирибосомы, «пометив» её 5'-конец добавленными 40S субъединицами, а 3'-конец — наночастицами золота. Визуализацию проводили с помощью крио-ЭМ и крио-ЭТ (с использованием ускоряющего напряжения, равного 150 кВ, для повышения контрастности изображения). При проведении реконструкции томограмм отдельные рибосомы были вырезаны и выравнены, т.е. обработаны путем усреднения субтомограмм для улучшения соотношения сигнал/шум. Карты усреднённой плотности для каждой рибосомы были использованы при реконструкции расположения рибосом внутри полисомы (с корректными параметрами вращения и трансляции). В результате была получена 3D-реконструкция целой полисомы, в которой было возможно визуализировать взаимную ориентацию каждой рибосомы по отношению друг

к другу. Таким образом было продемонстрировано, что 40S субъединицы рибосом направлены вовнутрь, а 60S субъединицы — наружу, опосредуя направленность (5'→3') хода цепи мРНК. По результатам этого анализа было выявлено, что двурядные полирибосомы в одном образце могут иметь как циркулярную, так и линейную (подобную зигзагу) топологию мРНК [8].

Для оптимизации сбора данных с помощью крио-ЭТ в дальнейшем мы провели сравнительный анализ одно- и двухосевой томографии. Классический подход при использовании крио-ЭТ заключается в получении данных серии изображений под одним углом, что приводит к возникновению артефактов в 3D-реконструкциях ввиду систематического отсутствия угловых изображений (т.н. эффект «отсутствующего клина»). Более того, изображения, полученные с помощью крио-ЭМ, характеризуются низким значением соотношения сигнал/шум ввиду ограничения дозы из-за риска повреждения образцов под действием радиации. Сочетание первого набора данных со второй серией изображений, полученной после вращения образца в плоскости, позволяет сократить объём недостающих данных с клина до пирамиды, что обеспечивает снижение уровня искажений при 3D-реконструкции и улучшение соотношения сигнал/шум. Применительно к полисомам и отдельным рибосомам (первая крио-ЭТ визуализация отдельных частиц), этот подход позволяет получить значительно улучшенные 3D-реконструкции и карты, более простые в интерпретации [9].

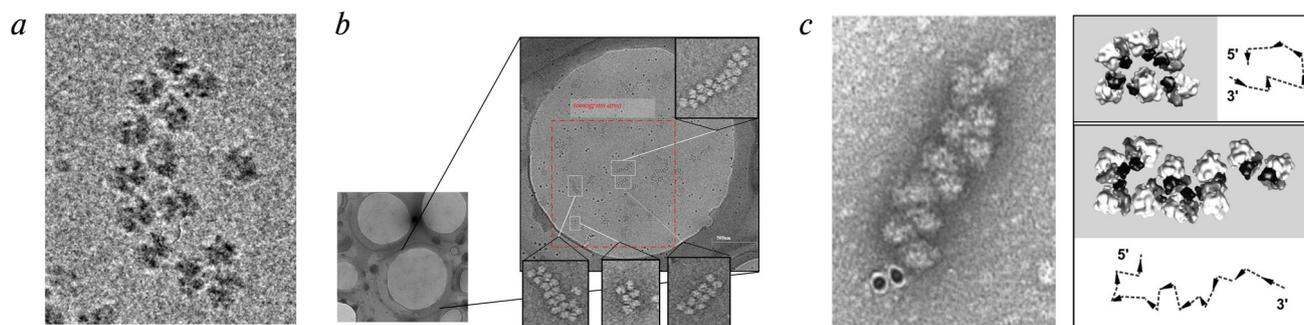


Рис. 1. *a, b* — Визуализация полирибосом из проростков пшеницы с помощью криоэлектронного микроскопа в условиях заморозки, т.е. в интактном и неокрашенном виде. Изображение, полученное с использованием крио-ЭМ, демонстрирует полисому, на которой была произведена первая попытка аннотации спирали (ноябрь 2008 г., *a*), незадолго до получения первых изображений с помощью крио-ЭТ (декабрь 2008 г., *b*). На небольшом рисунке показан участок криоэлектронной решётки с несколькими отверстиями, одно из которых было использовано для съёмки нескольких угловых серий в различных участках отверстия (отмечены белыми прямоугольниками; тёмные точки — это частицы золота, используемые в качестве координатных маркеров). На вставке показаны центральные секции трехмерной реконструкции полисом различного размера. *c* — Для двурядных полирибосом показано существование как циркулярной, так и линейной топологии мРНК [9]. Изображение, полученное с помощью электронной микроскопии с негативным окрашиванием 3'-конца наночастицами золота (слева) и аннотация рибосомных частиц (40S субъединицы рибосомы показаны тёмным цветом, 60S — светлым), основанная на 3D-реконструкции, полученной с помощью крио-ЭТ. Эта аннотация позволила описать ход цепи мРНК и её 5'→3' направленность. Изображения представлены с разрешения «Oxford University Press»

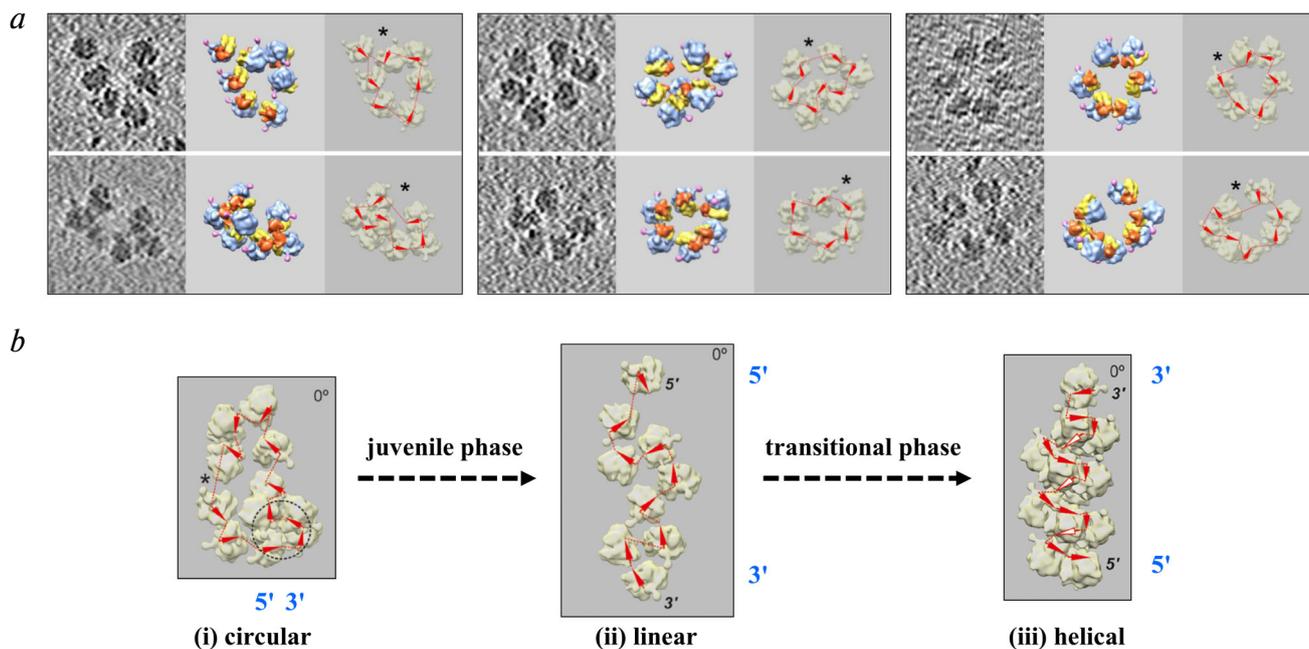


Рис. 2. *a* – Образование циркулярных полирибосом на эукариотической мРНК без кэп-структуры и поли(А)-хвоста, что было подтверждено путём сравнения полисом, содержащих кэпированную и полиаденилированную мРНК (слева), кэпированную и неполиаденилированную мРНК (по центру), некэпированную и неполиаденилированную мРНК (справа). Эти данные продемонстрировали, что циркуляризация полирибосом происходит независимо от поли(А)-хвоста и кэп-структуры [12]. *b* – Конформационные изменения эукариотических полирибосом в процессе многократной повторной трансляции. В ранней (ювенильной) фазе полисомы образуют циркулярные структуры, которые затем преобразуются в линейно расположенные полисомы среднего размера, осуществляющие активную трансляцию. За этим следует переходная фаза, приводящая к образованию плотно упакованных спиральных структур, обладающих пониженной трансляционной активностью. В этой работе было показано, что промежуточные полирибосомы существуют в открытой форме до момента формирования более компактных спиральных структур [13]. Изображения предоставлены с разрешения «Oxford University Press»

Следующая часть проекта, заключающаяся в реконструкции структуры полного полирибосомного комплекса, оказалась действительно амбициозной задачей и заняла несколько лет. Спустя множество проведенных серий исследований с использованием крио-ЭТ нам в итоге удалось получить супрамолекулярную структуру эукариотических полирибосом. Криоэлектронная томография (с использованием наночастиц золота в качестве координатных маркеров для совмещения изображений и получения 3D-структуры) в сочетании с усреднёнными субтомограммами и молекулярным моделированием позволили получить трёхмерную структуру полисомы, состоящую из 23 рибосом, связанных с одной молекулой мРНК (выбранной в качестве примера из многих других полисом). Поскольку это был один из самых больших асимметричных комплексов, структура которого была когда-либо разрешена (~ 110 МДа), то внесение полученных координат в базу данных PDB стало «особенным предприятием». На примере этой структуры было продемонстрировано, что спиральные полисомы образуют левозакрученную супрамолекулярную спираль. Её разрешение позволило визу-

ализировать три функциональные части полисомного комплекса: центральный «коровый» участок, который образует довольно компактную левостороннюю супрамолекулярную спираль, и более открытые участки, содержащие сайты инициации и терминации на разных концах. Спиральный участок формирует непрерывный канал для мРНК, в котором нуклеотидная цепь образует мостик между участками входа и выхода из канала на соседних рибосомах, что предотвращает образование петель мРНК между рибосомами. Эта структура предоставила ценнейшую информацию о контактах между рибосомами, опосредованных белками и РНК, в которых задействованы консервативные сайты 40S субъединиц рибосом и длинные выступающие сегменты экспансии РНК. Эти открытия пролили свет на молекулярную машинерию рибосомы и механизмы её функционирования [10]. Результаты этого исследования мы обсудили в обзоре, посвящённом многоуровневой интеграции данных о работе рибосомы от молекулярного до клеточного уровня, откуда это описание и цитируется [11].

Параллельно мы изучали зависимость циркуляризации полисом от структуры 5'-концево-

го кэпа и 3'-поли(А)-хвоста мРНК. Мы проанализировали контрольные полисомы с мРНК GFP или β -глобина, содержащие 5'-кэп и поли(А)-хвост, сравнивая их с неэкспонированной мРНК и с мРНК, у которой отсутствовал 3'-поли(А)-хвост. С помощью крио-ЭТ и усреднения субтомограмм мы смогли проследить ход цепи мРНК, соединяющей соседние сайты выхода и входа в канал мРНК на рибосомах, образующих полисомы. К нашему удивлению оказалось, что формирование и циркуляризация полисомом не зависят от тех элементов, которые на протяжении десятилетий рассматривались как ключевые факторы циркуляризации посредством взаимодействия с кэп-связанным фактором инициации eIF4F и поли(А)-связывающим белком, что привело к смене парадигмы в этой области [12]. Тем не менее до сих пор остаётся неясным, какие же элементы или ассоциированные с полисомой белковые факторы в действительности индуцируют её циркуляризацию.

Наша последняя совместная статья была посвящена изучению конформационных изменений полисомом на различных стадиях образования полирибосом. С помощью анализа для ряда

установленных временных точек с использованием бескеточной системы многократной повторной трансляции, седиментационного анализа и крио-ЭТ реконструкции мРНК-индуцированных полисомом нам удалось показать, что во время ювенильной фазы образуются циркулярные полисомы среднего размера с открытыми структурами, вслед за которыми появляются промежуточные «зигзагообразные» линейные и активно транслирующие полирибосомы, в конечном итоге переходящие в форму плотно упакованных спиральных структур со сниженной трансляционной активностью. Эти конформационные изменения сопровождаются снижением белок-синтезирующей активности. В этой работе была продемонстрирована динамика эукариотических полисомом и их конформационные переходы как функция их формирования и трансформации в сменяющих друг друга фазах, т.е. «онтогенез» полисомом [13].

Александр Спиринов лично представил первые полученные нами в ходе этой работы данные на 38-м конгрессе FEBS в Санкт-Петербурге (Россия) в 2013 г. В последующем наши совместно полученные результаты были представ-

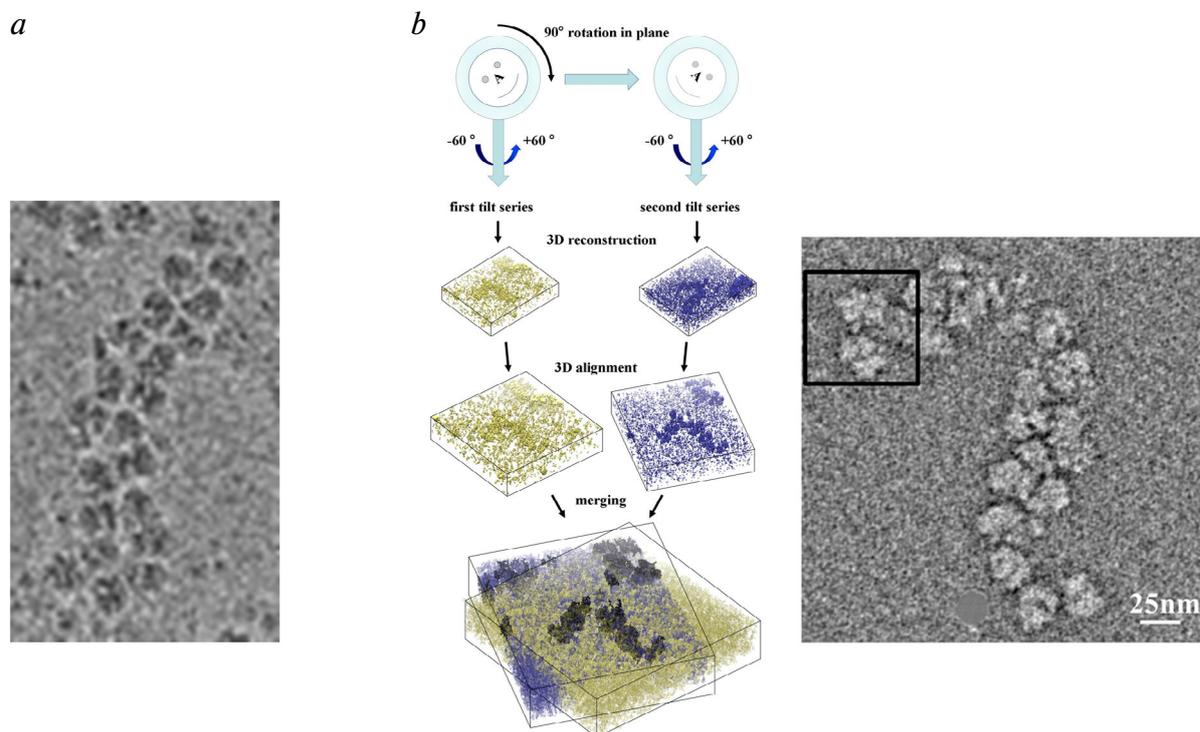


Рис. 3. *a* – Пример изображения большого полисомного комплекса, полученного с помощью крио-ЭМ, использованного для проведения крио-ЭТ. *b* – Концепция проведения съёмки угловой серии изображений и реконструкция томограммы (слева), которая может быть дополнена второй серией изображений, полученной под другим углом после разворота решётки для крио-ЭМ в плоскости примерно на 90°. 3D-реконструкция на основе данных двухосевой томографии даёт более ясную картину с меньшим уровнем искажений и потому более простую в интерпретации (более подробно описано в тексте). Такая реконструкция была проведена для полисомом и отдельных рибосом (например, первые крио-ЭТ изображения отдельных частиц опубликованы в работе [8]). Изображения представлены с разрешения «Elsevier»

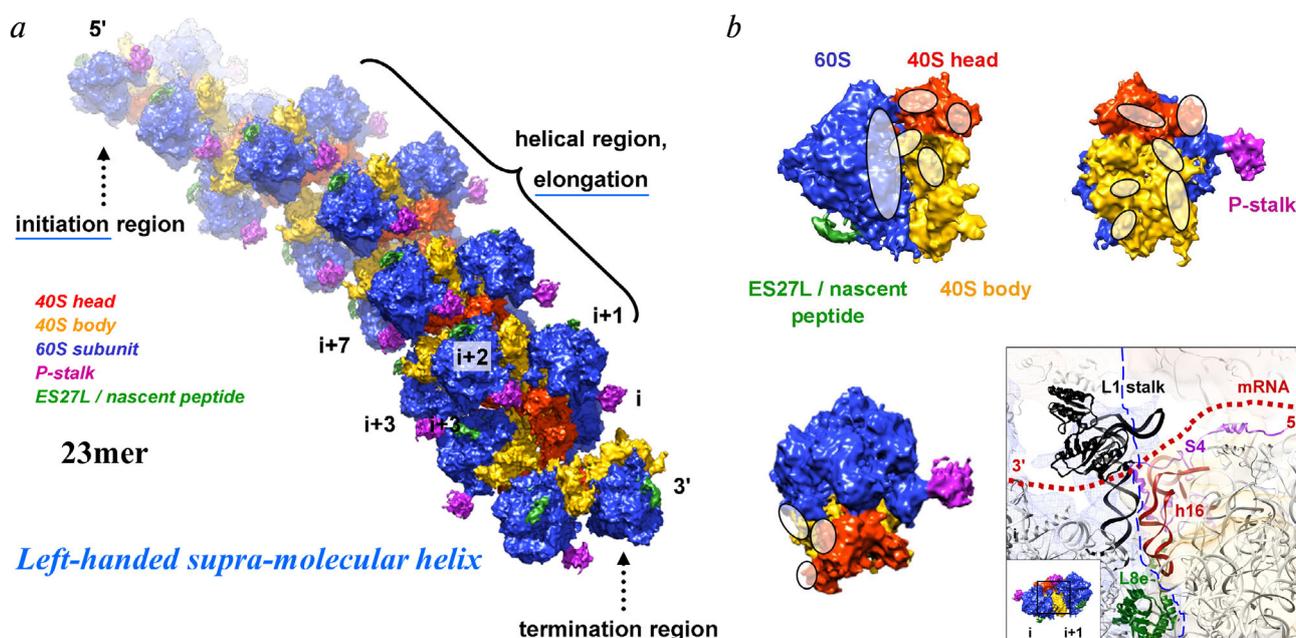


Рис. 4. *a, b* – 3D-реконструкция полисомы, состоящей из 23 рибосом, с использованием крио-ЭТ, усреднённых субтомограмм и молекулярного динамического моделирования. Для получения представления о структуре молекулярного комплекса в данные томограммы вносятся значения усреднённой плотности рибосом с соответствующими параметрами трансляции и вращения. 60S субъединица показана синим цветом, голова и тело 40S субъединицы – красным и оранжевым соответственно, Р-выступ и ES27L/наследственный пептид – розовым и зеленым соответственно. Полученные результаты демонстрируют, что спиральные полирибосомы образуют левозакрученную супрамолекулярную спираль [10]. Аннотированы участки инициации, элонгации и терминации трансляции. Показаны участки контактов между соседними рибосомами (овалы белого цвета; *b*); особенно интересный участок контакта (включающий L1-выступ и спираль h16 18S рРНК) представляет продвижение мРНК, выступающей из рибосомного канала (*i*) рибосомы и входящей в следующую рибосому (*i+1*), при этом последовательность мРНК остаётся защищённой от деградации за счет контакта рибосом

лены Жанной Афонинной, Александром Мясниковым и мной на нескольких международных конференциях, включая GTBio/Французская ассоциация кристаллографии (Париж, 2009); Конференцию по рибосомам (Орвието, Италия, 2010); Конференцию EMBO по биосинтезу белка и регуляции трансляции (Гейдельберг, Германия, 2011); Конференцию J. Monod, Транслирующая рибосома: на пути к зрелым белкам (Роскофф, Франция, 2012); Гордоновская научная конференция по 3D-ЭМ (Жирона, Испания, 2014); Гордоновская научная конференция по 3D-ЭМ (Колледж Колби Соьер, США, 2015); Конференция EMBO: Структура и функции рибосомы (Страсбург, Франция, 2016).

В ядро рабочей группы по изучению рибосомных комплексов входила Жанна Афонина из научной группы Александра Спирина и Владимира Широкова, которая приезжала из Пущино в Страсбург/Илькирш, где на протяжении нескольких месяцев в ходе её учёбы в аспирантуре получала препараты полирибосом в различных условиях и с различными конструкциями мРНК. Кроме того, активным участником работы был Jean-François Ménéret из моей группы, который начал работу с использованием методики элек-

тронной микроскопии с негативным окрашиванием, привнеся свой многолетний опыт работы в этой области; Александр Мясников, член моей группы, который получал образцы для крио-ЭМ и наладил тщательный сбор данных одно- и двухосевой томографии на новом микроскопе «Polara», проделал всю работу по обработке изображений и анализу томограмм (усреднение субтомограмм, седиментационный анализ, динамическое молекулярное моделирование), а также Владимир Широков, Александр Спири и я, руководящие исследованиями и обсуждавшие детали экспериментов со всеми членами команды. Я благодарен всем им. Моменты мозгового штурма и великий дух этой «полисомной команды», которые объединяли исследователей двух стран, навсегда останутся в нашей памяти. При размышлениях о топологии и расположении рибосом в цепи полисом, о подготовке образцов, о проведении томографии этих сложных образцов, при обсуждении результатов и обдумывании последующих шагов. Александр Спири покинул нас в конце 2020 г., а Владимир Широков – еще в 2019 г. Жизнь проходит, но воспоминания остаются, пока время продолжает идти. Александр Спири был невероятным

вдохновением для каждого, выдающимся ученым — страстным и в то же время человечным.

В электронном письме Александру Спирину в конце 2013 г., когда наша статья по полисомной супрамолекулярной спирали готовилась к опубликованию (она вышла позднее в *Nat. Commun.* в 2014 г. [10] вместе с двумя статьями в *Nucleic Acids Res.* [12, 13]), я писал: «Где бы [в каком бы журнале] эта работа ни была опубликована, она будет представлять собой основу для понимания ключевого аспекта биосинтеза белка. И потому я выражаю Вам, Александр, огромную благодарность за то, что мы повстречались осенью 2007 г., сразу после окончания вашего семинара, и начали обсуждать возможности 3D-анализа полисом... С тех пор каждый из нас вложил много сил [речь шла о всех задействованных в этой работе людях, т.е. Владимире Широкове, Жанне Афониной, Александре Мясникове и Jean-François Ménétret], чтобы вместе разработать проект, организовать поездки и обмены, получить соответствующие образцы и начать работу по криоэлектронной томографии, использование которой в нашей области было совсем не очевидно, когда мы всё это начинали. Наша совместная работа была интересной и захватывающей как с научной точки зрения, так и просто с человеческой». Он ответил мне: «Успешное сотрудничество с Вами и вашей группой стало замечательным опытом для всей моей научной команды и меня лично», и осенью 2014 г., когда статья в *Nat. Commun.* была уже на выходе, он написал: «Действительно, все мы сейчас можем сказать, что наша первая встреча, состоявшаяся несколько лет назад, и последующая совместная работа оказались очень плодотворными и привели к получению новых и интересных результатов фундаментального значения». Резюмируя вышесказанное, для меня было большой честью и удовольствием все эти годы работать с Александром Сергеевичем Спириным.

Со времени нашей совместной работы в период с 2008 по 2015 г., параллельно которой появлялись и другие интересные работы по бактериальным и эукариотическим полирибосомам

[14–16] (см. также наши обзоры и главы в книгах [17, 18]), эта область исследований продолжала движение вперед с развитием многоуровневого интегрирования [11, 17, 18] и крио-ЭМ высокого разрешения (на уровне 3 Å и выше), ставшей возможной благодаря появлению прямых детекторов электронов [11, 19] и новых методов обработки изображений. В будущем, вероятно, появится возможность анализа структуры полисом с квазиатомным разрешением, а также *in situ* непосредственно во внутриклеточном контексте, что стало бы осуществлением мечты Александра Спирина. Первые работы в этом направлении с использованием крио-ЭТ высокого разрешения для исследования рибосом внутри клетки были проведены в этом году [20], и полученные результаты указывают на многообещающее будущее этой области исследований.

Благодарности. Я благодарен за поддержку бывшим и настоящим членам моей исследовательской группы в СБИ/IGBMC и членам платформы интегрированной структурной биологии в СБИ/IGBMC.

Финансирование. Я подтверждаю полученную поддержку от следующих структур: Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National pour la Recherche Médicale (Inserm), Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), Institut National du Cancer (INCa), the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Ligue nationale contre le cancer (Ligue), Agence Nationale pour la Recherche (ANR) и USIAS Страсбургского университета (USIAS-2018-012). Работа отдела электронной микроскопии была поддержана такими структурами как Région Grand Est, French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) и Instruct-ERIC.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соответствие этическим стандартам. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов, выполненных автором.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Warner, J. R., Rich, A., and Hall, C. E. (1962) Electron microscope studies of ribosomal clusters synthesizing hemoglobin, *Science*, **138**, 1399–1403, doi: 10.1126/science.138.3548.1399.
- Warner, J. R., Knopf, P. M., and Rich, A. (1963) A multiple ribosomal structure in protein synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **49**, 122–129, doi: 10.1073/pnas.49.1.122.
- Wooding, F. B. (1968) Ribosome helices in mature cells, *J. Ultrastruct. Res.*, **24**, 157–164, doi: 10.1016/S0022-5320(68)80025-5.
- Kopeina, G. S., Afonina, Zh. A., Gromova, K. V., Shirokov, V. A., Vasiliev, V. D., and Spirin, A. S. (2008) Step-wise formation of eukaryotic double-row polyribosomes and circular translation of polysomal mRNA, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 2476–2488, doi: 10.1093/nar/gkm1177.
- Medalia, O., Weber, I., Frangakis, A. S., Nicastro, D., Gerisch, G., Baumeister, W. (2002) Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography, *Science*, **298**, 1209–1213, doi: 10.1126/science.1076184.

6. Spirin, A. S., Baranov, V. I., Ryabova, L. A., Ovodov, S., Alakhov, Y. B. (1988) A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield, *Science*, **242**, 1162-1164, doi: 10.1126/science.3055301.
7. Shirokov, V. A., Kommer, A. A., Kolb, V. A., and Spirin, A. S. (2007) Continuous-exchange protein-synthesizing systems, in *Methods in Molecular Biology, In vitro Transcription and Translation Protocols* (Grandi, G., ed.) Humana Press Inc., Totowa, NJ, **375**, pp. 19-55, doi: 10.1007%2F978-1-59745-388-2_2.
8. Myasnikov, A. G., Afonina, Z., and Klaholz, B. P. (2013) Single particle and molecular assembly analysis of polyribosomes by single- and double-tilt cryo electron tomography, *Ultramicroscopy*, **126**, 33-39, doi: 10.1016/j.ultramicro.2012.12.009.
9. Afonina, Z. A., Myasnikov, A. G., Khabibullina, N. F., Belorusova, A. Yu., Ménétret, J.-F., et al. (2013) Topology of mRNA chain in isolated eukaryotic double-row polyribosomes, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 445-454, doi: 10.1134/S0006297913050027.
10. Myasnikov, A. G., Afonina, Z. A., Ménétret, J.-F., Shirokov, V. A., Spirin, A. S., and Klaholz, B. P. (2014) The molecular structure of the left-handed supra-molecular helix of eukaryotic polyribosomes, *Nat. Commun.*, **5**, 5294, doi: 10.1038/ncomms6294.
11. Orlov, I., Myasnikov, A. G., Andronov, L., Natchiar, S. K., Khatter, H., et al. (2017) The integrative role of cryo electron microscopy in molecular and cellular structural biology, *Biol. Cell*, **109**, 81-93, doi: 10.1111/boc.201600042.
12. Afonina, Z. A., Myasnikov, A. G., Shirokov, V. A., Klaholz, B. P., Spirin, A. S. (2014) Formation of circular polyribosomes on eukaryotic mRNA without cap-structure and poly(A)-tail: a cryo electron tomography study, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 9461-9469, doi: 10.1093/nar/gku599.
13. Afonina, Z. A., Myasnikov, A. G., Shirokov, V. A., Klaholz, B. P., and Spirin, A. S. (2015) Conformation transitions of eukaryotic polyribosomes during multi-round translation, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 618-628, doi: 10.1093/nar/gku1270.
14. Ortiz, J. O., Förster, F., Kürner, J., Linaroudis, A. A., and Baumeister, W. (2006) Mapping 70S ribosomes in intact cells by cryo electron tomography and pattern recognition, *J. Struct. Biol.*, **156**, 334-341, doi: 10.1016/j.jsb.2006.04.014.
15. Brandt, F., Carlson, L. A., Hartl, F. U., Baumeister, W., Grünwald, K. (2010) The three-dimensional organization of polyribosomes in intact human cells, *Mol. Cell*, **39**, 560-569, doi: 10.1016/j.molcel.2010.08.003.
16. Brandt, F., Etchells, S. A., Ortiz, J. O., Elcock, A. H., Hartl, U., and Baumeister, W. (2009) The native 3D organization of bacterial polysomes, *Cell*, **136**, 261-271, doi: 10.1016/j.cell.2008.11.016.
17. Simonetti, A., Marzi, S., Myasnikov, A. G., Ménétret, J.-F., and Klaholz, B. P. (2011) Insights into translation initiation and termination complexes and into the polysome architecture, in *Ribosomes* (Rodnina, M. V., Wintermeyer, W., and Green, R., eds.) Springer, Vienna, doi: 10.1007/978-3-7091-0215-2_10.
18. Ménétret, J.-F., Khatter, H., Simonetti, A., Orlov, I., Myasnikov, A. G., et al. (2013) Integrative structure-function analysis of large nucleoprotein complexes, in *RNA Structure and Folding* (Klostermeier, D., and Hammann, C., eds.), doi: 10.1515/9783110284959.
19. Klaholz, B. P. (2019) Deriving and refining atomic models in crystallography and cryo-EM: the latest Phenix tools to facilitate structure analysis, *Acta Cryst.*, **D75**, 878-881, doi: 10.1107/S2059798319013391.
20. Tegunov, D., Xue, L., Dienemann, C., Cramer, P., and Mahamid, J. (2021) Multi-particle cryo-EM refinement with M visualizes ribosome-antibiotic complex at 3.5 Å in cells, *Nat. Methods*, **18**, 186-193, doi: 10.1038/s41592-020-01054-7.

STUDYING THE STRUCTURAL ORGANIZATION OF POLYRIBOSOMES WITH ALEXANDER S. SPIRIN

Bruno P. Klaholz^{1,2,3,4}

¹ Centre for Integrative Biology (CBI), Department of Integrated Structural Biology, IGBMC (Institute of Genetics and of Molecular and Cellular Biology), 67404 Illkirch, France; e-mail: klaholz@igbmc.fr

² Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 7104, 67404 Illkirch, France

³ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U964, 67404 Illkirch, France

⁴ Université de Strasbourg, 67081 Strasbourg, France

“Would it be possible to analyze molecular mechanisms and structural organisation of polyribosome assemblies using cryo electron tomography?” – we asked through a longstanding collaboration between my research group and that of Alexander S. Spirin. Indeed, it was: we found that double-row polyribosomes can have both circular and linear arrangements of their mRNA [Afonina, Z. A., et al. (2013) *Biochemistry (Moscow)*], we figured out how eukaryotic ribosomes assemble on an mRNA to form supramolecular left-handed helices [Myasnikov, A. G., et al. (2014) *Nat. Commun.*], that the circularization of polyribosomes is poly-A and cap-independent [Afonina, Z. A., et al. (2014) *Nucleic Acids Res.*], and that intermediary polyribosomes with open structures exist after a transition from a juvenile phase to strongly translating polysomes of medium size [Afonina, Z. A., et al. (2015) *Nucleic Acids Res.*] until they form densely packed helical structures with reduced activity. Our joint fruitful exchanges, hence, led to major advances in the field, which are reviewed here from a personal and historical perspective in memory of Alexander S. Spirin.

Keywords: polyribosomes, polysomes, eukaryotic ribosomes, cryo electron microscopy, cryo electron tomography

НЕКАНОНИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ мРНК ВИРУСОВ ЭУКАРИОТ

Обзор

© 2021 И.И. Сорокин^{1,2,3}, К.С. Василенко², И.М. Теренин¹,
Н.О. Калинина^{1,4}, В.И. Агол^{1,5}, С.Е. Дмитриев^{1,6,7*}

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119234 Москва, Россия; электронная почта: sergey.dmitriev@belozersky.msu.ru

² Институт белка РАН, 142290 Пушкино, Московская обл., Россия

³ Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, Московский физико-технический институт, 141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия

⁴ Институт биоорганической химии имени акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия

⁵ ФГБНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), 108819 Москва, Россия

⁶ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991 Москва, Россия

⁷ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 14.06.2021

После доработки 04.08.2021

Принята к публикации 04.08.2021

Для производства своих белков вирусы используют трансляционный аппарат заражённой клетки. При этом их мРНК вынуждены вступать в конкуренцию за рибосомы и трансляционные факторы с многочисленными клеточными матрицами. Чтобы не проиграть в этой борьбе, вирусы применяют специальные стратегии. мРНК многих эукариотических вирусов, размножающихся в цитоплазме, не имеют m⁷G-кэпа на 5'-конце. Однако они могут содержать структуры, привлекающие факторы трансляции и рибосомы альтернативными способами – например, участки внутреннего связывания рибосом (IRES-элементы), которые делают их трансляцию не зависящей от 5'-конца и, как следствие, от m⁷G-кэпа. Другие вирусные мРНК содержат кэп-независимые трансляционные энхансеры (CITE-элементы), которые могут быть расположены, в том числе и в 3'-нетранслируемой области (3'-НТО). В тех случаях, когда посадка рибосомы на мРНК происходит по кэп-зависимому пути, особые структуры в 5'-НТО могут менять формат рибосомного сканирования и узнавания стартового кодона. Необходимость компактизировать геном зачастую приводит к наличию в вирусных мРНК внутренних рамок, для трансляции которых могут использоваться разнообразные механизмы – например, пропускающее сканирование, соскальзывание 43S-комплекса, шунтирование или сопряжённая терминативная-реинициация, требующие особых *cis*-действующих элементов в мРНК. Некоторые из перечисленных особенностей делают вирусные мРНК менее требовательными к набору факторов инициации трансляции, обеспечивая устойчивость к условиям клеточного стресса и антивирусным механизмам клетки. Более того, вирусы могут создавать конкурентные преимущества для трансляции своих мРНК, инактивируя отдельные трансляционные факторы, подменяя их своими или провоцируя развитие стрессового ответа. Многие вирусы реорганизуют мембранные структуры клетки, в том числе с целью создания вирусных трансляционных «фабрик», пространственно изолируя места синтеза своих белков от действия антивирусных систем и обогащая их трансляционными компонентами. Тем не менее зачастую именно трансляция является ахиллесовой пятой их жизненного цикла. Лучшее понимание неканонических механизмов инициации трансляции вирусных мРНК даёт дополнительные ключи к разработке новых подходов в антивирусной терапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: внутренняя инициация трансляции, кэп-независимая трансляция, VPg, TURBS-опосредованная реинициация, кольцевые РНК, факторы инициации трансляции eIF2 и eIF4F, пикорнавирусы PV и EMCV, флавивирусы HCV и DENV, лентивирусы HIV-1 и HIV-2, коронавирус SARS-CoV-2.

DOI: 10.31857/S0320972521090049

ПОСВЯЩЕНИЕ

Мы написали этот обзор, чтобы отдать дань уважения памяти Александра Сергеевича Спирина, замечательного учёного, внёсшего огром-

ный вклад в изучение биосинтеза белка. Хотя основной областью интересов Александра Сергеевича были рибосомология и базовые процессы трансляции, он уделил внимание также и изучению трансляции РНК вирусов. В частнос-

ти, можно упомянуть исследования структуры и регуляции трансляции РНК вирусов растений, изучение особенностей инициации трансляции поксвирусов, использование вирусных механизмов для оптимизации бесклеточных систем синтеза белка. Этот труд написан учениками и друзьями Александра Сергеевича, его коллегами, соавторами и сотрудниками. Все мы восхищаемся им как учёным и человеком и с глубоким уважением и признательностью посвящаем его памяти наш обзор.

ВВЕДЕНИЕ

Наша планета населена вирусами, многие из которых являются патогенами эукариот. Несмотря на то что вирусные геномы могут превышать по своим размерам и сложности геномы некоторых примитивных бактерий, до сих пор не известно ни одного случая, когда они содержали бы полный комплект генов, необходимых для биосинтеза белка [1]. Это делает вирусы полностью зависимыми от клеточного трансляционного аппарата. Однако зачастую они не ограничиваются простым его использованием: многие вирусы способны узурпировать белоксинтезирующую машинерию, направляя львиную долю клеточных ресурсов на производство собственных белков. В ходе эволюции они выработали способность манипулировать разными этапами трансляционного цикла, в первую очередь стадией инициации трансляции. Атакуя отдельные компоненты этой системы и используя неканонические механизмы привлечения рибосом, вирусы обеспечивают конкурентное преимущество своим мРНК и лишают клетку возможности вернуть полноценный противовирусный ответ.

В этом обзоре мы рассмотрим многообразие способов, позволяющих вирусным мРНК выигрывать конкуренцию за трансляционный аппарат заражённой клетки, и основные структурные особенности таких мРНК.

КЛАССИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ мРНК

Цитоплазматические мРНК эукариот имеют на 5'-конце особую химическую структуру, m⁷G-кэп (7-метилгуанозин, присоединённый через 5',5'-трифосфатный мостик к первому нуклеотиду мРНК), а на 3'-конце, за редкими исключениями, — поли(А)-хвост. Эти полифункциональные «метки» узнаются в цитоплазме специальными белками [2–5]. 5'-Кэп в условиях активной трансляции связан с фактором eIF4F, состоящим из трёх субъединиц: небольшого кэп-связывающего белка eIF4E, крупной «платформы» eIF4G и АТР-зависимой РНК-хеликазы eIF4A. 3'-Конец мРНК обычно связан с несколькими молекулами поли(А)-связывающего белка РАВР, который, взаимодействуя с eIF4G, замыкает мРНК в петлю (рис. 1).

Другой набор трансляционных факторов связывается с малой субчастицей рибосомы, формируя преинициаторный 43S-комплекс [6]. Гетеротример eIF2 в комплексе с GTP обеспечивает доставку инициаторной Met-тРНК_i в Р-сайт. Ещё три фактора — eIF1, eIF1A и eIF5 — связываются в непосредственной близости от него и контролируют аккомодацию тРНК. Гигантский белок eIF3, состоящий у млекопитающих из 13 субъединиц, «обволакивает» 40S-субчастицу с разных сторон, контактируя одновременно почти со всеми факторами инициации. Благодаря взаимодействию eIF3 и eIF4G происходит привлечение 43S-комплекса на 5'-конец мРНК. Важно подчеркнуть, что при канонической инициации трансляции эукариотическая рибосома связывается именно в районе 5'-конца мРНК, и там же происходит укладка матрицы в канал 40S-субчастицы. Вслед за этим 43S-комплекс начинает двигаться в направлении 3'-конца, проверяя (сканируя) встречающиеся последовательности на наличие триплета AUG. Узнавание правильного стартового кодона (обычно AUG в

Принятые сокращения: гРНК — геномная РНК; кРНК — кольцевая РНК; НТО — нетранслируемая область; пгРНК — пре-геномная РНК; сгРНК — субгеномная РНК; СаMV — вирус мозаики цветной капусты; СІТЕ — кэп-независимый трансляционный энхансер; СrPV — вирус паралича сверчка; DENV — вирус денге; EMCV — вирус энцефаломиокардита; FCV — кошачий калицивирус; FMDV — вирус ящура; HAV — вирус гепатита А; HaIV — вирус *Halastavi árva*; HCV — вирус гепатита С; HIV-1 — вирус иммунодефицита человека типа 1; HNV — вирус Норуолка человека; IBV — вирус гриппа В; IGR — межцистронный участок; IRES — участок внутренней посадки рибосомы; ITAF — *транс*-действующий фактор, необходимый для работы IRES; ORF — открытая рамка считывания; PEMV-2 — вирус деформирующей мозаики гороха 2; PTE — трансляционный энхансер типа РМV (вируса мозаики проса); PV — полиовирус; RHDV — вирус геморрагической болезни кроликов; RhPV — вирус черёмуховой тли; RRL — лизат ретикулоцитов кролика; SARS-CoV-2 — коронавирус 2, вызывающий тяжёлый острый респираторный синдром; TCV — вирус морщинистости турнепса; TED — трансляционно-энхансерный домен; TLS — тРНК-подобная структура; TMEV — вирус мышинного энцефаломиелита Тейлера; TMV — вирус табачной мозаики; TPL — трёхчастный лидер поздних аденовирусных мРНК; TURBS — участок связывания рибосомы, расположенный до места терминации; TYMV — вирус жёлтой мозаики турнепса; VACV — вирус осповакцины; VPg — вирусный белок, ковалентно связанный с 5'-концом гРНК; WGE — бесклеточная система трансляции из зародышей пшеницы.

* Адресат для корреспонденции.

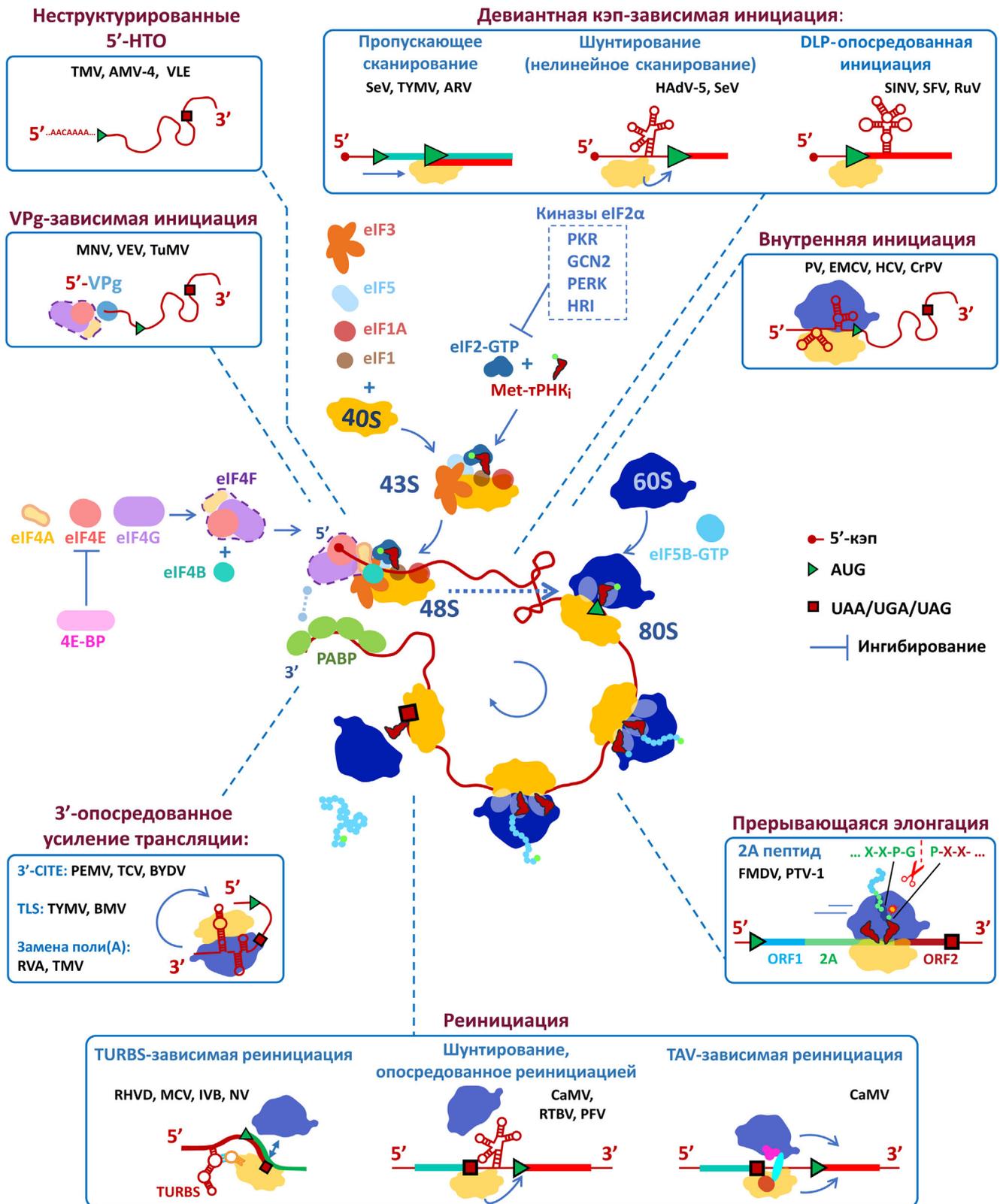


Рис. 1. Трансляционный цикл эукариотической мРНК и основные неканонические механизмы инициации трансляции, используемые вирусными мРНК. Полные названия вирусов приведены в тексте статьи

подходящем нуклеотидном контексте, но иногда — похожего кодона: CUG, ACG, GUG и т.п.) обеспечивается путём тщательного отслеживания конформации Met-тРНК_i в Р-сайте при участии факторов eIF1, eIF2, eIF5 и некоторых субъединиц eIF3. Благодаря их слаженному взаимодействию при распознавании стартового кодона из гидролизованной молекулы GTP, связанной с eIF2, происходит высвобождение фосфата P_i, что вызывает последовательную диссоциацию большинства факторов и необратимую остановку сканирующей рибосомы. На этом этапе с 40S-субчастицей связывается фактор eIF5B, который способствует присоединению 60S-субчастицы. Образовавшийся инициаторный 80S-комплекс готов принять аминоктил-тРНК в А-сайт и перейти к элонгации.

Описанный выше классический механизм инициации трансляции называется кэп-зависимым сканированием и является доминирующим для клеточных мРНК [3, 7]. Разные его этапы могут регулироваться в зависимости от условий, в которых оказывается клетка. В частности, при некоторых видах стресса фактор eIF2 подвергается фосфорилированию, в результате чего он уходит в неактивный комплекс с фактором обмена гуаниновых нуклеотидов eIF2B и перестаёт доставлять Met-тРНК_i в инициаторный комплекс, что приводит к быстрому подавлению клеточной трансляции. Другой объект регуляции — кэп-связывающий аппарат: связывание eIF4E с eIF4G разобщается белком 4E-BP1, активирующимся при дефосфорилировании. Оба пути зачастую включаются в клетке при вирусной инфекции.

Многие вирусы в ходе эволюции выработали способность использовать альтернативные механизмы инициации трансляции, а также манипулировать разными её этапами и изменять регуляцию. Это даёт им возможность обеспечить своим мРНК конкурентное преимущество перед клеточными матрицами.

«ДЕВИАНТНЫЕ» ФОРМЫ КЭП-ЗАВИСИМОЙ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ ВИРУСНЫХ мРНК

В этом разделе мы рассмотрим механизмы инициации трансляции тех вирусных мРНК, которые содержат на 5'-конце стандартную кэп-структуру, однако используют неканонические пути связывания с рибосомой или выбора стартового кодона.

Манипуляции с выбором стартового кодона. Из-за компактности вирусные геномы часто содержат перекрывающиеся кодирующие рамки.

С одной мРНК может быть синтезировано более одного белка — при этом они могут быть закодированы как в разных рамках считывания, так и в одной и той же рамке, беря начало с разных стартовых кодонов (в последнем случае речь может идти о ко-терминальных изоформах или об отдельных белках, получаемых протеолитическим процессингом).

При классическом кэп-зависимом сканировании рибосома не всегда начинает трансляцию с 5'-проксимального AUG-кодона. Сканирующий 43S-комплекс может не узнать AUG и просто «проехать» мимо [7]. Вероятность такого события зависит от нуклеотидного контекста AUG, в первую очередь от нуклеотидов в положениях -3 и +4. Пиримидины в этих позициях уменьшают вероятность узнавания («слабый» контекст), что приводит к явлению, называемому «пропускающим сканированием» (leaky scanning). Пурины в обоих положениях образуют «сильный» контекст, иногда называемый «козак-ковским», в честь открывшей это явление М. Козак. Узнавание может быть усилено стабильной вторичной структурой мРНК на определённом расстоянии к 3'-концу от рассматриваемого триплета, т.к. это замедляет продвижение сканирующего комплекса (см. ниже). Однако даже если комплекс узнал AUG и остановился, для окончательного его закрепления на выбранном кодоне должен произойти гидролиз связанной с eIF2 молекулы GTP и, главное, высвобождение P_i, делающее гидролиз необратимым. Если этого не происходит длительное время (например, в условиях неактивного eIF5), комплекс может возобновить сканирование и доехать до следующего подходящего кодона [8]. Этот второй механизм получил название «соскальзывание 43S-комплекса» (43S sliding), и он не зависит от контекста.

На практике обычно нелегко различить пропускающее сканирование и соскальзывание 43S-комплекса, т.к. оба имеют одни и те же последствия, хотя механизм и кинетика этих процессов различны. Однако поскольку 5'-проксимальные AUG-кодоны, причём в разных контекстах, игнорируются не так редко, оба явления, по-видимому, довольно распространены.

Многие вирусы используют эти механизмы в своих целях. Например, мРНК Р/С мышинного респировируса, более известного как вирус Сендай (murine respirovirus или Sendai virus, SeV), кодирует сразу восемь продуктов, для инициации синтеза трёх из них (С', Р и С, в порядке расположения сайтов инициации) используется пропускающее сканирование [9]. При этом белки С' и С имеют общий С-конец и закодированы в одной рамке, а Р — в другой, сильно перекры-

вающейся с первой. Для попадания инициаторного комплекса на стартовый кодон С-белка ему необходимо пропустить два предыдущих. Это обеспечивается тем, что стартовым кодоном С'-белка является АСG, а в случае Р – контекст AUG-кодона содержит пиримидин в положении –3. Аналогичные принципы позволяют продуцировать несколько белков с одной мРНК и другим вирусам, часто при этом в качестве первого из стартовых кодонов выступает AUG-подобный триплет (см. обзор Firth и Brierley [10]). Один из самых ярких случаев, когда благодаря пропускающему сканированию кодирующий потенциал мРНК используется особенно эффективно, – это субгеномная РНК (сгРНК) некоторых умбравирусов [11], где два довольно крупных белка закодированы в разных, но почти полностью перекрывающихся рамках.

Некоторые вирусные мРНК, возможно, нарушают классические принципы пропускающего сканирования. Например, в случае геномной РНК (гРНК) вируса жёлтой мозаики турнепса (turnip yellow mosaic virus, TYMV) частота инициации на первом из двух кодонов зависит от эффективности узнавания второго и от расстояния между ними [12], что сложно объяснить с позиций классического однонаправленного (5'–3') сканирования даже с учётом всех нюансов [13]. «Облегчённое» пропускающее сканирование на мРНК S1-реовируса птиц (avian reovirus, ARV) позволяет преинициаторному комплексу оказаться на стартовом кодоне рамки 5С. Возможно, в этих случаях первоочередную роль играет соскальзывание 43S-комплекса или выбор меняется в зависимости от концентрации мРНК и факторов в клетке [14]. Пропуск AUG-кодонов возможен не только в случае кэп-зависимой инициации, но и при других случаях сканирования (см. ниже).

Влияние на выбор стартового кодона могут оказывать также специальные элементы вторичной структуры вирусной мРНК. Стабильные шпильки, расположенные на расстоянии 14 нт или немного дальше от инициаторного кодона, не только способствуют его узнаванию, но и могут каким-то образом снижать потребность такой мРНК в некоторых факторах инициации (в частности, eIF2 и eIF4F). Такие структуры, называемые DLP (от *англ.* downstream loop), есть в сгРНК некоторых альфавирусов (например, вируса Синдбис (Sindbis virus, SINV) и вируса леса Семлики (Semliki forest virus, SFV)), а также у родственных им рубивирусов (вируса краснухи (rubella virus, RuV)) [15–17]. В заражённых ими клетках фосфорилирование фактора eIF2 киназой PKR на поздних стадиях инфекции приводит к резкому подавлению трансляции клеточ-

ных мРНК и гРНК самих вирусов [16, 18], однако сгРНК продолжают эффективно транслироваться. Эта трансляция устойчива также к искусственному ингибированию eIF2, хеликазы eIF4A [19, 20] и к разрезанию eIF4G [19], однако всё это справедливо только в контексте вирусной инфекции. Причина этого до конца не понятна, как и механизм доставки Met-тРНК_i в инициаторный комплекс при отсутствии eIF2 в этих условиях [21]. При реконструкции трансляции сгРНК SINV из очищенных компонентов eIF2 может быть заменён на факторы рециклинга и реинициации eIF2D или MCTS•DENR [22], однако эта активность, скорее всего, является для них побочной и едва ли имеет значение *in vivo* [23].

Консервативная шпилька в соответствующем положении кодирующей части, помогающая в выборе стартового кодона (сНР), есть и в мРНК некоторых флавивирусов (например, вируса денге, dengue virus, DENV) [24], однако в этом случае устойчивость трансляции к фосфорилированию eIF2 не задокументирована. Интересно, что мРНК DENV и родственных ему флавивирусов имеют пониженные требования к активности кэп-связывающего аппарата (см. ниже), однако шпилька сНР к этому, по видимому, отношения не имеет [25].

Нелинейное сканирование. Классическая модель рибосомного сканирования предполагает непрерывную инспекцию преинициаторным комплексом всех позиций в 5'-НТО без каких-либо пропусков. Однако в некоторых вирусных мРНК определённые участки лидера как будто избегают такого просмотра. Наличие в этих участках AUG-кодонов или стабильных шпилек, которые обычно препятствуют прохождению 43S-комплекса, не сказывается на уровне трансляции основной рамки. В таких случаях принято говорить о нелинейном сканировании или шунтировании (shunting).

Шунтирование – понятие собирательное. Обычно рассказ о нём начинают со случая 35S-прегеномной РНК (пгРНК) параретровируса CaMV (cauliflower mosaic virus, вирус мозаики цветной капусты), при описании которого и был введён этот термин [26]. Однако мы позволим себе нарушить эту традицию, поскольку сейчас известно, что в основе «шунтирования» на 35S-пгРНК лежит не нелинейное сканирование лидера преинициаторным 43S-комплексом, а особый механизм реинициации трансляции, включающийся после прочтения и терминации на стоп-кодоне первой короткой рамки, расположенной в 5'-НТО (upstream open reading frame, uORF). Поэтому мы опишем этот случай в разделе про реинициацию.

Шунтирование как нелинейное сканирование в полном смысле слова было впервые задокументировано в 1988 г. при изучении трансляции уже упоминавшейся выше мРНК Р/С вируса Сендай [27]. В то время как инициация трансляции первых трёх рамок в этой мРНК происходит по механизму обычного и пропускающего сканирования, на три дистальных стартовых кодона (находящихся в одной рамке и дающих начало ко-терминальным белкам Y1, Y2 и X) рибосомы попадают, минуя проксимальную область [9, 28]. Для этого, однако, требуется кэпированный 5'-конец мРНК Р/С. Механизм шунтирования при инициации на AUG-кодонах Y1 и Y2 (расположенных на расстоянии 15 нт друг от друга) детально изучен. После связывания с 5'-кэпом и сканирования первых ~50 нт лидера преинициаторный комплекс «перескакивает» на стартовые кодоны Y1 или Y2. Выявленного донорного сайта обнаружено не было, а акцепторным сайтом служит локальная окрестность AUG-кодонов Y1 и Y2, включающая необходимую для шунтирования последовательность длиной 24 нт, расположенную сразу за вторым из них. Интересно, что в искусственной конструкции, направляющей рибосому на те же кодоны путём классического кэп-зависимого сканирования, эта последовательность не влияла на эффективность их узнавания (т.е. необходимость в этой структуре не связана с остановкой сканирования, как в случае вышеописанной DLP). Другой уникальной особенностью является то, что стартовые AUG-кодоны Y1 и Y2 могут быть заменены на другие триплеты без потери эффективности шунтирования. Вирусные белки для шунтирования на мРНК Р/С не требуются.

Второй случай, считающийся классическим, — это нелинейное сканирование так называемого трёхчастного лидера (tripartite leader, TPL) поздних мРНК аденовируса 5 человека (human adenovirus 5, HAdV-5), а также мРНК IVa2 этого же вируса. Группа Р. Шнайдера показала, что 40S-субчастица, связавшись с кэпированным 5'-концом и начав сканирование, пропускает затем внутреннюю сильно структурированную часть TPL, причём важную роль в этом шунтировании, по мнению авторов, играет спаривание определённого участка лидера с 18S рРНК [29]. Этот процесс может идти и в незаражённых клетках, но требует каких-то дополнительных белков, помимо канонических инициаторных факторов [30]. При инфекции он дополнительно стимулируется аденовирусным белком 100К, который связывает одновременно TPL и фактор eIF4G [31]. Механизм этого явления не до конца ясен, однако стоит заметить, что

100К содержит RGG-мотив (аргинин-глицин-глицин), который присутствует также в ряде клеточных мРНК-связывающих белков и, как выяснилось значительно позднее, действительно может опосредовать связывание с eIF4G [32]. В случае клеточных RGG-белков, правда, такое взаимодействие приводит к образованию неактивных рибонуклеопротеидов (мРНП). Трансляция, направляемая TPL, устойчива к частичной инактивации eIF4F [33], хотя связано ли это с шунтированием, неизвестно.

Существуют и другие, менее охарактеризованные случаи шунтирования: например, на мРНК папилломавируса 18 человека (human papillomavirus 18, HPV 18), кодирующей белок E1; на бицистронной пгРНК вируса гепатита В уток (duck hepatitis B virus, DHBV); на трицистронной мРНК S1 реовируса ARV; на мРНК 3 коронавируса, вызывающего свинной трансмиссивный гастроэнтерит (transmissible gastroenteritis coronavirus, TGEV), и некоторых других (см. обзоры [10, 34]). Инициация трансляции на всех этих мРНК требует наличия кэпированного 5'-конца, но введение в «шунтируемую» рибосомой область стабильных шпилек и AUG-кодонов не приводит к ингибированию трансляции. Молекулярные механизмы во всех этих случаях также до конца не охарактеризованы, но они, по-видимому, отличаются от двух вышеописанных, поскольку не имеют упомянутых специфических черт.

Особенности инициации трансляции вирусных мРНК с неструктурированными 5'-НТО. мРНК некоторых вирусов имеют лидеры, находящиеся полностью в одноцепочечной конформации. Это понижает их требования к некоторым факторам инициации. Классическим примером является сгРНК 4 вируса мозаики люцерны (alfalfa mosaic virus, AMV), которая содержит U-богатую неструктурированную 5'-НТО длиной 36 нт. В системе *in vitro*, реконструированной из очищенных компонентов, эта мРНК может образовывать инициаторный 48S-комплекс при отсутствии АТФ и факторов группы eIF4 [35]. И хотя в полном клеточном лизате её трансляция, по-видимому, требует целостного фактора eIF4F (см. обсуждение в статье Hann и Gehrke [36]), упомянутые структурные особенности дают этой мРНК конкурентные преимущества перед клеточными матрицами и позволяют относительно эффективно транслироваться даже при отсутствии 5'-кэпа.

Преимущественно одноцепочечную конформацию, по-видимому, имеет также А-богатый омега-лидер мРНК вируса табачной мозаики (tobacco mosaic virus, TMV), способный направлять очень эффективную трансляцию во

многих эукариотических бесклеточных системах, в том числе и в некэпированном виде [37]. В лаборатории А.С. Спирина было показано, что в реконструированной трансляционной системе мРНК с этим лидером может образовывать инициаторный 48S-комплекс при отсутствии eIF4F и АТР [38]. Авторами была предложена модель «диффузионного блуждания» — двунаправленного АТР-независимого сканирования этого лидера, хотя вопрос о том, может ли происходить такой процесс в полном клеточном лизате и тем более в живой клетке, остаётся открытым.

Ещё более выражены необычные свойства неспирализованных 5'-НТО в случае транскриптов с олиго(А)-лидерами, характерными для промежуточных и поздних мРНК вируса осповакцины (*vaccinia virus*, VACV). По ранним оценкам, длина этих лидеров, образующихся при транскрипции путём нематричного синтеза, составляет около 30–40 нт, однако более поздние данные говорят о меньшей длине: от 7–8 нт для промежуточных до 11–20 нт — для поздних [39, 40], и указывают на превалирование некэпированных транскриптов среди мРНК, синтезируемых на этих стадиях инфекции [40]. В работе Shirokikh и Spirin [41] было показано, что в системе сборки инициаторных 48S-комплексов из очищенных компонентов мРНК с олиго(А)-лидерами сходной длины могут обходиться не только без eIF4F, но и без eIF3. Возможно, это свойство лежит в основе преимущественной трансляции мРНК VACV во время инфекции и её устойчивости к разрезанию eIF4G и добавлению аналога кэпа в *in vitro* систему [42, 43]. Похожая ситуация имеет место и в случае мРНК дрожжевых вирусоподобных элементов (*virus-like elements*, VLE) pGKL1/2, которые также имеют олиго(А)-лидеры переменной длины, не превышающей, как правило, 12 нт [44]. Как и в случае VACV, многие транскрипты VLE некэпированы, а их трансляция не требует eIF4E. Чтобы эффективно инициировать трансляцию в инфицированных клетках, длина олиго(А)-лидеров не должна превышать 12 нт [45]. Это объясняется тем, что при большей длине с таким лидером сможет связаться РАВР [5], что приведёт к ингибированию посадки рибосом. В клетках человека, заражённых VACV, преимущественная трансляция мРНК с олиго(А)-лидерами требует фосфорилирования рибосомного белка RACK1 вирусной киназой [46], однако причина этого неясна.

Альтернативный кэп-связывающий аппарат. Отдельного упоминания заслуживают примеры, когда вирусы кодируют собственные кэп-связывающие белки, подменяющие фактор инициа-

ции eIF4F или некоторые из его субъединиц. Поскольку сам способ инициации трансляции при этом остаётся стандартным, мы ограничимся лишь их перечислением, а заинтересованные читатели могут обратиться к ранее опубликованным работам [47, 48]. Так, гигантские вирусы простейших кодируют собственный ортолог фактора eIF4E; кэп-связывающая субъединица PB2 РНК-полимеразы вируса гриппа (*influenza A virus*, IAV) связывает eIF4G и таким образом заменяет клеточный eIF4E (который при инфекции инактивируется) для вирусных мРНК; сходную активность имеет, по-видимому, белок N некоторых аренавирусов (*Junin virus* (JUNV), *Tacaribe virus* (TCRV) и *Pichinde virus* (PICV)); а белок N хантавируса (*Sin Nombre orthohantavirus*, SNV, семейство *Bunyaviridae*) заменяет фактор eIF4F целиком, поскольку обладает активностями всех трёх его субъединиц. В следующем разделе мы рассмотрим случаи, когда функции 5'-кэпа (все или только некоторые) выполняют белки, ковалентно связанные с 5'-концом вирусной мРНК.

VPg-ЗАВИСИМАЯ ИНИЦИАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ

Наличие кэп-структуры не является обязательным для инициации трансляции, зависимой от 5'-конца. Некоторые вирусные мРНК не имеют кэпа, но способны использовать тот же набор факторов инициации, вовлекаемых в трансляцию, в той же последовательности, что и при кэп-зависимой инициации. Для этого вместо кэпа используется белок VPg (*viral protein genome-linked*), ковалентно связанный с 5'-концом РНК и в каком-то смысле подменяющий кэп-структуру. Наличие VPg характерно для многих РНК-вирусов, однако основная функция этого белка связана с репликацией РНК. Использование же его вместо кэпа характерно только для представителей семейств *Potyviridae*, *Caliciviridae* и, возможно, *Astroviridae*.

Яркими примерами являются калицивирусы, инфицирующие млекопитающих. Их VPg может выполнять функцию 5'-кэпа, обеспечивая вирусной мРНК связывание с eIF4E или даже напрямую с eIF4G и РАВР, что описано для представителей родов *Vesivirus* и *Norovirus* [49, 50]. Например, С-концевой участок VPg норовируса мышей (*murine norovirus*, MNV) взаимодействует с HEAT-1-доменом фактора eIF4G, что приводит к эффективной сборке преинициаторного комплекса на вирусной мРНК [50]. Подобные случаи известны и для вирусов растений: VPg потивирусов способен конкурировать

за кэп-связывающий сайт фактора eIF4E. Таким образом, с одной стороны, подавляется кэп-зависимая инициация мРНК заражённой клетки, а с другой — обеспечивается трансляция вирусных мРНК [51]. Помимо этого, для потивирусов показано синергичное действие VPg и PABP: PABP в 3–4 раза усиливает связывание VPg с eIF4F, что стимулирует трансляцию мРНК вируса мозаичности турнепса (turnip mosaic virus, TuMV) в бесклеточной системе из зародышей пшеницы (wheat germ extract, WGE). При добавлении очищенного PABP в систему WGE, истощённую по факторам eIF4F, eIFiso4F и PABP, наблюдалось усиление трансляции вирусной мРНК более чем в 30 раз [52], что практически на порядок превышает стимулирующий эффект PABP на трансляцию клеточных мРНК в этой системе. Возможны и альтернативные механизмы привлечения инициаторного комплекса: так, VPg кошачьего калицивируса (feline calicivirus, FCV) и вируса Норуолка человека (human Norwalk virus, HNV) действуют путём связывания с eIF3 [53].

Помимо привлечения факторов инициации, VPg может выполнять и другие функции в трансляции: например, норовирусные VPg взаимодействуют с G3BP1, одним из ключевых компонентов в формировании стресс-гранул, и это связывание также стимулирует синтез вирусных белков [54]. Важность этих механизмов подчёркивает тот факт, что протеолитическое удаление VPg (например, у вируса везикулярной экзантемы (vesicular exanthema virus, VEV), представителя калицивирусов) приводит к полной потере инфекционности вирусной мРНК [55].

Всё вышеописанное свидетельствует в пользу того, что наличие VPg у потивирусов и калицивирусов является жизненной необходимостью в борьбе за клеточный трансляционный аппарат. Дизайн низкомолекулярных ингибиторов, способных специфично разобщать взаимодействие VPg с его партнёрами, может быть перспективным направлением в лечении заболеваний, вызываемых калицивирусами у млекопитающих и потивирусами у растений.

ВНУТРЕННЯЯ ИНИЦИАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ

Альтернативным способом инициации трансляции является использование особых *цис*-действующих элементов в мРНК, именуемых участками внутренней посадки рибосомы (internal ribosome entry site, IRES). Как правило, IRES-элементы представляют собой высоструктурированные участки мРНК, находя-

щиеся в 5'-НТО или в межгенных спейсерах полицистронных мРНК, отдельные домены которых отвечают за связывание факторов инициации и рибосом, а иногда имитируют тРНК или другие трансляционные компоненты (рис. 2). IRES должен выполнять две задачи: во-первых, привлекать инициаторный комплекс независимо от наличия в мРНК 5'-кэпа, а во-вторых, обеспечивать ремоделирование малой рибосомной субчастицы, позволяющее ей поместить внутреннюю область матрицы в РНК-связывающий канал. Именно второй аспект активности IRES-элемента определяет его способность обеспечивать внутреннюю инициацию трансляции, а не только делать её кэп-независимой. Это отличает IRES-элементы, например, от рассматриваемых ниже кэп-независимых энхансеров трансляции.

Особый способ привлечения инициаторного комплекса зачастую позволяет IRES-содержащим мРНК иметь пониженные требования к набору факторов инициации (а в отдельных случаях и вовсе обходиться без них), что даёт им возможность эффективно функционировать в условиях, когда трансляция клеточных мРНК подавлена. На этом свойстве IRES-элементов многие содержащие их вирусы строят свои стратегии трансляционного приоритета, принудительно инактивируя отдельные компоненты белоксинтезирующего аппарата клетки.

Многообразие и сложности с классификацией IRES-элементов. Известно большое разнообразие вирусных IRES-элементов в плане их структуры и функциональных свойств. Не все они изучены одинаково хорошо, что сильно затрудняет их классификацию. Недавно открытые или малоизученные IRES-элементы часто выделяют в новые типы, что ещё больше запутывает дело. Кроме того, существенная доля работ по идентификации IRES-элементов выполнена без учёта возможных артефактов (см. следующий раздел), из-за чего некоторые случаи, вероятно, могут оказаться ложными. Ситуация осложняется ещё и тем, что у вирусов часты случаи горизонтального переноса между отдалёнными филогенетическими группами, и это не позволяет с уверенностью использовать для классификации таксономическую принадлежность вируса.

На наш взгляд, удобной является классификация, построенная на подобию вторичных структур, механизмов привлечения рибосом и минимального набора необходимых факторов инициации, предопределяемых этой структурой. Для целей данного обзора мы выделим 4 основных типа IRES-элементов, пронумеровав их в порядке истории их открытия, а группы, не вошедшие в эту классификацию, опишем от-

дельно. При этом мы хотели бы подчеркнуть, что мы не претендуем на то, что этот способ классификации лучше тех, которые используют наши коллеги [47, 56–60].

Обстоятельства, затрудняющие изучение IRES-элементов. Успехи в изучении классических IRES-элементов, описанных в следующем разделе, способствовали появлению мнения, что и многие другие вирусные мРНК используют для инициации трансляции механизм внутреннего связывания рибосомы. Действительно, у целого ряда вирусных мРНК 5'-НТО имеют сложную вторичную структуру и содержат uAUG-кодоны (от *англ.* upstream AUG), которые, казалось бы, должны сильно снижать эффективность рибосомного сканирования. При этом такие мРНК продолжают транслироваться в условиях, когда кэп-связывающий аппарат частично инактивирован, а большинство клеточных мРНК неактивны.

Для подтверждения присутствия IRES-элемента в том или ином фрагменте мРНК обычно используется метод бицистронных конструкций, предложенный ещё в первых работах на эту тему [61, 62]. Он основан на оценке экспрессии двух репортёрных генов, находящихся в одной мРНК. Репортёр, расположенный ближе к 5'-концу мРНК, транслируется по кэп-зависимому механизму и служит внутренним контролем. В то же время вторая рамка может эффективно транслироваться, только если рибосомы будут иметь возможность связаться с межцистронной областью, т.е. если в ней будет содержаться функциональный IRES. Этот элегантный подход получил широкое распространение, однако при его неправильном применении и пренебрежении рядом «подводных камней» есть высокий риск получить ложноположительные результаты [63–66].

Одна из основных проблем в применении этого метода — использование плазмид для доставки бицистронных репортёров. Плазмидная ДНК, попадая в культивируемые клетки млекопитающих, помимо ожидаемых бицистронных мРНК, продуцирует в небольших количествах хаотичный набор «нелегитимных» транскриптов — продуктов фоновой промоторной активности и неконтролируемого сплайсинга [64, 67]. Среди них оказываются моноцистронные мРНК, кодирующие тот репортёр, по активности которого оценивается внутренняя инициация. И как бы ни было мало их количество по сравнению с аутентичным бицистронным транскриптом, иногда именно они и обеспечивают всю наблюдаемую продукцию этого репортёра. В качестве альтернативы, лишённой этих недостатков, предлагается использовать бицистрон-

ные мРНК, синтезированные *in vitro* [63, 67], однако этот метод по-прежнему применяется лишь в единичных работах. При этом стоит заметить, что метод РНК-трансфекции также имеет свои ограничения. В частности, при использовании липокатионных реагентов большая часть доставленных в клетку липосом не изливается в цитоплазму, поэтому, например, анализировать количество или стабильность попавшей в клетки мРНК методом RT-qPCR бессмысленно [68].

Однако главный изъян метода бицистронных конструкций проявляется, когда исследователи проводят сравнение уровней экспрессии второго цистрона, направляемых гипотетическими IRES-элементами, между собой (а также с контрольной конструкцией с неспецифичным спейсером). Принципиальный недостаток кроется в субъективности интерпретации результатов такого сравнения [63]. Этот подход оправдан, если в природной мРНК изучаемая область действительно находится в межцистронном положении (как, например, в случае межгенного IRES-элемента *Dicistroviridae*), однако такие ситуации встречаются редко. В случае же 5'-НТО необходимо сравнивать между собой не разные бицистронные конструкции, а бицистронную и моноцистронную конструкции, содержащие изучаемую 5'-НТО в межгенном или 5'-концевом положении соответственно. Именно такое сравнение позволит выяснить, по какому механизму транслируется природная мРНК: если эффективности трансляции, направляемой 5'-НТО в этих двух ситуациях, будут сопоставимы, можно говорить о заметном вкладе внутренней инициации [63]. Впрочем, этот подход также не даёт полной гарантии однозначного вывода, поскольку есть риск, что встраивание изучаемого фрагмента РНК в искусственный контекст может повлиять на его функциональную активность.

Ещё одним источником ложноположительных результатов при поиске IRES-элементов может являться популярная бесклеточная система трансляции, лизат ретикулоцитов кролика (*rabbit reticulocyte lysate*, RRL) с гидролизованной эндогенными мРНК. Эта система не воспроизводит конкурентные условия клетки и имеет обеднённый репертуар РНК-связывающих белков, поэтому транслируемые в ней мРНК демонстрируют относительно слабую зависимость от 5'-кэпа, повышенную чувствительность к вариациям вторичной структуры 5'-НТО и aberrантную внутреннюю инициацию на протяжённых неструктурированных областях, содержащих AUG-кодоны (см. обсуждение в ранее опубликованных работах [63, 65, 69]). Кроме того, часть молекул eIF4G, входящих в состав eIF4F, связана в RRL с эапирированными

5'-концевыми фрагментами гидролизованых мРНК и высвобождается при добавлении ингибиторов кэп-зависимой инициации (m^7GTP , 4E-VP1 или специфичных протеаз, разрезающих eIF4G), что приводит к стимуляции трансляции некэпированных или малоэффективных кэпированных мРНК. Аберрантная внутренняя инициация в случае бицистронных конструкций и ложная кэп-независимость в случае моноцистронных могут быть ошибочно истолкованы как признак наличия IRES. В бесклеточных системах, приготовленных из культивируемых клеток млекопитающих, эти явления обычно не воспроизводятся [69, 70]. Впрочем, при работе даже с такими системами нужно помнить, что результаты могут сильно зависеть от условий приготовления и концентрации компонентов, и с осторожностью соотносить данные, полученные в конкретной бесклеточной системе, с результатами в культивируемых клетках, а тем более *in vivo*.

Далее мы опишем способы IRES-опосредованной инициации на примере наиболее изу-

ченных представителей каждого из четырёх типов (рис. 2, табл. 1), а затем коснёмся тех случаев, которые находятся в процессе изучения и не отнесены пока к какой-либо из категорий либо требуют дополнительного подтверждения.

Классические IRES-элементы типа I. Внутренняя инициация трансляции эукариотической мРНК впервые была показана в конце 1980-х гг. на примере IRES-элемента полиовируса (poliovirus, PV, семейство Picornaviridae) [62, 77], который и стал прототипом IRES-элементов типа I. Представители этой группы обнаружены только в 5'-НТО гРНК некоторых пикорнавирусов, и IRES PV является наиболее изученным из них (рис. 2, а).

Как и у других пикорнавирусов, гРНК PV некэпирована и содержит на 5'-конце белок VPg (который в данном случае, скорее всего, не участвует в инициации трансляции). IRES имеет длину около 650 нт и занимает большую часть ~740-нуклеотидной 5'-НТО. В этой области расположено несколько структурных доменов (II–VI), необходимых для ак-

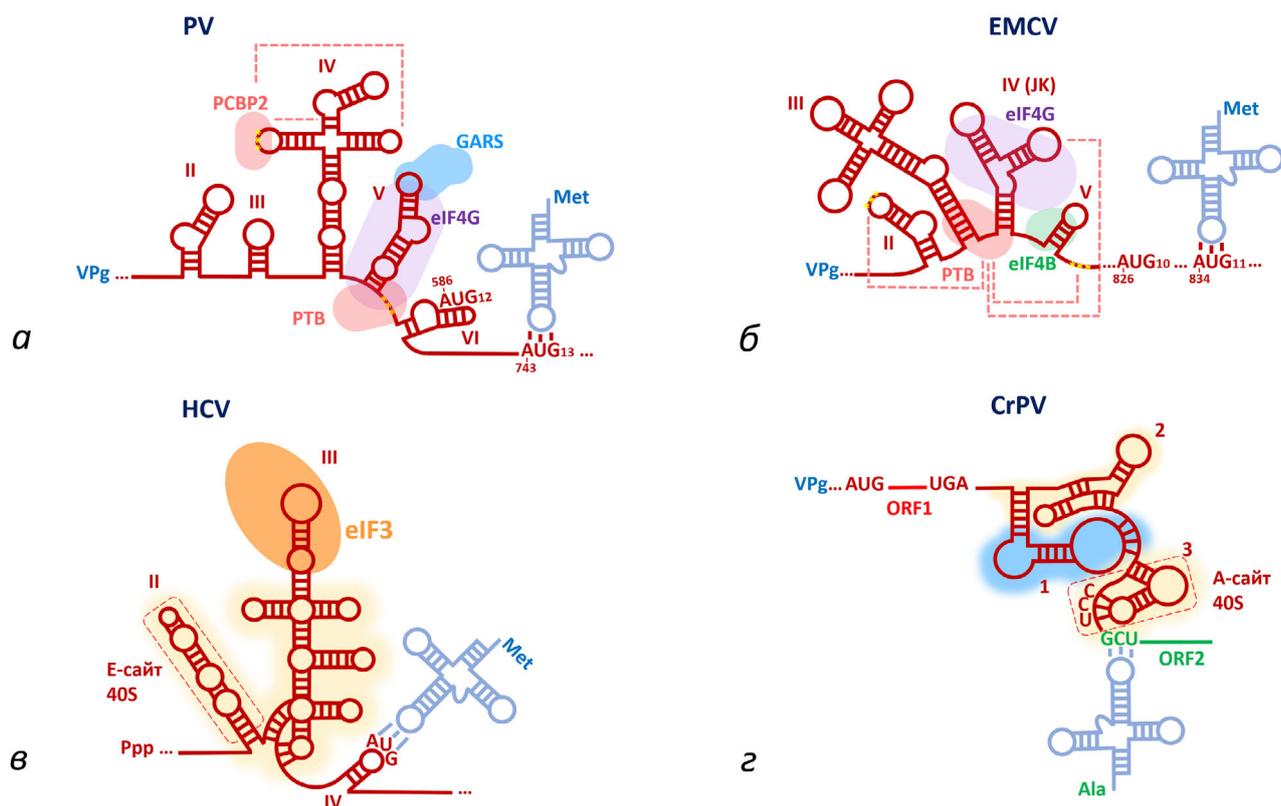


Рис. 2. Основные типы классических IRES-элементов на примере наиболее характерных представителей (полные названия вирусов приведены в тексте статьи). Схематически показана вторичная структура элементов типов I–IV (а–г соответственно), специфично связывающиеся с ними белки, а также области контакта с 40S- и 60S-субчастицами (жёлтое и голубое затенение соответственно). Показаны также аминоксил-тРНК, обеспечивающие доставку N-концевой аминокислоты будущего белка

Таблица 1. Классические типы IRES-элементов и их краткая характеристика

Тип IRES	Необходимые eIF и ITAF*	K_d , нМ	Положение в мРНК	Семейство (Pod) вирусов	Некоторые представители**
I	(eIF1), (eIF1A), eIF2, eIF3, eIF4A, (eIF4B), eIF4G, (PTB), PCBP2, (PCBP1, GARS, UNR, La)	78 (eIF4G) [71]; 40 (eIF4F) [71]; 41 (PTB) [71]; 250 (PCBP1) [72]	5'-НТО	Picornaviridae (Enterovirus)	Poliovirus (PV) <i>Human Coxsackievirus B3 CVB3</i> <i>Human rhinovirus A (HRV)</i>
II	(eIF1), (eIF1A), eIF2, eIF3, eIF4A, (eIF4B), eIF4G; PTB, (ITAF45)	55 (40S) [73]	5'-НТО	Picornaviridae (Cardiovirus) Picornaviridae (Aphthovirus)	Encephalomyocarditis virus (EMCV) <i>Foot-and-mouth disease virus (FMDV)</i>
III	(eIF1A), eIF2/eIF5B, eIF3	1,9 (40S) [74]; 35 (eIF3) [74]	5'-НТО	Flaviviridae (Hepacivirus) Flaviviridae (Pestivirus) Picornaviridae (Senecavirus) Picornaviridae (Teschovirus) Picornaviridae (Enterovirus)	Hepatitis C virus (HCV) <i>Classical swine fever virus (CSFV)</i> <i>Seneca valley virus (SVV)</i> <i>Porcine teschovirus 1 (PTV-1)</i> <i>Porcine enterovirus 8 (PEV8)</i>
IV a	нет (eEF2)	22–26 (40S) [75] 8 (80S) [76]	IGR	Dicistroviridae (Cripavirus)	Cricket paralysis virus (CrPV)
b	нет (eEF2)	25 (80S) [76]		Dicistroviridae (Aparavirus)	<i>Taura syndrome virus (TSV)</i>
c	нет	—		не присвоено	<i>Halastavi árva virus (HalV)</i>

Примечание. Указаны характерные представители (названия вирусов, в мРНК которых они содержатся), расположение в гРНК, необходимые для инициации трансляции факторы и ITAF, а также равновесные константы диссоциации (K_d) для некоторых из них.

* Информация о требованиях к факторам инициации и ITAF основана преимущественно на данных, полученных в опытах по реконструкции инициаторных комплексов из очищенных компонентов, и отражает потребности, характерные именно для этих реконструированных систем; в скобках даны названия факторов, либо стимулирующих сборку (eIF1A, eIF4B, PTB), либо не являющихся абсолютно необходимыми для всех представителей данного типа (ITAF45), либо нужных для дополнительных целей – например, выбора правильного стартового кодона (eIF1), перехода к элонгации (eEF2) или трансляции в других бесклеточных системах (некоторые ITAF).

** Жирным шрифтом выделены названия вирусов с наиболее хорошо охарактеризованными IRES-элементами данного типа.

тивности IRES-элемента [78, 79], за которыми следует слабоструктурированная область длиной 160 нт и стартовый кодон AUG₇₄₃, 13-й по счёту с 5'-конца (рис. 2, a). У основания домена VI расположен олигопиримидиновый тракт (Y_n), включающий консервативную последовательность UUUC. Другие представители этого типа IRES-элементов – например, в гРНК энтеровируса A71 (enterovirus EV-A71), вируса Коксаки типа B (Coxsackievirus B3,

CVB3) и риновируса человека A (human rhinovirus A2, HRV A2) – имеют сходное устройство (подробнее см. в недавно опубликованных обзорах [56, 59, 80]).

Особенностью этого типа IRES-элементов является наличие «криптического» AUG-кодона (в случае PV – это AUG₅₈₆), расположенного внутри домена VI, на расстоянии 18–20 нт в 3'-сторону от Y_n. Этот кодон важен для эффективной работы IRES-элемента [81]. Он может узна-

ваться инициаторным комплексом, однако из-за неоптимального нуклеотидного контекста этот AUG не является основным стартовым кодоном для синтеза вирусного полипротеина. Настоящий стартовый кодон, AUG₇₄₃, находится гораздо дальше — на расстоянии более 100 нт от конца домена VI. В случае HRV аналогичную пару составляют AUG₅₈₉ и AUG₆₂₆, расположенные друг напротив друга вблизи основания шпильки домена VI. У разных вирусов эти два AUG-кодона могут находиться как в одной, так и в разных рамках считывания.

Результаты экспериментов по мутагенезу показывают, что мотив Y_n, криптоический AUG-кодон и разделяющий их спейсер фиксированной длины образуют единый функциональный модуль Y_n-X_m-AUG, который важен для эффективной работы IRES-элемента и, по всей видимости, является местом посадки рибосомы (см. статью Pilipenko et al. [81] и упомянутые в ней более ранние работы). Тандем Y_n-AUG характерен также и для других типов пикорнавирусных IRES-элементов, однако там он может не быть строго необходимым (см. ниже). Особый интерес к этому элементу структуры связан с тем, что он обуславливает нейровирулентность вируса. Сконструированные мутанты высоконейровирулентного для мышей штамма полиовируса, у которых в состав тандема на место криптоического AUG был перемещён основной инициаторный AUG₇₄₃ в благоприятном контексте, проявляли высокую степень аттенуации (уменьшения патогенности) в опытах на мышах. При этом они в значительной степени сохраняли способность размножаться в культивируемых клетках (в том числе нейрональной природы), а их РНК проявляла высокую трансляционную активность в бесклеточной системе из клеток асцитной карциномы Кребс-2, тем самым указывая на наличие/отсутствие именно в клетках центральной нервной системы особого фактора или факторов, определяющих значимость модуля Y_n-X_m-AUG для биологии полиовируса [82]. Интересно, что в вышедшей недавно работе Lulla et al. [83] было обнаружено, что AUG₅₈₉ у ряда энтеровирусов не является «молчащим», а может направлять синтез 65-членного пептида, влияющего на ход инфекции в клетках кишечного эпителия. Возможно, некоторые из ранее описанных эффектов мутаций AUG₅₈₆ на патогенность вируса связаны с нарушением синтеза этого пептида.

Ещё одна интрига заключается в малопонятном механизме попадания рибосомы с участка Y_n-X_m-AUG на основной стартовый кодон AUG₇₄₃. Данные по мутагенезу области между этими кодонами, введению стабильных шпи-

лек и дополнительных AUG позволяют предположить нелинейное сканирование этого региона, напоминающее шунтирование [84, 85]. В случае HRV, где два AUG находятся друг напротив друга в стабильной шпильке, часть рибосом также попадает с AUG₅₈₉ на AUG₆₂₆ путём её шунтирования [86].

Для функционирования IRES-элементов типа I необходим практически весь стандартный для канонической схемы инициации трансляции набор факторов, за исключением eIF4E (табл. 2; [85]). Вместо связывания eIF4E с кэпом начало процессу даёт взаимодействие eIF4G с доменом V IRES-элемента, а дальше последовательность событий очень похожа на стандартную для эукариот: eIF4G связывает eIF3 и привлекает преинициаторный 43S-комплекс, который затем узнаёт AUG-кодон в нижерасположенной области. Есть, однако, и существенные отличия. Прежде всего, посадка 40S-субчастицы на мРНК происходит не с 5'-конца, а на внутренний участок (по-видимому, в районе криптоического AUG); возможно, какую-то роль в этом играет непосредственное сродство IRES-элемента к рибосоме [73]. Кроме того, для работы этих IRES-элементов требуются вспомогательные белки (IRES *trans*-acting factors, ITAF), не принимающие участия в канонической трансляции.

Как правило, в роли ITAF выступают клеточные РНК-связывающие белки, которые либо помогают связаться факторам инициации, либо просто участвуют в поддержании правильной пространственной структуры IRES-элемента, выполняя функцию РНК-шаперонов [56, 60]. Несмотря на то что связывание с IRES-элементами типа I задокументировано для десятков разных белков, лишь для очень небольшого числа этих взаимодействий чётко показана функциональная значимость. В частности, в реконструированной из очищенных компонентов бесклеточной системе для сборки 48S-комплекса на IRES PV из восьми проанализированных ITAF строго необходим оказался всего один, поли(гС)-связывающий белок PCBP2, взаимодействующий с несколькими участками в домене IV (см. статью Sweeney et al. [85] и ссылки в ней), либо его паралог PCBP1. Эффективность образования комплекса несколько усиливалась ещё одним ITAF, полипиримидин-связывающим белком PTB/PTBP1, классическим РНК-шапероном, способствующим привлечению фактора eIF4G [87]. Другие ITAF, такие как GARS [88], La/SSB [89] или UNR/CSDE1 [90], несмотря на специфичное связывание с участками IRES-элемента и на стимуляцию его работы в других *in vitro* систе-

мах, в этом эксперименте на сборку 48S-комплекса не повлияли [85].

Тем не менее, по-видимому, именно набор ITAF и их взаимодействие с отдельными структурными участками РНК определяет тканеспецифичность, присущую активности IRES-элементов типа I *in vivo*. Эта черта важна для вирусного патогенеза. Так, эффекты аттенуирующих мутаций во внутреннем районе 5'-НТО штаммов живой противополиомиелитной вакцины Сэбина, снижающих аффинность к факторам инициации трансляции [71, 91], значительно сильнее выражены в нервных клетках, чем в клетках другой природы [92–94]. Это различие, имеющее прямое отношение к патогенезу полиомиелита, очевидно, объясняется межклеточными вариациями в концентрации или наборе ITAF, или трансляционных факторов.

Ещё один немаловажный аспект патогенеза связан с механизмами, с помощью которых вирусы этой группы обеспечивают трансляционный приоритет своим мРНК. На ранних стадиях инфекции энтеровирусная протеаза 2A расщепляет фактор eIF4G, отрезая от него сайт связывания eIF4E, что влечёт за собой подавление трансляции клеточных мРНК (см. обзоры [56, 80]). Кроме того, деградации подвергается PABP, однако в этом случае полноразмерный белок окончательно исчезает лишь к моменту, когда необходимо переключить трансляцию вирусной РНК на репликацию (мРНК пикорнавирусов полиаденилированы и используют PABP для стимуляции трансляции [95]). Также на поздних стадиях инфекции протеаза 3C разрушает РТВ и PCBP2, что подавляет активность IRES-элемента, и разрезает фактор eIF5B (хотя получающийся в результате протеолиза фрагмент длиннее тех, что успешно работают *in vitro* в реакциях сборки 80S-комплексов, поэтому физиологическая роль протеолиза eIF5B неясна) [80].

В процессе репликации РНК-содержащих вирусов, к которым принадлежит и полиовирус, синтезируется двуцепочечная РНК, что активирует протеинкиназу R (PKR/eIF2AK2). Следствием является фосфорилирование eIF2 α , но при этом трансляция вирусной мРНК продолжается [96]. Одно из возможных объяснений заключается в том, что специфичная к eIF2 α субъединица фосфатазы PP1, CReP/PPP1R15B, способна удерживать активный eIF2 α на мембране эндоплазматического ретикула, где и происходит трансляция вирусных мРНК. Это физически ограждает трансляционные комплексы от инактивирующих киназ [97].

Классические IRES-элементы типа II. IRES-элементы этого типа были открыты в пионерс-

кой работе, выполненной группой Э. Виммера в 1988 г. [61]. В качестве классических представителей этого типа принято рассматривать структуры в 5'-НТО двух пикорнавирусов: вируса энцефаломиокардита (encephalomyocarditis virus, EMCV, из рода кардиовирусов, *Cardiovirus*) и ящура (foot-and-mouth disease virus, FMDV, из рода афтовирусов, *Aphthovirus*). IRES-элементы EMCV и FMDV имеют практически одинаковую длину (около 450 нт) и очень схожую доменную организацию (домены II–V/VI или, по другой номенклатуре, домены H–K/L [98]; рис. 2, б), однако отличаются расположением стартовых кодонов. Кроме того, некоторые аспекты биологии IRES-элементов этого типа были подробно изучены на примере ещё одного кардиовируса – вируса мышинного энцефаломиелита Тейлера (Theiler's murine encephalomyelitis virus, TMEV).

Как и представители предыдущей группы, IRES-элементы типа II содержат высокоаффинный сайт связывания eIF4G, расположенный в домене IV (J–K) [99]. Такой способ привлечения eIF4G делает трансляцию независимой от 5'-кэпа и eIF4E. Однако важно понимать, что само по себе привлечение инициаторных факторов не является достаточным условием для внутренней инициации. Так, при введении одного только домена J–K в 5'-НТО или 3'-НТО репортёрной мРНК её трансляция практически полностью перестаёт зависеть от кэпа, но посадка рибосомы на неё по-прежнему может происходить исключительно с 5'-конца [100]. На этом примере наглядно видно, что пикорнавирусный IRES имеет модульную структуру, в которой домен J–K может рассматриваться как своеобразный CITE (см. ниже), а для укладки мРНК в канал необходимы другие домены.

Посадка рибосомы происходит, как и в случае PV, с 3'-стороны от IRES-элемента. При этом AUG консервативного модуля Y_n–X_m–AUG, расположенного на его границе, в данном случае обычно выступает в качестве инициаторного кодона, а целостность тандема Y_n–AUG не критична для общей активности IRES-элемента, хотя и важна для нейровирулентности вируса (см. ниже). Анализ влияния вставок и делеций, вносимых в эту область у IRES TMEV, позволил сформулировать концепцию «стартового окна» (starting window; [101]). Согласно ей, IRES помещает инициаторный 43S-комплекс на определённый участок мРНК, после чего он может либо узнать AUG-кодон внутри этого участка, либо, при отсутствии там AUG, начать сканирование и выбрать точку старта дальше. Правила выбора инициаторного кодона внутри стартового окна не совсем соответствуют таковым при

стандартном сканировании: с одной стороны, нуклеотидный контекст играет здесь ту же роль, с другой – вероятность узнавания AUG от 5'-концевой границы к 3'-концевой сильно увеличивается, а затем выходит на плато [101]. Эта разница наглядно видна при сравнении распределения 48S-комплексов между AUG-кодонами в инициаторной области EMCV в двух случаях: когда трансляция направляется IRES-элементом и когда большая часть IRES-элемента удалена, а рибосомы садятся с 5'-конца [8, 102]. В первом из них комплексы в основном формируются на AUG₈₃₄ (11-м по счёту), который и является основным стартовым кодоном полипротеина EMCV, а расположенный перед ним AUG₈₂₆, несмотря на хороший контекст, почти не узнаётся рибосомой, т.к. находится, по-видимому, на самой границе стартового окна. Если же рибосомы попадают на эту же область путём кэп-зависимой инициации, то наблюдается обратное распределение в полном соответствии с предсказанием сканирующей модели. Уместно отметить, что сходные правила характерны и для классической 5'-конец-зависимой инициации трансляции в случае AUG-кодонов, находящихся вблизи самого 5'-конца – это сходство, вероятно, обусловлено общими для этих двух случаев особенностями, возникающими при укладке мРНК в канал 40S-субчастицы. Аналогия усиливается тем, что 48S-комплексы на AUG₈₂₆ EMCV можно увидеть в реконструированной трансляционной системе при отсутствии фактора eIF1 – в тех же условиях, в которых удаётся увидеть комплексы на AUG, расположенных вблизи 5'-конца, на кэп-зависимых мРНК [103].

В инициаторной области мРНК EMCV есть ещё один AUG, 12-й по счёту (AUG₈₄₆), который находится в одной рамке с AUG₈₃₄. В некоторых условиях на него может происходить описанное выше соскальзывание 43S-комплекса [8], но в норме он не является инициаторным. А вот FMDV имеет два функциональных стартовых кодона (также находящихся в одной рамке), разделённых протяжённым спейсером длиной 84 нт и дающих начало двум изоформам лидерной (L) протеазы, при этом второй AUG используется чаще [80]. По всей видимости, преинициаторный комплекс собирается на IRES FMDV в окрестностях первого AUG, после чего либо происходит его узнавание, либо eIF1-зависимое сканирование и узнавание второго (см. статью Andreev et al. [104] и ссылки в ней).

Требования к каноническим факторам инициации у IRES-элементов типа II в бескеточной системе в основном такие же, как и у PV-подобных [105, 106]. Однако особого внимания

здесь заслуживают ITAF, которые в ряде случаев определяют биологию вирусов – в частности, их способность синтезировать белки и размножаться в тех или иных типах клеток, а также нейровирулентность *in vivo*. Так, все три упоминавшихся выше IRES-элемента (из EMCV, TMEV и FMDV) требуют для сборки инициаторного 48S-комплекса РТВ, но FMDV нужен ещё и дополнительный ITAF, белок Mpp1/ITAF45/PA2G4 [105, 106]. PA2G4 связан с клеточным циклом и есть только в пролиферирующих клетках, а в нейронах отсутствует – вероятно, поэтому замена IRES-элемента нейровирулентного штамма GDVII вируса TMEV на IRES FMDV приводит к полной потере им способности размножаться в нервных клетках [105].

Интересны случаи взаимосвязи мутаций в участках узнавания ITAF с потерей нейровирулентности без утраты вирусом способности размножаться и синтезировать белки в клетках других типов. Например, у TMEV разрушение тандема Y_n–AUG путём изменения критического расстояния между его полипиримидиновым блоком (который, вероятно, служит одним из сайтов связывания РТВ [107]) и AUG не оказывает существенного влияния на его репродукцию в культуре клеток ВНК-21 и бескеточную трансляцию [101], но резко снижает нейровирулентность для мышей [108]. Известны и другие подобные примеры (см. обсуждение в ранее опубликованных работах [105, 109]). Механизм такой взаимосвязи удалось установить при изучении зависимости нейровирулентности TMEV от взаимодействия IRES-элемента с разными формами РТВ. Клетки центральной нервной системы (в частности, нейроны) содержат мало белка РТВР1, но зато продуцируют его нейрон-специфичный паралог – nРТВ/РТВР2. Обе формы РТВ связываются с одними и теми же участками IRES TMEV и проявляют сравнимую способность стимулировать трансляцию. Однако некоторые мутации в РТВ-связывающих мотивах снижают сродство IRES к nРТВ существенно сильнее, чем к «обычному» РТВ. Эти мутации значительно понижают нейровирулентность вируса, не оказывая существенного влияния на трансляционную активность и его размножение в других клетках [109].

Функциональные свойства *цис*-элементов 5'-НТО IRES-зависимых вирусов влияют также и на характер клинических симптомов вызываемых ими болезней. Сконструированные мутанты TMEV могут вызывать или летальную тетраплегию, или лишь лёгкие неврологические нарушения в зависимости от контекста AUG-кодона, входящего в состав стартового окна [110]. Эти примеры иллюстрируют, как осо-

бенности неканонических механизмов инициации трансляции вирусных РНК, обусловленные структурой соответствующих *цис*-элементов и разнообразием взаимодействующих с ними клеточных факторов, углубляют понимание патогенеза вирусных заболеваний.

Патогенез пикорнавирусов с IRES-элементами типа II связан, конечно же, и с применяемыми ими механизмами подавления клеточной трансляции. Так, вирус ящура кодирует две протеазы, способные расщеплять eIF4G: 3C и L [80]. EMCV не кодирует протеаз, способных разрезать этот фактор, однако при заражении в клетке активируется белок-репрессор 4E-BP1 [111], что приводит к ингибированию кэп-зависимой трансляции и даёт приоритет вирусной мРНК.

В связи с описанными стратегиями репрессии eIF4F уместно упомянуть ещё одну разновидность пикорнавирусных IRES-элементов, обнаруженную в 5'-НТО вируса гепатита А (hepatitis A virus, HAV). Несмотря на явное сходство с пикорнавирусными IRES-элементами типа II, IRES HAV долгое время относили к отдельной группе, поскольку он требует для своей работы полнокомпонентный фактор eIF4F, включающий и eIF4E, и интактный eIF4G [112]. Кроме того, его домен V, связывающий eIF4G, отличается по первичной структуре от J-К-домена EMCV и FMDV. Однако последующие исследования показали, что пространственные структуры этих доменов похожи [113]. Что же касается зависимости от eIF4E – оказалось, что и в случае других пикорнавирусных IRES-элементов eIF4E положительно влияет на аффинность eIF4G и helicазную активность eIF4A [114], так что специфика HAV IRES оказалась, скорее, в степени этой зависимости. В любом случае протеолиз eIF4G не является необходимым для функционирования IRES-элементов типов I и II: в начале инфекции вирусные протеазы ещё не синтезированы, поэтому для привлечения рибосом используется интактный eIF4F.

Классические IRES-элементы типа III. Данная группа представлена в мРНК нескольких семейств вирусов: Flaviridae, Picornaviridae и, возможно, отдельных представителей Dicistroviridae. Механизм работы этого типа элементов лучше всего изучен для IRES из 5'-НТО вируса гепатита С (hepatitis C virus, HCV) из семейства флавириусов (рис. 2, в) [115]. Инициация на 5'-НТО HCV длиной ~330 нт в отличие от вышеописанных механизмов не включает стадию сканирования. IRES связывает 40S-субчастицу рибосомы напрямую [116], при этом AUG-кодон оказывается в непосредственной близости от Р-сайта малой субчастицы рибосомы. Более крупный домен III связывается с 40S-субчастицей со сто-

роны, обращённой в раствор, взаимодействуя как с рибосомными белками, так и с рРНК, а домен II располагается в районе Е-сайта (см. ранее опубликованные статьи [117–120] и ссылки в них). Помимо 40S-субчастицы, IRES HCV способен связывать и фактор eIF3 [121], хотя стабильность комплекса РНК • 40S ($K_d = 1,9$ нМ) гораздо выше, чем комплекса РНК • eIF3 ($K_d = 35$ нМ) [74]. Ранние эксперименты *in vitro* показали, что для инициации на мРНК HCV принципиально необходимы лишь факторы eIF2 и eIF3 [116]. eIF1A помогает стабилизировать Met-тРНК_i в Р-сайте [122]. Дополнительные белки (ITAF) не являются обязательными, хотя некоторые из них, возможно, способны усиливать трансляцию, направляемую IRES-элементом HCV [123]. В недавней работе показана важная роль модифицированных нуклеотидов (m^6A), а также m^6A -связывающего белка YTHDC2 в активности IRES-элемента HCV [124].

Позднее классический eIF2-зависимый путь оказался не единственным вариантом доставки Met-тРНК_i. Выяснилось, что трансляция, направляемая IRES HCV, может идти и при недоступности функционального eIF2 (при его фосфорилировании в условиях клеточного стресса или при добавлении специфичных ингибиторов) [125, 126]. *In vitro* было показано, что доставка Met-тРНК_i в 48S-комплекс на HCV-подобных IRES-элементах возможна с помощью eIF5B, ортолога бактериального IF2 [126, 127], что затем подтвердили структурные исследования [128]. В системе сборки из очищенных компонентов функциональный инициаторный комплекс на IRES HCV может быть сформирован также с помощью факторов 40S-рециклинга и реинициации: eIF2D или димера MCTS1 • DENR [22, 129, 130]. Однако нокаут гена *EIF2D* не приводит к потере eIF2-независимости IRES HCV [122, 131], что может говорить о том, что этот фактор, скорее всего, не участвует в инициации трансляции мРНК HCV в живых клетках (хотя для более корректного эксперимента следовало бы одновременно удалить eIF2D и один из компонентов димера MCTS1 • DENR, т.к. эти факторы взаимозаменяемы [22, 132]). В работе Kim et al. [133] активность по доставке Met-тРНК_i при инициации трансляции HCV была также приписана фактору eIF2A, хотя в прямом эксперименте по сборке инициаторного комплекса он не был активен [129], а нокаут его гена не приводил к потере устойчивости к инактивации eIF2 [122, 131]. Более того, преинициаторный комплекс с Met-тРНК_i на некоторых IRES-элементах этого типа можно получить и без участия трансляционных факторов, что описано для IRES обезьяньего

пикорнавируса 9 (simian picornavirus type 9, SPV9) [134]. На IRES HCV такой комплекс удалось получить только при нефизиологически высокой концентрации Mg^{2+} [135], но этот путь, по-видимому, крайне неэффективен [126].

Изначально предполагалось, что положение eIF3 в инициаторном комплексе на IRES типа III совпадает с положением eIF3 в аналогичных комплексах, образуемых в процессе кэп-зависимой трансляции. Однако структурные исследования показали, что сайты связывания IRES и eIF3 на поверхности 40S-субчастицы перекрываются. Это предполагает иную ориентацию eIF3 в инициаторных комплексах, образованных на HCV-подобных IRES-элементах. Так, в комплексе 40S, eIF2, eIF3 и DHX29 с IRES CSFV, лишённым домена II, белок eIF3 вообще не образует контактов с 40S-субчастицей [120]. На этом основании было высказано предположение, что основным предназначением связывания eIF3 IRES-элементами этого типа является конкурентное ингибирование клеточной трансляции. Так ли это на самом деле, должны показать дополнительные эксперименты. Отметим, однако, что лишённые домена II IRES-элементы HCV и CSFV не способны образовывать 80S-комплекс [127, 136], а eIF5B-зависимый механизм доставки инициаторной тРНК требует участия eIF3 [126, 127].

Интересен процесс захвата («угона», *англ.* hijack) транслирующей рибосомы IRES-элементами этого типа. Методами спектроскопии одиночных молекул и криоэлектронной микроскопии показано, что IRES HCV способен связывать рибосому, транслирующую другую мРНК или ту же мРНК, в которой он находится. IRES прочно связывается с платформой 40S-субчастицы и, предположительно, остаётся в таком состоянии до момента терминации. После высвобождения синтезированного пептида и разборки рибосомы домен II IRES-элемента укладывается в Е-сайт, направляя РНК HCV в мРНК-связывающий канал [137]. Такой способ «резервирования» рибосомы, вероятно, помогает вирусной РНК получить трансляционный приоритет в заражённой клетке.

HCV-подобные IRES-элементы, помимо Flaviviridae, встречаются ещё и в некоторых группах Picornaviridae (подробнее см. в обзоре Arhab et al. [59]), что подтверждает существование горизонтального переноса не только генов, но и отдельных регуляторных элементов вирусных мРНК.

Классические IRES-элементы типа IV. Вышеперечисленные типы IRES требуют участия хотя бы некоторых факторов инициации для обеспечения внутренней посадки рибосомы. Но суще-

ствуют IRES-элементы, не требующие для работы ни факторов инициации, ни вспомогательных белков, таких как ITAF, ни даже инициаторной Met-тРНК, [138]. Направляемая ими трансляция начинается не с метионина [138, 139]. Подобные IRES-элементы отличаются малой длиной (~200 нт) и найдены пока только у представителей семейства Dicistroviridae, где они располагаются в межцистронном участке (intergenic region, IGR) гРНК [56]. Независимость от факторов инициации и взаимодействие с высококонсервативной межсубъединичной областью рибосом позволяет этим IRES-элементам иницировать трансляцию в гетерологичных системах – например, клетках (и их экстрактах) млекопитающих, насекомых, растений, простейших, дрожжей и даже бактерий [58] – что совершенно не характерно, например, для IRES-элементов типов I, II и III.

На данный момент известны три подгруппы IRES-элементов типа IV. Классическим представителем подтипа IVa, как и всего типа в целом, является IRES из IGR вируса паралича сверчка (cricket paralysis virus, CrPV), отвечающий за трансляцию второго цистрона его гРНК (рис. 2, з). Три домена этого IRES-элемента, содержащие псевдоузлы (см. статью Pflingsten et al. [140] и ссылки в ней), напрямую связывают рибосому и функционально подменяют тРНК и трансляционные факторы [138, 141, 142], что позволяет собирать готовую к элонгации 80S-рибосому, минуя классические стадии инициации. Детали этого механизма были выяснены с помощью криоэлектронной микроскопии: домен 3 IRES CrPV и подобных ему вирусов связывается с А-сайтом рибосомы, при этом входящий в его состав псевдоузел I (PKI) мимикрирует под тРНК, находящуюся в кодон-антикодонном взаимодействии с мРНК [141, 143]. В процессе псевдотранслокации под действием фактора элонгации eEF2 домен 3 перемещается в Р-сайт, освобождая А-сайт для eEF1A-зависимой посадки Ala-тРНК^{Ala} (GCU – первый кодирующий кодон второго цистрона CrPV) [75, 141, 144, 145]. Синтез полипептидной цепи начинается после следующего (второго) акта транслокации, т.е. сразу со стадии элонгации – благодаря чему первым аминокислотным остатком в белке становится аланин [138]. Методом FRET показано, что IRES CrPV способен связываться как со свободной 40S-субчастицей, так и с полностью собранной 80S-рибосомой [75].

Подтип IVb представлен IGR IRES-элементами вирусов синдрома Тауры (Taura syndrome virus, TSV), красного огненного муравья (*Solenopsis invicta* virus 1, SINV-1) и паралича медоной пчелы (honey bee paralysis virus, HBPV).

От IRES-элементов подтипа IVa их отличает наличие дополнительной шпильчатой структуры (SLIII) в домене 3, роль которой до конца не ясна. Удаление этой шпильки хотя и не препятствует связыванию с 80S-рибосомой или транслочационной активности eEF2, но делает продуктивную трансляцию невозможной [76, 146]. Структурные исследования показывают, что SLIII принимает участие в имитации тРНК и взаимодействует с 28S рРНК [143]. По всей видимости, SLIII необходима для корректного позиционирования IRES-элемента на рибосоме, но, возможно, как-то влияет и на транслочацию [76, 143].

Особенности недавно охарактеризованного механизма инициации на IGR IRES вируса *Halastavi árva* (HalV), выделенного из содержимого кишечника пресноводного карпа, позволили отнести его к отдельному подтипу IVc. Главным его отличием от CrPV является неспособность связываться со свободной 40S-субчастицей из-за отсутствия функционального домена 2. IRES HalV связывает 80S-рибосому при помощи домена 1, взаимодействующего с 60S-субчастицей, в то время как домен 3 связывается с 40S-субчастицей сразу в Р-, а не в А-сайте. Как следствие, инициация на IRES HalV не требует eEF2-зависимой псевдотранслочации, что делает его простейшим из всех известных на данный момент механизмов инициации трансляции [147].

Помимо трансляции рамки, кодирующей белки оболочки, некоторые IGR IRES способны также направлять трансляцию альтернативных (+1 и +2) рамок считывания. Механизм и физиологическое значение этого процесса пока поняты не до конца (см. обсуждение в работах [148, 149]). Вторая интересная черта, свойственная лишь некоторым из упомянутых групп вирусов, — очень стабильная шпилька (SLVI) длиной 14–18 п.н. на конце первого цистрона, непосредственно перед началом IRES-элемента. Вероятно, эта шпилька помогает регулировать поток рибосом «на подходе» к IRES-элементу, препятствуя его разворачиванию [149].

Химерные и неклассифицированные IRES-элементы. Говоря о Dicisroviridae, необходимо отметить, что мРНК этих вирусов модифицированы VPg, поэтому трансляция их первого цистрона также не может быть кэп-зависимой. Она направляется IRES-элементами, при этом разные вирусы этого семейства используют различные стратегии для привлечения рибосом. Первая заключается в том, что 5'-НТО содержит протяжённые одноцепочечные участки, способные «неспецифично» связывать 40S-субчастицу в присутствии фактора eIF3 [150, 151]. Подоб-

ные неструктурированные последовательности обычно обогащены остатками уридина или аденина, как в случае 5'-концевых IRES-элементов вируса черёмуховой тли (*Rhopalosiphum padi* virus, RhPV) и HalV соответственно. Для образования инициаторного комплекса строго необходимы лишь eIF2, eIF3 и сама 40S-субчастица, однако для нахождения стартового кодона путём ограниченного сканирования нужен также eIF1, а eIF1A и факторы группы eIF4 сильно стимулируют сборку [150, 151]. Из-за того, что в этом механизме не используется специфичное связывание мРНК с компонентами трансляционного аппарата, 5'-концевой IRES RhPV обеспечивает инициацию трансляции в любых эукариотических системах, от дрожжей до млекопитающих.

В то же время 5'-концевой IRES другого представителя Dicisroviridae, уже упоминавшегося вируса CrPV, имеет, по-видимому, отдалённое функциональное сходство с IRES HCV, несмотря на различие их структур. Он специфично связывает фактор eIF3, причём в данном случае это взаимодействие строго необходимо для посадки 40S-субчастицы [152, 153]. Как и IRES HCV, 5'-концевой IRES CrPV взаимодействует с «факультативным» рибосомным белком RACK1, что объясняет обнаруженную ранее зависимость трансляции первого, но не второго цистрона CrPV от этого белка [154]. Тем не менее детальный структурно-функциональный анализ реконструированного комплекса этого IRES-элемента с очищенными 40S и eIF3 выявил ряд уникальных черт [152]. Три его домена охватывают «голову» 40S-субчастицы, взаимодействуя с белками и рРНК, а одноцепочечная область, следующая за доменом III, оказывается уложенной в мРНК-канал. Добавление Met-тРНК_i либо eIF2, либо eIF5B приводит к образованию преинициаторного комплекса, в котором в Р-сайте находится не стартовый кодон AUG₇₀₉, а предшествующий ему uAUG₇₀₁. Чтобы комплекс собрался именно на стартовом AUG₇₀₉, необходимы дополнительные факторы — eIF1 и eIF1A, причём в этом случае eIF2 уже не может быть заменён на eIF5B [152]. Это подразумевает локальное сканирование инициаторной области, напоминающее таковое у вышеописанного IRES EMCV. Интересно, что uAUG₇₀₁ открывает микрорамку AUGUGA, поэтому при реальной трансляции нельзя исключить попадания рибосомы на стартовый кодон AUG₇₀₉ также и в результате реинициации.

Ещё одной группой IRES-элементов, не попадающих в приведённую нами классификацию, являются обнаруженные у некоторых пикорнавирусов «химерные» IRES-элементы.

По доменной организации они сходны с типами I и II, однако одни домены в их составе больше похожи на соответствующие участки IRES-элементов типа I, а другие — на домены элементов типа II [59]. Среди представителей Flaviviridae также есть вирусы, несущие IRES-элементы пикорнавирусного типа с плохо охарактеризованной структурой [59].

В силу слабой изученности не подлежит пока однозначной классификации IRES, обнаруженный в вирусе мозаики пшеницы (*triticum mosaic virus*, TriMV). Некэпированная мРНК этого вируса имеет необычно большую для растительных вирусов 5'-НТО (739 нт), содержащую 12 uAUG, что исключает эффективную инициацию трансляции с использованием сканирующего механизма. И действительно, помещение стабильной шпильки на 5'-конец вирусной мРНК не приводит к подавлению трансляции. Механизм работы этого IRES-элемента изучен недостаточно, но известно, что он связывает eIF4G [155]. Это, как и наличие важной для трансляции полипиримидиновой последовательности перед инициаторным кодоном, возможно, роднит его с пикорнавирусными IRES-элементами типов I и II [156], однако утверждать это наверняка пока нельзя.

Случаи, требующие дополнительного изучения. В силу большой социальной значимости вируса иммунодефицита человека 1 (*human immunodeficiency virus type 1*, HIV-1) исследованию трансляции его мРНК посвящено множество работ. мРНК HIV-1, синтезируемые клеточной РНК-полимеразой II с провирусной ДНК, кэпированы и полиаденилированы. Альтернативный сплайсинг приводит к образованию нескольких транскриптов, кодирующих различные вирусные белки, а несплайсированная (она же геномная) РНК кодирует gag-pol. Её 5'-НТО имеет длину 335 нт и содержит ряд элементов вторичной структуры, необходимых для репликации вируса, и стабильную шпильку, называемую TAR, расположенную на самом 5'-конце гРНК. Считается, что такие шпильки эффективно ингибируют 5'-конец-зависимую инициацию трансляции. С другой стороны, наличие 5'-кэпа и отсутствие uAUG-кодонов в 5'-НТО говорят, скорее, в пользу стандартного механизма инициации трансляции этой мРНК. Подобно пикорнавирусам, HIV-1 кодирует протеазу, которая способна разрезать eIF4G (а также РАРВ) [157–160]. Однако она действует лишь на один из паралогов eIF4G — eIF4G1/eIF4G1, не затрагивая второй, eIF4G2/eIF4G3 [158, 159]. Данные об эффектах этого разрезания противоречивы: в одних работах оно подавляло трансляцию только клеточных мРНК, не затра-

гивая синтез gag и трансляцию репортёрных мРНК с пикорнавирусными IRES, в других — отрицательно действовало на любые мРНК (включая репортёры с лидером HIV-1 и пикорнавирусными IRES), кроме тех, которые содержали IRES HCV [157–159]. Пикорнавирусные же протеазы подавляют трансляцию мРНК HIV-1, что контрастирует с их эффектом на классическую IRES-зависимую инициацию.

Тем не менее в ряде работ были сделаны попытки показать наличие в несплайсированной мРНК HIV-1 IRES-элемента [161–163]. К сожалению, в большинстве из них авторы использовали бицистронные плазмиды и RRL, а основным подходом было сравнение разных бицистронных конструкций между собой. В единственной на сегодняшний день работе, где применяли мРНК-трансфекцию клеток, никакого значимого вклада внутренней инициации в трансляцию, направляемую 5'-НТО HIV-1, обнаружено не было [164]. Такой же результат был получен и в бесклеточных системах на основе лизатов культивируемых клеток. Выяснилось, что шпилечная структура TAR, очень сильно подавляющая трансляцию в RRL [165], слабо влияет на неё в живых клетках [164]. Введение же uAUG в 5'-НТО HIV-1 значительно подавляло трансляцию вирусной мРНК, что лучше сочетается с кэп-зависимым сканированием, чем с внутренней инициацией [164, 166]. В то же время нельзя исключать, что в трансляции мРНК HIV-1, помимо канонических факторов инициации, задействованы какие-то вспомогательные белки, облегчающие сканирование структурированного лидера — например, РНК-хеликазы RHA/DDX9 и DDX3, компонент ядерного кэп-связывающего комплекса CBP80/NCBP1 или вирусный белок Tat (см. обсуждение в статье Smirnova et al. [164]).

Ещё более экстравагантная гипотеза предполагает наличие IRES-элемента внутри кодирующих последовательностей gag HIV-1 и HIV-2 [167–169]. Сама возможность существования IRES-элемента целиком в кодирующей части, где его структура будет постоянно нарушаться транслирующими рибосомами, представляется несколько сомнительной, и аргументы в пользу его присутствия там также нельзя назвать убедительными. Для его изучения авторы использовали *безлидерную* мРНК — то есть мРНК, вообще не имеющую 5'-НТО [167–169]. Это исключало какое-либо влияние природной 5'-НТО на трансляцию. При этом авторы исходили из предпосылки, что безлидерная мРНК не может эффективно иницировать трансляцию по 5'-конец-зависимому механизму. Однако это предположение расходится с фактами: такие

мРНК в эукариотических системах могут использовать до четырёх разных способов инициации трансляции, включая классический [170, 171]. Ещё один аргумент авторов состоит в том, что инициация на 5'-концевом AUG-кодоне безлидерной мРНК с гипотетическим IRES-элементом в кодирующей части имеет иные требования к концентрациям факторов инициации, чем трансляция с внутренних AUG-кодонов [167]. Однако подобные различия описаны и для обычных кэп-зависимых мРНК, содержащих несколько стартовых кодонов [14, 172]. Таким образом, несмотря на обилие работ, изучавших инициацию трансляции мРНК ретро- и лентивирусов [173], пока нельзя утверждать, что она происходит по какому-то необычному механизму.

Неканонический механизм инициации трансляции несомненно характерен для мРНК представителей семейства *Flaviviridae*: вирусов Зика (*Zika virus, ZIKV*), лихорадки Западного Нила (*West Nile virus, WNV*), жёлтой лихорадки (*yellow fever virus, YFV*) и уже упоминавшегося *DENV*. Хотя эти мРНК кэпированы, их эффективная трансляция продолжается и после инактивации eIF4E и eIF4G, а наличие функционального кэпа не является необходимым [25, 174, 175]. По одним данным, это свойство полностью определяется 5'-НТО вирусной мРНК [174, 175], по другим – требует взаимодействия 5'- и 3'-НТО [25], однако описанная ранее шпилька sHP в кодирующей части для этого точно не требуется. Несмотря на то что в 2006 г. у 5'-НТО мРНК *DENV* было показано отсутствие IRES-активности [25], две недавние работы [174, 175] оспаривают это утверждение. С учётом вышеописанных сложностей в интерпретации результатов, полученных методом бицистронных конструкций, разобраться в этом вопросе помогли бы дополнительные исследования. Тем не менее не вызывает сомнений тот факт, что механизм инициации трансляции этих вирусных мРНК является нестандартным.

Ещё одним недостаточно изученным случаем является полипуриновый IRES в сгРНК растительного вируса сгTMV. Он направляет синтез вирусного белка оболочки (СР), закодированного во втором цистроне этой бицистронной мРНК. Отсутствием стабильной вторичной структуры он напоминает вышеописанные IRES-элементы из 5'-НТО вирусов *RhPV* и *HaIV*: богатая остатками аденинов последовательность, по-видимому, формирует протяжённые одноцепочечные участки, которые способны обеспечивать внутреннюю инициацию трансляции не только в растениях, но также и в дрожжах

и клетках млекопитающих [176]. С другой стороны, как и все тобамовирусы, сгTMV кодирует отдельную моноцистронную сгРНК СР, из-за чего вклад трансляции бицистронной мРНК в общий синтез СР составляет около 3% [177]. Схожая оценка вклада внутренней инициации была сделана и для неструктурированного IRES-элемента из вируса морщинистости турнепса (*turnip crinkle virus, TCV*) [178]. Физиологическую роль такого «запасного» механизма синтеза СР ещё предстоит выяснить.

СТРУКТУРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ В 3'-НТО ВИРУСНЫХ мРНК, ВОВЛЕЧЕННЫЕ В ИНИЦИАЦИЮ ТРАНСЛЯЦИИ

На первый взгляд, размещение энхансеров трансляции на 3'-конце мРНК, т.е. на максимальном удалении от места, где происходит инициация, кажется несколько странным. Однако необходимо помнить, что трансляция вирусной гРНК конкурирует с её репликацией. Размещение трансляционных энхансеров близко к 3'-концу гРНК является изящным решением этой проблемы: начиная синтез отрицательной цепи, РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp) практически сразу «плавит» структуру 3'-концевых элементов, ингибируя трансляцию и тем самым обеспечивая беспрепятственную репликацию генома. К примеру, было показано, что связывание RdRp с 3'-НТО гРНК *TCV* вызывает необратимую структурную перестройку 3'-концевого элемента, тем самым обеспечивая начало репликации и ингибируя встречную трансляцию РНК [179].

Кроме того, (+)РНК-вирусы в качестве матриц для синтеза белков часто используют сгРНК, которые преимущественно являются 3'-концевыми фрагментами гРНК. В ряде случаев трансляция сгРНК регулируется теми же 3'-концевыми элементами, что и трансляция полноразмерной гРНК. Такая унификация позволяет вирусам реализовывать свойственную им стратегию компактизации генома.

В отличие от вирусов животных, большинство вирусов растений заинтересованы в выживании клетки-хозяина, т.к. это способствует их распространению в соседние клетки через плазмодесмы. Поэтому полное подавление синтеза клеточных белков путём высокоэффективной прямой конкуренции или путём разрушения части элементов клеточного аппарата трансляции для них нехарактерно. Как правило, гРНК вирусов растений не являются более эффективными матрицами по сравнению с клеточными РНК, но постоянно связанные с их 3'-концевыми

ми структурными элементами ключевые факторы инициации и/или рибосомные субчастицы могут обеспечить их оптимальную трансляционную активность, достаточную для размножения вируса и не зависящую от уровня трансляции клеточных мРНК.

3'-Концевые энхансеры трансляции (3'-CITE).

Большинство (+)РНК-вирусов растений, 5'-концы гРНК которых не несут ни кэпа, ни VPg, содержат в своих 3'-НТО так называемые энхансеры кэп-независимой трансляции (cap-independent translation enhancers, 3'-CITE) – структурные элементы, которые функционально заменяют кэп-структуру, связывая факторы инициации трансляции и/или субчастицы рибосом. Как правило, 3'-CITE формируют киссинг-взаимодействие со шпилькой на 5'-конце гРНК, своеобразно воспроизводя циркуляризацию клеточных мРНК, обычно обеспечиваемую взаимодействием eIF4F с PABP.

Основываясь на сходстве вторичной структуры, различают 6 основных типов 3'-CITE, а именно: BTE (BYDV-like translation enhancer), TED (translation enhancer domain), PTE (PMV-like translational enhancer), ISS (I-shaped structure), YSS (Y-shaped structure) и TSS (T-shaped structure) (рис. 3, а; табл. 2).

Все 3'-CITE, кроме TSS, связывают фактор инициации eIF4F, используя при этом немного разные механизмы. В случае PTE и TED, а также, вероятно, ISS и YSS основной точкой взаи-

модействия с eIF4F является субъединица eIF4E. Генетические, биохимические и структурные данные, полученные при изучении PTE, TED и ISS, показывают, что эти 3'-CITE взаимодействуют с кэп-связывающим карманом eIF4E, при этом высокоподвижные остатки гуанина имитируют кэп. Отметим, что PTE связывает eIF4E с высокой аффинностью, близкой к аффинности связывания полного eIF4F, в то время как TED взаимодействует с eIF4E гораздо слабее, чем с полным eIF4F (K_d для последнего более чем на порядок ниже). Вероятно, во втором случае структурные перестройки eIF4E при взаимодействии с eIF4G увеличивают прочность его связывания с 3'-CITE аналогично тому, как это происходит при связывании с кэпированными мРНК.

BTE – единственный из 3'-CITE, непосредственно связывающий eIF4G. eIF4F он связывает примерно в 5 раз сильнее, что также может говорить о конформационных перестройках eIF4G, вызываемых взаимодействием с eIF4E. Анализ минимального фрагмента eIF4G, необходимого для связывания 3'-CITE и для усиления трансляции, показал, что он включает в себя сайты связывания eIF4A, eIF3 и РНК-связывающий домен, а участки, взаимодействующие с eIF4E и PABP, не являются необходимыми [189].

Возможно, способность 3'-CITE прочно связывать (секвестировать) факторы инициации

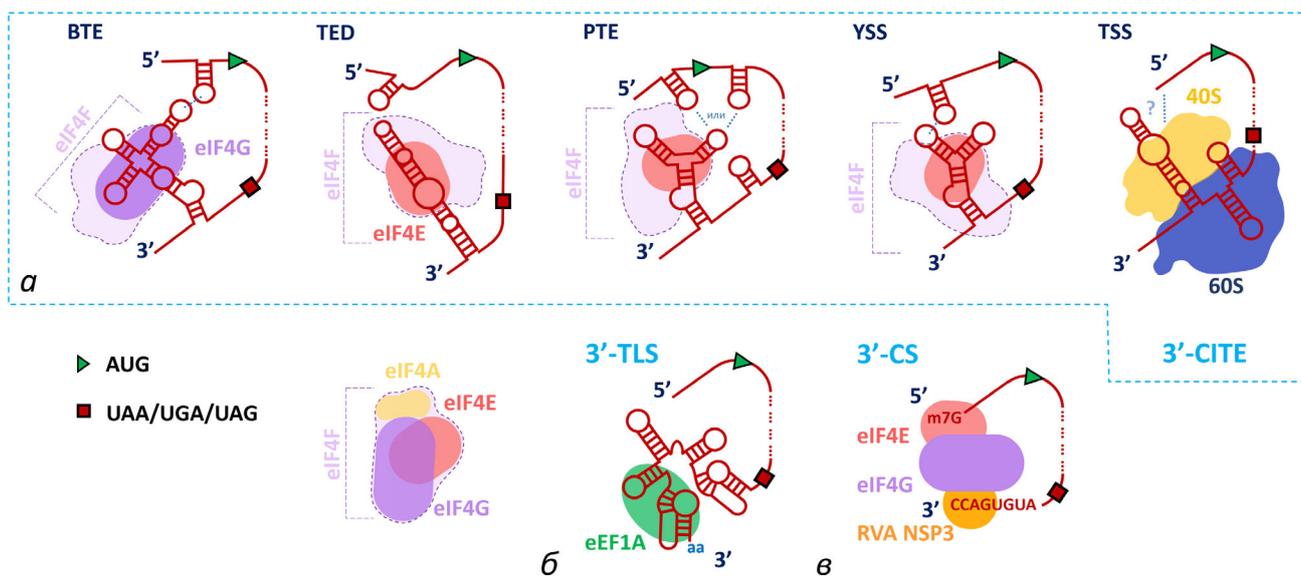


Рис. 3. Основные способы усиления трансляции вирусных мРНК с помощью элементов, размещённых в 3'-НТО. а – 5 основных типов 3'-CITE и связывающиеся с ними трансляционные компоненты. б – Аминоацелированный 3'-TLS в комплексе с eEF1A. в – 3'-CS ротавируса и компоненты, замыкающие мРНК в кольцо. Полные названия вирусов приведены в тексте статьи, названия элементов – в табл. 2. aa – аминокислотный остаток

Таблица 2. Типы 3'-концевых энхансеров кэп-независимой трансляции (3'-CITE) и их краткая характеристика

Тип 3'-CITE	Семейство (Под) вирусов	Взаимодействие с 5'-концом гРНК	Связывает	K_d , нМ
BTE <i>BYDV like Translation Enhancer</i>	Luteoviridae (<i>Luteovirus</i>); Tombusviridae (<i>Necrovirus</i> , <i>Dianthovirus</i> , <i>Umbravirus*</i>)	Да (RCNMV?)**	eIF4G eIF4F	177 [180] 37 [180]
TED <i>Translation Enhancer Domain</i>	Не присвоено (<i>Albetovirus</i>); Tombusviridae (<i>Carmovirus</i>)	Да (STNV?)**	eIF4F eIFiso4F eIF4E eIF4isoE	17–30 [181] 33–50 [181] 780 [181]; 313 [182] 660 [181]
PTE <i>PMV-like Translation Enhancer</i>	Tombusviridae (<i>Panicovirus</i> , <i>Carmovirus</i> , <i>Aureusvirus</i> , <i>Umbravirus*</i>)	Да (PEMV-2 нет)	eIF4E eIF4F	58 [182] 48 [182]
ISS <i>I-Shaped Structure</i>	Tombusviridae (<i>Tombusvirus</i> , <i>Carmovirus</i> , <i>Aureusvirus</i>)	Да	eIF4F	190 [183]
YSS <i>Y-Shaped Structure</i>	Tombusviridae (<i>Tombusvirus</i>)	Да	eIF4F eIFiso4F	[184]*** [184]***
TSS <i>T-Shaped Structure</i>	Tombusviridae (<i>Carmovirus</i> , <i>Umbravirus*</i>)	Нет	60S 80S	340 [185]; 233 [186] 450 [185]; 300 [187]; 1720 [186]
kl-TSS <i>kissing loop T-Shaped Structure</i>	Tombusviridae (<i>Umbravirus*</i>)	Да	40S 60S 80S	360 [186] 300 [186] 520 [186]; 610 [188]

* Принадлежность умбравирюсов к семейству Tombusviridae условна: сходство с представителями этого семейства имеет лишь одна из двух гРНК этих вирусов, но именно она содержит 3'-CITE.

** Для этих вирусов мутационный анализ не подтвердил предсказанного киссинг-взаимодействия 3'-CITE со шпилькой на 5'-конце гРНК.

*** Связывание белков показано неравновесным методом.

четвертой группы используется вирусами не только для стимуляции синтеза собственных белков, но и для подавления кэп-зависимой трансляции клеточных мРНК. Было показано, что фрагменты РНК, содержащие 3'-CITE различных типов, являются эффективными ингибиторами трансляции как вирусных, так и кэпированных репортёрных мРНК *in vitro* [190]. Кроме того, при конкурентной трансляции в бесклеточной системе вирусной РНК, содержащей 3'-CITE PTE, и кэпированной матрицы только трансляция последней была существенно подавлена [191].

В отличие от 3'-CITE других типов, TSS непосредственно связывает большую рибосом-

ную субчастицу и 80S-рибосому, а в случае kl-TSS из гРНК-2 вируса деформирующей мозаики гороха 2 (pea enation mosaic virus 2, PEMV-2) — также и малую рибосомную субчастицу. Структурный анализ показал, что TSS формирует тРНК-подобную структуру, которая, однако, не может быть аминокислотирована, поскольку находится не на самом 3'-конце РНК. Тем не менее TSS может конкурировать с аминокислот-тРНК за посадку на рибосому, и предварительные крио-ЭМ-данные подтвердили, что TSS TCV связывается в Р-сайте 80S-рибосомы [192].

В одном из изолятов вируса некротической пятнистости дыни (melon necrotic spot virus,

MNSV) идентифицирован короткий (65 нт) энхансер трансляции, который, вероятно, был получен в результате рекомбинации с 3'-НТО гРНК азиатского варианта вируса желтухи тыквенных (cucurbit aphid-borne yellows virus, CABYV, изолят Xinjiang) из рода *Polerovirus* семейства Luteoviridae [193]. Поскольку вторичная структура этого элемента — две соединённые короткие шпильки — не похожа на структуру ни одного из известных 3'-СІТЕ, его иногда выделяют в отдельный тип — СХТЕ (CABYV-Xinjiang-like Translation Element). Механизм действия СХТЕ пока не изучен. Почти ничего не известно ни о требованиях этого 3'-СІТЕ к трансляционным факторам (кроме того, что он остаётся активным в растениях с подавленной активностью eIF4E), ни о его взаимодействии с 5'-концом мРНК.

Механизмы инициации трансляции с использованием иммобилизованных на 3'-конце матрицы факторов до конца не ясны, однако существуют указания на то, что посадка рибосомы в этом случае происходит на 5'-конец мРНК, после чего следует классическое сканирование в поисках нужного инициаторного кодона. Добавление стабильной шпильки на самый конец 5'-НТО приводит к блокированию или сильному ингибированию синтеза вирусного или репортёрного белка как *in vivo*, так и *in vitro* [194, 195], подтверждая необходимость свободного 5'-конца мРНК. Сканирование 5'-НТО было проверено с помощью стандартных тестов — введением дополнительных AUG-кодонов [183, 195–197] или шпилек между 5'-концом мРНК и инициаторным кодоном [195, 198]. В большинстве случаев приоритет в инициации трансляции имели ближайšie к 5'-концу AUG-кодоны, а промежуточные шпильки ингибировали синтез белка.

Тем не менее следует упомянуть необычный 3'-СІТЕ, идентифицированный в обеих гРНК вируса махровости чёрной смородины (blackcurrant reversion perovirus, BRV), который обеспечивает эффективную кэп-независимую трансляцию, взаимодействуя с 5'-НТО [199]: он способен стимулировать внутреннюю инициацию в протопластах клеток, когда последовательность 5'-НТО вставлена между репортёрными рамками считывания. Таким образом, этот 3'-СІТЕ, вероятно, функционирует как часть составного IRES-элемента.

Неясным остаётся вопрос, связывают ли 3'-СІТЕ только факторы инициации или на них может формироваться 40S-содержащий преинициаторный комплекс для последующего трансфера на 5'-конец. Известно, что слабое связывание 40S-субчастицы с ВТЕ вируса жел-

той карликовости ячменя (barley yellow dwarf virus, BYDV) усиливается при добавлении eIF4F, eIF4A, eIF4B и АТР [200], что может означать формирование преинициаторного комплекса на этом 3'-СІТЕ. Однако превалирует всё же альтернативная точка зрения, что хеликазная активность факторов инициации усиливает прямое связывание 40S с участком ВТЕ, комплементарным 18S рРНК [189]. Недавно показано, что гРНК PEMV-2 с точечной мутацией, разрушившей дальнее киссинг-взаимодействие и заблокировавшей перенос компонентов инициации с 3'- на 5'-конец, количественно связывала 40S-субчастицу в WGE [191]. гРНК с аналогичной мутацией и удалённым 3'-СІТЕ РТЕ 40S-субчастицу не связывала. Это прямое свидетельство того, что РТЕ, помимо факторов инициации, связывает и малую субчастицу рибосомы (возможно, через цепочку взаимодействий).

Особняком стоят 3'-СІТЕ группы TSS, связывающие большую рибосомную субчастицу и целую 80S-рибосому. В отличие от факторов инициации четвёртой группы, которые связывают остальные 3'-СІТЕ, 60S-субчастицы не являются дефицитными компонентами аппарата трансляции. Иммобилизация 60S-субчастиц на вирусной гРНК для обеспечения эффективной трансляции в условиях конкуренции не выглядит целесообразной. Секвестрирование 60S-субчастиц для подавления трансляции клеточных мРНК также вряд ли может быть эффективным, поскольку количество вирусной РНК в клетке относительно невелико. Кроме того, большинство вирусных гРНК, содержащих TSS, не имеют структур, обеспечивающих взаимодействие 5'- и 3'-конца, т.е. отсутствует механизм доставки связанных субчастиц или рибосом для участия в инициации трансляции. На основании косвенных данных было высказано предположение, что 80S-рибосома способна одновременно связывать 5'-НТО и 3'-TSS гРНК TCV, приводя к образованию петли [201]. Однако остаётся непонятным, как связанная рибосома может быть включена в процесс инициации. То, что и в этом случае используется более или менее традиционный механизм, можно заключить из того, что в клетках, дефицитных по фактору инициации eIF4G, трансляция репортёрной РНК с 5'- и 3'-НТО гРНК TCV была заметно подавлена [202].

Точное взаимное позиционирование элементов 5'-НТО и сближенного с ней 3'-СІТЕ, по-видимому, не является важным для эффективной инициации трансляции или выбора стартового кодона. Удлинение 5'-конца гРНК [195, 196] или изменение положения шпильки, обеспечивающей киссинг-взаимодействие [196,

197], критически не сказываются на уровне синтеза белков. В единственном известном случае (гРНК РЕМV-2), когда 3'-концевой сайт дальнего киссинг-взаимодействия не является частью основного 3'-SITE РТЕ (связывающего eIF4E или eIF4F), а входит в отдельный вспомогательный 3'-SITE kl-TSS, перенос точки взаимодействия также не оказывал существенного влияния на трансляцию гРНК *in vitro* [191]. Всё это говорит о том, что ни узнавание 5'-конца, ни позиционирование инициаторного комплекса на конкретном AUG-кодоне не определяются геометрией взаимодействия конкретных элементов. Иными словами, 3'-SITE лишь обеспечивает пространственное сближение факторов инициации (или преинициаторных комплексов), связанных с концами РНК, для уменьшения общей энтропии процесса. Вместе с тем при инициации на сгРНК того же РЕМV-2, где 3'-SITE-зависимый синтез двух вспомогательных белков стартует с близкорасположенных AUG-кодонов, находящихся на небольшом расстоянии от обеспечивающей дальнейшее взаимодействие шпильки, преимущество имеет второй инициаторный кодон. Относительная эффективность синтеза этих двух белков *in vivo* зависит от расстояния между AUG-кодонами и их положения относительно сайта взаимодействия концов сгРНК [195]. Возможно, при определенных условиях взаимодействии иницирующей 40S-субчастицы с цепью РНК через 3'-SITE может определять её преимущественное положение при сканировании и тем самым обеспечивать узнавание определенного AUG-кодона.

Очевидно, что сканирование 5'-НТО или начало трансляции рамки считывания, разрушающие вторичную структуру РНК, должны приводить к потере дальнего взаимодействия между 3'-SITE и 5'-концом гРНК и, таким образом, к периодическому выключению инициации трансляции. Считается, что такой динамический, или «осциллирующий», характер инициации является своего рода регуляцией, обеспечивающей уровень трансляции оптимальный для размножения вируса [196, 197]. Действительно, было показано, что загруженность транслируемой *in vitro* гРНК РЕМV-2 рибосомами невысока по сравнению с экпированной мРНК и составляет 1–3 рибосомы [191, 195]. Это означает относительно низкую частоту посадки рибосом на РНК, что может быть следствием периодического блокирования инициации трансляции. Было высказано предположение [191], что «разреженное» распределение рибосом на гРНК важно для эффективного синтеза RdRp, который обеспечивается программи-

руемым сдвигом рамки считывания, вызываемым тремя последовательными структурными элементами в районе точки сдвига [203]. Очевидно, что трансляция гРНК должна приводить к периодическому плавлению этих элементов, для восстановления структуры которых могут требоваться значительные пространственные и временные промежутки между транслирующими рибосомами.

тРНК-подобные структуры (TLS). На 3'-конце гРНК некоторых вирусов растений, принадлежащих к восьми родам трёх различных семейств, обнаружены элементы, структурно и функционально напоминающие тРНК – TLS (тРНК-подобные структуры, tRNA-like structure; рис. 3, б). Все TLS содержат псевдоузел, который позволяет сформировать аминокотилируемый аналог акцепторного стебля, не содержащий 5'-конец РНК. TLS обладают тремя важными свойствами тРНК: они являются субстратом для клеточной ССА-нуклеотидилтрансферазы, аминокотилируются конкретными аминокотил-тРНК-синтетазами и формируют тройственный комплекс с eEF1A • GTP.

Различают 3 основных типа TLS: аминокотилируемые валином (характерные для представителей семейства *Tumoviridae*), гистидином (*Viraviridae*) и тирозином (*Bromoviridae*). Каждый из этих типов имеет характерную первичную и вторичную структуры, обеспечивающие специфичность аминокотилирования. Несмотря на то что способность TLS к аминокотилированию и связыванию фактора элонгации подразумевает участие этих структурных элементов в трансляции, пока достоверно была показана только их роль в регуляции посадки вирусной репликазы для синтеза (–)–цепи РНК и в выполнении функции теломер при участии нуклеотидилтрансферазы.

TLS вируса ТУМV является наиболее изученным примером тРНК-подобного трансляционного энхансера. гРНК ТУМV экпирована, и для максимального усиления трансляции требуется одновременно экпирование 5'-конца и аминокотилирование 3'-конца гРНК [204]. Поскольку способность связывать eEF1A • GTP необходима для эффективной трансляции, а специфичность аминокотилирования не оказывает на неё влияния, был сделан вывод, что эффект усиления опосредуется фактором элонгации eEF1A. Кристаллическая структура TLS ТУМV подтвердила сходство его поверхности с тРНК со стороны, взаимодействующей с аминокотил-тРНК-синтетазой и фактором eEF1A [205]. Недавно показано, что TLS ТУМV может связывать рибосому [205] (правда, только на примере прокариотических 70S-рибосом). В связи с вышесказан-

ным возникает вопрос: выполняют ли аминокислоты 3'-TLS главную функцию аминокислот-тРНК — включение аминокислоты в синтезируемый белок? После открытия аминокислот-тРНК такая их функция казалась очевидной, и были сделаны попытки это проверить. Хотя в ряде работ был показан перенос радиоактивно-меченой аминокислоты с TLS TYMV в синтезируемый белок, другие исследования этого не подтвердили, и позднее сами авторы признали эти результаты артефактами, вызванными переносом аминокислоты на соответствующую тРНК (см. обсуждение в статье Naenni et al. [206]). История получила продолжение через четверть века, когда, чтобы объяснить эффективную инициацию трансляции на втором инициаторном кодоне гРНК TYMV, на основании полученных *in vitro* данных был предложен механизм «тройного кода», предполагающий прямое узнавание этого кодона рибосомой, связанной с Val-TLS, и начало синтеза белка с N-концевым валином [207]. Однако независимая проверка этих результатов, выполненная на тех же объектах и в той же системе трансляции, их не подтвердила [208]. Были получены свидетельства в пользу того, что в данном случае, скорее всего, имеет место необычный вариант пропускающего сканирования (см. выше) [12], и показано, что инициация трансляции на втором инициаторном кодоне зависит от наличия 5'-кэпа, а не TLS [208]. В целом непосредственное участие TLS в трансляции в качестве функционального аналога аминокислот-тРНК остаётся интересной гипотезой, не получившей пока убедительного подтверждения.

TLS вируса мозаики костра (brome mosaic virus, BMV) также является энхансером трансляции [209]. Мутации, нарушающие структуру TLS, приводили к снижению эффективности трансляции гРНК BMV *in vitro* [210]. Поскольку были получены свидетельства того, что и в этом случае аминокислоты TLS (тирозином) является важным для его энхансерной активности, можно предположить схожий механизм действия TLS вирусов TYMV и BMV, однако его детали до сих пор неясны. Синергизм действия 5'-кэпа и 3'-TLS позволил предположить, что связанный с TLS фактор eEF1A каким-то образом взаимодействует с фактором инициации eIF4F, подменяя тем самым каноническую цепочку взаимодействий eIF4F • PABP • poly(A). С другой стороны, данные о связывании аминокислот-TLS с рибосомой [205] говорят о возможности того же механизма усиления трансляции, что и в случае 3'-CITE TSS, для которых тоже постулировано связывание рибосом благодаря мимикрии под тРНК в Р-сайте.

На данный момент до конца не ясно, является ли усиление трансляции общим и необходимым свойством всех аминокислот-тРНК. Ряд наблюдений заставляет в этом усомниться. Например, тРНК-подобная структура гРНК TMV, схожая с TLS TYMV, не важна для её трансляции [211], а TLS вируса розетчатости арахиса (peanut clump virus, PCV) не связывает eEF1A • GTP [212].

Аминокислот-тРНК изредка встречаются и на 3'-концах РНК вирусов животных — например, у представителей тетравирусов (Tetraviridae), поражающих насекомых [213, 214]. Однако эти структуры пока почти не изучены.

Функциональные элементы, заменяющие поли(А)-хвост. (+)РНК всех ротавирусов группы А (group A rotavirus, RVA) содержат на 3'-конце консенсусную последовательность GACC (3'-consensus sequence (3'-CS); рис. 3, в), которая специфично связывает N-концевой домен вирусного неструктурного белка 3 (NSP3) [215]. C-концевой домен этого белка взаимодействует с eIF4G [216], конкурируя с поли(А)-связывающим белком. NSP3 является очень эффективным энхансером вирусной трансляции [217], вероятно, выполняя функцию PABP при формировании циклической структуры вирусной РНК. Кроме того, NSP3 — мощный ингибитор трансляции клеточных мРНК, поскольку вытеснение PABP из комплекса с eIF4G препятствует циркуляризации полиаденилированных матриц [217].

Схожий механизм реализуется при трансляции гРНК уже упоминавшегося вируса AMV. 3'-НТО этой РНК формирует содержащую псевдоузел структуру, напоминающую TLS и узнаваемую вирусной репликазой и тРНК-специфичными ферментами. Однако эта тРНК-подобная структура разрушается при связывании вирусного белка оболочки (CP), который блокирует синтез (–)-цепи РНК и приводит к усилению трансляции [218, 219]. CP также связывает eIF4G или eIFiso4G [220] и, вероятно, имитирует взаимодействие eIF4G • PABP • poly(A), обеспечивая циклизацию вирусной гРНК и стимулируя её трансляцию.

Шпилька на 3'-конце гРНК DENV [221] и содержащий несколько псевдоузлов структурный элемент внутри 3'-НТО гРНК TMV [211] способны заменять 3'-поли(А) при трансляции кэпированных репортёрных мРНК. На этом основании был сделан вывод об их функциональной эквивалентности полиаденилированному 3'-концу мРНК. 3'-НТО вируса HCV также способна неспецифично увеличивать уровень экспрессии мРНК вне зависимости от механизма инициации трансляции [222].

РЕИНИЦИАЦИЯ ПРИ ТРАНСЛЯЦИИ ВИРУСНЫХ мРНК

Вирусные мРНК, содержащие несколько разнесённых или частично перекрывающихся рамок считывания, могут использовать для доставки рибосомы на дистальные рамки механизмы реинициации трансляции. Обычно эукариотическая рибосома не склонна к реинициации после прочтения полноразмерных белок-кодирующих рамок, поскольку ввиду моноцистронности большинства мРНК эволюция здесь работала на противодействие aberrантной реинициации на 3'-НТО [223]. Тем не менее из этого правила есть как минимум два исключения. Первое – это реинициация после трансляции uORF, расположенных в 5'-НТО многих мРНК. Её эффективность может сильно варьировать в зависимости от длины uORF, расстояния от стоп-кодона до основной рамки и присутствия цисдействующих элементов в 5'-НТО. Второе исключение – это случаи, когда благодаря специальным механизмам становится возможной эффективная реинициация после прочтения полноразмерной рамки, и этот путь характерен в первую очередь для вирусных мРНК.

TURBS-опосредованная реинициация трансляции. Некоторые вирусы используют для синтеза нескольких белков с одной РНК особый механизм терминации-реинициации на частично перекрывающихся рамках [224], трансляция которых является сопряжённой. В местах перекрывания таких рамок возможны варианты взаимного расположения старт- и стоп-кодонов, некоторые из которых показаны на рис. 4, а. Подобная реинициация хорошо изучена на примере представителей семейства Caliciviridae (вирусе геморрагической болезни кроликов (rabbit hemorrhagic disease virus, RHDV), а также ранее упоминавшихся FCV, MNV и WNV) и несколько хуже – для вируса гриппа В (influenza B virus, IBV) из семейства Orthomyxoviridae. Так, одна из сгРНК RHDV кодирует основной белок капсида VP1 в первой рамке и малый белок капсида VP2 – во второй. Механизм сопряжённой терминации-реинициации позволяет, по всей видимости, поддерживать оптимальную стехиометрию двух белков, способствуя правильной сборке капсида.

Данный механизм основан на «принуждении» рибосомы, завершившей на стоп-кодоне первой рамки, вместо диссоциации с мРНК (рециклинга) заново инициировать

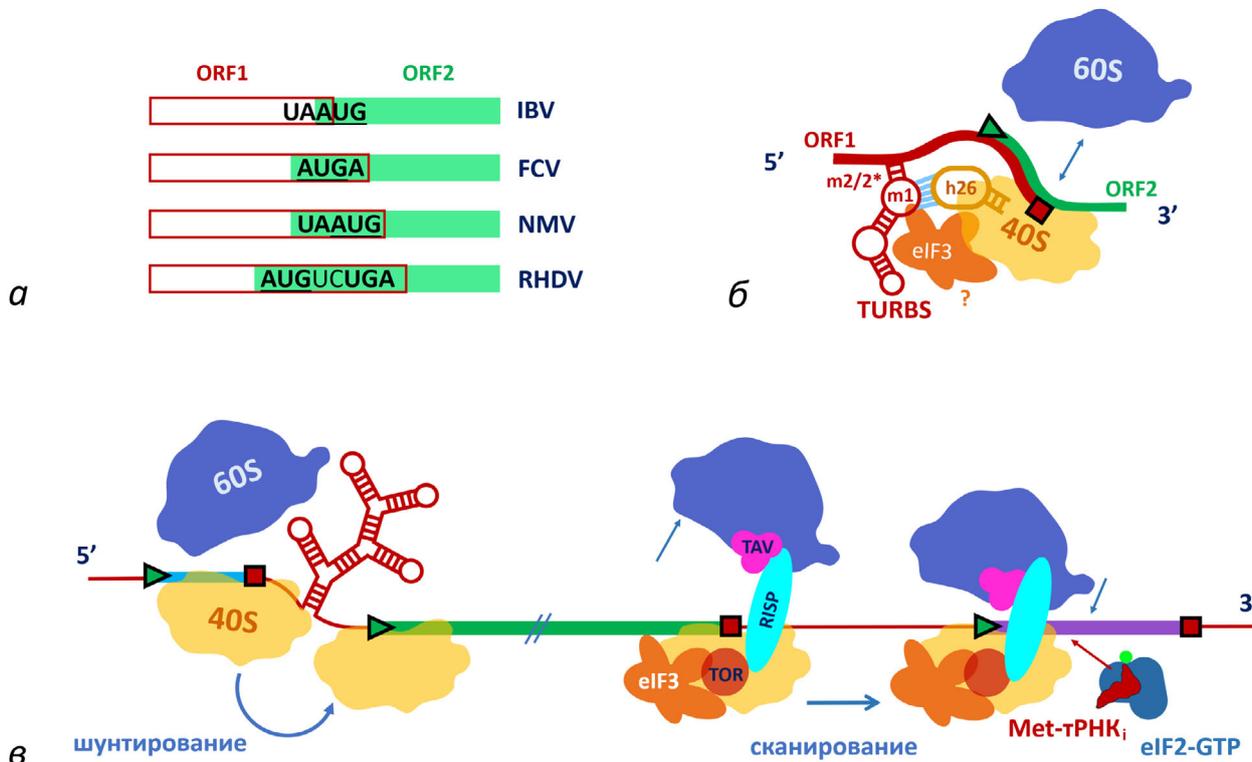


Рис. 4. Механизмы трансляции вирусных мРНК, основанные на эффективной реинициации. *а* – Примеры участков перекрывания трансляционно сопряжённых рамок в вирусных мРНК, содержащих TURBS. *б* – Механизм работы TURBS. *в* – Два механизма, используемых пгРНК СаМV: слева – шунтирование, опосредованное реинициацией, справа – TAV-опосредованная реинициация. Обозначения стартовых и стоп-кодонов – как на рис. 2 и 3

трансляцию (рис. 4, б). Он требует наличия в конце первой рамки, незадолго до стоп-кодона, специального структурного элемента, связывающего рибосому – TURBS (от *англ.* termination upstream ribosomal binding site) [225–227]. В составе TURBS есть консервативный мотив 1 (m1), комплементарный петле в шпильке h26 18S рРНК, и мотив 2 (m2/2*), формирующий шпильчатую структуру с выпетливанием, содержащим m1 [228, 229]. В результате взаимодействия h26 с участком UGGGA, общим для m1 калицивирусов и IBV, некоторые из 40S-субчастиц после терминации и разборки пост-терминационного комплекса остаются связанными с мРНК. Это позволяет им реиницировать, если поблизости окажется стартовый кодон. Таким образом, в каком-то смысле TURBS обеспечивает внутреннюю инициацию трансляции, однако в отличие от IRES-элементов он способен оперировать лишь с уже привлечённой ранее рибосомой, т.е. когда нет необходимости заново укладывать мРНК в канал 40S-субчастицы.

Представления о том, какие трансляционные факторы необходимы для TURBS-опосредованной реинициации, неоднозначны. В ранних работах было показано, что eIF3, как и 40S, способен прямо связываться с TURBS FCV в *in vitro* системе на основе RRL. На этом основании было высказано предположение, что eIF3 играет ключевую роль в этом процессе и строго необходим для эффективной реинициации по этому механизму [225]. Это соответствовало важной роли данного фактора в реинициации на некоторых клеточных мРНК, содержащих uORF [223]. Однако впоследствии в реконструированной *in vitro* системе было показано, что реинициация на мРНК RHDV и норовируса человека (human norovirus, HNV) возможна и без участия eIF3, хотя его добавление усиливает эффект [230]. Авторы также показали, что реинициация возможна по нескольким сценариям. В одном случае требуются Met-тРНК_i, eIF1, eIF1A и eIF2; при другом варианте нужны Met-тРНК_i и eIF2D; третий механизм требует лишь Met-тРНК_i и вовлекает в инициацию не диссоциировавшую на субчастицы 80S-рибосому [230]. Тем не менее в других работах по изучению TURBS RHDV, HNV и IBV реинициация в присутствии eIF3 происходила эффективно даже на мРНК с нарушенным m1 TURBS [231, 232], из чего был сделан вывод, что связывания eIF3 с TURBS достаточно для удержания пост-терминационной 40S-субчастицы на мРНК.

Различия в наблюдаемых механизмах реинициации могут объясняться тем, что у разных вирусов процесс происходит немного по-разному, а концентрации инициаторных факторов, ионов магния и калия, используемые в реконструиро-

ванной *in vitro* системе, могут отличаться от значений в полном лизате. Тем не менее на основании вышеизложенных данных можно предположить, что ключевую роль в TURBS-опосредованной реинициации играет именно связывание m1 с 40S-субчастицей, хотя eIF3 может усиливать, стабилизировать или даже заменять это взаимодействие, а также, возможно, участвовать в регуляции реинициации в зависимости от состояния клетки или в ходе жизненного цикла.

Помимо калицивирусов и IBV, описаны и другие случаи эффективной реинициации на перекрывающихся рамках: например, у мРНК вируса H_vV190S паразитического грибка *Helminthosporium victoriae*, респираторно-синцитиального вируса человека (human respiratory syncytial virus, HRSV) и прототипического гиповируса (*Cryphonectria hypovirus 1*, CHV1-EP713) [223]. Мотив TURBS в РНК этих вирусов не обнаружен, однако выявлены другие слабо охарактеризованные участки неконсервативной вторичной структуры, имеющие комплементарность с 18S рРНК.

Шунтирование, опосредованное реинициацией. 35S пгРНК параретровируса CaMV использует ещё один необычный способ реинициации. Эта мРНК имеет очень длинную 5'-НТО, во внутренней части которой находится протяжённая область, формирующая сложную вторичную структуру со стабильным стеблем в основании и разветвлёнными шпильками в дистальной части. Эта область содержит несколько нефункциональных AUG-кодонов, а непосредственно перед стеблем расположена короткая uORF, кодирующая 6-членный пептид [26]. В серии работ, выполненных в лаборатории Т. Хона и его последователей, было показано, что данный вариант шунтирования требует трансляции этой uORF, терминации на её стоп-кодоне и высвобождения пептида, после чего рибосома «проскакивает» всю область со стабильной вторичной структурой и реиницирует на рамке ORF VII, кодирующей белок P7 [34]. Таким образом, в данном случае шунтирование не является, по сути, нелинейным сканированием (уже описанным ранее), а выступает как особый случай реинициации (рис. 4, в, слева). В область, пропускаемую рибосомой, авторы вводили разные фрагменты РНК, в том числе очень длинные и содержащие варьруемое количество AUG-кодонов, а в одном из опытов она даже содержала разрыв сахарофосфатного остова – и все эти модификации не приводили к снижению эффективности трансляции ORF VII. Участки, окаймляющие эту область, получили образные названия мест «взлёта» (take-off) и «приземления» (landing) рибосомы, подразумевающие её схождение с мРНК во время «прыжка». Тем не

менее сейчас более приемлемой представляется точка зрения, что при «прыжке» цепочка мРНК не выходит из канала малой субчастицы: вместо этого стабильная шпилька «протягивается» через канал, не расплетаясь. Такое прохождение нерасплетённой шпильки через канал можно наблюдать в реконструированной *in vitro* системе в присутствии неполного набора факторов инициации – в частности, при отсутствии eIF1 [233]. Поскольку рециклинг пост-терминационного комплекса и последующая реинициация подразумевают малоизученное пока перекрывание функций между содержащими SU11-домен факторами eIF1, eIF2D и DENR [132], специфика 35S пгРНК CaMV может заключаться в использовании необычного сочетания факторов в этих пост-терминационных процессах.

CaMV – не единственный вирус, применяющий такую необычную стратегию. пгРНК ряда других параретровирусов растений (в том числе большинства представителей семейства Caulimoviridae), ДНК-параретровирусов (например, палочковидного тунгровируса риса, rice tungro bacilliform virus, RTBV), гРНК одного из пикорна-подобных вирусов растений (сферического тунгровируса риса, rice tungro spherical virus, RTSV), а также пгРНК спумавирусов – ретровирусов с ДНК-геномом (в частности, прототипного спумавируса человека, prototypic foamy virus, PFV), имеют похожие структуры, которые обеспечивают такую же реинициацию с шунтированием большого участка РНК [34].

Механизмы реинициации с участием вирусных белков. Растительные параретровирусы используют и другой способ эффективной реинициации, который был охарактеризован в серии работ, выполненных под руководством Л. Рябовой, также на примере мРНК CaMV. Этот механизм связан с активностью вирусного белка P6/TAV (transactivator viroplasm) и назван TAV-опосредованной реинициацией (рис. 4, в, справа).

TAV связывается с фактором eIF3 в составе инициаторного комплекса (вероятно, в момент, когда из него уходит фактор eIF4B) и удерживает его после присоединения большой субчастицы рибосомы благодаря своему сродству к нескольким белкам 60S [34]. Кроме того, TAV привлекает в полисомы киназу TOR и способствует её активации [234]. TOR, в свою очередь, активирует киназу S6K1, которая затем фосфорилирует субъединицу h фактора eIF3, что помогает удерживать eIF3 на рибосоме при элонгации и способствует реинициации [235].

Другой важный игрок в этом процессе – клеточный белок RISP, выступающий партнёром TAV в связывании eIF3, 40S- и 60S-субчастиц [236]. В недавней работе той же группы [237]

предложена интересная модель, согласно которой протяжённая молекула RISP, взаимодействуя одновременно с белками eS6/RSP6 и eL24/RPL24, выполняет роль скобы, удерживающей вместе большую и малую субчастицы рибосом. При этом связывание регулируется фосфорилированием eS6 и самого RISP сигнальным каскадом TOR-S6K1.

По всей видимости, в условиях вирусной инфекции присутствие на рибосоме TAV и активированного RISP обеспечивает эффективную реинициацию сразу двумя способами. Во-первых, удержание eIF3 на элонгирующих рибосомах позволяет 40S-субчастице, оставшейся на мРНК после терминации и ухода 60S-субчастицы, быстро рекрутировать факторы инициации и возобновить сканирование. Во-вторых, нарушение рециклинга 60S-субчастицы предположительно способствует 80S-опосредованной реинициации (существование которой ранее было показано в других эукариотических системах [132, 230, 238, 239]). Являются ли эти механизмы специфичными для упомянутых растительных вирусов или они могут работать и в случае других полицистронных вирусных мРНК, пока неизвестно.

ПРЕРЫВАЮЩАЯСЯ ЭЛОНГАЦИЯ (МЕХАНИЗМ «StopGo»)

У некоторых вирусов семейств Picornaviridae, Iflaviviridae, Tetraviridae, Dicistroviridae и Reoviridae есть и ещё один принципиально иной способ продукции отдельного полипептида, закодированного во внутренней области мРНК, – так называемый механизм «StopGo» [240]. Он требует специального участка аминокислотной последовательности – 2A-пептида. Рибосома, синтезировавшая такой пептид, с высокой частотой (иногда близкой к 100%) не образует пептидную связь в одной конкретной позиции, однако после этого продолжает трансляцию. В результате начинает синтезироваться отдельный белок, хотя нового акта инициации трансляции в этом случае, по сути, не происходит. «Классическим» примером считается 2A-пептид из FMDV, на практике же широко применяются более активные пептиды E2A и T2A из вирусов PTV-1 и TaV (*Thosea asigna* virus) [240, 241].

ТРАНСЛЯЦИЯ КОЛЬЦЕВЫХ ВИРУСНЫХ РНК

Большой интерес представляют также кольцевые (ковалентно замкнутые) белок-кодирую-

шие РНК (circRNA, кРНК). Такие кРНК не имеют свободного 5'-конца и должны инициировать трансляцию по механизму внутренней посадки рибосомы – т.е., вероятно, содержать IRES [242]. Однако имеющиеся на этот счёт данные противоречивы, получены преимущественно методами биоинформатики и не всегда имеют экспериментальное подтверждение. В клетках эукариот кольцевые транскрипты получаются в результате «обратного» сплайсинга, при котором последующий экзон соединяется с предыдущим. Подобные «закольцованные» в результате сплайсинга РНК были обнаружены и у вирусов [243], но про механизм их трансляции мало что известно.

Одна из транслируемых кРНК кодирует онкобелок E7 вируса папилломы [244]. E7 вызывает опухолевую трансформацию клеток, контролируя транскрипцию протоонкогенов и генов-супрессоров опухолевого роста, структуру и модификации хроматина. Показано, что кРНК HPV, синтезируемая после трансфекции клеток цервикальной карциномы плазмидой с мини-геном E7, содержит модифицированные нуклеотиды m⁶A и транслируется в полисомах [244]. кРНК найдены в жизненном цикле и других вирусов – например, Эпштейна–Барр (Epstein–Barr virus, EBV), саркомы Капоши (Kaposi sarcoma herpes virus, KSHV), HBV и др. [245]. Однако достоверно неизвестно, выполняют ли они роль мРНК.

В мире вирусов встречаются также РНК, которые изначально являются кольцевыми – в основном это вириды и вирусоиды. Однако случается, когда вирусная кРНК кодирует белок, известный совсем немного. Один из них – вирусоид-сателлит вируса жёлтой пятнистости риса (rice yellow mottle virus – RYMV), чей «РНК-наногеном» представляет собой ковалентно замкнутую РНК длиной 220 нт. Согласно AbouHaidar et al. [246], эта кРНК содержит сайт связывания рибосомы (AAGGA) за 11 нт до AUG-кодона, обеспечивающий внутреннюю инициацию. Продукт трансляции – белок массой 16 кДа, у которого отсутствует гомология с известными белками. Этот белок способен связывать свою мРНК и, вероятно, необходим для защиты генома вирусоида [246].

МЕХАНИЗМЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ ВИРУСНЫМ мРНК ТРАНСЛЯЦИОННЫЙ ПРИОРИТЕТ

Выше мы описывали механизмы трансляции вирусных мРНК, направленные на повышение эффективности синтеза вирусных белков, а также позволяющие адаптироваться к широкому

диапазону условий стресса, неизбежно возникающего в клетках при вирусной инфекции. В данном разделе мы кратко опишем наиболее яркие примеры механизмов, позволяющих вирусам обеспечивать преимущественную трансляцию своих мРНК. Зачастую это достигается при помощи ингибирования компонентов клеточного кЭП-связывающего аппарата или других элементов канонического механизма инициации трансляции, их модификации или уничтожения (рис. 5). Кроме того, существуют стратегии, основанные на компартиментализации компонентов жизненного цикла вирусов, что позволяет в буквальном смысле оградить их от защитных механизмов заражённой клетки.

Воздействие на компоненты трансляционного аппарата. Многие вирусы для эффективной конкуренции за клеточные ресурсы активно манипулируют трансляционными компонентами. Яркий пример – белок NSP1 коронавируса SARS-CoV-2 (коронавирус 2, вызывающий тяжёлый острый респираторный синдром, severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2). Своим С-концевым доменом он связывается с входным мРНК-каналом 40S-субчастицы, «заккупоривая» его подобно пробке [247–249]. N-Концевой домен стабилизирует это связывание и, вероятно, тоже взаимодействует с 40S-субчастицей. Препятствуя загрузке клеточных мРНК в рибосому, NSP1 в то же время позволяет транслироваться мРНК SARS-CoV-2. Дело в том, что вирусные гРНК и сгРНК имеют общий лидер, содержащий шпилечную структуру SL1, которая специфично связывается с N-концевым доменом белка [250–252]. Это взаимодействие приводит к освобождению мРНК-канала рибосомы от С-концевого домена NSP1 и позволяет начать трансляцию [251, 252]. Интересно, что связыванию NSP1 с 40S-субчастицей способствуют факторы инициации, а с целой рибосомой белок взаимодействует хуже [253]. Это позволяет предположить, что в заражённой клетке ингибирующий комплекс образуется именно на стадии инициации трансляции. Так или иначе, NSP1 является мощным инструментом, помогающим вирусу распоряжаться ресурсами клетки, но одновременно он может быть и удобной мишенью для антивирусной терапии [250].

Белок NSP1 другого коронавируса, SARS-CoV, также способен связываться с рибосомой, ингибируя трансляцию клеточных мРНК. Однако в данном случае NSP1, вероятно, привлекает ряд клеточных эндонуклеаз, избирательно расщепляющих мРНК в зависимости от используемого ими механизма инициации трансляции [254].

Известны примеры, когда вирусы осуществляют ограниченный протеолиз факторов ини-

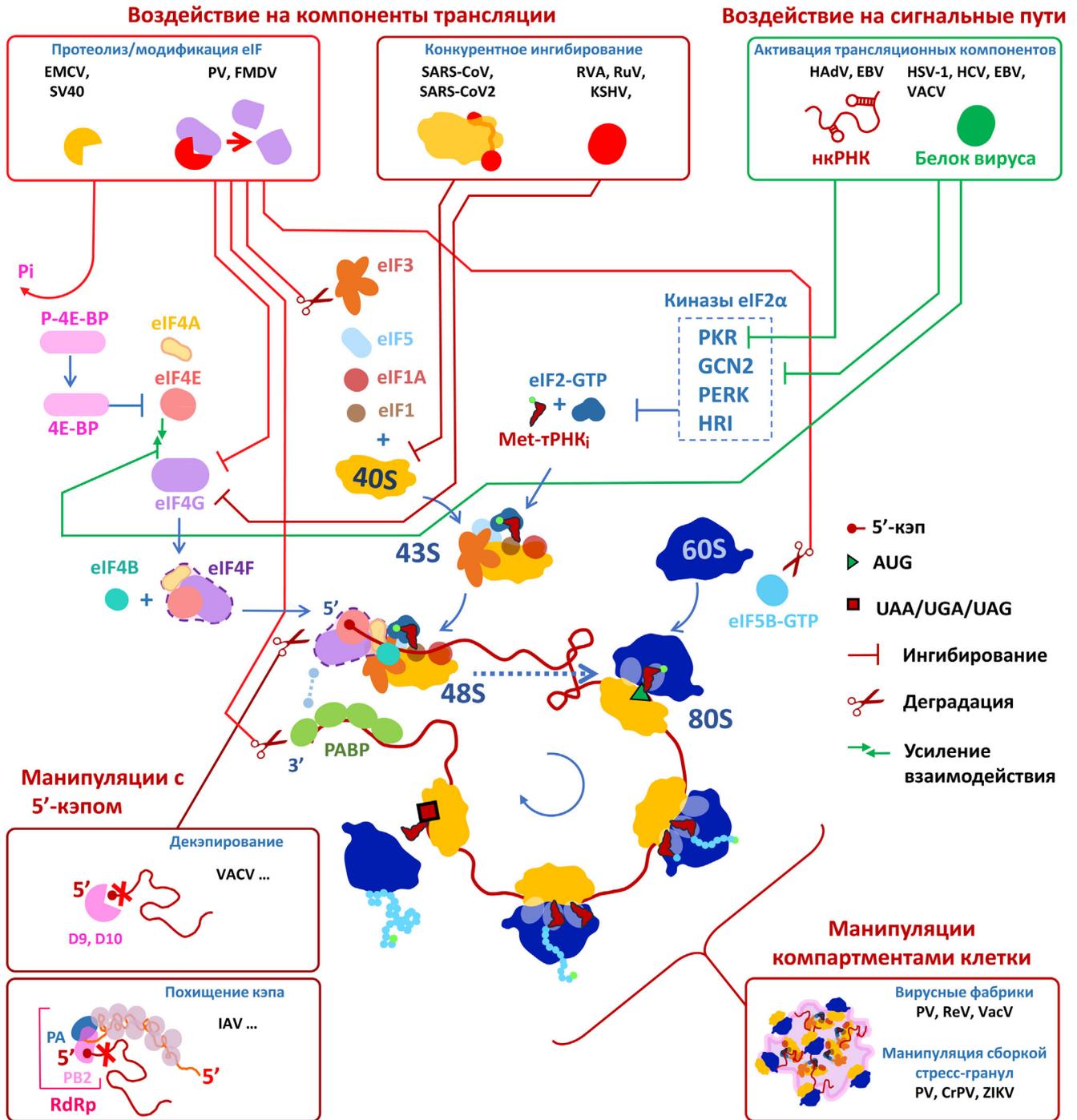


Рис. 5. Механизмы создания вирусами конкурентных преимуществ для трансляции собственных мРНК. Полные названия вирусов приведены в тексте статьи

циации трансляции. Так, в разделах, посвящённых IRES-элементам, мы упоминали вирусные протеазы, разрезающие eIF4G. Подобные механизмы позволяют вирусам повысить эффективность кэп-независимой трансляции, направляя на неё высвобождающиеся ресурсы клетки [80, 255]. Иногда протеолизу подвергаются фак-

торы инициации, необходимые для трансляции мРНК самого вируса (субъединицы eIF3, eIF5B, PABP и другие), что может использоваться для регуляции жизненного цикла.

Возможны и другие пути воздействия на инициаторный аппарат [255]. Например, РНК-полимераза и белок NS1 вируса гриппа привле-

кают фактор eIF4G на вирусные мРНК, обеспечивая им победу в конкуренции за этот дефицитный фактор; белок ICP6 вируса простого герпеса 1-го типа (herpes simplex virus 1, HSV-1) усиливает взаимодействие eIF4E с eIF4G, не давая клетке инактивировать трансляцию с помощью 4E-BP1 в ответ на заражение; вирус EMCV, напротив, активирует 4E-BP1 (см. выше), поскольку не нуждается в eIF4E; обезьяний полиомавирус SV40 также активирует 4E-BP1 на поздних стадиях инфекции; ряд вирусов манипулируют белком PABP, модулируя образование замкнутой петли (белок капсида вируса краснухи, NS1 вируса гриппа, белки SOX10 и K10 вируса KSHV, белок NSP3 ротавируса). Подробнее с этой темой можно ознакомиться в обзоре Walsh и Mohr [255].

Манипуляции с 5'-кэпом. Некоторые вирусы используют другой способ «нечестной конкуренции» – выводят из строя клеточные матрицы. Так, белки D9 и D10 вируса VACV прямо связывают кэп клеточных мРНК и декэпируют их. Это высвобождает ресурсы для трансляции неэкспроцированных вирусных мРНК с 5'-поли(А)-лидером, что необходимо на поздней стадии инфекции (см. выше). Интересно, что белок D9 только ингибирует трансляцию, декэпируя мРНК и тем самым провоцируя их деградацию, а D10 дополнительно стимулирует трансляцию мРНК с поли(А)-лидерами [256].

Ещё более виртуозным является механизм «похищения» кэпа у клеточных мРНК, осуществляемый (–)РНК-вирусами семейств Arenaviridae, Bunyaviridae и Orthomyxoviridae. Эти вирусы не имеют собственных экспроцирующих ферментов, однако кодируют белки, способные связывать кэп и отщеплять его вместе с 5'-концевыми 15–20 нт клеточной мРНК. Отделяемый фрагмент используется затем как затравка для синтеза (+)-цепи РНК вируса, содержащей экспроцированный отрезок клеточной мРНК. Например, репликаза (RdRp) вируса гриппа IAV состоит из трёх субъединиц: PA, PB1 и PB2, при этом PB2 отвечает за связывание кэпа, а PA обладает эндонуклеазной активностью. Представители аренавирусов и буньявирусов совмещают функции связывания кэпа и эндонуклеазы в одном белке L.

Другие вирусы (как РНК-, так и ДНК-содержащие, но также размножающиеся в цитоплазме) приобрели в ходе эволюции собственный экспроцирующий аппарат. Экспроцирующие ферменты закодированы в геномах VACV, RuV, SARS-CoV, SARS-CoV-2, вируса Эбола (Ebola virus, EBOV), вируса везикулярного стоматита (vesicular stomatitis virus, VSV), гигантских вирусов простейших и других. Наиболее изученным является гетеродимер D1-D12 VACV, широко применяе-

мый для экспроцирования мРНК, синтезированных *in vitro*. Подробнее о декэпировании, «похищении» кэпа и неканоническом экспроцировании вирусных РНК можно прочитать в обзоре Decroly et al. [257].

Компартментализованная трансляция вирусных мРНК. Отдельного рассмотрения заслуживают механизмы, связанные с локализованной трансляцией, формированием РНП-гранул и образованием особых вирусных компартментов внутри клетки [258]. У многих РНК-содержащих вирусов жизненный цикл связан с «вирусными фабриками» (viral factory, VF) – специальными внутриклеточными структурами, формирующимися с использованием мембранных органелл клетки [259]. У (+)РНК-содержащих вирусов VF, как правило, являются лишь платформами для синтеза вирусных РНК, но у ряда вирусов с дцРНК- и (–)РНК-геномом они служат ещё и местом трансляции их мРНК, ограждая их от действия клеточных регуляторных механизмов. В такие специализированные компартменты вирусы могут активно привлекать трансляционные факторы [258]. Ассоциация трансляции вирусных мРНК с мембранами может играть роль в устойчивости её к клеточному ответу на инфекцию и безотносительно VF – как в описанном выше случае мРНК полиовируса, избегающей ингибирующего эффекта фосфорилирования eIF2 α благодаря мембранной локализации активной фракции eIF2 в инфицированной клетке [97].

Клеточный ответ на вирусную инфекцию включает образование стресс-гранул. Это приводит, в частности, к уменьшению концентрации доступных трансляционных компонентов в цитозоле, что должно мешать трансляции вирусных мРНК. Однако многие вирусы умело манипулируют этим процессом, либо препятствуя образованию гранул (например, путём протеолиза их ключевых компонентов), как это делают ZIKV, VSV, IAV и ряд пикорнавирусов, либо, наоборот, способствуя их сборке в нужный момент жизненного цикла, как RuV [260, 261]. Подробнее о механизмах, связанных с локализованной трансляцией вирусных мРНК, и манипуляциях мембранными и гранулярными компартментами можно прочитать в соответствующих обзорах [258–261].

Воздействие на компоненты сигнальных каскадов. Ещё одна распространённая стратегия, используемая вирусами для манипуляции стрессовым ответом, заключается в непосредственном воздействии на сигнальные пути клетки. Классический пример – ингибирование киназы α -субъединицы eIF2, способствующих репрессии инициации трансляции. Белки US1 вируса HSV-1, SM EBV, E3L и K3L VACV, NS5A HCV

связываются с киназой PKR/EIF2AK2 и ингибируют её активность. Белки gB HSV-1, K3L VACV и E2 HCV действуют на другую киназу eIF2 α , PERK/EIF2AK3. При этом E2 HCV выступает в роли псевдосубстрата как для PKR, так и для PERK. Известны случаи, когда с PKR связываются малые некодирующие РНК вирусов, препятствуя её активации: например, такой активностью обладают РНК *EBER* вируса EBV и РНК *IA* аденовируса [255, 262].

Нельзя забывать и об опосредованном влиянии вирусной инфекции на инициацию трансляции. Например, пикорнавирусы способны влиять на проницаемость клеточной мембраны и изменять внутриклеточные концентрации солей, оптимизируя условия для инициации трансляции IRES-элементами и негативно влияя на кэп-зависимую трансляцию [263, 264].

Зачастую разные механизмы избирательного подавления биосинтеза белка в клетке работают скоординированно, лишая клеточные мРНК одновременно 5'-кэпа, аппарата кэп-зависимой трансляции и канонической доставки Met-tRNA_i, а также доступа к компартментам с активными трансляционными компонентами. Дополнительное воздействие осуществляется путём манипуляции механизмами стрессового ответа клетки. Всё это ставит клетку под контроль размножающегося в ней вируса и зачастую лишает её шансов не только на выживание, но и на контролируруемую гибель.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном обзоре мы рассмотрели неканонические механизмы инициации трансляции, характерные для вирусных мРНК. Использование этих механизмов даёт им конкурентное преимущество

в условиях вирусной инфекции, зачастую усугубляемое активностью специальных вирусных белков. С другой стороны, эти особенности делают вирусы потенциально уязвимыми к лекарствам, направленным на специфические компоненты этих путей [265]. Низкомолекулярные вещества и олигонуклеотиды, изменяющие сложную структуру IRES-элементов или CITE, нарушающие важные РНК–РНК и РНК–белковые взаимодействия, атакующие ITAF и другие критические для неканонической трансляции компоненты, могут препятствовать экспрессии вирусных мРНК и блокировать инфекцию. Потенциал антивирусной терапии, связанной с таким подходом, ещё предстоит раскрыть.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда: гранты № 19-74-20186 (К.С.В., раздел «Структурные элементы в 3'-НТО вирусных мРНК, вовлечённые в инициацию трансляции») и № 20-14-00178 (Н.О.К., остальные разделы).

Благодарности. Авторы благодарны А.А. Богданову за приглашение в тематический сборник, посвящённый памяти А.С. Спирина, а также А.А. Аграновскому и М.В. Щепетильникову за обсуждение отдельных разделов обзора. И.И.С. и С.Е.Д. входят в состав Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rodrigues, R. A. L., da Silva, L. C. F., and Abrahão, J. S. (2020) Translating the language of giants: translation-related genes as a major contribution of giant viruses to the virosphere, *Arch. Virol.*, **165**, 1267-1278, doi: 10.1007/s00705-020-04626-2.
- Pelletier, J., and Sonenberg, N. (2019) The organizing principles of eukaryotic ribosome recruitment, *Annu. Rev. Biochem.*, **88**, 307-335, doi: 10.1146/annurev-biochem-013118-111042.
- Hinnebusch, A. G. (2014) The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation, *Annu. Rev. Biochem.*, **83**, 779-812, doi: 10.1146/annurev-biochem-060713-035802.
- Alekhina, O. M., and Vassilenko, K. S. (2012) Translation initiation in eukaryotes: versatility of the scanning model, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 1465-1477, doi: 10.1134/S0006297912130056.
- Eliseeva, I. A., Lyabin, D. N., and Ovchinnikov, L. P. (2013) Poly(A)-binding proteins: structure, domain organization, and activity regulation, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 1377-1391, doi: 10.1134/S0006297913130014.
- Hinnebusch, A. G. (2017) Structural insights into the mechanism of scanning and start codon recognition in eukaryotic translation initiation, *Trends Biochem. Sci.*, **42**, 589-611, doi: 10.1016/j.tibs.2017.03.004.
- Kozak, M. (2002) Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation, *Gene*, **299**, 1-34, doi: 10.1016/s0378-1119(02)01056-9.
- Terenin, I. M., Akulich, K. A., Andreev, D. E., Polyanskaya, S. A., Shatsky, I. N., and Dmitriev, S. E. (2016) Sliding of a 43S ribosomal complex from the recognized AUG codon triggered by a delay in eIF2-bound GTP hydrolysis, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 1882-1893, doi: 10.1093/nar/gkv1514.

9. Latorre, P., Kolakofsky, D., and Curran, J. (1998) Sendai virus Y proteins are initiated by a ribosomal shunt, *Mol. Cell Biol.*, **18**, 5021-5031, doi: 10.1128/MCB.18.9.5021.
10. Firth, A. E., and Brierley, I. (2012) Non-canonical translation in RNA viruses, *J. Gen. Virol.*, **93**, 1385-1409, doi: 10.1099/vir.0.042499-0.
11. Taliansky, M. E., and Robinson, D. J. (2003) Molecular biology of umbraviruses: phantom warriors, *J. Gen. Virol.*, **84**, 1951-1960, doi: 10.1099/vir.0.19219-0.
12. Matsuda, D., and Dreher, T. W. (2006) Close spacing of AUG initiation codons confers dicistronic character on a eukaryotic mRNA, *RNA*, **12**, 1338-1349, doi: 10.1261/rna.67906.
13. Kozak, M. (1995) Adherence to the first-AUG rule when a second AUG codon follows closely upon the first, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2662-2666, doi: 10.1073/pnas.92.7.2662.
14. Dasso, M. C., Milburn, S. C., Hershey, J. W., and Jackson, R. J. (1990) Selection of the 5'-proximal translation initiation site is influenced by mRNA and eIF-2 concentrations, *Eur. J. Biochem.*, **187**, 361-371, doi: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb15313.x.
15. Frolov, I., and Schlesinger, S. (1994) Translation of Sindbis virus mRNA: effects of sequences downstream of the initiating codon, *J. Virol.*, **68**, 8111-8117, doi: 10.1128/JVI.68.12.8111-8117.1994.
16. Ventoso, I., Sanz, M. A., Molina, S., Berlanga, J. J., Carrasco, L., and Esteban, M. (2006) Translational resistance of late alphavirus mRNA to eIF2alpha phosphorylation: a strategy to overcome the antiviral effect of protein kinase PKR, *Genes Dev.*, **20**, 87-100, doi: 10.1101/gad.357006.
17. Pappas, C. L., Tzeng, W. P., and Frey, T. K. (2006) Evaluation of cis-acting elements in the rubella virus subgenomic RNA that play a role in its translation, *Arch. Virol.*, **151**, 327-346, doi: 10.1007/s00705-005-0614-x.
18. Gorchakov, R., Frolova, E., Williams, B. R., Rice, C. M., and Frolov, I. (2004) PKR-dependent and -independent mechanisms are involved in translational shutoff during Sindbis virus infection, *J. Virol.*, **78**, 8455-8467, doi: 10.1128/JVI.78.16.8455-8467.2004.
19. Sanz, M. A., Castelló, A., Ventoso, I., Berlanga, J. J., and Carrasco, L. (2009) Dual mechanism for the translation of subgenomic mRNA from Sindbis virus in infected and uninfected cells, *PLoS One*, **4**, e4772, doi: 10.1371/journal.pone.0004772.
20. Garcia-Moreno, M., Sanz, M. A., Pelletier, J., and Carrasco, L. (2013) Requirements for eIF4A and eIF2 during translation of Sindbis virus subgenomic mRNA in vertebrate and invertebrate host cells, *Cell Microbiol.*, **15**, 823-840, doi: 10.1111/cmi.12079.
21. Carrasco, L., Sanz, M. A., and Gonzalez-Almela, E. (2018) The regulation of translation in alphavirus-infected cells, *Viruses*, **10**, 70, doi: 10.3390/v10020070.
22. Skabkin, M. A., Skabkina, O. V., Dhote, V., Komar, A. A., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. (2010) Activities of Ligatin and MCT-1/DENR in eukaryotic translation initiation and ribosomal recycling, *Genes Dev.*, **24**, 1787-1801, doi: 10.1101/gad.1957510.
23. Sanz, M. A., González Almela, E., and Carrasco, L. (2017) Translation of Sindbis Subgenomic mRNA is Independent of eIF2, eIF2A and eIF2D, *Sci. Rep.*, **7**, 43876, doi: 10.1038/srep43876.
24. Clyde, K., and Harris, E. (2006) RNA secondary structure in the coding region of dengue virus type 2 directs translation start codon selection and is required for viral replication, *J. Virol.*, **80**, 2170-2182, doi: 10.1128/JVI.80.5.2170-2182.2006.
25. Edgil, D., Polacek, C., and Harris, E. (2006) Dengue virus utilizes a novel strategy for translation initiation when cap-dependent translation is inhibited, *J. Virol.*, **80**, 2976-2986, doi: 10.1128/JVI.80.6.2976-2986.2006.
26. Fütterer, J., Kiss-László, Z., and Hohn, T. (1993) Nonlinear ribosome migration on cauliflower mosaic virus 35S RNA, *Cell*, **73**, 789-802, doi: 10.1016/0092-8674(93)90257-q.
27. Curran, J., and Kolakofsky, D. (1988) Scanning independent ribosomal initiation of the Sendai virus X protein, *EMBO J.*, **7**, 2869-2874, doi: 10.1002/j.1460-2075.1988.tb03143.x.
28. de Breyne, S., Simonet, V., Pelet, T., and Curran, J. (2003) Identification of a cis-acting element required for shunt-mediated translational initiation of the Sendai virus Y proteins, *Nucleic Acids Res.*, **31**, 608-618, doi: 10.1093/nar/gkg143.
29. Yueh, A., and Schneider, R. J. (2000) Translation by ribosome shunting on adenovirus and hsp70 mRNAs facilitated by complementarity to 18S rRNA, *Genes Dev.*, **14**, 414-421.
30. Dmitriev, S. E., Terenin, I. M., Dunaevsky, Y. E., Merrick, W. C., and Shatsky, I. N. (2003) Assembly of 48S translation initiation complexes from purified components with mRNAs that have some base pairing within their 5'-untranslated regions, *Mol. Cell Biol.*, **23**, 8925-8933, doi: 10.1128/MCB.23.24.8925-8933.2003.
31. Xi, Q., Cuesta, R., and Schneider, R. J. (2004) Tethering of eIF4G to adenoviral mRNAs by viral 100k protein drives ribosome shunting, *Genes Dev.*, **18**, 1997-2009, doi: 10.1101/gad.1212504.
32. Rajyaguru, P., and Parker, R. (2012) RGG motif proteins: modulators of mRNA functional states, *Cell Cycle*, **11**, 2594-2599, doi: 10.4161/cc.20716.
33. Dolph, P. J., Racaniello, V., Villamarin, A., Palladino, F., and Schneider, R. J. (1988) The adenovirus tripartite leader may eliminate the requirement for cap-binding protein complex during translation initiation, *J. Virol.*, **62**, 2059-2066, doi: 10.1128/JVI.62.6.2059-2066.1988.
34. Pooggin, M. M., and Ryabova, L. A. (2018) Ribosome shunting, polycistronic translation, and evasion of antiviral defenses in plant pararetroviruses and beyond, *Front. Microbiol.*, **9**, 644, doi: 10.3389/fmicb.2018.00644.
35. Pestova, T. V., and Kolupaeva, V. G. (2002) The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection, *Genes Dev.*, **16**, 2906-2922, doi: 10.1101/gad.1020902.
36. Hann, L. E., and Gehrke, L. (1995) mRNAs containing the unstructured 5' leader sequence of alfalfa mosaic virus RNA 4 translate inefficiently in lysates from poliovirus-infected HeLa cells, *J. Virol.*, **69**, 4986-4993, doi: 10.1128/JVI.69.8.4986-4993.1995.
37. Gallie, D. R., Sleat, D. E., Watts, J. W., Turner, P. C., and Wilson, T. M. (1987) A comparison of eukaryotic viral 5'-leader sequences as enhancers of mRNA expression *in vivo*, *Nucleic Acids Res.*, **15**, 8693-8711, doi: 10.1093/nar/15.21.8693.
38. Agalarov, S., Sakharov, P. A., Fattakhova, D., Sogorin, E. A., and Spirin, A. S. (2014) Internal translation initiation and eIF4F/ATP-independent scanning of mRNA by eukaryotic ribosomal particles, *Sci. Rep.*, **4**, 4438, doi: 10.1038/srep04438.
39. Yang, Z., Martens, C. A., Bruno, D. P., Porcella, S. F., and Moss, B. (2012) Pervasive initiation and 3'-end formation

- of poxvirus postreplicative RNAs, *J. Biol. Chem.*, **287**, 31050-31060, doi: 10.1074/jbc.M112.390054.
40. Vopálenský, V., Sýkora, M., Mělková, Z., Mašek, T., and Pospíšek, M. (2020) Transcripts of vaccinia virus postreplicative genes do not contain a 5' methylguanosine cap, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.07.15.204867.
 41. Shirokikh, N. E., and Spirin, A. S. (2008) Poly(A) leader of eukaryotic mRNA bypasses the dependence of translation on initiation factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 10738-10743, doi: 10.1073/pnas.0804940105.
 42. Mulder, J., Robertson, M. E., Seamons, R. A., and Belsham, G. J. (1998) Vaccinia virus protein synthesis has a low requirement for the intact translation initiation factor eIF4F, the cap-binding complex, within infected cells, *J. Virol.*, **72**, 8813-8819, doi: 10.1128/JVI.72.11.8813-8819.1998.
 43. Bablanian, R., Goswami, S. K., Esteban, M., Banerjee, A. K., and Merrick, W. C. (1991) Mechanism of selective translation of vaccinia virus mRNAs: differential role of poly(A) and initiation factors in the translation of viral and cellular mRNAs, *J. Virol.*, **65**, 4449-4460, doi: 10.1128/JVI.65.8.4449-4460.1991.
 44. Vopálenský, V., Sýkora, M., Mašek, T., and Pospíšek, M. (2019) Messenger RNAs of yeast virus-like elements contain non-templated 5' Poly(A) leaders, and their expression is independent of eIF4E and Pab1, *Front. Microbiol.*, **10**, 2366, doi: 10.3389/fmicb.2019.02366.
 45. Dhungel, P., Cao, S., and Yang, Z. (2017) The 5'-poly(A) leader of poxvirus mRNA confers a translational advantage that can be achieved in cells with impaired cap-dependent translation, *PLoS Pathog.*, **13**, e1006602, doi: 10.1371/journal.ppat.1006602.
 46. Jha, S., Rollins, M. G., Fuchs, G., Procter, D. J., Hall, E. A., et al. (2017) Trans-kingdom mimicry underlies ribosome customization by a poxvirus kinase, *Nature*, **546**, 651-655, doi: 10.1038/nature22814.
 47. Jan, E., Mohr, I., and Walsh, D. (2016) A cap-to-tail guide to mRNA translation strategies in virus-infected cells, *Annu. Rev. Virol.*, **3**, 283-307, doi: 10.1146/annurev-virology-100114-055014.
 48. Linero, F., Welnowska, E., Carrasco, L., and Scolaro, L. (2013) Participation of eIF4F complex in Junin virus infection: blockage of eIF4E does not impair virus replication, *Cell Microbiol.*, **15**, 1766-1782, doi: 10.1111/cmi.12149.
 49. Leen, E. N., Sorgeloos, F., Correia, S., Chaudhry, Y., Cannac, F., et al. (2016) A conserved interaction between a C-terminal motif in Norovirus VPg and the HEAT-1 domain of eIF4G is essential for translation initiation, *PLoS Pathog.*, **12**, e1005379, doi: 10.1371/journal.ppat.1005379.
 50. Chung, L., Bailey, D., Leen, E. N., Emmott, E. P., Chaudhry, Y., et al. (2014) Norovirus translation requires an interaction between the C terminus of the genome-linked viral protein VPg and eukaryotic translation initiation factor 4G, *J. Biol. Chem.*, **289**, 21738-21750, doi: 10.1074/jbc.M114.550657.
 51. Coutinho de Oliveira, L., Volpon, L., Rahardjo, A. K., Osborne, M. J., Culjkovic-Kraljacic, B., et al. (2019) Structural studies of the eIF4E-VPg complex reveal a direct competition for capped RNA: implications for translation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 24056-24065, doi: 10.1073/pnas.1904752116.
 52. Khan, M. A., and Goss, D. J. (2019) Poly (A) binding protein enhances the binding affinity of potyvirus VPg to eukaryotic initiation factor eIF4F and activates *in vitro* translation, *Int. J. Biol. Macromol.*, **121**, 947-955, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.135.
 53. Daughenbaugh, K. F., Fraser, C. S., Hershey, J. W., and Hardy, M. E. (2003) The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment, *EMBO J.*, **22**, 2852-2859, doi: 10.1093/emboj/cdg251.
 54. Hosmillo, M., Lu, J., McAllaster, M. R., Eaglesham, J. B., Wang, X., et al. (2019) Noroviruses subvert the core stress granule component G3BP1 to promote viral VPg-dependent translation, *Elife*, **8**, e46681, doi: 10.7554/eLife.46681.
 55. Burroughs, J. N., and Brown, F. (1978) Presence of a covalently linked protein on calicivirus RNA, *J. Gen. Virol.*, **41**, 443-446, doi: 10.1099/0022-1317-41-2-443.
 56. Mailliot, J., and Martin, F. (2018) Viral internal ribosomal entry sites: four classes for one goal, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **9**, e1458, doi: 10.1002/wrna.1458.
 57. Yamamoto, H., Unbehaun, A., and Spahn, C. M. T. (2017) Ribosomal chamber music: toward an understanding of IRES mechanisms, *Trends Biochem. Sci.*, **42**, 655-668, doi: 10.1016/j.tibs.2017.06.002.
 58. Jaafar, Z. A., and Kieft, J. S. (2019) Viral RNA structure-based strategies to manipulate translation, *Nat. Rev. Microbiol.*, **17**, 110-123, doi: 10.1038/s41579-018-0117-x.
 59. Arhab, Y., Bulakhov, A. G., Pestova, T. V., and Hellen, C. U. T. (2020) Dissemination of Internal Ribosomal Entry Sites (IRES) between viruses by horizontal gene transfer, *Viruses*, **12**, 612, doi: 10.3390/v12060612.
 60. Kwan, T., and Thompson, S. R. (2019) Noncanonical translation initiation in eukaryotes, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **11**, a032672, doi: 10.1101/cshperspect.a032672.
 61. Jang, S. K., Krausslich, H. G., Nicklin, M. J., Duke, G. M., Palmenberg, A. C., and Wimmer, E. (1988) A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during *in vitro* translation, *J. Virol.*, **62**, 2636-2643, doi: 10.1128/JVI.62.8.2636-2643.1988.
 62. Pelletier, J., and Sonenberg, N. (1988) Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA, *Nature*, **334**, 320-325, doi: 10.1038/334320a0.
 63. Terenin, I. M., Smirnova, V. V., Andreev, D. E., Dmitriev, S. E., and Shatsky, I. N. (2017) A researcher's guide to the galaxy of IRESs, *Cell. Mol. Life Sci.*, **74**, 1431-1455, doi: 10.1007/s00018-016-2409-5.
 64. Kozak, M. (2005) A second look at cellular mRNA sequences said to function as internal ribosome entry sites, *Nucleic Acids Res.*, **33**, 6593-6602, doi: 10.1093/nar/gki958.
 65. Jackson, R. J. (2013) The current status of vertebrate cellular mRNA IRESs, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**, a011569, doi: 10.1101/cshperspect.a011569.
 66. Thompson, S. R. (2012) So you want to know if your message has an IRES? *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **3**, 697-705, doi: 10.1002/wrna.1129.
 67. Andreev, D. E., Terenin, I. M., Dmitriev, S. E., and Shatsky, I. N. (2016) Pros and cons of pDNA and mRNA transfection to study mRNA translation in mammalian cells, *Gene*, **578**, 1-6, doi: 10.1016/j.gene.2015.12.008.
 68. Barreau, C., Dutertre, S., Paillard, L., and Osborne, H. B. (2006) Liposome-mediated RNA transfection should be used with caution, *RNA*, **12**, 1790-1793, doi: 10.1261/rna.191706.
 69. Dmitriev, S. E., Andreev, D. E., Adyanova, Z. V., Terenin, I. M., and Shatsky, I. N. (2009) Efficient cap-dependent

- translation of mammalian mRNAs with long and highly structured 5'-untranslated regions *in vitro* and *in vivo*, *Mol. Biol. (Mosk.)*, **43**, 108-113, doi: 10.1134/S0026893309010154.
70. Dmitriev, S. E., Bykova, N. V., Andreev, D. E., and Terenin, I. M. (2006) Adequate system for studying translation initiation on the human retrotransposon L1 mRNA *in vitro*, *Mol. Biol. (Mosk.)*, **40**, 20-24, doi: 10.1134/S0026893306010043.
 71. Avanzino, B. C., Jue, H., Miller, C. M., Cheung, E., Fuchs, G., and Fraser, C. S. (2018) Molecular mechanism of poliovirus Sabin vaccine strain attenuation, *J. Biol. Chem.*, **293**, 15471-15482, doi: 10.1074/jbc.RA118.004913.
 72. Beckham, S. A., Matak, M. Y., Belousoff, M. J., Venugopal, H., Shah, N., et al. (2020) Structure of the PCBP2/stem-loop IV complex underlying translation initiation mediated by the poliovirus type I IRES, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 8006-8021, doi: 10.1093/nar/gkaa519.
 73. Chamond, N., Deforges, J., Ulryck, N., and Sargueil, B. (2014) 40S recruitment in the absence of eIF4G/4A by EMCV IRES refines the model for translation initiation on the archetype of type II IRESs, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 10373-10384, doi: 10.1093/nar/gku720.
 74. Kieft, J. S., Zhou, K., Jubin, R., and Doudna, J. A. (2001) Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA, *RNA*, **7**, 194-206, doi: 10.1017/s1355838201001790.
 75. Petrov, A., Grosely, R., Chen, J., O'Leary, S. E., and Puglisi, J. D. (2016) Multiple parallel pathways of translation initiation on the CrPV IRES, *Mol. Cell*, **62**, 92-103, doi: 10.1016/j.molcel.2016.03.020.
 76. Jang, C. J., and Jan, E. (2010) Modular domains of the Dicistroviridae intergenic internal ribosome entry site, *RNA*, **16**, 1182-1195, doi: 10.1261/rna.2044610.
 77. Jang, S. K., Davies, M. V., Kaufman, R. J., and Wimmer, E. (1989) Initiation of protein synthesis by internal entry of ribosomes into the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA *in vivo*, *J. Virol.*, **63**, 1651-1660, doi: 10.1128/JVI.63.4.1651-1660.1989.
 78. Pilipenko, E. V., Blinov, V. M., Romanova, L. I., Sinyakov, A. N., Maslova, S. V., and Agol, V. I. (1989) Conserved structural domains in the 5'-untranslated region of picornaviral genomes: an analysis of the segment controlling translation and neurovirulence, *Virology*, **168**, 201-209, doi: 10.1016/0042-6822(89)90259-6.
 79. Skinner, M. A., Racaniello, V. R., Dunn, G., Cooper, J., Minor, P. D., and Almond, J. W. (1989) New model for the secondary structure of the 5' non-coding RNA of poliovirus is supported by biochemical and genetic data that also show that RNA secondary structure is important in neurovirulence, *J. Mol. Biol.*, **207**, 379-392, doi: 10.1016/0022-2836(89)90261-1.
 80. Martínez-Salas, E., Francisco-Velilla, R., Fernandez-Chamorro, J., Lozano, G., and Diaz-Toledano, R. (2015) Picornavirus IRES elements: RNA structure and host protein interactions, *Virus Res.*, **206**, 62-73, doi: 10.1016/j.virusres.2015.01.012.
 81. Pilipenko, E. V., Gmyl, A. P., Maslova, S. V., Svitkin, Y. V., Sinyakov, A. N., and Agol, V. I. (1992) Prokaryotic-like *cis* elements in the cap-independent internal initiation of translation on picornavirus RNA, *Cell*, **68**, 119-131, doi: 10.1016/0092-8674(92)90211-t.
 82. Slobodskaya, O. R., Gmyl, A. P., Maslova, S. V., Tolskaya, E. A., Viktorova, E. G., and Agol, V. I. (1996) Poliovirus neurovirulence correlates with the presence of a cryptic AUG upstream of the initiator codon, *Virology*, **221**, 141-150, doi: 10.1006/viro.1996.0360.
 83. Lulla, V., Dinan, A. M., Hosmillo, M., Chaudhry, Y., Sherry, L., et al. (2019) An upstream protein-coding region in enteroviruses modulates virus infection in gut epithelial cells, *Nat. Microbiol.*, **4**, 280-292, doi: 10.1038/s41564-018-0297-1.
 84. Hellen, C. U., Pestova, T. V., and Wimmer, E. (1994) Effect of mutations downstream of the internal ribosome entry site on initiation of poliovirus protein synthesis, *J. Virol.*, **68**, 6312-6322, doi: 10.1128/JVI.68.10.6312-6322.1994.
 85. Sweeney, T. R., Abaeva, I. S., Pestova, T. V., and Hellen, C. U. (2014) The mechanism of translation initiation on type 1 picornavirus IRESs, *EMBO J.*, **33**, 76-92, doi: 10.1002/embj.201386124.
 86. Kaminski, A., Pöyry, T. A., Skene, P. J., and Jackson, R. J. (2010) Mechanism of initiation site selection promoted by the human rhinovirus 2 internal ribosome entry site, *J. Virol.*, **84**, 6578-6589, doi: 10.1128/JVI.00123-10.
 87. Kafasla, P., Morgner, N., Robinson, C. V., and Jackson, R. J. (2010) Polypyrimidine tract-binding protein stimulates the poliovirus IRES by modulating eIF4G binding, *EMBO J.*, **29**, 3710-3722, doi: 10.1038/emboj.2010.231.
 88. Andreev, D. E., Hirnet, J., Terenin, I. M., Dmitriev, S. E., Niepmann, M., and Shatsky, I. N. (2012) Glycyl-tRNA synthetase specifically binds to the poliovirus IRES to activate translation initiation, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 5602-5614, doi: 10.1093/nar/gks182.
 89. Meerovitch, K., Svitkin, Y. V., Lee, H. S., Lejbkowitz, F., Kenan, D. J., et al. (1993) La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate, *J. Virol.*, **67**, 3798-3807, doi: 10.1128/JVI.67.7.3798-3807.1993.
 90. Hunt, S. L., Hsuan, J. J., Totty, N., and Jackson, R. J. (1999) unr, a cellular cytoplasmic RNA-binding protein with five cold-shock domains, is required for internal initiation of translation of human rhinovirus RNA, *Genes Dev.*, **13**, 437-448, doi: 10.1101/gad.13.4.437.
 91. Svitkin, Y. V., Pestova, T. V., Maslova, S. V., and Agol, V. I. (1988) Point mutations modify the response of poliovirus RNA to a translation initiation factor: a comparison of neurovirulent and attenuated strains, *Virology*, **166**, 394-404, doi: 10.1016/0042-6822(88)90510-7.
 92. Agol, V. I., Drozdov, S. G., Ivannikova, T. A., Kolesnikova, M. S., Korolev, M. B., and Tolskaya, E. A. (1989) Restricted growth of attenuated poliovirus strains in cultured cells of a human neuroblastoma, *J. Virol.*, **63**, 4034-4038, doi: 10.1128/JVI.63.9.4034-4038.1989.
 93. La Monica, N., and Racaniello, V. R. (1989) Differences in replication of attenuated and neurovirulent polioviruses in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y, *J. Virol.*, **63**, 2357-2360, doi: 10.1128/JVI.63.5.2357-2360.1989.
 94. Guest, S., Pilipenko, E., Sharma, K., Chumakov, K., and Roos, R. P. (2004) Molecular mechanisms of attenuation of the Sabin strain of poliovirus type 3, *J. Virol.*, **78**, 11097-11107, doi: 10.1128/JVI.78.20.11097-11107.2004.
 95. Svitkin, Y. V., Imataka, H., Khaleghpour, K., Kahvejian, A., Liebig, H. D., and Sonenberg, N. (2001) Poly(A)-binding protein interaction with eIF4G stimulates picornavirus IRES-dependent translation, *RNA*, **7**, 1743-1752.
 96. White, J. P., Reineke, L. C., and Lloyd, R. E. (2011) Poliovirus switches to an eIF2-independent mode of translation during infection, *J. Virol.*, **85**, 8884-8893, doi: 10.1128/JVI.00792-11.

97. Kastan, J. P., Dobrikova, E. Y., Bryant, J. D., and Gromeier, M. (2020) CREP mediates selective translation initiation at the endoplasmic reticulum, *Sci. Adv.*, **6**, eaba0745, doi: 10.1126/sciadv.aba0745.
98. Pilipenko, E. V., Blinov, V. M., Chernov, B. K., Dmitrieva, T. M., and Agol, V. I. (1989) Conservation of the secondary structure elements of the 5'-untranslated region of cardio- and aphthovirus RNAs, *Nucleic Acids Res.*, **17**, 5701-5711, doi: 10.1093/nar/17.14.5701.
99. Kolupaeva, V. G., Pestova, T. V., Hellen, C. U., and Shatsky, I. N. (1998) Translation eukaryotic initiation factor 4G recognizes a specific structural element within the internal ribosome entry site of encephalomyocarditis virus RNA, *J. Biol. Chem.*, **273**, 18599-18604, doi: 10.1074/jbc.273.29.18599.
100. Terenin, I. M., Andreev, D. E., Dmitriev, S. E., and Shatsky, I. N. (2013) A novel mechanism of eukaryotic translation initiation that is neither m7G-cap-, nor IRES-dependent, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 1807-1816, doi: 10.1093/nar/gks1282.
101. Pilipenko, E. V., Gmyl, A. P., Maslova, S. V., Belov, G. A., Sinyakov, A. N., et al. (1994) Starting window, a distinct element in the cap-independent internal initiation of translation on picornaviral RNA, *J. Mol. Biol.*, **241**, 398-414, doi: 10.1006/jmbi.1994.1516.
102. Kaminski, A., Howell, M. T., and Jackson, R. J. (1990) Initiation of encephalomyocarditis virus RNA translation: the authentic initiation site is not selected by a scanning mechanism, *EMBO J.*, **9**, 3753-3759, doi: 10.1002/j.1460-2075.1990.tb07588.x.
103. Pestova, T. V., Borukhov, S. I., and Hellen, C. U. (1998) Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons, *Nature*, **394**, 854-859, doi: 10.1038/29703.
104. Andreev, D. E., Fernandez-Miragall, O., Ramajo, J., Dmitriev, S. E., Terenin, I. M., et al. (2007) Differential factor requirement to assemble translation initiation complexes at the alternative start codons of foot-and-mouth disease virus RNA, *RNA*, **13**, 1366-1374, doi: 10.1261/rna.469707.
105. Pilipenko, E. V., Pestova, T. V., Kolupaeva, V. G., Khitrina, E. V., Poperechnaya, A. N., et al. (2000) A cell cycle-dependent protein serves as a template-specific translation initiation factor, *Genes Dev.*, **14**, 2028-2045.
106. Pestova, T. V., Hellen, C. U., and Shatsky, I. N. (1996) Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry, *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 6859-6869, doi: 10.1128/MCB.16.12.6859.
107. Kolupaeva, V. G., Hellen, C. U., and Shatsky, I. N. (1996) Structural analysis of the interaction of the pyrimidine tract-binding protein with the internal ribosomal entry site of encephalomyocarditis virus and foot-and-mouth disease virus RNAs, *RNA*, **2**, 1199-1212.
108. Pilipenko, E. V., Gmyl, A. P., Maslova, S. V., Khitrina, E. V., and Agol, V. I. (1995) Attenuation of Theiler's murine encephalomyelitis virus by modifications of the oligopyrimidine/AUG tandem, a host-dependent translational cis element, *J. Virol.*, **69**, 864-870, doi: 10.1128/JVI.69.2.864-870.1995.
109. Pilipenko, E. V., Viktorova, E. G., Guest, S. T., Agol, V. I., and Roos, R. P. (2001) Cell-specific proteins regulate viral RNA translation and virus-induced disease, *EMBO J.*, **20**, 6899-6908, doi: 10.1093/emboj/20.23.6899.
110. Pilipenko, E. V., Viktorova, E. G., Khitrina, E. V., Maslova, S. V., Jarousse, N., et al. (1999) Distinct attenuation phenotypes caused by mutations in the translational starting window of Theiler's murine encephalomyelitis virus, *J. Virol.*, **73**, 3190-3196, doi: 10.1128/JVI.73.4.3190-3196.1999.
111. Gingras, A. C., Svitkin, Y., Belsham, G. J., Pause, A., and Sonenberg, N. (1996) Activation of the translational suppressor 4E-BP1 following infection with encephalomyocarditis virus and poliovirus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5578-5583, doi: 10.1073/pnas.93.11.5578.
112. Borman, A. M., and Kean, K. M. (1997) Intact eukaryotic initiation factor 4G is required for hepatitis A virus internal initiation of translation, *Virology*, **237**, 129-136, doi: 10.1006/viro.1997.8761.
113. Koirala, D., Shao, Y., Koldobskaya, Y., Fuller, J. R., Watkins, A. M., et al. (2019) A conserved RNA structural motif for organizing topology within picornaviral internal ribosome entry sites, *Nat. Commun.*, **10**, 3629, doi: 10.1038/s41467-019-11585-z.
114. Avanzino, B. C., Fuchs, G., and Fraser, C. S. (2017) Cellular cap-binding protein, eIF4E, promotes picornavirus genome restructuring and translation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 9611-9616, doi: 10.1073/pnas.1704390114.
115. Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M., and Nomoto, A. (1992) Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA, *J. Virol.*, **66**, 1476-1483, doi: 10.1128/JVI.66.3.1476-1483.1992.
116. Pestova, T. V., Shatsky, I. N., Fletcher, S. P., Jackson, R. J., and Hellen, C. U. (1998) A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs, *Genes Dev.*, **12**, 67-83, doi: 10.1101/gad.12.1.67.
117. Malygin, A. A., Kossinova, O. A., Shatsky, I. N., and Karpova, G. G. (2013) HCV IRES interacts with the 18S rRNA to activate the 40S ribosome for subsequent steps of translation initiation, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 8706-8714, doi: 10.1093/nar/gkt632.
118. Quade, N., Boehringer, D., Leibundgut, M., van den Heuvel, J., and Ban, N. (2015) Cryo-EM structure of Hepatitis C virus IRES bound to the human ribosome at 3.9-Å resolution, *Nat. Commun.*, **6**, 7646, doi: 10.1038/ncomms8646.
119. Yamamoto, H., Collier, M., Loerke, J., Ismer, J., Schmidt, A., et al. (2015) Molecular architecture of the ribosome-bound Hepatitis C Virus internal ribosomal entry site RNA, *EMBO J.*, **34**, 3042-3058, doi: 10.15252/embj.201592469.
120. Hashem, Y., des Georges, A., Dhote, V., Langlois, R., Liao, H. Y., et al. (2013) Hepatitis-C-virus-like internal ribosome entry sites displace eIF3 to gain access to the 40S subunit, *Nature*, **503**, 539-543, doi: 10.1038/nature12658.
121. Sizova, D. V., Kolupaeva, V. G., Pestova, T. V., Shatsky, I. N., and Hellen, C. U. (1998) Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' non-translated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs, *J. Virol.*, **72**, 4775-4782, doi: 10.1128/JVI.72.6.4775-4782.1998.
122. Jaafar, Z. A., Oguro, A., Nakamura, Y., and Kieft, J. S. (2016) Translation initiation by the hepatitis C virus IRES requires eIF1A and ribosomal complex remodeling, *Elife*, **5**, e21198, doi: 10.7554/eLife.21198.
123. King, H. A., Cobbold, L. C., and Willis, A. E. (2010) The role of IRES trans-acting factors in regulating translation initiation, *Biochem. Soc. Trans.*, **38**, 1581-1586, doi: 10.1042/BST0381581.

124. Kim, G. W., and Siddiqui, A. (2021) N6-methyladenosine modification of HCV RNA genome regulates cap-independent IRES-mediated translation via YTHDC2 recognition, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2022024118, doi: 10.1073/pnas.2022024118.
125. Robert, F., Kapp, L. D., Khan, S. N., Acker, M. G., Koltz, S., et al. (2006) Initiation of protein synthesis by hepatitis C virus is refractory to reduced eIF2, GTP, Met-tRNA(i)(Met) ternary complex availability, *Mol. Biol. Cell*, **17**, 4632-4644, doi: 10.1091/mbc.e06-06-0478.
126. Terenin, I. M., Dmitriev, S. E., Andreev, D. E., and Shatsky, I. N. (2008) Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 836-841, doi: 10.1038/nsmb.1445.
127. Pestova, T. V., de Breyne, S., Pisarev, A. V., Abaeva, I. S., and Hellen, C. U. (2008) eIF2-dependent and eIF2-independent modes of initiation on the CSFV IRES: a common role of domain II, *EMBO J.*, **27**, 1060-1072, doi: 10.1038/emboj.2008.49.
128. Yamamoto, H., Unbehaun, A., Loerke, J., Behrmann, E., Collier, M., et al. (2014) Structure of the mammalian 80S initiation complex with initiation factor 5B on HCV-IRES RNA, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **21**, 721-727, doi: 10.1038/nsmb.2859.
129. Dmitriev, S. E., Terenin, I. M., Andreev, D. E., Ivanov, P. A., Dunaevsky, J. E., et al. (2010) GTP-independent tRNA delivery to the ribosomal P-site by a novel eukaryotic translation factor, *J. Biol. Chem.*, **285**, 26779-26787, doi: 10.1074/jbc.M110.119693.
130. Weisser, M., Schafer, T., Leibundgut, M., Bohringer, D., Aylett, C. H. S., and Ban, N. (2017) Structural and functional insights into human re-initiation complexes, *Mol. Cell*, **67**, 447-456.e447, doi: 10.1016/j.molcel.2017.06.032.
131. González-Almela, E., Williams, H., Sanz, M. A., and Carrasco, L. (2018) The initiation factors eIF2, eIF2A, eIF2D, eIF4A, and eIF4G are not involved in translation driven by hepatitis C virus IRES in human cells, *Front. Microbiol.*, **9**, 207, doi: 10.3389/fmicb.2018.00207.
132. Young, D. J., Makeeva, D. S., Zhang, F., Anisimova, A. S., Stolboushkina, E. A., et al. (2018) Tma64/eIF2D, Tma20/MCT-1, and Tma22/DENR recycle post-termination 40S subunits *in vivo*, *Mol. Cell*, **71**, 761-774.e765, doi: 10.1016/j.molcel.2018.07.028.
133. Kim, J. H., Park, S. M., Park, J. H., Keum, S. J., and Jang, S. K. (2011) eIF2A mediates translation of hepatitis C viral mRNA under stress conditions, *EMBO J.*, **30**, 2454-2464, doi: 10.1038/emboj.2011.146.
134. de Breyne, S., Yu, Y., Pestova, T. V., and Hellen, C. U. (2008) Factor requirements for translation initiation on the Simian picornavirus internal ribosomal entry site, *RNA*, **14**, 367-380, doi: 10.1261/rna.696508.
135. Lancaster, A. M., Jan, E., and Sarnow, P. (2006) Initiation factor-independent translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site, *RNA*, **12**, 894-902, doi: 10.1261/rna.2342306.
136. Locker, N., Easton, L. E., and Lukavsky, P. J. (2007) HCV and CSFV IRES domain II mediate eIF2 release during 80S ribosome assembly, *EMBO J.*, **26**, 795-805, doi: 10.1038/sj.emboj.7601549.
137. Yokoyama, T., Machida, K., Iwasaki, W., Shigeta, T., Nishimoto, M., et al. (2019) HCV IRES captures an actively translating 80S ribosome, *Mol. Cell*, **74**, 1205-1214.e1208, doi: 10.1016/j.molcel.2019.04.022.
138. Wilson, J. E., Pestova, T. V., Hellen, C. U., and Sarnow, P. (2000) Initiation of protein synthesis from the A site of the ribosome, *Cell*, **102**, 511-520, doi: 10.1016/s0092-8674(00)00055-6.
139. Sasaki, J., and Nakashima, N. (2000) Methionine-independent initiation of translation in the capsid protein of an insect RNA virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 1512-1515, doi: 10.1073/pnas.010426997.
140. Pflugsten, J. S., Costantino, D. A., and Kieft, J. S. (2006) Structural basis for ribosome recruitment and manipulation by a viral IRES RNA, *Science*, **314**, 1450-1454, doi: 10.1126/science.1133281.
141. Fernández, I. S., Bai, X. C., Murshudov, G., Scheres, S. H., and Ramakrishnan, V. (2014) Initiation of translation by cricket paralysis virus IRES requires its translocation in the ribosome, *Cell*, **157**, 823-831, doi: 10.1016/j.cell.2014.04.015.
142. Spahn, C. M., Jan, E., Mulder, A., Grassucci, R. A., Sarnow, P., and Frank, J. (2004) Cryo-EM visualization of a viral internal ribosome entry site bound to human ribosomes: the IRES functions as an RNA-based translation factor, *Cell*, **118**, 465-475, doi: 10.1016/j.cell.2004.08.001.
143. Koh, C. S., Brilot, A. F., Grigorieff, N., and Korostelev, A. A. (2014) Taura syndrome virus IRES initiates translation by binding its tRNA-mRNA-like structural element in the ribosomal decoding center, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 9139-9144, doi: 10.1073/pnas.1406335111.
144. Murray, J., Savva, C. G., Shin, B. S., Dever, T. E., Ramakrishnan, V., and Fernandez, I. S. (2016) Structural characterization of ribosome recruitment and translocation by type IV IRES, *Elife*, **5**, e13567, doi: 10.7554/eLife.13567.
145. Muhs, M., Hilal, T., Mielke, T., Skabkin, M. A., Sanbonmatsu, K. Y., et al. (2015) Cryo-EM of ribosomal 80S complexes with termination factors reveals the translocated cricket paralysis virus IRES, *Mol. Cell*, **57**, 422-432, doi: 10.1016/j.molcel.2014.12.016.
146. Pflugsten, J. S., Costantino, D. A., and Kieft, J. S. (2007) Conservation and diversity among the three-dimensional folds of the Dicistroviridae intergenic region IRESes, *J. Mol. Biol.*, **370**, 856-869, doi: 10.1016/j.jmb.2007.04.076.
147. Abaeva, I. S., Vicens, Q., Boehler, A., Soufari, H., Simonetti, A., et al. (2020) The Halastavi arva virus intergenic region IRES promotes translation by the simplest possible initiation mechanism, *Cell Rep.*, **33**, 108476, doi: 10.1016/j.celrep.2020.108476.
148. Kerr, C. H., Wang, Q. S., Moon, K. M., Keatings, K., Allan, D. W., et al. (2018) IRES-dependent ribosome repositioning directs translation of a +1 overlapping ORF that enhances viral infection, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 11952-11967, doi: 10.1093/nar/gky1121.
149. Ren, Q., Wang, Q. S., Firth, A. E., Chan, M. M., Gouw, J. W., et al. (2012) Alternative reading frame selection mediated by a tRNA-like domain of an internal ribosome entry site, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, E630-639, doi: 10.1073/pnas.1111303109.
150. Terenin, I. M., Dmitriev, S. E., Andreev, D. E., Royall, E., Belsham, G. J., et al. (2005) A cross-kingdom internal ribosome entry site reveals a simplified mode of internal ribosome entry, *Mol. Cell Biol.*, **25**, 7879-7888, doi: 10.1128/MCB.25.17.7879-7888.2005.
151. Abaeva, I. S., Pestova, T. V., and Hellen, C. U. (2016) Attachment of ribosomal complexes and retrograde scanning during initiation on the Halastavi arva virus IRES, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 2362-2377, doi: 10.1093/nar/gkw016.
152. Neupane, R., Pisareva, V. P., Rodriguez, C. F., Pisarev, A. V., and Fernandez, I. S. (2020) A complex IRES at the

- 5'-UTR of a viral mRNA assembles a functional 48S complex via an uAUG intermediate, *Elife*, **9**, e54575, doi: 10.7554/eLife.54575.
153. Gross, L., Vicens, Q., Einhorn, E., Noireterre, A., Schaeffer, L., et al. (2017) The IRES^{5'}UTR of the dicistrovirus cricket paralysis virus is a type III IRES containing an essential pseudoknot structure, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 8993-9004, doi: 10.1093/nar/gkx622.
 154. Majzoub, K., Hafirassou, M. L., Meignin, C., Goto, A., Marzi, S., et al. (2014) RACK1 controls IRES-mediated translation of viruses, *Cell*, **159**, 1086-1095, doi: 10.1016/j.cell.2014.10.041.
 155. Roberts, R., Mayberry, L. K., Browning, K. S., and Rakotondrafara, A. M. (2017) The *Triticum Mosaic virus* 5' leader binds to both eIF4G and eIFiso4G for translation, *PLoS One*, **12**, e0169602, doi: 10.1371/journal.pone.0169602.
 156. Jaramillo-Mesa, H., Gannon, M., Holshbach, E., Zhang, J., Roberts, R., et al. (2019) The *Triticum Mosaic virus* internal ribosome entry site relies on a picornavirus-like YX-AUG motif to designate the preferred translation initiation site and to likely target the 18S rRNA, *J. Virol.*, **93**, e01705-18, doi: 10.1128/JVI.01705-18.
 157. Castelló, A., Franco, D., Moral-López, P., Berlanga, J. J., Álvarez, E., et al. (2009) HIV-1 protease inhibits Cap- and poly(A)-dependent translation upon eIF4GI and PABP cleavage, *PLoS One*, **4**, e7997, doi: 10.1371/journal.pone.0007997.
 158. Perales, C., Carrasco, L., and Ventoso, I. (2003) Cleavage of eIF4G by HIV-1 protease: effects on translation, *FEBS Lett.*, **533**, 89-94, doi: 10.1016/s0014-5793(02)03764-x.
 159. Ohlmann, T., Prévôt, D., Décimo, D., Roux, F., Garin, J., et al. (2002) *In vitro* cleavage of eIF4GI but not eIF4GII by HIV-1 protease and its effects on translation in the rabbit reticulocyte lysate system, *J. Mol. Biol.*, **318**, 9-20, doi: 10.1016/S0022-2836(02)00070-0.
 160. Ventoso, I., Blanco, R., Perales, C., and Carrasco, L. (2001) HIV-1 protease cleaves eukaryotic initiation factor 4G and inhibits cap-dependent translation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 12966-12971, doi: 10.1073/pnas.231343498.
 161. Buck, C. B., Shen, X., Egan, M. A., Pierson, T. C., Walker, C. M., and Siliciano, R. F. (2001) The human immunodeficiency virus type 1 gag gene encodes an internal ribosome entry site, *J. Virol.*, **75**, 181-191, doi: 10.1128/JVI.75.1.181-191.2001.
 162. Vallejos, M., Carvajal, F., Pino, K., Navarrete, C., Ferrer, M., et al. (2012) Functional and structural analysis of the internal ribosome entry site present in the mRNA of natural variants of the HIV-1, *PLoS One*, **7**, e35031, doi: 10.1371/journal.pone.0035031.
 163. Brasey, A., Lopez-Lastra, M., Ohlmann, T., Beerens, N., Berkhout, B., et al. (2003) The leader of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA harbors an internal ribosome entry segment that is active during the G2/M phase of the cell cycle, *J. Virol.*, **77**, 3939-3949, doi: 10.1128/jvi.77.7.3939-3949.2003.
 164. Smirnova, V. V., Terenin, I. M., Khutornenko, A. A., Andreev, D. E., Dmitriev, S. E., and Shatsky, I. N. (2016) Does HIV-1 mRNA 5'-untranslated region bear an internal ribosome entry site? *Biochimie*, **121**, 228-237, doi: 10.1016/j.biochi.2015.12.004.
 165. Svitkin, Y. V., Pause, A., and Sonenberg, N. (1994) La autoantigen alleviates translational repression by the 5' leader sequence of the human immunodeficiency virus type 1 mRNA, *J. Virol.*, **68**, 7001-7007, doi: 10.1128/JVI.68.11.7001-7007.1994.
 166. Berkhout, B., Arts, K., and Abbink, T. E. (2011) Ribosomal scanning on the 5'-untranslated region of the human immunodeficiency virus RNA genome, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 5232-5244, doi: 10.1093/nar/gkr113.
 167. de Breynne, S., Chamond, N., Décimo, D., Trabaud, M. A., André, P., et al. (2012) *In vitro* studies reveal that different modes of initiation on HIV-1 mRNA have different levels of requirement for eukaryotic initiation factor 4F, *FEBS J.*, **279**, 3098-3111, doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08689.x.
 168. Weill, L., James, L., Ulryck, N., Chamond, N., Herbreteau, C. H., et al. (2010) A new type of IRES within gag coding region recruits three initiation complexes on HIV-2 genomic RNA, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 1367-1381, doi: 10.1093/nar/gkp1109.
 169. Herbreteau, C. H., Weill, L., Décimo, D., Prévôt, D., Darlix, J. L., et al. (2005) HIV-2 genomic RNA contains a novel type of IRES located downstream of its initiation codon, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 1001-1007, doi: 10.1038/nsmb1011.
 170. Akulich, K. A., Andreev, D. E., Terenin, I. M., Smirnova, V. V., Anisimova, A. S., et al. (2016) Four translation initiation pathways employed by the leaderless mRNA in eukaryotes, *Sci. Rep.*, **6**, 37905, doi: 10.1038/srep37905.
 171. Andreev, D. E., Terenin, I. M., Dunaevsky, Y. E., Dmitriev, S. E., and Shatsky, I. N. (2006) A leaderless mRNA can bind to mammalian 80S ribosomes and direct polypeptide synthesis in the absence of translation initiation factors, *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 3164-3169, doi: 10.1128/MCB.26.8.3164-3169.2006.
 172. Tahara, S. M., Dietlin, T. A., Dever, T. E., Merrick, W. C., and Worrilow, L. M. (1991) Effect of eukaryotic initiation factor 4F on AUG selection in a bicistronic mRNA, *J. Biol. Chem.*, **266**, 3594-3601.
 173. Barrera, A., Olguín, V., Vera-Otarola, J., and López-Lastra, M. (2020) Cap-independent translation initiation of the unspliced RNA of retroviruses, *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.*, **1863**, 194583, doi: 10.1016/j.bbagr.2020.194583.
 174. Song, Y., Mugavero, J., Stauff, C. B., and Wimmer, E. (2019) Dengue and Zika virus 5' untranslated regions harbor internal ribosomal entry site functions, *mBio*, **10**, e00459-19, doi: 10.1128/mBio.00459-19.
 175. Fernández-García, L., Angulo, J., Ramos, H., Barrera, A., Pino, K., et al. (2020) The internal ribosome entry site of the Dengue virus mRNA is active when cap-dependent translation initiation is inhibited, *J. Virol.*, doi: 10.1128/JVI.01998-20.
 176. Dorokhov, Y. L., Skulachev, M. V., Ivanov, P. A., Zvereva, S. D., Tjulkina, L. G., et al. (2002) Polypurine (A)-rich sequences promote cross-kingdom conservation of internal ribosome entry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 5301-5306, doi: 10.1073/pnas.082107599.
 177. Dorokhov, Y. L., Sheshukova, E. V., and Komarova, T. V. (2017) Tobamovirus 3'-terminal Gene overlap may be a mechanism for within-host fitness improvement, *Front. Microbiol.*, **8**, 851, doi: 10.3389/fmicb.2017.00851.
 178. May, J., Johnson, P., Saleem, H., and Simon, A. E. (2017) A sequence-independent, unstructured internal ribosome entry site is responsible for internal expression of the coat protein of *Turnip Crinkle virus*, *J. Virol.*, **91**, e02421-16, doi: 10.1128/JVI.02421-16.
 179. Yuan, X., Shi, K., Meskauskas, A., and Simon, A. E. (2009) The 3' end of *Turnip crinkle virus* contains a highly interactive structure including a translational enhancer that

- is disrupted by binding to the RNA-dependent RNA polymerase, *RNA*, **15**, 1849-1864, doi: 10.1261/rna.1708709.
180. Treder, K., Kneller, E. L., Allen, E. M., Wang, Z., Browning, K. S., and Miller, W. A. (2008) The 3' cap-independent translation element of Barley yellow dwarf virus binds eIF4F via the eIF4G subunit to initiate translation, *RNA*, **14**, 134-147, doi: 10.1261/rna.777308.
 181. Gazo, B. M., Murphy, P., Gatchel, J. R., and Browning, K. S. (2004) A novel interaction of Cap-binding protein complexes eukaryotic initiation factor (eIF) 4F and eIF(iso)4F with a region in the 3'-untranslated region of satellite tobacco necrosis virus, *J. Biol. Chem.*, **279**, 13584-13592, doi: 10.1074/jbc.M311361200.
 182. Wang, Z., Treder, K., and Miller, W. A. (2009) Structure of a viral cap-independent translation element that functions via high affinity binding to the eIF4E subunit of eIF4F, *J. Biol. Chem.*, **284**, 14189-14202, doi: 10.1074/jbc.M808841200.
 183. Nicholson, B. L., Wu, B., Chevtchenko, I., and White, K. A. (2010) Tombusvirus recruitment of host translational machinery via the 3' UTR, *RNA*, **16**, 1402-1419, doi: 10.1261/rna.2135210.
 184. Nicholson, B. L., Zaslaver, O., Mayberry, L. K., Browning, K. S., and White, K. A. (2013) Tombusvirus Y-shaped translational enhancer forms a complex with eIF4F and can be functionally replaced by heterologous translational enhancers, *J. Virol.*, **87**, 1872-1883, doi: 10.1128/JVI.02711-12.
 185. Stupina, V. A., Meskauskas, A., McCormack, J. C., Yingling, Y. G., Shapiro, B. A., et al. (2008) The 3' proximal translational enhancer of *Turnip crinkle virus* binds to 60S ribosomal subunits, *RNA*, **14**, 2379-2393, doi: 10.1261/rna.1227808.
 186. Gao, F., Kasprzak, W., Stupina, V. A., Shapiro, B. A., and Simon, A. E. (2012) A ribosome-binding, 3' translational enhancer has a T-shaped structure and engages in a long-distance RNA-RNA interaction, *J. Virol.*, **86**, 9828-9842, doi: 10.1128/JVI.00677-12.
 187. Zuo, X., Wang, J., Yu, P., Eyler, D., Xu, H., et al. (2010) Solution structure of the cap-independent translational enhancer and ribosome-binding element in the 3' UTR of *Turnip crinkle virus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 1385-1390, doi: 10.1073/pnas.0908140107.
 188. Gao, F., Gulay, S. P., Kasprzak, W., Dinman, J. D., Shapiro, B. A., and Simon, A. E. (2013) The kissing-loop T-shaped structure translational enhancer of Pea enation mosaic virus can bind simultaneously to ribosomes and a 5' proximal hairpin, *J. Virol.*, **87**, 11987-12002, doi: 10.1128/JVI.02005-13.
 189. Zhao, P., Liu, Q., Miller, W. A., and Goss, D. J. (2017) Eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) coordinates interactions with eIF4A, eIF4B, and eIF4E in binding and translation of the barley yellow dwarf virus 3' cap-independent translation element (BTE), *J. Biol. Chem.*, **292**, 5921-5931, doi: 10.1074/jbc.M116.764902.
 190. Wang, Z., Parisien, M., Scheets, K., and Miller, W. A. (2011) The cap-binding translation initiation factor, eIF4E, binds a pseudoknot in a viral cap-independent translation element, *Structure*, **19**, 868-880, doi: 10.1016/j.str.2011.03.013.
 191. Du, Z., Alekhina, O. M., Vassilenko, K. S., and Simon, A. E. (2017) Concerted action of two 3' cap-independent translation enhancers increases the competitive strength of translated viral genomes, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 9558-9572, doi: 10.1093/nar/gkx643.
 192. Sharma, G., Stupina, V., Pallesen, J., Shapiro, B., Simon, A., Dinman, J., and Frank, J. (2012) Cryo-electron microscopy (Cryo-EM) structure of a cap-independent translational enhancer of the *Turnip crinkle virus* (TCV) bound to the eukaryotic ribosome, *Biophys. J.*, **102**, 393A, doi: 10.1016/j.bpj.2011.11.2147.
 193. Miras, M., Sempere, R. N., Kraft, J. J., Miller, W. A., Aranda, M. A., and Truniger, V. (2014) Interfamilial recombination between viruses led to acquisition of a novel translation-enhancing RNA element that allows resistance breaking, *New Phytol.*, **202**, 233-246, doi: 10.1111/nph.12650.
 194. Guo, L., Allen, E. M., and Miller, W. A. (2001) Base-pairing between untranslated regions facilitates translation of uncapped, nonpolyadenylated viral RNA, *Mol. Cell*, **7**, 1103-1109, doi: 10.1016/s1097-2765(01)00252-0.
 195. Gao, F., Alekhina, O. M., Vassilenko, K. S., and Simon, A. E. (2018) Unusual dicistronic expression from closely spaced initiation codons in an umbravirus subgenomic RNA, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 11726-11742, doi: 10.1093/nar/gky871.
 196. Rakotondrafara, A. M., Polacek, C., Harris, E., and Miller, W. A. (2006) Oscillating kissing stem-loop interactions mediate 5' scanning-dependent translation by a viral 3'-cap-independent translation element, *RNA*, **12**, 1893-1906, doi: 10.1261/rna.115606.
 197. Fabian, M. R., and White, K. A. (2006) Analysis of a 3'-translation enhancer in a tombusvirus: a dynamic model for RNA-RNA interactions of mRNA termini, *RNA*, **12**, 1304-1314, doi: 10.1261/rna.69506.
 198. Sarawaneeyaruk, S., Iwakawa, H. O., Mizumoto, H., Murakami, H., Kaido, M., et al. (2009) Host-dependent roles of the viral 5' untranslated region (UTR) in RNA stabilization and cap-independent translational enhancement mediated by the 3' UTR of Red clover necrotic mosaic virus RNA1, *Virology*, **391**, 107-118, doi: 10.1016/j.virol.2009.05.037.
 199. Karetnikov, A., and Lehto, K. (2008) Translation mechanisms involving long-distance base pairing interactions between the 5' and 3' non-translated regions and internal ribosomal entry are conserved for both genomic RNAs of Blackcurrant reversion nepovirus, *Virology*, **371**, 292-308, doi: 10.1016/j.virol.2007.10.003.
 200. Sharma, S. D., Kraft, J. J., Miller, W. A., and Goss, D. J. (2015) Recruitment of the 40S ribosome subunit to the 3'-untranslated region (UTR) of a viral mRNA, via the eIF4 complex, facilitates cap-independent translation, *J. Biol. Chem.*, **290**, 11268-11281, doi: 10.1074/jbc.M115.645002.
 201. Stupina, V. A., Yuan, X., Meskauskas, A., Dinman, J. D., and Simon, A. E. (2011) Ribosome binding to a 5' translational enhancer is altered in the presence of the 3' untranslated region in cap-independent translation of turnip crinkle virus, *J. Virol.*, **85**, 4638-4653, doi: 10.1128/JVI.00005-11.
 202. Yoshii, M., Nishikiori, M., Tomita, K., Yoshioka, N., Kozuka, R., et al. (2004) The *Arabidopsis* cucumovirus multiplication 1 and 2 loci encode translation initiation factors 4E and 4G, *J. Virol.*, **78**, 6102-6111, doi: 10.1128/JVI.78.12.6102-6111.2004.
 203. Gao, F., and Simon, A. E. (2016) Multiple *Cis*-acting elements modulate programmed -1 ribosomal frameshifting in Pea enation mosaic virus, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 878-895, doi: 10.1093/nar/gkv1241.
 204. Matsuda, D., and Dreher, T. W. (2004) The tRNA-like structure of Turnip yellow mosaic virus RNA is a 3'-translational enhancer, *Virology*, **321**, 36-46, doi: 10.1016/j.virol.2003.10.023.
 205. Colussi, T. M., Costantino, D. A., Hammond, J. A., Ruehle, G. M., Nix, J. C., and Kieft, J. S. (2014) The structural basis of transfer RNA mimicry and confor-

- mational plasticity by a viral RNA, *Nature*, **511**, 366-369, doi: 10.1038/nature13378.
206. Haenni, A. L., Joshi, S., and Chapeville, F. (1982) tRNA-like structures in the genomes of RNA viruses, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **27**, 85-104, doi: 10.1016/s0079-6603(08)60598-x.
207. Barends, S., Bink, H. H., van den Worm, S. H., Pleij, C. W., and Kraal, B. (2003) Entrapping ribosomes for viral translation: tRNA mimicry as a molecular Trojan horse, *Cell*, **112**, 123-129, doi: 10.1016/s0092-8674(02)01256-4.
208. Matsuda, D., and Dreher, T. W. (2007) Cap- and initiator tRNA-dependent initiation of TYMV polyprotein synthesis by ribosomes: evaluation of the Trojan horse model for TYMV RNA translation, *RNA*, **13**, 129-137, doi: 10.1261/rna.244407.
209. Gallie, D. R., and Kobayashi, M. (1994) The role of the 3'-untranslated region of non-polyadenylated plant viral mRNAs in regulating translational efficiency, *Gene*, **142**, 159-165, doi: 10.1016/0378-1119(94)90256-9.
210. Barends, S., Rudinger-Thirion, J., Florentz, C., Giegé, R., Pleij, C. W., and Kraal, B. (2004) tRNA-like structure regulates translation of *Brome mosaic virus* RNA, *J. Virol.*, **78**, 4003-4010, doi: 10.1128/jvi.78.8.4003-4010.2004.
211. Leathers, V., Tanguay, R., Kobayashi, M., and Gallie, D. R. (1993) A phylogenetically conserved sequence within viral 3' untranslated RNA pseudoknots regulates translation, *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 5331-5347, doi: 10.1128/mcb.13.9.5331-5347.1993.
212. Matsuda, D., Dunoyer, P., Hemmer, O., Fritsch, C., and Dreher, T. W. (2000) The valine anticodon and valylatability of *Peanut clump virus* RNAs are not essential but provide a modest competitive advantage in plants, *J. Virol.*, **74**, 8720-8725, doi: 10.1128/jvi.74.18.8720-8725.2000.
213. Gordon, K. H., Johnson, K. N., and Hanzlik, T. N. (1995) The larger genomic RNA of *Helicoverpa armigera* stunt tetravirus encodes the viral RNA polymerase and has a novel 3'-terminal tRNA-like structure, *Virology*, **208**, 84-98, doi: 10.1006/viro.1995.1132.
214. Sherlock, M. E., Hartwick, E. W., MacFadden, A., and Kieft, J. S. (2021) Structural diversity and phylogenetic distribution of valyl tRNA-like structures in viruses, *RNA*, **27**, 27-39, doi: 10.1261/rna.076968.120.
215. Poncet, D., Laurent, S., and Cohen, J. (1994) Four nucleotides are the minimal requirement for RNA recognition by rotavirus non-structural protein NSP3, *EMBO J.*, **13**, 4165-4173.
216. Groft, C. M., and Burley, S. K. (2002) Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization, *Mol. Cell*, **9**, 1273-1283, doi: 10.1016/s1097-2765(02)00555-5.
217. Vende, P., Piron, M., Castagné, N., and Poncet, D. (2000) Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end, *J. Virol.*, **74**, 7064-7071, doi: 10.1128/jvi.74.15.7064-7071.2000.
218. Olsthoorn, R. C., Mertens, S., Brederode, F. T., and Bol, J. F. (1999) A conformational switch at the 3' end of a plant virus RNA regulates viral replication, *EMBO J.*, **18**, 4856-4864, doi: 10.1093/emboj/18.17.4856.
219. Chen, S. C., and Olsthoorn, R. C. (2010) *In vitro* and *in vivo* studies of the RNA conformational switch in *Alfalfa mosaic virus*, *J. Virol.*, **84**, 1423-1429, doi: 10.1128/JVI.01443-09.
220. Krab, I. M., Caldwell, C., Gallie, D. R., and Bol, J. F. (2005) Coat protein enhances translational efficiency of *Alfalfa mosaic virus* RNAs and interacts with the eIF4G component of initiation factor eIF4F, *J. Gen. Virol.*, **86**, 1841-1849, doi: 10.1099/vir.0.80796-0.
221. Holden, K. L., and Harris, E. (2004) Enhancement of dengue virus translation: role of the 3' untranslated region and the terminal 3' stem-loop domain, *Virology*, **329**, 119-133, doi: 10.1016/j.virol.2004.08.004.
222. Bung, C., Bochkaeva, Z., Terenin, I., Zinovkin, R., Shatsky, I. N., and Niepmann, M. (2010) Influence of the hepatitis C virus 3'-untranslated region on IRES-dependent and cap-dependent translation initiation, *FEBS Lett.*, **584**, 837-842, doi: 10.1016/j.febslet.2010.01.015.
223. Gunišová, S., Hronová, V., Mohammad, M. P., Hinnebusch, A. G., and Valášek, L. S. (2018) Please do not recycle! Translation reinitiation in microbes and higher eukaryotes, *FEMS Microbiol. Rev.*, **42**, 165-192, doi: 10.1093/femsre/fux059.
224. Powell, M. L. (2010) Translational termination-reinitiation in RNA viruses, *Biochem. Soc. Trans.*, **38**, 1558-1564, doi: 10.1042/BST0381558.
225. Pöyry, T. A., Kaminski, A., Connell, E. J., Fraser, C. S., and Jackson, R. J. (2007) The mechanism of an exceptional case of reinitiation after translation of a long ORF reveals why such events do not generally occur in mammalian mRNA translation, *Genes Dev.*, **21**, 3149-3162, doi: 10.1101/gad.439507.
226. Meyers, G. (2007) Characterization of the sequence element directing translation reinitiation in RNA of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus, *J. Virol.*, **81**, 9623-9632, doi: 10.1128/JVI.00771-07.
227. Meyers, G. (2003) Translation of the minor capsid protein of a calicivirus is initiated by a novel termination-dependent reinitiation mechanism, *J. Biol. Chem.*, **278**, 34051-34060, doi: 10.1074/jbc.M304874200.
228. Wennesz, R., Luttermann, C., Kreher, F., and Meyers, G. (2019) Structure-function relationship in the "termination upstream ribosomal binding site" of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 1920-1934, doi: 10.1093/nar/gkz021.
229. Luttermann, C., and Meyers, G. (2009) The importance of inter- and intramolecular base pairing for translation reinitiation on a eukaryotic bicistronic mRNA, *Genes Dev.*, **23**, 331-344, doi: 10.1101/gad.507609.
230. Zinoviev, A., Hellen, C. U. T., and Pestova, T. V. (2015) Multiple mechanisms of reinitiation on bicistronic calicivirus mRNAs, *Mol. Cell*, **57**, 1059-1073, doi: 10.1016/j.molcel.2015.01.039.
231. Powell, M. L., Leigh, K. E., Poyry, T. A., Jackson, R. J., Brown, T. D., and Brierley, I. (2011) Further characterisation of the translational termination-reinitiation signal of the influenza B virus segment 7 RNA, *PLoS One*, **6**, e16822, doi: 10.1371/journal.pone.0016822.
232. Powell, M. L., Napthine, S., Jackson, R. J., Brierley, I., and Brown, T. D. (2008) Characterization of the termination-reinitiation strategy employed in the expression of influenza B virus BM2 protein, *RNA*, **14**, 2394-2406, doi: 10.1261/rna.1231008.
233. Abaeva, I. S., Marintchev, A., Pisareva, V. P., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. (2011) Bypassing of stems versus linear base-by-base inspection of mammalian mRNAs during ribosomal scanning, *EMBO J.*, **30**, 115-129, doi: 10.1038/emboj.2010.302.
234. Schepetilnikov, M., Kobayashi, K., Geldreich, A., Caranta, C., Robaglia, C., et al. (2011) Viral factor TAV recruits TOR/S6K1 signalling to activate reinitiation after long ORF translation, *EMBO J.*, **30**, 1343-1356, doi: 10.1038/emboj.2011.39.
235. Schepetilnikov, M., and Ryabova, L. A. (2018) Recent discoveries on the role of TOR (Target of rapamycin) signaling

- in translation in plants, *Plant Physiol.*, **176**, 1095-1105, doi: 10.1104/pp.17.01243.
236. Thiébeauld, O., Schepetilnikov, M., Park, H. S., Geldreich, A., Kobayashi, K., et al. (2009) A new plant protein interacts with eIF3 and 60S to enhance virus-activated translation re-initiation, *EMBO J.*, **28**, 3171-3184, doi: 10.1038/emboj.2009.256.
 237. Mancera-Martínez, E., Dong, Y., Makarian, J., Srouf, O., Thiébeauld, O., et al. (2021) Phosphorylation of a reinitiation supporting protein, RISP, determines its function in translation reinitiation, *Nucleic Acids Res.*, **49**, 6908-6924, doi: 10.1093/nar/gkab501.
 238. Skabkin, M. A., Skabkina, O. V., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. (2013) Reinitiation and other unconventional posttermination events during eukaryotic translation, *Mol. Cell*, **51**, 249-264, doi: 10.1016/j.molcel.2013.05.026.
 239. Young, D. J., Guydosh, N. R., Zhang, F., Hinnebusch, A. G., and Green, R. (2015) Rli1/ABCE1 recycles terminating ribosomes and controls translation reinitiation in 3'-UTRs *in vivo*, *Cell*, **162**, 872-884, doi: 10.1016/j.cell.2015.07.041.
 240. Brown, J. D., and Ryan, M. D. (2010) *Ribosome "Skipping": "Stop-Carry On" or "StopGo" Translation*. in *Recoding: Expansion of Decoding Rules Enriches Gene Expression* (Atkins, J. F., and Gesteland, R. F., eds.) Springer New York, New York, NY, pp. 101-121.
 241. Liu, Z., Chen, O., Wall, J. B. J., Zheng, M., Zhou, Y., et al. (2017) Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector, *Sci. Rep.*, **7**, 2193, doi: 10.1038/s41598-017-02460-2.
 242. Pamudurti, N. R., Bartok, O., Jens, M., Ashwal-Fluss, R., Stottmeister, C., et al. (2017) Translation of CircRNAs, *Mol. Cell*, **66**, 9-21.e27, doi: 10.1016/j.molcel.2017.02.021.
 243. Tagawa, T., Kopardé, V. N., and Ziegelbauer, J. M. (2021) Identifying and characterizing virus-encoded circular RNAs, *Methods*, doi: 10.1016/j.ymeth.2021.03.004.
 244. Zhao, J., Lee, E. E., Kim, J., Yang, R., Chamseddin, B., et al. (2019) Transforming activity of an oncoprotein-encoding circular RNA from human papillomavirus, *Nat. Commun.*, **10**, 2300, doi: 10.1038/s41467-019-10246-5.
 245. Tan, K. E., and Lim, Y. Y. (2020) Viruses join the circular RNA world, *FEBS J.*, doi: 10.1111/febs.15639.
 246. AbouHaidar, M. G., Venkataraman, S., Golshani, A., Liu, B., and Ahmad, T. (2014) Novel coding, translation, and gene expression of a replicating covalently closed circular RNA of 220 nt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 14542-14547, doi: 10.1073/pnas.1402814111.
 247. Thoms, M., Buschauer, R., Ameisemeier, M., Koepke, L., Denk, T., et al. (2020) Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2, *Science*, **369**, 1249-1255, doi: 10.1126/science.abc8665.
 248. Yuan, S., Peng, L., Park, J. J., Hu, Y., Devarkar, S. C., et al. (2020) Nonstructural protein 1 of SARS-CoV-2 is a potent pathogenicity factor redirecting host protein synthesis machinery toward viral RNA, *Mol. Cell*, **80**, 1055-1066.e1056, doi: 10.1016/j.molcel.2020.10.034.
 249. Schubert, K., Karousis, E. D., Jomaa, A., Scaiola, A., Echeverria, B., et al. (2020) SARS-CoV-2 Nsp1 binds the ribosomal mRNA channel to inhibit translation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **27**, 959-966, doi: 10.1038/s41594-020-0511-8.
 250. Vankadari, N., Jeyasankar, N. N., and Lopes, W. J. (2020) Structure of the SARS-CoV-2 Nsp1/5'-untranslated region complex and implications for potential therapeutic targets, a vaccine, and virulence, *J. Phys. Chem. Lett.*, **11**, 9659-9668, doi: 10.1021/acs.jpclett.0c02818.
 251. Tidu, A., Janvier, A., Schaeffer, L., Sosnowski, P., Kuhn, L., et al. (2020) The viral protein NSP1 acts as a ribosome gatekeeper for shutting down host translation and fostering SARS-CoV-2 translation, *RNA*, doi: 10.1261/rna.078121.120.
 252. Shi, M., Wang, L., Fontana, P., Vora, S., Zhang, Y., et al. (2020) SARS-CoV-2 Nsp1 suppresses host but not viral translation through a bipartite mechanism, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2020.09.18.302901.
 253. Lapointe, C. P., Grosely, R., Johnson, A. G., Wang, J., Fernandez, I. S., and Puglisi, J. D. (2021) Dynamic competition between SARS-CoV-2 NSP1 and mRNA on the human ribosome inhibits translation initiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2017715118, doi: 10.1073/pnas.2017715118.
 254. Huang, C., Lokugamage, K. G., Rozovics, J. M., Narayanan, K., Semler, B. L., and Makino, S. (2011) SARS coronavirus nsp1 protein induces template-dependent endonucleolytic cleavage of mRNAs: viral mRNAs are resistant to nsp1-induced RNA cleavage, *PLoS Pathog.*, **7**, e1002433, doi: 10.1371/journal.ppat.1002433.
 255. Walsh, D., and Mohr, I. (2011) Viral subversion of the host protein synthesis machinery, *Nat. Rev. Microbiol.*, **9**, 860-875, doi: 10.1038/nrmicro2655.
 256. Cantu, F., Cao, S., Hernandez, C., Dhungel, P., Spradlin, J., and Yang, Z. (2020) Poxvirus-encoded decapping enzymes promote selective translation of viral mRNAs, *PLoS Pathog.*, **16**, e1008926, doi: 10.1371/journal.ppat.1008926.
 257. Decroly, E., Ferron, F., Lescar, J., and Canard, B. (2011) Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA, *Nat. Rev. Microbiol.*, **10**, 51-65, doi: 10.1038/nrmicro2675.
 258. Lashkevich, K. A., and Dmitriev, S. E. (2021) mRNA targeting, transport and local translation in eukaryotic cells: from the classical view to a diversity of new concepts, *Mol. Biol.*, doi: 10.1134/S0026893321030080.
 259. Romero-Brey, I., and Bartenschlager, R. (2014) Membranous replication factories induced by plus-strand RNA viruses, *Viruses*, **6**, 2826-2857, doi: 10.3390/v6072826.
 260. Reineke, L. C., and Lloyd, R. E. (2013) Diversion of stress granules and P-bodies during viral infection, *Virology*, **436**, 255-267, doi: 10.1016/j.virol.2012.11.017.
 261. McCormick, C., and Khapersky, D. A. (2017) Translation inhibition and stress granules in the antiviral immune response, *Nat. Rev. Immunol.*, **17**, 647-660, doi: 10.1038/nri.2017.63.
 262. Dzananovic, E., McKenna, S. A., and Patel, T. R. (2018) Viral proteins targeting host protein kinase R to evade an innate immune response: a mini review, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **34**, 33-59, doi: 10.1080/02648725.2018.1467151.
 263. Alonso, M. A., and Carrasco, L. (1981) Reversion by hypotonic medium of the shutoff of protein synthesis induced by encephalomyocarditis virus, *J. Virol.*, **37**, 535-540, doi: 10.1128/JVI.37.2.535-540.1981.
 264. Nair, C. N. (1981) Monovalent cation metabolism and cytopathic effects of poliovirus-infected HeLa cells, *J. Virol.*, **37**, 268-273, doi: 10.1128/JVI.37.1.268-273.1981.
 265. Dmitriev, S. E., Vladimirov, D. O., and Lashkevich, K. A. (2020) A quick guide to small-molecule inhibitors of eukaryotic protein synthesis, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 1389-1421, doi: 10.1134/S0006297920110097.

**NON-CANONICAL TRANSLATION INITIATION MECHANISMS
EMPLOYED BY EUKARYOTIC VIRAL mRNAs****Review****I. I. Sorokin^{1,2,3}, K. S. Vassilenko², I. M. Terenin¹,
N. O. Kalinina^{1,4}, V. I. Agol^{1,5}, and S. E. Dmitriev^{1,6,7*}**¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; E-mail: sergey.dmitriev@belozersky.msu.ru*² *Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia*³ *Research Center for Molecular Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases, Moscow Institute of Physics and Technology, 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia*⁴ *Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia*⁵ *Institute of Poliomyelitis, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of the Russian Academy of Sciences, 108819 Moscow, Russia*⁶ *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia*⁷ *Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia*

Viruses exploit translation machinery of the infected cell for the synthesis of their proteins. Therefore, viral mRNAs have to compete for ribosomes and translation factors with bulk cellular mRNAs. To win this fight, viruses adopt various strategies, one of which is to circumvent the need for cap-binding factors. Instead, they recruit translation initiation factors and ribosomes in alternative ways, either via internal ribosome binding sites (IRESs) that make translation independent of the 5'-end altogether or via cap-independent translational enhancers (CITEs) that promote initiation at the bare 5'-end, even if located in the 3'-untranslated regions (3'-UTRs). The viruses that use the canonical cap-dependent ribosome recruitment can alter ribosomal scanning and start-codon recognition. The urge for genome compression often gives rise to internal and overlapped open reading frames, which translation occurs by means of specific initiation mechanisms, such as leaky scanning, 43S sliding, shunting, or coupled termination-reinitiation. The deviations from the canonical initiation mechanism allow viral mRNAs to have a more relaxed dependence on the translation initiation factors, thereby providing resistance to antiviral mechanisms and cellular stress responses. Moreover, viruses can relieve the competition for the translational machinery by inactivating individual translational factors and/or replacing them with virus-encoded counterparts. Certain viruses even reorganize intracellular structure creating viral translational "factories", thus spatially isolating the sites of their protein synthesis from cellular antiviral systems, and enriching them with translational components. On the other hand, such virus-specific mechanisms may become the Achilles' heel of a viral life cycle. A better understanding of the non-canonical mechanisms of viral mRNA translation initiation provides additional clues to the development of new approaches in antiviral therapy.

Keywords: internal initiation of translation, cap-independent translation, VPg, 3'-CITE, TURBS-mediated reinitiation, circular RNAs, translation initiation factors eIF2 and eIF4F, picornaviruses PV and EMCV, flaviviruses HCV and DENV, lentiviruses HIV-1 and HIV-2, coronavirus SARS-CoV-2

УДК 577.21

МОДИФИКАЦИИ РИБОСОМНОГО ПРОФАЙЛИНГА, ПОЗВОЛЯЮЩИЕ ПОЛУЧИТЬ НОВЫЕ ДАННЫЕ О РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ

Обзор

© 2021 Д.Е. Андреев^{1,2}, В.В. Смирнова¹, И.Н. Шатский^{1*}

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия; электронная почта: shatsky@genebee.msu.su

² ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 30.04.2021

После доработки 18.06.2021

Принята к публикации 18.06.2021

Рибосомный профайлинг (ribosome profiling, riboseq) положил начало изучению трансляции на полномном уровне у всех живых организмов. Данный метод основан на глубоком секвенировании фрагментов мРНК, защищаемых рибосомами от разрезания рибонуклеазами, так называемых рибосомных футпринтов. В классическом варианте рибосомный профайлинг вместе с секвенированием РНК позволяет не только довольно точно детектировать транскрибируемые рамки считывания в транскриптом, но и отслеживать изменения в экспрессии генов в ответ на различные воздействия. Основной особенностью данного подхода является то, что в этом варианте рибосомного профайлинга обычно проводится селекция фрагментов мРНК по размеру 25–35 нуклеотидов и при этом не анализируется информация о рибосомных футпринтах других размеров. Кроме того, оригинальный рибосомный профайлинг «усредняет» данные от всех рибосом и не позволяет изучать специфические рибосомные комплексы, ассоциированные с различными трансляционными факторами. Тем не менее разработанные недавно модификации рибосомного профайлинга позволяют ответить на ряд вопросов. В частности, стало возможно наблюдать не только за элонгирующими, но и за сканирующими и реиницирующими рибосомами; наблюдать события, связанные со столкновением рибосом при трансляции мРНК; обнаруживать новые способы котрансляционной сборки мультисубъединичных белковых комплексов, происходящие в процессе трансляции; а также использовать селективное выделение специфических рибосомных комплексов, связанных с определенными белковыми факторами. Новые данные, полученные с помощью этих модифицированных подходов, позволяют лучше понять механизмы регуляции трансляции и функциональную роль компонентов трансляционного аппарата.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рибосомный профайлинг, рибосома, трансляция, белковый синтез, сканирование, мРНК, секвенирование нового поколения.

DOI: 10.31857/S0320972521090050

ВВЕДЕНИЕ

Технологии массового параллельного секвенирования, которые также называются секвенированием нового (следующего) поколения, находят все больше применений в науках о жизни. Различные варианты методик отличаются не только получением информации о конкретных последовательностях ДНК и РНК в клетке, но и тем, с какими компонентами в клетке они ассо-

цированы. Один из вариантов развития данных технологий основан на том, что рибосомные субчастицы, вовлеченные в трансляцию, защищают фрагменты мРНК от разрезания рибонуклеазами [1, 2]. Тот факт, что фрагменты мРНК, защищаемые рибосомой (рибосомные футпринты, РФП), имеют достаточно большую длину ~ 25–35 нуклеотидов (нт) и остаются стабильно связанными с рибосомой после разрезания, позволил исследователям из лаборатории Jonathan Weissman разработать способ выделения и секвенирования РФП, который получил название рибосомный профайлинг [3].

Исходный экспериментальный протокол рибосомного профайлинга может быть описан следующей последовательностью действий [4]. Клетки перед выделением обрабатывают инги-

Принятые сокращения: НТО – нетранслируемая область; ОРС – открытая рамка считывания; ПИК – прединициаторный комплекс; РСК – рибосомный сканирующий комплекс; РФП – рибосомный футпринт; eIF – эукариотический инициаторный фактор; RQC – контроль качества при помощи транслирующих рибосом.

* Адресат для корреспонденции.

битором трансляции циклогексимидам, который «останавливает» рибосомы там, где они транслируют мРНК. После разрушения клеток лизат обрабатывают рибонуклеазой I, которая эффективно разрезает не только незащищенную мРНК, но также вносит многочисленные разрывы в рРНК. Тем не менее 80S рибосомные субчастицы с фрагментами РНК остаются достаточно стабильными для того, чтобы их можно было выделить (например, в градиенте сахарозы при ультрацентрифугировании через сахарозную «подушку» или с помощью гель-фильтрации). После выделения РНК из таких 80S рибосом и разделения фрагментов в денатурирующем акриламидном геле проводят выделение фрагментов РНК требуемого размера. Далее фрагменты РНК с помощью стандартных подходов превращают в библиотеки кДНК для последующего массового параллельного секвенирования. Одновременно порция того же самого лизата, отобранная до обработки рибонуклеазой, используется для выделения мРНК и ее последующего фрагментирования с помощью щелочного гидролиза. Фрагменты мРНК той же длины, что и РФП, используются для приготовления библиотек и последующего секвенирования мРНК. После прочтения всех РФП и фрагментов мРНК проводится их картирование на геном или транскриптом, в результате чего создается моментальный снимок всей трансляции и транскрипции в клетках при заданных условиях.

При разработке любого нового метода требуется приложить большие усилия, чтобы заставить научное сообщество поверить в реальность и ценность получаемых результатов. Результаты самой первой работы по рибосомному профайлингу сразу же убедили нас в том, что данный подход действительно работает. Как и стоило ожидать, РФП преимущественно обнаруживались в кодирующих открытых рамках считывания (ОРС) мРНК. Но самым убедительным аргументом стал тот факт, что сигнал от транслирующей рибосом демонстрировал четкую триплетную периодичность. Такие данные однозначно свидетельствовали о том, что секвенирование РФП действительно дает информацию о расположении транслирующих рибосом на мРНК в клетке.

Начиная с даты первой публикации в 2009 г. метод рибосомного профайлинга получил активнейшее развитие и сейчас используется для изучения регуляции экспрессии генов и картирования кодирующих участков генома для любых живых организмов, начиная от бактерий и архей и заканчивая органами и тканями животных и человека. Метод активно развивается и эволюционирует как со стороны эксперимен-

тального подхода, так и со стороны биоинформатических инструментов для обработки, интерпретации и визуализации получаемых результатов. В частности, одна из первых и самых очевидных модификаций метода заключалась в использовании различных ингибиторов трансляции, действующих на рибосому. Так, некоторые ингибиторы приводят к обогащению рибосомами стартовых кодонов мРНК — у эукариот для этих целей используются антибиотики лактиномицин и харрингтонин. Другие антибиотики, такие как анизомицин и тигециклин, способны останавливать рибосомы в различных конформациях, что позволяет анализировать конформационные распределения состояний рибосом в различных условиях [5–8]. В данном обзоре мы не будем подробно останавливаться на этих аспектах, поскольку они детально обсуждаются в недавних обзорах от лидеров в области использования рибосомного профайлинга, включая разработчиков метода [9–15].

Важно отметить, что подавляющее большинство работ основано на исследовании «стандартного» РФП, фрагмента мРНК длиной 25–35 нт, защищаемого элонгирующей рибосомой от разрезания рибонуклеазой и остающегося ассоциированным с рибосомой после такой обработки. Те же рибосомные комплексы, которые являются нестабильными после разрезания нуклеазами или защищают фрагменты мРНК большего размера, не анализируются при использовании классического подхода (рис. 1). Более того, стандартный способ получения РФП не позволяет установить состав рибосомных комплексов, защищающих мРНК — теряется информация о комплексах, ассоциированных с трансляционными факторами на разных стадиях белкового синтеза. Мы подробно остановимся на новых модификациях рибосомного профайлинга, которые выходят за рамки анализа «стандартных» РФП и позволяют глубже взглянуть на те аспекты белкового синтеза, которые не видны при использовании стандартного подхода. В основном эти новые модификации касаются клеток эукариот, аппарат трансляции которых значительно сложнее, чем у бактерий, и требует большего числа регулирующих белковых факторов.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ТЕХНИКИ РИБОСОМНОГО ПРОФАЙЛИНГА НА СТАДИЮ СКАНИРОВАНИЯ ПРИ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ У ЭУКАРИОТ

В основе инициации трансляции у большинства клеточных мРНК эукариот лежит сканиру-

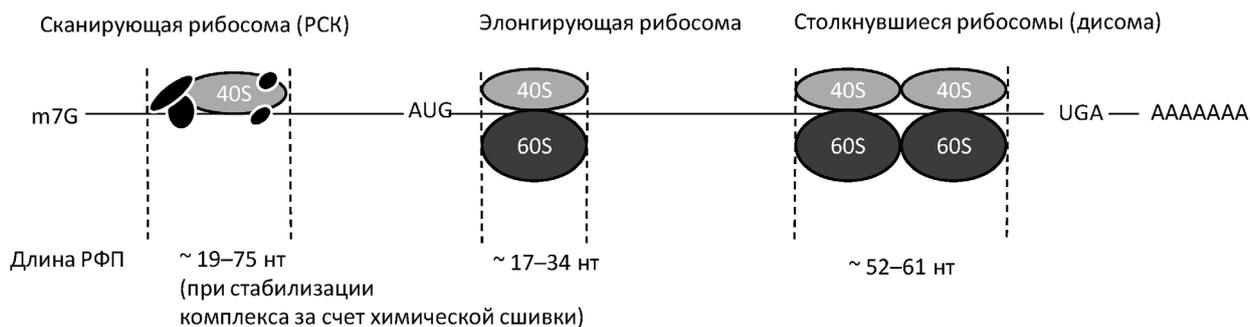


Рис. 1. Варианты рибосомных футпринтов от различных рибосомных комплексов. При использовании стандартного подхода выделяются рибосомные футпринты, соответствующие только элонгирующей рибосоме (комплекс посередине). Указанный диапазон длин футпринтов является приблизительным, поскольку варьирует в разных работах

ющий механизм, принцип которого был предложен Marilyn Kozak 40 лет назад [16, 17]. Согласно этому механизму, m7G-кэп на 5'-конце мРНК связывает тримерный белковый комплекс eIF4F, состоящий из eIF4G1 (каркасный белок) и связанных с ним eIF4E (кэп-связывающая субъединица) и хеликазы eIF4A. Комплекс eIF4F через взаимодействие eIF4G1 с иницирующим фактором eIF3 привлекает на 5'-конец мРНК 43S преиницирующий комплекс (43S ПИК). Комплекс 43S представляет собой 40S рибосомную субчастицу, нагруженную факторами инициации eIF3, eIF1, eIF1A, eIF5 и тройным комплексом (ТК) eIF2xGTPxMet-tRNA_i. После связывания с 5'-концом мРНК 40S рибосома и факторы инициации образуют сканирующий комплекс (48S РСК), который начинает двигаться в сторону 3'-конца мРНК, продевая последовательно нуклеотидную цепь мРНК через мРНК-связывающий канал 40S рибосомной субчастицы, в то время как ТК сканирует нуклеотидную последовательность на присутствие стартового кодона в подходящем нуклеотидном контексте. Предполагается, что в удержании мРНК 40S субчастицей в процессе сканирования принимают участие как структурные компоненты мРНК-связывающего канала 40S субчастицы, так и иницирующий фактор eIF4G1 и, возможно, РНК-связывающие мотивы некоторых субъединиц фактора eIF3. После узнавания стартового кодона происходит высвобождение факторов инициации и GDP, присоединение 60S субчастицы, и начинается синтез полипептида [18–22].

Хотя данная модель инициации, основанная на множестве кропотливых биохимических экспериментов, является на данный момент общепринятой, остается ряд важных вопросов, требующих дополнительных исследований. Главным препятствием в изучении стадии сканирования является то, что 43S ПИК и сканирующие комплексы являются по своей природе

нестабильными и разрушаются в процессе выделения из клеток. Так, стандартный подход для выделения рибосомных комплексов, центрифугирование в градиенте сахарозы, приводит к потере ассоциации инициаторных факторов с 40S рибосомой, что конечно же не отражает реальной ситуации. Для решения данной проблемы был разработан метод фиксации трансляционных комплексов в клетках за счет химического сшивания с помощью формальдегида [23].

Данный подход был использован в модификации рибосомного профайлинга, позволяющей детектировать положение РСК на мРНК [24]. Работа была сделана на клетках дрожжей *S. cerevisiae*. После обработки клеток формальдегидом их разрушали, лизат обрабатывали рибонуклеазой и затем разделяли в градиенте сахарозы. За счет использования химической сшивки оказалось возможным выделить небольшую фракцию рибосомных комплексов, обладающих коэффициентом седиментации меньше, чем 80S (80S также стабилизируются формальдегидом и видны на градиенте). Затем выделяли защищенные РСК фрагменты мРНК и подвергали их массовому параллельному секвенированию. На стадии селекции по размеру проводился выбор широкого спектра фрагментов до 250 нт, поскольку ожидалось, что сканирующие рибосомы за счет дополнительных взаимодействий мРНК с инициаторными факторами могут защищать фрагменты мРНК большей длины, чем элонгирующие рибосомы [25–27] (рис. 1).

Оказалось, что фрагменты мРНК, защищаемые сканирующими рибосомами, действительно имеют очень разнообразное распределение по длине – от 19 до 75 нт. Большая часть РСК-футпринтов обнаруживалась в 5'-НТО, со значительным обогащением на стартовых кодонах. Соответствующие рибосомные футпринты, как и ожидалось, редко обнаруживаются в кодирующих участках мРНК и 3'-НТО, однако обогаще-

ние наблюдается на терминирующих кодонах ОРС (по всей видимости, за счет образования интермедиатов в процессе терминации трансляции). Общая картина и характеристики футпринтов РСК полностью согласуются с моделью сканирования.

Интересно отметить несколько важных деталей, проясняющих ряд аспектов сканирования и узнавания стартового кодона. Во-первых, при выравнивании футпринтов относительно стартовых кодонов удалось обнаружить несколько паттернов длин фрагментов, имеющих фиксированный 5'-конец в положении – 12, соответствующих мРНК, выходящей из рибосомы. При этом 3'-концы соответствующих футпринтов располагаются в положении + 6, + 16 и + 24 соответственно. Авторы предполагают, что три популяции футпринтов соответствуют трем различным функциональным состояниям рибосомного комплекса на AUG кодоне. Так, самый короткий футпринт, по всей видимости, соответствует только что прибывшей рибосоме в «открытой» конформации, необходимой для сканирования. Во-вторых, более детальное изучение рибосомных футпринтов на стартовом кодоне позволяет идентифицировать минорные популяции фрагментов большей длины. Авторы предполагают, что эти футпринты образуются по двум причинам – за счет дополнительных контактов с инициаторными факторами в районе выхода мРНК из канала рибосомы, а также за счет образования очереди из сканирующих рибосом.

Анализ тех футпринтов от РСК, которые расположены до стартового кодона в 5'-НТО, также оказался очень полезен и интересен. Для многих мРНК распределение сканирующих рибосом по 5'-НТО было однородным, что соответствует представлениям об эффективном процессе сканирования. Тем не менее на некоторых мРНК обнаруживается локальное накопление сканирующих рибосом в определенных участках 5'-НТО, что говорит о возможном существовании блокирующих участков, которые с трудом проходятся рибосомой при сканировании. В ряде случаев такие паузы в 5'-НТО не могут быть объяснены присутствием коротких рамок считывания или локальных структурных элементов. По предположениям авторов, такие паузы могут либо быть связаны с последовательностью нуклеотидов, которая «плоха» для сканирования, либо со связыванием белков, препятствующих движению сканирующих рибосом. Приведенные авторами рибосомные профили с паузами сканирующих рибосом для мРНК *PAB1* и *SEC4* являются очень яркими и интересными примерами существования регуляторных *cis*-действи-

ющих элементов в 5'-НТО, которые, вероятно, замедляют сканирующие рибосомы [28].

Метод рибосомного профайлинга сканирующих комплексов вскоре был адаптирован и успешно использован для изучения сканирования у высших эукариот – на примере клеточных культур млекопитающих [28, 29] и для рыбки дафио-рерио (*zebrafish*, *Danio rerio*) [30]. В целом основные результаты, полученные для дрожжей, наблюдаются и в этих работах. Мы подчеркнем несколько важных, на наш взгляд, выводов, которые проясняют аспекты регуляции инициации трансляции и сканирования. Так, изучение футпринтов РСК, приходящихся на самый 5'-конец мРНК, поддерживает модель постепенного продвижения 5'-конца последовательности в мРНК-связывающий канал рибосомы. В экспериментах с *D. rerio* было показано, что рибосомные футпринты на 5'-концах мРНК имеют широкий набор длин от 15 до 80 нт, в то время как остальные сканирующие рибосомы, начавшие движение от 5'-конца, в основном защищают фрагменты большой длины (60–70 нт). Постепенное увеличение длины футпринтов с 5'-конца мРНК свидетельствует против модели, согласно которой мРНК-связывающий канал рибосомы сразу же загружается 5'-проксимальным сегментом мРНК. Эти результаты соотносятся с данными, полученными путем биохимических экспериментов [31, 32]. Кроме того, в работе [30] было установлено, что эффективность посадки сканирующих рибосом на мРНК, которые начинаются с С или Т, снижена по сравнению с транскриптами, у которых первый нуклеотид является А или G, вероятно, из-за более низкой аффинности кэпа к eIF4E [33, 34]. Также стоит отметить интересное наблюдение, связанное с регуляторными функциями коротких рамок считывания в 5'-НТО. Было показано, что ингибирующий эффект таких рамок считывания связан с природой терминирующего кодона этой рамки – присутствие наименее эффективного из трех стоп-кодонов, UGA, сильнее всего снижает количество сканирующих рибосом после рамки [30].

Мы считаем, что данная модификация рибосомного профайлинга является чрезвычайно важной для понимания принципов регуляции сканирования в 5'-НТО мРНК. В частности, данный метод будет крайне полезен для того, чтобы выяснить механизмы кэп-независимой трансляции у млекопитающих. Так, если определенная мРНК может иницировать трансляцию за счет внутренней посадки рибосомы с использованием IRES-элемента (internal ribosome entry site), то стоит ожидать отсутствия РФП от сканирующих рибосом в значительной части ее

5'-НТО. В противном случае механизм кэп-независимой инициации, по всей видимости, должен быть основан на сканировании [35]. Другими словами, мы считаем, что данный метод позволит выяснить реальный механизм инициации трансляции для тех мРНК, в последовательности которых ранее было предположено наличие IRES-элементов.

СЕЛЕКТИВНЫЙ РИБОСОМНЫЙ ПРОФАЙЛИНГ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ФУНКЦИИ ИНИЦИАТОРНЫХ ФАКТОРОВ

Эволюция технологии рибосомного профайлинга привела к появлению его особой модификации, названной селективным рибосомным профайлингом. Суть модификации заключается в выделении после обработки рибонуклеазой части рибосом, ассоциированных с определенным белком (рис. 2). Это достигается путем выделения рибосомных комплексов либо с помощью антител к интересующему белку, либо с помощью тэга, введенного в этот белок, после чего из отобранных комплексов выделяют фрагменты мРНК и подвергают их массовому параллельному секвенированию. Таким образом осуществляют позиционное картирование – т.е. наличие того или иного фактора в рибосомном комплексе соотносится с положением рибосомы на нуклеотидной последовательности какой-либо мРНК.

Данный подход был впервые применен в 2011 г. для изучения взаимодействия насцентного полипептида с шапероном Trigger factor (TF) в процессе трансляции у бактерий *E. coli* [36]. Ав-

торы данной работы ввели аффинный тэг AviTag в TF, после чего фиксировали рибосомные комплексы с помощью сшивающего агента DSP (дитиобиссукцинимидилпропионат), обрабатывали лизат микрококковой нуклеазой и выделяли 70S рибосомы, ассоциированные с TF через насцентный полипептид. С помощью данного подхода было показано, что TF начинает взаимодействовать с насцентным полипептидом на стадии ~ 100 аминокислотных остатков (а.о.). Этот вывод был получен при сравнении метагеномного рибосомного профиля от всех рибосом и от рибосом, отобранных с помощью AviTag – в последнем случае наблюдалось резкое увеличение количества РФП после ~ 100-го кодона мРНК.

Селективный рибосомный профайлинг был применен сразу тремя группами исследователей для изучения функции трансляционных факторов (соответствующие статьи опубликованы в одном номере высокорейтингового журнала *Molecular Cell* [28, 29, 37]). Во всех трех работах продемонстрирован любопытный факт, что иницирующий фактор eIF3 сохраняет свои контакты с рибосомой и на начальной фазе элонгации. Этот результат соответствует данным о структуре рибосомных комплексов с eIF3 – на многих предложенных крио-ЭМ моделях 40S рибосомных комплексов eIF3 имеет контакты с обращенной в раствор (solvent side) поверхностью 40S рибосомы [38–41]. Кроме того, согласно результатам ряда работ, eIF3 играет важную роль в реинициации после трансляции коротких ОРС в 5'-НТО, что подразумевает сохранение взаимодействия eIF3 с 80S рибосомой при трансляции короткой рамки считывания [42, 43].

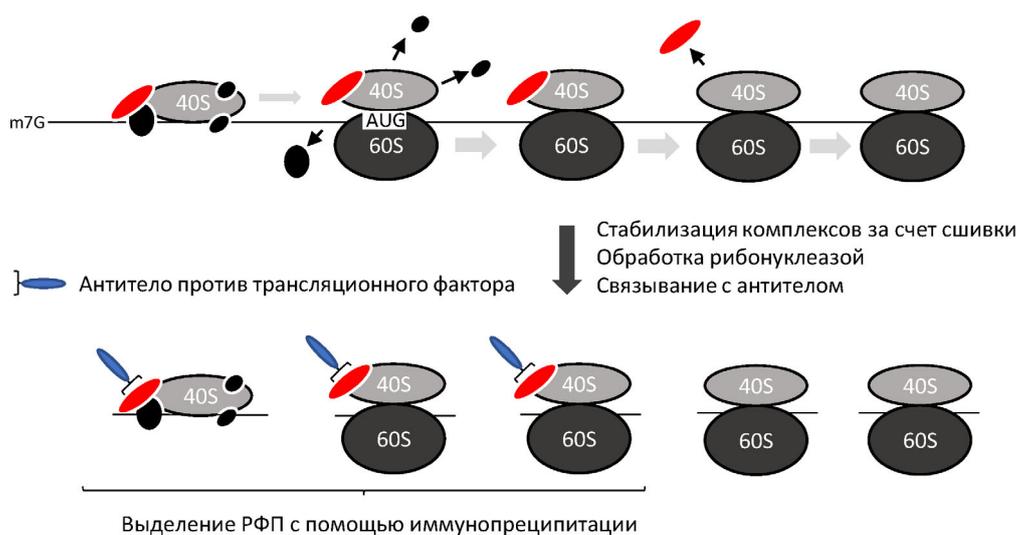


Рис. 2. Схематическое изображение селективного рибосомного профайлинга

В двух исследованиях с использованием сшивающего реагента для фиксации инициаторных комплексов [28, 29] было показано, что контакты eIF3 с рибосомой формируются на самом начальном этапе сканирования и драматически падают при достижении стартового кодона, но следовые количества eIF3 сохраняются и после прохождения стартового кодона: согласно первой из этих публикаций — до 20–25-го кодона, согласно второй — примерно до 12-го кодона. Хотя эти результаты, как уже упоминалось, не противоречат структурным и биохимическим данным, есть две причины считать данную оценку завышенной. Первая причина заключается в том, что далеко не каждый стартовый кодон ОРС расположен в оптимальном для инициации контексте, и во многих случаях существует возможность проскальзывающего сканирования инициаторных комплексов, что не учитывается при интерпретации результатов данных работ. Недавнее исследование, посвященное изучению проскальзывающего сканирования через стартовые кодоны основной ОРС, показывает, что этот механизм активно используется в клетках млекопитающих и может быть детектирован методом рибосомного профайлинга [44]. Мы предполагаем, что какая-то часть сканирующих рибосом, не узнавших стартовый кодон, может принести вклад в обогащение сигнала от связанных с eIF3 рибосомных комплексов. Вторая причина связана с результатами недавней работы, показывающей специфическое взаимодействие eIF3 с 80S рибосомой, транслирующей определенный набор мРНК [37]. Вклад этих специфических мРНК, таким образом, может исказить общую картину для всех транслируемых мРНК.

Остановимся на упомянутой работе более подробно. Lin et al. с помощью рибосомного профайлинга изучали эффект подавления одной из субъединиц eIF3, eIF3e, на экспрессию генов в клеточной линии MCF-10A [37]. Оказалось, что нокдаун eIF3e приводил к статистически значимым изменениям «трансляционной эффективности» для нескольких сотен мРНК. Важно отметить, что «трансляционная эффективность» в опубликованных работах часто оценивается по соотношению РФП к фрагментам мРНК для каждой конкретной мРНК. Этот термин не совсем точный, поскольку отражает нагрузку мРНК рибосомами, а не реальную эффективность трансляции мРНК. Так, группа мРНК с повышенной «трансляционной эффективностью» была обогащена мРНК, кодирующими митохондриальные и трансмембранные белки. В то же время результаты альтернативного метода измерения эффективности белкового синте-

за, основанного на пульс-мечении синтезируемых белков (pulse SILAC, pSILAC) и масс-спектрометрии, оказались прямо противоположными — нокдаун eIF3e, наоборот, приводил к пониженному синтезу сходного набора митохондриальных и трансмембранных белков.

Чтобы разрешить данное противоречие, авторы работы [37] более детально проанализировали данные рибосомного профайлинга и обнаружили, что мРНК с кажущейся повышенной «трансляционной эффективностью» покрыты рибосомами неравномерно: в клетках с нокдауном eIF3e наблюдается значительное повышение плотности рибосом между 25-м и 75-м триплетами кодирующей последовательности. Для изучения природы данного эффекта был использован селективный рибосомный профайлинг — после обработки лизата клеток рибонуклеазой из фракции 80S моносом с помощью антител выделялись те рибосомы, которые ассоциированы с eIF3 (важно отметить, что в данном случае не проводилась фиксация комплексов с помощью сшивающих агентов). Действительно, оказалось, что eIF3 ассоциирован с 80S рибосомами, вовлеченными в элонгацию специфических мРНК. Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что eIF3 стабильно ассоциирован (поскольку детектируется без сшивки) с некоторыми мРНК в процессе элонгации и, по всей видимости, каким-то образом стимулирует элонгацию на протяжении первых 75 кодонов.

Суммируя основные выводы результатов трех указанных выше работ по функциональной роли eIF3, можно сделать следующие выводы: eIF3, как и другие факторы инициации, в основном высвобождается на стадии образования 80S, однако покидает рибосому в последнюю очередь и может некоторое непродолжительное время оставаться связанным с элонгирующей рибосомой. При этом на некоторых мРНК взаимодействие с eIF3 может сохраняться на протяжении длительного времени, и это взаимодействие необходимо для эффективной трансляции нескольких десятков триплетов. Крайне интересно и важно понять, что именно заставляет eIF3 задерживаться на определенных мРНК в процессе элонгации и где именно находится eIF3 на 80S — изменяются ли контакты eIF3 с рибосомой по сравнению с прединициаторным, например, сканирующим, комплексом.

eIF3 — не единственный фактор инициации, который изучали с помощью селективного рибосомного профайлинга. Так, авторы двух работ также использовали eIF2 при обогащении РСК [28, 29]. Как и ожидалось, eIF2 оказывается связан с РСК с самого начала процесса сканирования, а при достижении стартового кодона он

«исчезает». Интересно отметить тот факт, что при сравнении селективного профайлинга против eIF2 и eIF3 с данными от неотобранных футпринтов от РСК удалось подтвердить тот факт, что факторы инициации диссоциируют при узнавании стартового кодона, однако eIF3 уходит позже eIF2.

Интересно, что схожие результаты были получены и для eIF4G с eIF4E [28]. Оказалось, что эти факторы остаются связанными с рибосомой в процессе сканирования всей 5'-НТО. Если для eIF4G этот результат был вполне ожидаем, то для кэп-связывающего белка eIF4E он был неочевиден. Действительно, можно было предположить, что eIF4E остается связанным с кэпом и в какой-то момент диссоциирует от eIF4G, продолжающего движение со сканирующей рибосомой, однако эта гипотеза не нашла подтверждения по результатам селективного рибосомного профайлинга – согласно полученным результатам, все РСК содержат eIF4E. Затем на основании результатов дополнительных экспериментов авторами была предложена модель, согласно которой eIF4E сохраняет взаимодействие с кэпом на протяжении всего сканирования, а следовательно, 5'-НТО может одновременно сканировать только одна рибосома [28]. Эта крайне нетривиальная и провокационная модель заслуживает отдельного обсуждения.

Описанная выше модель основана на результатах двух ключевых экспериментов. В первом авторы блокировали иницировавшие 80S рибосомы с помощью ингибитора трансляции харрингтоина [6, 45] и не обнаружили накопления РСК перед 80S, «застрявшей» на стартовом кодоне. Второй эксперимент заключался в использовании набора репортерных конструкций, содержащих 5'-НТО из повторяющихся блоков [28]. С увеличением количества блоков и, соответственно, длины 5'-НТО было обнаружено падение активности репортера в зависимости от увеличения длины 5'-НТО. Результаты этих экспериментов, по мнению авторов, подтверждают гипотезу работы одной сканирующей рибосомы на 5'-НТО. Мы предполагаем, что этим результатам есть альтернативное объяснение. Вероятно, РСК может диссоциировать от мРНК в процессе сканирования, особенно если он натывается на препятствие. Тогда отсутствие накопления сканирующих рибосом перед 80S может объясняться диссоциацией за счет столкновения РСК с «замороженной» 80S. В том же ключе можно объяснить и зависимость трансляции от длины лидирующей последовательности – при увеличении общего времени сканирования увеличивается вероятность потери сканирующего комплекса. Можно предпо-

ложить, что вероятность диссоциации сканирующей рибосом критически зависит от лидирующей последовательности – ослабление взаимодействия компонентов сканирующего комплекса с неоптимальными последовательностями повышает вероятность диссоциации рибосомы от мРНК. Стоит отметить обсуждавшиеся ранее данные по профайлингу сканирующих комплексов в дрожжах, когда на индивидуальных мРНК наблюдались значительные паузы от сканирующих рибосом в определенных положениях на 5'-НТО. Таким образом, на наш взгляд, полученные в работе данные не опровергают модель, согласно которой 5'-НТО может одновременно транслировать несколько РСК. Здесь также уместно привести результаты прямого эксперимента [46], когда авторы осуществили бесклеточную трансляцию кэпированной мРНК с достаточно длинной 5'-НТО и использовали циклогексимид для остановки 80S элонгирующей рибосомы на стартовом кодоне. «Замораживая» сканирование через данную 5'-НТО путем повышения содержания магния и негидролизуемого аналога АТР, АМР-РNP (аденилилимидодифосфат), с помощью электронной микроскопии авторы наблюдали в этой системе структуры, состоящие из нескольких 40S рибосом вместе с одной полной 80S рибосомой. Эти данные предоставляют дополнительные доказательства в поддержку сканирующей модели инициации трансляции у эукариот с разрывом взаимодействия между кэпом и фактором eIF4E на определенной стадии сканирования.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЕЛЕКТИВНОГО РИБОСОМНОГО ПРОФАЙЛИНГА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КОТРАНСЛЯЦИОННОЙ СБОРКИ МУЛЬТИСУБЪЕДИНИЧНЫХ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ

Сворачивание вновь синтезированных белков является серьезной проблемой в «переполненной» клеточной среде, поскольку непродуктивные взаимодействия могут привести к неправильной укладке белковых цепей, агрегации и деградации. Эта проблема, как известно, преодолевается в клетках сочетанием одновременного синтеза белковых цепей с промотированием их правильного сворачивания. Клетки используют для этой цели молекулярные шапероны для стимуляции котрансляционного сворачивания белков. Использование рибосомного профайлинга для изучения котрансляционного сворачивания было впервые предложено и при-

менено в упоминавшейся ранее работе по изучению функции шаперона Trigger factor у бактерий [36]. Позднее такой же подход был использован для изучения функции других котрансляционных шаперонов и последовательности сворачивания белков, например, была исследована функция Ssb, шаперона дрожжей из семейства Hsp70, в котрансляционном взаимодействии с насцентным полипептидом [47].

Наиболее интересные и интригующие результаты были получены при изучении сборки мультисубъединичных белковых комплексов. Известно, что сборка некоторых комплексов требует участия специализированных шаперонов. Например, сборка 20S протеасомы у дрожжей осуществляется пятью специализированными шаперонами: Roc1–Roc4 и Ump1 [48, 49]. Однако верно ли это для большинства комплексов, или для них используется какой-то другой способ сборки, оставалось неясным.

Чтобы исследовать процесс сборки сложных мультисубъединичных комплексов в клетках дрожжей *S. cerevisiae*, авторы работы [50] использовали селективный рибосомный профайлинг, при котором проводилось аффинное выделение рибосомных комплексов за отдельные субъединицы исследуемого комплекса, слитые с тэгом – в данном случае использовался GFP. В качестве первого примера авторы исследовали сборку синтетазы жирных кислот (FAS), состоящей из двух субъединиц, которые собираются в додекамерный комплекс $\alpha\beta_6$. Селективный рибосомный профайлинг показал, что сборка FAS инициируется котрансляционно асимметричным образом. Тэгируемая α -субъединица не взаимодействовала с рибосомами, транслируемыми α - или β -цепью. Напротив, тэгируемая β -субъединица взаимодействовала с рибосомами, транслируемыми мРНК α -субъединицы: наблюдалось примерно 40-кратное обогащение РФП по сравнению с неселектированными РФП, начиная со 125-го триплета α -субъединицы, и обогащение сохранялось до завершения синтеза всей субъединицы. На основании этого результата была предложена модель, по которой сначала полностью синтезируется β -субъединица FAS, которая может стабильно свернуться в отсутствие α . Затем происходит трансляция α -субъединицы, в процессе которой из рибосомы появляется структурный домен, который начинает взаимодействовать с уже синтезированной β -субъединицей. Проанализировав еще 11 мультисубъединичных комплексов, авторы работы показали, что 9 комплексов собираются котрансляционно и всего лишь 3 собираются после синтеза всех субъединиц. Таким образом, котрансляционная сборка мультисубъединич-

ных комплексов – это, по всей видимости, очень распространенный, если не основной, механизм их формирования. Авторы предполагают, что такой вариант сборки может реализовываться для гораздо большего количества белковых комплексов, например, для гомо- или гетеродимеров [50].

В последующих работах было получено доказательство того, что котрансляционная сборка белковых комплексов также широко применяется в клетках млекопитающих. В работе [51] было показано, что мультисубъединичные транскрипционные комплексы TFIID, TREX-2 и SAGA также собираются котрансляционно. Кроме того, авторы упомянутой ранее работы по изучению сканирующих комплексов [29], по всей видимости, случайно обнаружили факт котрансляционной сборки уже обсуждавшегося нами 800 кДа трансляционного фактора eIF3: используя тэгируемые субъединицы eIF3 для выделения сканирующих рибосомных комплексов, авторы обнаружили обогащение РФП от мРНК, кодирующих другие субъединицы eIF3.

Интересно рассмотреть два возможных механизма котрансляционной сборки субъединиц комплексов. Согласно первой модели, полностью синтезированная субъединица взаимодействует с синтезируемой насцентной цепью второй субъединицы, направляя ее сборку и защищая от агрегации. Такая модель, получившая название последовательной, по всей видимости, является основной. Вторая модель предусматривает то, что насцентные пептиды двух субъединиц могут начать взаимодействовать между собой прямо в процессе трансляции. Для этого необходимо, чтобы взаимодействующие участки находились в *N*-концевых частях обеих субъединиц. Такая модель получила название одновременной сборки (рис. 3). Авторы работы [51] показали, что одна пара субъединиц комплекса TFIID, TAF6-TAF9, собирается по принципу одновременной сборки. Такая модель подразумевает, что две различные полирибосомы взаимодействуют друг с другом через насцентные цепи белков, образуя, можно сказать, «суперполисому». Крайне интересно понять, как в таком случае координируются процессы трансляции двух мРНК, ведь для скоординированной сборки комплексов необходима идеальная синхронизация инициации, элонгации и терминации трансляции на двух мРНК одновременно. Мы полагаем, что исследование такого гипотетического механизма трансляции «суперполисом» может привести к открытию принципиально новых механизмов регуляции трансляции.

делялась фракция фрагментов РНК с длиной 40–80 нт, которая теоретически могла содержать фрагменты мРНК, защищаемые двумя «столкнувшимися» рибосомами. Действительно, были обнаружены футпринты от «дисом», которые, как и ожидалось, в основном картируются в транслируемых ОРС мРНК и которыми обогащены некоторые мРНК, в чьих последовательностях ранее были обнаружены специфические рибосомные паузы (например, на мРНК *HAS1*). Интересно наблюдение, что «дисомы» крайне редко обнаруживаются в начале рамки считывания вплоть до 25 нт. По всей видимости, это говорит о том, что иницилирующая рибосома не начинает трансляцию до тех пор, пока элонгирующая 80S рибосома не освободит 25 нт мРНК.

Модификация рибосомного профайлинга, позволяющая изучать «дисомы» и столкновения более двух рибосом, в дальнейшем была использована в нескольких исследованиях. Авторы работы [53] применили данный подход для изучения столкновений рибосом в клетках линии НЕК293 и клетках *D. rerio*. Согласно оценке авторов, столкновение рибосом – очень распространенное явление даже в нормальных, не стрессовых условиях: около 11% мРНК имеют хотя бы один сайт столкновения рибосом. Такие паузы наблюдаются в дискретных положениях в кодирующих частях мРНК и на неоптимальных терминирующих кодонах. С помощью модифицированного рибосомного профайлинга авторы не только подтвердили случаи известных рибосомных пауз для индивидуальных генов и последовательностей триплетов, но и обнаружили новый мотив, приводящий к паузе рибосом. Так, при картировании паузы от «дисом» по отношению к Е-Р-А сайту лидирующей рибосомы был выявлен не только известный мотив Pro-Pro-Lys, но и новый мотив Arg-X-Lys. Также было обнаружено, что формирование дисом на стоп-кодонах усиливается, если в положении +4 находится С – это наблюдение соответствует данным об эффекте контекста стоп-кодона на эффективность терминации [54, 55]. Интересно отметить тот факт, что в ряде случаев на особенно «сильных» местах паузы могут образовываться очереди из множества рибосом – так, накопление до 6 рибосом в ряд было обнаружено перед сайтом паузы на мРНК *XBP1u*. Полученные данные однозначно говорят о том, что столкновения рибосом – это вполне обычное явление, происходящее в клетках в нормальных условиях.

Нужно отметить интересную гипотезу, которая была предложена при изучении «столкнувшихся» рибосом в клетках дрожжей [56] и в пе-

чени мыши [57]. В обоих случаях РФП из «дисом» составляют существенную фракцию всех РФП. В обоих случаях авторы предполагают, что столкновения рибосом (по крайней мере, части из них) не случайны, а ассоциированы с котрансляционным сворачиванием белков. Так, у дрожжей паузами обогащены участки последовательности, расположенные в кодирующей части мРНК, соответствующей промежутку между альфа-спиралями. При этом в процессе трансляции с насцентными полипептидами «дисом» ассоциируются специфические шапероны [56].

В то же время известно, что две столкнувшиеся рибосомы могут служить сигналом для активации специфического пути контроля качества на уровне трансляции, который называется RQC. Этот путь довольно хорошо изучен и детально описан в последних работах, и мы не будем подробно описывать последовательность событий, которые происходят после активации RQC [58–61], однако отметим самый первый этап – узнавание уникального интерфейса между столкнувшимися рибосомами специфической Е3 убиквитинлигазой Hel2 (Rqt1) у дрожжей и ZNF598 – у млекопитающих. Более того, столкнувшиеся рибосомы могут также активировать риботоксический стрессовый ответ. Так, «дисомы» привлекают специализированную киназу ZAK α , которая при этом аутофосфорилируется и затем активирует SAPK (p38/JNK) сигнальный каскад [62]. Кроме того, столкнувшиеся рибосомы могут также рекрутировать белок GCN1 [63], который способен приводить к активации GCN2, фосфорилированию eIF2 и, как результат, к глобальному подавлению трансляции.

Учитывая данные модифицированного рибосомного профайлинга о том, что столкновения рибосом – это обычное явление, которое происходит в нормальных условиях, можно предложить следующую модель. В нормальных условиях столкновения рибосом часто происходят на нормальных, неповрежденных мРНК, однако они успевают разрешиться до того, как активируется RQC или другие стрессовые пути. Тем не менее даже в нормальных условиях некоторые мРНК индуцируют настолько сильные паузы, что активируется RQC (в качестве примера изучался случай с мРНК *XBP1u* [53]). При возникновении стресса, приводящего к более длительным паузам «дисом» или к накоплению значительного количества поврежденных мРНК, активно запускается RQC. Если же паузы встречаются слишком часто и не успевают разрешиться даже с помощью RQC, происходит активация интегрированного стрессового ответа (ISR) и подавление трансляции, а также актива-

ция риботоксического стресса через SAPK (p38/JNK) с последующей активацией апоптоза. Многие детали регуляции трансляции за счет столкновения рибосом еще предстоит изучить. Стоит отметить, что рибосомный профайлинг «дисом» оказывается очень ценным инструментом для изучения функции факторов, вовлеченных в котрансляционный контроль качества мРНК и рибосомы [42, 64, 65].

ОБСУЖДЕНИЕ

За чуть более чем 10 лет своего существования рибосомный профайлинг завоевал заслуженную популярность. Теперь оказывается довольно сложно отследить все статьи, где используется этот метод, поскольку часто рибосомный профайлинг рутинно применяется вместе с десятками других подходов и не упоминается в аннотации к статье. Большинство применений рибосомного профайлинга основано на классическом подходе с анализом РФП от 80S или 70S рибосом. Особенно привлекательно использовать данный метод для изучения функции транскрипционных факторов как основных, так и тех, которые работают на специфических мРНК. С помощью «обычного» рибосомного профайлинга можно обнаружить мРНК, зависящие от исследуемого фактора инициации, а в некоторых случаях можно даже предположить механизм работы этого фактора. Мы не можем обойти вниманием ряд недавних работ, в которых изучалась роль некоторых неканонических факторов трансляции, и вкратце перечислим некоторые из них. Так, с помощью рибосомного профайлинга была исследована роль инициа-

торных факторов eIF2D, MCT и DENR [66–68], eIF5A [69], EEF3 [70], eIF1 [71, 72], eIF4A, eIF4B и Ded1 [73], Rli1/ABCE1 [74], Dom34 [52], eIF5 [75] и eIF4G2 [76]. Мы предполагаем, что модификации рибосомного профайлинга, описанные в данной статье, окажутся еще более ценными при изучении функциональной роли малоизученных транскрипционных факторов и регуляторов.

Рибосомный профайлинг и его новые модификации, описанные в данном обзоре, уже стали важнейшим методом для изучения принципов регуляции синтеза белка в живых клетках, и его вклад в наше понимание трансляции сложно переоценить. Вместе с тем мы до сих пор не до конца понимаем возможные артефакты рибосомного профайлинга и их вклад в интерпретацию результатов. Яркий пример, рассмотренный в данном обзоре — мнимое увеличение «транскрипционной эффективности» некоторых мРНК, регулируемых eIF3, которое на самом деле оказалось связанным с подавлением трансляции [37]. Следовательно, для независимого подтверждения результатов рибосомного профайлинга необходимо использовать альтернативные экспериментальные подходы.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00152).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов, выполненных авторами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Castles, J. J., and Singer, M. F. (1969) Degradation of polyuridylic acid by ribonuclease II: protection by ribosomes, *J. Mol. Biol.*, **40**, 1-17, doi: 10.1016/0022-2836(69)90292-7.
2. Wolin, S. L., and Walter, P. (1988) Ribosome pausing and stacking during translation of a eukaryotic mRNA, *EMBO J.*, **7**, 3559-3569.
3. Ingolia, N. T., Ghaemmaghami, S., Newman, J. R., and Weissman, J. S. (2009) Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling, *Science*, **324**, 218-223, doi: 10.1126/science.1168978.
4. Ingolia, N. T., Brar, G. A., Rouskin, S., McGeachy, A. M., and Weissman, J. S. (2012) The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments, *Nat. Prot.*, **7**, 1534-1550, doi: 10.1038/nprot.2012.086.
5. Lee, S., Liu, B., Lee, S., Huang, S. X., Shen, B., and Qian, S. B. (2012) Global mapping of translation initiation sites in mammalian cells at single-nucleotide resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, E2424-2432, doi: 10.1073/pnas.1207846109.
6. Ingolia, N. T., Lareau, L. F., and Weissman, J. S. (2011) Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes, *Cell*, **147**, 789-802, doi: 10.1016/j.cell.2011.10.002.
7. Wu, C. C., Zinshteyn, B., Wehner, K. A., and Green, R. (2019) High-resolution ribosome profiling defines discrete ribosome elongation states and translational regulation during cellular stress, *Mol. Cell*, **73**, 959-970.e955, doi: 10.1016/j.molcel.2018.12.009.
8. Lareau, L. F., Hite, D. H., Hogan, G. J., and Brown, P. O. (2014) Distinct stages of the translation elongation cycle revealed by sequencing ribosome-protected mRNA fragments, *eLife*, **3**, e01257, doi: 10.7554/eLife.01257.
9. Ingolia, N. T., Hussmann, J. A., and Weissman, J. S. (2019) Ribosome profiling: global views of translation, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **11**, doi: 10.1101/cshperspect.a032698.
10. Brar, G. A., and Weissman, J. S. (2015) Ribosome profiling reveals the what, when, where and how of protein synthesis,

- Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **16**, 651-664, doi: 10.1038/nrm4069.
11. Kiniry, S. J., Michel, A. M., and Baranov, P. V. (2020) Computational methods for ribosome profiling data analysis, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **11**, e1577, doi: 10.1002/wrna.1577.
 12. Ingolia, N. T. (2014) Ribosome profiling: new views of translation, from single codons to genome scale, *Nat. Rev. Genet.*, **15**, 205-213, doi: 10.1038/nrg3645.
 13. Andreev, D. E., O'Connor, P. B., Loughran, G., Dmitriev, S. E., Baranov, P. V., and Shatsky, I. N. (2017) Insights into the mechanisms of eukaryotic translation gained with ribosome profiling, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 513-526, doi: 10.1093/nar/gkw1190.
 14. Calviello, L., and Ohler, U. (2017) Beyond read-counts: Ribo-seq data analysis to understand the functions of the transcriptome, *Trends Genet.*, **33**, 728-744, doi: 10.1016/j.tig.2017.08.003.
 15. Michel, A. M., and Baranov, P. V. (2013) Ribosome profiling: a Hi-Def monitor for protein synthesis at the genome-wide scale, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **4**, 473-490, doi: 10.1002/wrna.1172.
 16. Kozak, M. (1978) How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell*, **15**, 1109-1123, doi: 10.1016/0092-8674(78)90039-9.
 17. Kozak, M. (1980) Evaluation of the "scanning model" for initiation of protein synthesis in eucaryotes, *Cell*, **22**, 7-8, doi: 10.1016/0092-8674(80)90148-8.
 18. Hinnebusch, A. G. (2014) The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation, *Annu. Rev. Biochem.*, **83**, 779-812, doi: 10.1146/annurev-biochem-060713-035802.
 19. Hinnebusch, A. G. (2017) Structural insights into the mechanism of scanning and start codon recognition in eukaryotic translation initiation, *Trends Biochem. Sci.*, **42**, 589-611, doi: 10.1016/j.tibs.2017.03.004.
 20. Tahmasebi, S., Sonenberg, N., Hershey, J. W. B., and Mathews, M. B. (2019) Protein synthesis and translational control: a historical perspective, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **11**, doi: 10.1101/cshperspect.a035584.
 21. Hershey, J. W. B., Sonenberg, N., and Mathews, M. B. (2019) Principles of translational control, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **11**, doi: 10.1101/cshperspect.a032607.
 22. Hinnebusch, A. G., Ivanov, I. P., and Sonenberg, N. (2016) Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs, *Science*, **352**, 1413-1416, doi: 10.1126/science.aad9868.
 23. Valasek, L., Szamecz, B., Hinnebusch, A. G., and Nielsen, K. H. (2007) In vivo stabilization of preinitiation complexes by formaldehyde cross-linking, *Methods Enzymol.*, **429**, 163-183, doi: 10.1016/S0076-6879(07)29008-1.
 24. Archer, S. K., Shirokikh, N. E., Beilharz, T. H., and Preiss, T. (2016) Dynamics of ribosome scanning and recycling revealed by translation complex profiling, *Nature*, **535**, 570-574, doi: 10.1038/nature18647.
 25. Pisarev, A. V., Kolupaeva, V. G., Yusupov, M. M., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. (2008) Ribosomal position and contacts of mRNA in eukaryotic translation initiation complexes, *EMBO J.*, **27**, 1609-1621, doi: 10.1038/emboj.2008.90.
 26. Kozak, M. (1977) Nucleotide sequences of 5'-terminal ribosome-protected initiation regions from two reovirus messages, *Nature*, **269**, 391-394, doi: 10.1038/269390a0.
 27. Lazarowitz, S. G., and Robertson, H. D. (1977) Initiator regions from the small size class of reovirus messenger RNA protected by rabbit reticulocyte ribosomes, *J. Biol. Chem.*, **252**, 7842-7849, doi: 10.1016/S0021-9258(17)41043-X.
 28. Bohlen, J., Fenzl, K., Kramer, G., Bukau, B., and Teleman, A. A. (2020) Selective 40S footprinting reveals cap-tethered ribosome scanning in human cells, *Mol. Cell*, **79**, 561-574.e565, doi: 10.1016/j.molcel.2020.06.005.
 29. Wagner, S., Herrmannova, A., Hronova, V., Gunisova, S., Sen, N. D., et al. (2020) Selective translation complex profiling reveals staged initiation and co-translational assembly of initiation factor complexes, *Mol. Cell*, **79**, 546-560.e547, doi: 10.1016/j.molcel.2020.06.004.
 30. Giess, A., Torres Cleuren, Y. N., Tjeldnes, H., Krause, M., Bizuayehu, T. T., et al. (2020) Profiling of small ribosomal subunits reveals modes and regulation of translation initiation, *Cell Rep.*, **31**, 107534, doi: 10.1016/j.celrep.2020.107534.
 31. Elfakess, R., Sinvani, H., Haimov, O., Svitkin, Y., Sonenberg, N., and Dikstein, R. (2011) Unique translation initiation of mRNAs-containing TISU element, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 7598-7609, doi: 10.1093/nar/gkr484.
 32. Kumar, P., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. (2016) Toward the mechanism of eIF4F-mediated ribosomal attachment to mammalian capped mRNAs, *Genes Dev.*, **30**, 1573-1588, doi: 10.1101/gad.282418.116.
 33. Meyuhas, O., and Kahan, T. (2015) The race to decipher the top secrets of TOP mRNAs, *Biochim. Biophys. Acta*, **1849**, 801-811, doi: 10.1016/j.bbagr.2014.08.015.
 34. Tamarkin-Ben-Harush, A., Vasseur, J. J., Debart, F., Ulitsky, I., and Dikstein, R. (2017) Cap-proximal nucleotides via differential eIF4E binding and alternative promoter usage mediate translational response to energy stress, *eLife*, **6**, doi: 10.7554/eLife.21907.
 35. Shatsky, I. N., Terenin, I. M., Smirnova, V. V., and Andreev, D. E. (2018) Cap-independent translation: what's in a name? *Trends Biochem. Sci.*, **43**, 882-895, doi: 10.1016/j.tibs.2018.04.011.
 36. Oh, E., Becker, A. H., Sandikci, A., Huber, D., Chaba, R., et al. (2011) Selective ribosome profiling reveals the cotranslational chaperone action of trigger factor *in vivo*, *Cell*, **147**, 1295-1308, doi: 10.1016/j.cell.2011.10.044.
 37. Lin, Y., Li, F., Huang, L., Polte, C., Duan, H., Fang, J., et al. (2020) eIF3 associates with 80S ribosomes to promote translation elongation, mitochondrial homeostasis, and muscle health, *Mol. Cell*, **79**, 575-587.e577, doi: 10.1016/j.molcel.2020.06.003.
 38. Hashem, Y., des Georges, A., Dhote, V., Langlois, R., Liao, H. Y., et al. (2013) Structure of the mammalian ribosomal 43S preinitiation complex bound to the scanning factor DHX29, *Cell*, **153**, 1108-1119, doi: 10.1016/j.cell.2013.04.036.
 39. Des Georges, A., Dhote, V., Kuhn, L., Hellen, C. U., Pestova, T. V., et al. (2015) Structure of mammalian eIF3 in the context of the 43S preinitiation complex, *Nature*, **525**, 491-495, doi: 10.1038/nature14891.
 40. Eliseev, B., Yeramala, L., Leitner, A., Karuppasamy, M., Raimondeau, E., et al. (2018) Structure of a human cap-dependent 48S translation pre-initiation complex, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 2678-2689, doi: 10.1093/nar/gky054.
 41. Brito Querido, J., Sokabe, M., Kraatz, S., Gordiyenko, Y., Skehel, J. M., et al. (2020) Structure of a human 48S translational initiation complex, *Science*, **369**, 1220-1227, doi: 10.1126/science.aba4904.
 42. Valasek, L. S., Zeman, J., Wagner, S., Beznoskova, P., Pavlikova, Z., et al. (2017) Embraced by eIF3: structural and functional insights into the roles of eIF3 across the translation cycle, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 10948-10968, doi: 10.1093/nar/gkx805.
 43. Mohammad, M. P., Munzarova Pondelickova, V., Zeman, J., Gunisova, S., and Valasek, L. S. (2017) In vivo evidence that eIF3 stays bound to ribosomes elongating and terminating on short upstream ORFs to promote reinitiation, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 2658-2674, doi: 10.1093/nar/gkx049.
 44. Benitez-Cantos, M. S., Yordanova, M. M., O'Connor, P. B. F., Zhdanov, A. V., Kovalchuk, S. I., et al. (2020) Translation initiation downstream from annotated start codons in human mRNAs coevolves with the Kozak context, *Genome Res.*, **30**, 974-984, doi: 10.1101/gr.257352.119.

45. Fresno, M., Jimenez, A., and Vazquez, D. (1977) Inhibition of translation in eukaryotic systems by harringtonine, *Eur. J. Biochem.*, **72**, 323-330, doi: 10.1111/j.1432-1033.1977.tb11256.x.
46. Shirokikh, N. E., Dutikova, Y. S., Staroverova, M. A., Hannan, R. D., and Preiss, T. (2019) Migration of small ribosomal subunits on the 5'-untranslated regions of capped messenger RNA, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, doi: 10.3390/ijms20184464.
47. Doring, K., Ahmed, N., Riemer, T., Suresh, H. G., Vainshtein, Y., et al. (2017) Profiling Ssb-nascent chain interactions reveals principles of Hsp70-assisted folding, *Cell*, **170**, 298-311.e220, doi: 10.1016/j.cell.2017.06.038.
48. Le Tallec, B., Barrault, M. B., Courbeyrette, R., Guerois, R., Marsolier-Kergoat, M. C., and Peyroche, A. (2007) 20S proteasome assembly is orchestrated by two distinct pairs of chaperones in yeast and in mammals, *Mol. Cell*, **27**, 660-674, doi: 10.1016/j.molcel.2007.06.025.
49. Rosenzweig, R., and Glickman, M. H. (2008) Chaperone-driven proteasome assembly, *Biochem. Soc. Trans.*, **36**, 807-812, doi: 10.1042/BST0360807.
50. Shiber, A., Doring, K., Friedrich, U., Klann, K., Merker, D., et al. (2018) Cotranslational assembly of protein complexes in eukaryotes revealed by ribosome profiling, *Nature*, **561**, 268-272, doi: 10.1038/s41586-018-0462-y.
51. Kamenova, I., Mukherjee, P., Conic, S., Mueller, F., El-Saafin, F., et al. (2019) Co-translational assembly of mammalian nuclear multisubunit complexes, *Nat. Commun.*, **10**, 1740, doi: 10.1038/s41467-019-09749-y.
52. Guydosh, N. R., and Green, R. (2014) Dom34 rescues ribosomes in 3'-untranslated regions, *Cell*, **156**, 950-962, doi: 10.1016/j.cell.2014.02.006.
53. Han, P., Shichino, Y., Schneider-Poetsch, T., Mito, M., Hashimoto, S., et al. (2020) Genome-wide survey of ribosome collision, *Cell Rep.*, **31**, 107610, doi: 10.1016/j.celrep.2020.107610.
54. Brown, A., Shao, S., Murray, J., Hegde, R. S., and Ramakrishnan, V. (2015) Structural basis for stop codon recognition in eukaryotes, *Nature*, **524**, 493-496, doi: 10.1038/nature14896.
55. McCaughan, K. K., Brown, C. M., Dalphin, M. E., Berry, M. J., and Tate, W. P. (1995) Translational termination efficiency in mammals is influenced by the base following the stop codon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 5431-5435, doi: 10.1073/pnas.92.12.5431.
56. Zhao, T., Chen, Y. M., Li, Y., Wang, J., Chen, S., et al. (2021) Disome-seq reveals widespread ribosome collisions that promote cotranslational protein folding, *Genome Biol.*, **22**, 16, doi: 10.1186/s13059-020-02256-0.
57. Arpat, A. B., Liechti, A., De Matos, M., Dreos, R., Janich, P., and Gatfield, D. (2020) Transcriptome-wide sites of collided ribosomes reveal principles of translational pausing, *Genome Res.*, **30**, 985-999, doi: 10.1101/gr.257741.119.
58. Joazeiro, C. A. P. (2019) Mechanisms and functions of ribosome-associated protein quality control, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**, 368-383, doi: 10.1038/s41580-019-0118-2.
59. Ikeuchi, K., Izawa, T., and Inada, T. (2018) Recent progress on the molecular mechanism of quality controls induced by ribosome stalling, *Front. Genet.*, **9**, 743, doi: 10.3389/fgene.2018.00743.
60. Joazeiro, C. A. P. (2017) Ribosomal stalling during translation: providing substrates for ribosome-associated protein quality control, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **33**, 343-368, doi: 10.1146/annurev-cellbio-111315-125249.
61. Defenouillere, Q., and Fromont-Racine, M. (2017) The ribosome-bound quality control complex: from aberrant peptide clearance to proteostasis maintenance, *Curr. Genet.*, **63**, 997-1005, doi: 10.1007/s00294-017-0708-5.
62. Wu, C. C., Peterson, A., Zinshteyn, B., Regot, S., and Green, R. (2020) Ribosome collisions trigger general stress responses to regulate cell fate, *Cell*, **182**, 404-416.e414, doi: 10.1016/j.cell.2020.06.006.
63. Pochopien, A. A., Beckert, B., Kasvandik, S., Berninghausen, O., Beckmann, R., et al. (2021) Structure of Gcn1 bound to stalled and colliding 80S ribosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, doi: 10.1073/pnas.2022756118.
64. Meydan, S., and Guydosh, N. R. (2020) Disome and Trisome profiling reveal genome-wide targets of ribosome quality control, *Mol. Cell*, **79**, 588-602.e586, doi: 10.1016/j.molcel.2020.06.010.
65. Tuck, A. C., Rankova, A., Arpat, A. B., Liechti, L. A., Hess, D., et al. (2020) Mammalian RNA decay pathways are highly specialized and widely linked to translation, *Mol. Cell*, **77**, 1222-1236.e1213, doi: 10.1016/j.molcel.2020.01.007.
66. Young, D. J., Makeeva, D. S., Zhang, F., Anisimova, A. S., Stolboushkina, E. A., et al. (2018) Tma64/eIF2D, Tma20/MCT-1, and Tma22/DENR recycle post-termination 40S subunits *in vivo*, *Mol. Cell*, **71**, 761-774.e765, doi: 10.1016/j.molcel.2018.07.028.
67. Gaikwad, S., Ghobakhlu, F., Young, D. J., Visweswaraiyah, J., Zhang, H., and Hinnebusch, A. G. (2021) Reprogramming of translation in yeast cells impaired for ribosome recycling favors short, efficiently translated mRNAs, *eLife*, **10**, doi: 10.7554/eLife.64283.
68. Castelo-Szekely, V., De Matos, M., Tusup, M., Pascolo, S., Ule, J., and Gatfield, D. (2019) Charting DENR-dependent translation reinitiation uncovers predictive uORF features and links to circadian timekeeping via clock, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 5193-5209, doi: 10.1093/nar/gkz261.
69. Schuller, A. P., Wu, C. C., Dever, T. E., Buskirk, A. R., and Green, R. (2017) eIF5A functions globally in translation elongation and termination, *Mol. Cell*, **66**, 194-205.e195, doi: 10.1016/j.molcel.2017.03.003.
70. Kasari, V., Margus, T., Atkinson, G. C., Johansson, M. J. O., and Hauryliuk, V. (2019) Ribosome profiling analysis of eEF3-depleted *Saccharomyces cerevisiae*, *Sci. Rep.*, **9**, 3037, doi: 10.1038/s41598-019-39403-y.
71. Zhou, F., Zhang, H., Kulkarni, S. D., Lorsch, J. R., and Hinnebusch, A. G. (2020) eIF1 discriminates against suboptimal initiation sites to prevent excessive uORF translation genome-wide, *RNA*, **26**, 419-438, doi: 10.1261/rna.073536.119.
72. Fijalkowska, D., Verbruggen, S., Ndah, E., Jonckheere, V., Menschaert, G., and Van Damme, P. (2017) eIF1 modulates the recognition of suboptimal translation initiation sites and steers gene expression via uORFs, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 7997-8013, doi: 10.1093/nar/gkx469.
73. Sen, N. D., Zhou, F., Harris, M. S., Ingolia, N. T., and Hinnebusch, A. G. (2016) eIF4B stimulates translation of long mRNAs with structured 5'-UTRs and low closed-loop potential but weak dependence on eIF4G, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 10464-10472, doi: 10.1073/pnas.1612398113.
74. Young, D. J., Guydosh, N. R., Zhang, F., Hinnebusch, A. G., and Green, R. (2015) Rli1/ABCE1 recycles terminating ribosomes and controls translation reinitiation in 3'-UTRs *in vivo*, *Cell*, **162**, 872-884, doi: 10.1016/j.cell.2015.07.041.
75. Tang, L., Morris, J., Wan, J., Moore, C., Fujita, Y., et al. (2017) Competition between translation initiation factor eIF5 and its mimic protein 5MP determines non-AUG initiation rate genome-wide, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 11941-11953, doi: 10.1093/nar/gkx808.
76. Sugiyama, H., Takahashi, K., Yamamoto, T., Iwasaki, M., Narita, M., et al. (2017) Nat1 promotes translation of specific proteins that induce differentiation of mouse embryonic stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 340-345, doi: 10.1073/pnas.1617234114.

**MODIFICATIONS OF THE RIBOSOME PROFILING THAT PROVIDE
NEW DATA ON THE REGULATION OF TRANSLATION****Review****D. E. Andreev^{1,2}, V. V. Smirnova¹, and I. N. Shatsky^{1*}**¹ *Lomonosov Moscow State University, A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,
119992 Moscow, Russia; e-mail: shatsky@genebee.msu.su*² *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry
of the Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia*

Ribosome profiling (riboseq) has opened the possibilities for the genome-wide studies of translation in all living organisms. This method is based on deep sequencing of mRNA fragments protected by the ribosomes from hydrolysis by ribonucleases, the so-called ribosomal footprints (RFPs). Ribosomal profiling together with RNA sequencing allows not only to identify with a reasonable accuracy translated reading frames in the transcriptome, but also to track changes in gene expression in response to various stimuli. Notably, ribosomal profiling in its classical version has certain limitations. The size of the selected mRNA fragments is 25-35 nts, while RFPs of other sizes are usually omitted from analysis. Also, ribosomal profiling "averages" the data from all ribosomes and does not allow to study specific ribosomal complexes associated with particular translation factors. However, recently developed modifications of ribosomal profiling provide answers to a number of questions. Thus, it has become possible to analyze not only elongating, but also scanning and reinitiating ribosomes, to study events associated with the collision of ribosomes during mRNA translation, to discover new ways of cotranslational assembly of multisubunit protein complexes during translation, and to selectively isolate ribosomal complexes associated with certain protein factors. New data obtained using these modified approaches provide a better understanding of the mechanisms of translation regulation and the functional roles of translational apparatus components.

Keywords: ribosome profiling, ribosome, translation, protein synthesis, scanning, mRNA, Next-Generation Sequencing

УДК 577.21

РАЗЛИЧИЯ И СХОДСТВО ПРОЦЕССОВ ТЕРМИНАЦИИ ТРАНЛЯЦИИ И СПАСЕНИЯ РИБОСОМЫ В БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ И В МИТОХОНДРИЯХ И ЦИТОПЛАЗМЕ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Обзор

© 2021 А.А. Коростелев

*RNA Therapeutics Institute, Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, UMass Medical School,
Worcester, MA, USA; e-mail: Andrei.Korostelev@umassmed.edu*

Поступила в редакцию 24.05.2021

После доработки 24.05.2021

Принята к публикации 17.06.2021

Когда рибосома встречает стоп-кодон на молекуле мРНК, она прекращает процесс трансляции, высвобождает вновь синтезированный белок и разбирается на субъединицы, чтобы инициировать процесс трансляции на новой мРНК. Терминация трансляции является высоко динамичным процессом, в котором рилизинг-факторы (RF1 и RF2 у бактерий и eRF1 • eRF3 • ГТФ у эукариот) координируют высвобождение пептида с крупномасштабными молекулярными перестройками рибосомы. Рибосомы, остановившиеся на аберрантных мРНК, освобождаются и рециклируются различными бактериальными, митохондриальными или цитоплазматическими механизмами контроля качества. Эти механизмы работают при участии факторов спасения, обладающих пептидил-тРНК гидролазной активностью (бактериальные факторы ArfA • RF2 и ArfB, митохондриальные факторы ICT1 и mtRF-R и цитоплазматический фактор Vms1), которые отличаются друг от друга и от рилизинг-факторов. Тем не менее в результате проведённых недавно структурных исследований было показано замечательное сходство между механизмами терминации трансляции и спасения рибосомы. В этом обзоре описывается, как в этих механизмах используется внутренняя динамика рибосомы, подчёркивая активную роль рибосомы на всех этапах процесса трансляции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: трансляция, терминация, рибосома, спасение.

DOI: 10.31857/S0320972521090062

ВВЕДЕНИЕ

Трансляция мРНК в белок начинается со стартового кодона (обычно кодона AUG) и заканчивается одним из трёх стоп-кодонов: UAA, UAG или UGA [1, 2]. Для своевременного биосинтеза белков, рециклизации рибосомы и инициации трансляции необходим точный и эффективный процесс терминации [3, 4]. В отличие от смысловых кодонов, которые распознаются различными аминокислот-тРНК, стоп-кодонами распознаются рилизинг-факторами: RF1 или RF2 у бактерий и aRF1/eRF1 у архей/эукариот [5–9]. Кроме того, в процессе терминации принимают участие рилизинг-факторы с ГТФазной активностью, такие как несущественный фактор RF3 у некоторых бактерий и не-

заменяемые факторы aRF3/eRF3 у архей/эукариот. Показано, что они выполняют различные функции в этих доменах жизни. Понимание подробных структурных механизмов терминации трансляции имеет большое значение в связи с фундаментальной ролью процесса терминации в биосинтезе белка, проиллюстрированной катастрофическими последствиями мутаций или других изменений структуры мРНК, которые приводят к аберрантному высвобождению. Например, большая часть генетических нарушений вызвана преждевременными стоп-кодонами, приводящими к образованию укороченных белков и деградации мРНК [10].

Кроме рилизинг-факторов, в бактериальных и эукариотических митохондриальных и цитоплазматических системах трансляции недавно были идентифицированы различные RF-подобные белки, которые могут смягчать трансляционный стресс. В их число входят механизмы спасения рибосом и контроля качества, которые способствуют рециклизации рибосом, остано-

Принятые сокращения: крио-ЭМ – криогенная электронная микроскопия; DC – центр декодирования; H69 – 23S-спираль 69; PTS – пептидил-трансферазный центр; RF – рилизинг-фактор.

вившихся на aberrантных молекулах мРНК. Последние включают укороченные мРНК и мРНК с неоптимальными (редкими) кодонами или структурными особенностями (например, вторичной структурой мРНК или сайтами связывания с белками), которые предотвращают процесс элонгации рибосом. Распознавание, высвобождение пептида и рециклинг остановленных рибосом достигается независимыми путями, включая участие ArfA и ArfB у бактерий, mtRF1a и mtRF-R в митохондриях и Dom34 и Vms1 в цитоплазме эукариот. Недавние биофизические и структурные исследования продемонстрировали ключевую роль динамики рибосомы в процессах трансляции, терминации и спасения самой рибосомы. Механика перестройки рибосом переключается с моделями, предложенными Александром Спириным для транслкации рибосом вдоль мРНК, включая крупномасштабные перестройки субъединиц рибосомы [11, 12]. Эти данные подчеркивают, что рибосома играет основную механическую роль на всех этапах трансляции, включая терминацию и спасение рибосом.

ТЕРМИНАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ У БАКТЕРИЙ И МИТОХОНДРИЙ

Рилизинг-факторы являются бифункциональными белками: они распознают стоп-кодон и катализируют гидролиз сложноэфирной связи в пептидил-тРНК. Бактериальные рилизинг-факторы RF1/RF2 независимо распознают кодоны UAA, UAG/UAA и UGA соответственно. Эти белки длиной ~350–380 а.о. включают супердомен распознавания кодонов (домены 2 и 4), который связывается с малой 30S-субъединицей рибосомы, и каталитический домен 3, который связывается с большой 50S-субъединицей рибосомы (рис. 1, a–c). Подвижный домен 1 взаимодействует с периферическим L11-выступом на 50S-субъединице (рис. 1, b–c), способствуя связыванию RF с рибосомой [13, 14]. Супердомен распознавания кодонов содержит консервативный мотив P¹⁸⁴X^T¹⁸⁶ (где X часто представлен A, V или другой короткой аминокислотой) в RF1 или мотив S²⁰⁶P^F²⁰⁸ в RF2 [15, 16], которые взаимодействуют со стоп-кодонами (для бактериальных белков и РНК приводит-

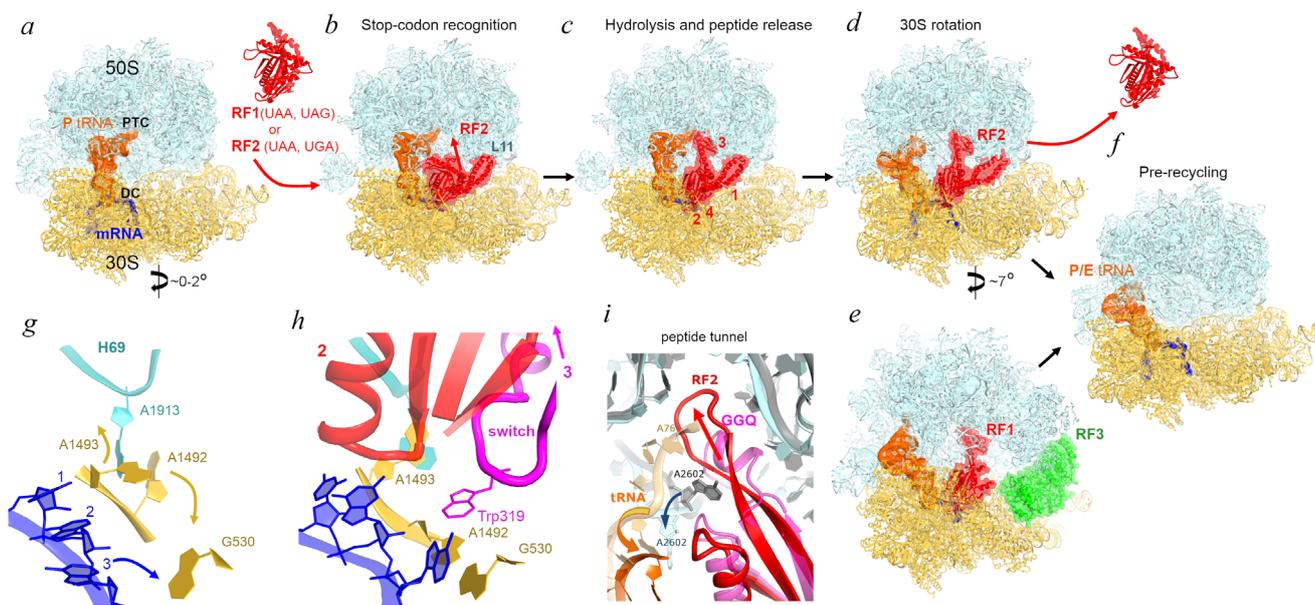


Рис. 1. Терминация трансляции у бактерий происходит вследствие крупномасштабных конформационных изменений. a–d – Крио-ЭМ-структуры, демонстрирующие перестройки рилизинг-факторов и межсубъединичное вращение бактериальной 70S-рибосомы после распознавания стоп-кодона и высвобождения пептида. Показан белок RF2 *E. coli*: панели (b и c) [51] и d [61]. Центр декодирования (DC) и пептидил-трансферазный центр (PTC) отмечены на панели (a). Кристаллическая структура свободного RF2 показана между панелями (a) и (b) [40]. Доменная организация RF1/RF2 показана арабскими цифрами на панели (c). e – Крио-ЭМ-структура RF1 и RF3 на рибосоме *E. coli* с P/E тРНК и повернутой 30S-субъединицей [58]. f – Крио-ЭМ-структура рибосомы *E. coli* до рециклинга с P/E тРНК и повернутой 30S-субъединицей после диссоциации факторов высвобождения [61]. g и h – Перемещение кодона и DC после связывания RF2 (Структура II в [61]). Стоп-кодон и DC на панели g были смоделированы на основе Структуры I в [54]. i – Перемещение RF2 в PTC [61]. Каталитическая конформация RF2 с GGQ-несущей α-спиралью показана розовым цветом, и рибосома окрашена в серый цвет. Конформация β-шпильки RF2 (красный) совпадает с перемещением A2602 и отходом тРНК (оранжевый) из PTC (сине-зеленый)

ся цифровое обозначение остатков, характерное для *Escherichia coli*, если не указано иное) [17–20]. В биохимических исследованиях и с помощью мутационного анализа были установлены другие аминокислотные остатки домена 2, имеющие важное значение для обеспечения специфичности связывания рилизинг-факторов со стоп-кодонами [21, 22].

Каталитический домен 3 содержит длинную α -спираль, заканчивающуюся универсально консервативным мотивом GGQ (рис. 1, с и 2, с), который, как было показано в ранних исследованиях, играет ключевую роль в катализе [23, 24]. Замены глицина в бактериальных и эукариотических рилизинг-факторах вызывали их инактивацию [24–26]. Напротив, замены остатков глутамина RF не влияли на каталитическую активность [25, 27, 28], за исключением мутантных форм с мотивом GGP, которые были неактивными [18, 29]. Эти исследования показывают, что уникальная конформация GGQ очень важна для проявления каталитической активности рилизинг-факторов.

Кристаллографические исследования высокого разрешения позволили получить подробную картину процесса распознавания стоп-кодонов и каталитического механизма действия рилизинг-факторов на все три стоп-кодона [17–20] (см. обзоры [30–34]). Последние достижения в области криогенной электронной микроскопии (крио-ЭМ) позволяют определять ранее недостижимые переходные состояния макромолекул с разрешением, близким к атомному. Вместе с результатами биохимических и биофизических исследований [35–38], недавние структурные исследования позволяют почти полностью реконструировать динамический механизм терминации – от начального распознавания стоп-кодона до гидролиза пептидил-тРНК и диссоциации RF.

Динамичные рилизинг-факторы имеют важное значение для правильной терминации трансляции. В клетке RF могут стохастически связываться с А-сайтом рибосомы, содержащим смысловой или стоп-кодон. Для точности терминации гидролазная функция должна быть строго координирована с распознаванием стоп-кодона. Эта координация достигается путем предотвращения вставки каталитического домена 3 в пептидил-трансферазный центр (РТС), если только супердомен распознавания кодонов не размещён в А-сайте, содержащем стоп-кодон. Кристаллические структуры и исследования в растворах показали, что свободные рилизинг-факторы принимают компактную конформацию [39–42], при которой каталитический домен упакован в домен распознавания кодо-

на (рис. 1, а и b). Однако в ранних структурных исследованиях было показано, что в рибосоме RF находятся в раздвинутой («открытой») конформации (рис. 1, с), в которой RF1 или RF2 в А-сайте рибосомы соединяют 30S- и 50S-субъединицы [17–20, 43, 44]. На основании этих результатов была предложена привлекательная гипотеза о том, что рилизинг-факторы выбирают А-сайт рибосомы, находясь в компактной конформации, при которой мотив GGQ располагается далеко от РТС. Было высказано предположение, что «открытие» рилизинг-фактора происходит после распознавания стоп-кодона [17, 43, 45–47]. Структурные доказательства такого перехода были получены лишь недавно. Кристаллографические исследования со сверхточным мутантом RF1 и антибиотиком бластицидином S (BlaS) зафиксировали кодон-распознающий супердомен в А-сайте, в то время как каталитический домен был в неупорядоченном состоянии в межсубъединичном пространстве в связи с динамическими перестройками рилизинг-факторов на рибосоме [48]. Последующие крио-ЭМ-исследования визуализировали компактный RF2 на рибосоме, связанный с альтернативным рилизинг-фактором А (ArfA; [49]), и мутантом ArfA [50], что подчёркивает сродство компактизованных рилизинг-факторов к рибосоме (рис. 2, а). ArfA помогает RF2 распознавать рибосомы без стоп-кодонов (обсуждается ниже), поэтому структурная динамика RF на терминирующей рибосоме оставалась неясной до недавнего исследования крио-ЭМ в реальном времени [51]. В этом исследовании удалось получить как RF1, так и RF2 в компактной неактивной конформации в ранние моменты реакции терминации (рис. 1, b). Они перестроились в каталитически активную открытую конформацию в более поздние моменты времени (рис. 1, с; [51]). Открытие RF сопряжено с локальной перестройкой DC рибосомы (т.е., А-сайта 30S-субъединицы) и РТС на 50S-субъединице, что совместно обеспечивает высокую точность терминации трансляции.

Локальные перестройки в центре декодирования и пептидил-трансферазном центре. DC образован универсально консервативными остатками малой рибосомной РНК (G530, A1493 и A1493 16S рРНК *E. coli*), которые определяют точность декодирования мРНК. Во время элонгации эти нуклеотиды стабилизируют спаривание оснований Уотсона–Крика между кодоном мРНК и антикодоном тРНК и обеспечивают точность элонгации [52–54]. Эти нуклеотиды также необходимы во время терминации, поскольку они способствуют открытию рилизинг-фактора для катализа высвобождения пепти-

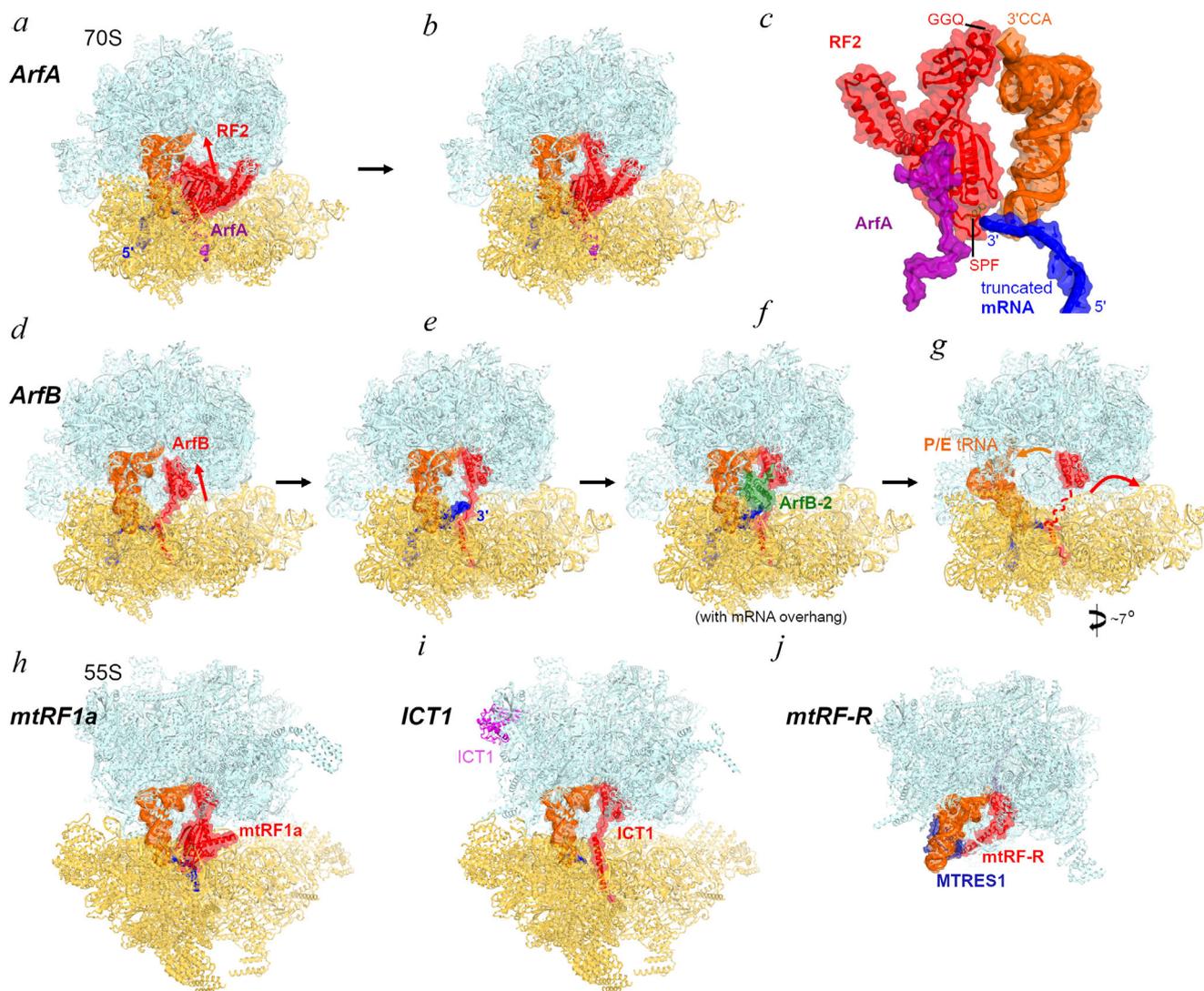


Рис. 2. Механизмы спасения и высвобождения рибосом с участием бактериальных факторов ArfA и ArfB и митохондриальных факторов mtRF1a, ICT1 и mtRF-R. *a* и *b* – Крио-ЭМ-структуры рибосом *E. coli* с укороченной мРНК, ArfA и компактным (*a*) или развёрнутым (*b*) RF2 [49]. *c* – Крупный план взаимодействия между ArfA, RF2, мРНК и тРНК в Р-сайте рибосомы. *d–g* – Крио-ЭМ-структуры рибосом *E. coli* с укороченной мРНК (с выступом длиной 0 или 9 нуклеотидов после кодона Р-сайта) и ArfB [110, 111]. *h* – Крио-ЭМ-структура терминирующего комплекса 55S митохондрий свиньи с mtRF1a, связанным со стоп-кодоном [87], очень напоминает бактериальные терминальные комплексы с RF1. *i* – Крио-ЭМ-структура митохондриального комплекса спасения 55S с ICT1 [87] очень напоминает бактериальный комплекс 70S с ArfB [сравните с панелью (*e*)]. *j* – Крио-ЭМ-структура большой митохондриальной субъединицы, связанной с фактором спасения человека mtRF-R и вспомогательным фактором MTRES1 [98]

да (рис. 1, *g* и *h*; [17]). В частности, «терминирующая» конформация DC может вмещать гибкий линкерный участок между кодон-распознающим и каталитическим доменами RF (рис. 1, *h*), который называется петлёй переключения (а.о. ~290–305 в RF1 и а.о. ~310–325 в RF2) и обладает гибкостью в компактизованном рилизинг-факторе [51]. Распознавание стоп-кодона RF приводит к стекингу третьего нуклеотида стоп-кодона на G530 и перемещению A1492 и A1493 в специфичную для терминации конформацию (рис. 1, *g* и *h*). Упаковка петли пере-

ключения (с Trp319 в RF2) против A1492 и A1493 направляет домен 3 в РТС, приводя к активации развёрнутого RF (рис. 1, *h*). В соответствии с основной ролью переключающей петли, её мутации нарушают динамику открытия RF и изменяют точность процесса терминации [19, 48].

В пептидил-трансферазном центре мотив GGQ располагается таким образом, чтобы катализировать гидролиз сложноэфирной связи, связывающей образующийся пептид с тРНК в Р-сайте [17]. Кристаллические структуры, выполненные при высоком разрешении, показали,

что A2602, необходимый для эффективности терминации [55–57], содействует докингу мотива GGQ в РТС за счёт стекинга на консервативном остатке Arg256 (RF1). Мотив GGQ образует короткую α -спираль (рис. 1, *i*), в которой амид основной цепи глутамин расположен рядом с рибозой концевого нуклеотида Р-тРНК A76. NH-группа расположена таким образом, чтобы стабилизировать промежуточное переходное состояние и уходящую группу [17], в соответствии с основной каталитической ролью глутаминового остова [29].

После гидролиза пептидил-тРНК и пептид, и рилизинг-фактор должны диссоциировать из рибосомы, чтобы позволить ей разделиться на субъединицы и начать новый раунд трансляции. Два крио-ЭМ-исследования сообщили о нескольких структурах, которые предполагают конформационные перестройки, приводящие к диссоциации RF1 и RF2. Был визуализирован комплекс рибосомы со связанным RF1 с использованием Api137 [58], который связывается с рибосомным туннелем и задерживает RF1 на рибосоме [59]. Этот комплекс образовывался в присутствии ГТФазы RF3, которая стимулирует диссоциацию RF1 [35, 60]. В другом исследовании были получены структуры комплекса со связанным RF2 и без RF3, что соответствует независимой от RF3 диссоциацией RF2 [35]. Структуры визуализировали ретракцию деацилированного 3'-конца тРНК ССА из РТС, связанную с поворотом A2602 из его GGQ-координирующего положения (рис. 1, *i*). GGQ-несущий мотив RF2 был перемещён в длинную β -шпильку, которая простиралась в рибосомный туннель, как если бы закупоривала РТС (рис. 1, *i*). Это говорит о том, что верхушка каталитического домена может перестраиваться таким образом, чтобы смещать диффузию вновь формируемого белка в направлении выхода из туннеля, облегчая высвобождение белка из рибосомы.

Межсубъединичное вращение после высвобождения пептида сопряжено с диссоциацией RF. Во время трансляции рибосома подвергается ряду межсубъединичных перестроек. На стадии элонгации тРНК и мРНК перемещаются внутри рибосомы, поскольку малая субъединица спонтанно поворачивается на $\sim 10^\circ$ и связывает ГТФазную транслоказу EF-G в бактериях или eEF2 у эукариот [33, 62–66]. Напротив, крупномасштабные перестройки рибосомы не считались частью механизма терминации. Действительно, исследования FRET и рентгеновская кристаллография показали, что RF связывают и стабилизируют не повёрнутую рибосому [35–37, 67] как в пред-реакционных [68], так и

в пост-реакционных состояниях [17–20]. Однако недавние биофизические наблюдения показали, что взаимодействие рилизинг-факторов с рибосомой ассоциировано с крупномасштабной динамикой рибосомы [35]. Последующие крио-ЭМ-исследования визуализировали RF1 [58] и RF2 [61], связанные с рибосомой в различных вращательных состояниях, отличных от ранее определенных кристаллических структур. Были получены изображения того, как перестройки рибосом облегчают диссоциацию RF из рибосомы.

После гидролиза пептидил-тРНК рибосома содержит деацилированную тРНК в Р-сайте и рилизинг-фактор в А-сайте (рис. 1, *c*). Благодаря пониженному сродству деацил-тРНК к Р-сайту на 50S-субъединице (в сравнении со сродством пептидил-тРНК) и повышенному сродству к Е-сайту на 50S-субъединице, тРНК может принимать гибридное состояние Р/Е, в котором акцепторное плечо переносится на большую субъединицу. Исследования FRET и крио-ЭМ показали, что деацил-тРНК может спонтанно колебаться на развёрнутой рибосоме между классическим Р/Р- и гибридным Р/Е-состояниями, совпадая с не повёрнутой и повёрнутой конформациями рибосомы соответственно [37, 69–74]. Подобные колебания могут происходить в присутствии RF [58, 61]. Постепенное вращение малой субъединицы связано с движением каталитического домена рилизинг-фактора из РТС, в то время как домен распознавания кодонов остаётся прикреплённым к DC [61]. При повороте малой субъединицы примерно на 7° наблюдается равновесие структур со связанным RF2 и без него, это позволяет предположить, что RF2 диссоциирует в основном из повёрнутой конформации рибосомы (рис. 1, *d* и *f*). Точно так же RF1 диссоциирует в присутствии ГТФазы RF3 (рис. 1, *e*), которая стабилизирует конформацию повёрнутой рибосомы [58, 75–78]. Примечательно, что RF3 не консервативен у бактерий [79], и он незаменим для роста *E. coli* [80, 81]. Это означает, что RF1 может осуществлять терминацию и диссоциировать без RF3, и что диссоциация как RF1, так и RF2 управляется перестройками рибосом. Дестабилизация RF на малой субъединице сопряжена с разборкой центрального межсубъединичного мостика, образованного 23S-спиралью 69 (H69) и декодирующим центром (рис. 1, *h*). В повёрнутой рибосоме без RF2 H69 отделяется от DC и прикрепляется к 50S-субъединице вблизи A2602, указывая тем самым, что реструктуризация рибосомы совпадает с локальными перестройками РТС после высвобождения пептида [61]. В этом положении H69 будет конфлик-

товать с RF2 в соответствии с состоянием после диссоциации RF2. В случае отделения H69 от малой субъединицы рибосома становится субстратом, с которым связывается фактор рециклинга рибосомы RRF [82, 83], расщепляющий рибосому на субъединицы с помощью EF-G.

Митохондрии кодируют два RF-подобных белка, mtRF1a и mtRF1, но только для mtRF1a было показано, что он катализирует процесс терминации трансляции [84]. Как и бактериальный RF1, mtRF1a человека (HMRF1L) содержит мотив P²⁰⁶KT²⁰⁸ и катализирует высвобождение пептида на стоп-кодонах UAA и UAG [85, 86] (для эукариотических белков используются номера аминокислотных остатков в белках человека, если не указано иное). Недавняя крио-ЭМ-работа визуализировала комплекс терминации митохондрий свиньи с mtRF1a (рис. 2, *h*; [87]). Взаимодействия домена распознавания кодонов, петли переключения и домена 3 с рибосомой демонстрируют, что структурные механизмы распознавания кодонов и терминации с помощью mtRF1a сходны с механизмами действия RF1. Хотя диссоциацию mtRF1a ещё предстоит визуализировать, сохранение межсубъединичных перестроек в миторибосомах [88, 89] указывает на то, что диссоциация mtRF1a при отсутствии митохондриального ортолога RF3 может быть сходна с диссоциацией RF2.

Напротив, остаётся неясной функция mtRF1 [84]. Этот биоинформатически идентифицированный гомолог RF1, состоящий из ~445 а.о. [90], имеет *N*-концевое удлинение домена 1 (~70 а.о.), которое может влиять на связывание с рибосомой. Более того, супердомен распознавания кодонов существенно отличается от такового в RF1 и содержит мотив P²⁶⁴EVGLS²⁶⁹ и другие расширения, которые, вероятно, несовместимы с кодонами мРНК в А-сайте [91, 92]. Было высказано предположение, что mtRF1 распознает кодоны аргинина (AGA и AGG), которые, как полагали, были переназначены как кодоны терминации в митохондриях [93]. Однако не удалось обнаружить связывающую или каталитическую активность mtRF1 на рибосомах с мРНК, содержащих стоп-кодона или кодоны аргинина. В результате этот белок не может компенсировать делецию гомолога функционального RF у дрожжей [85–87]. В последующей работе было показано, что терминация на кодонах аргинина в митохондриях человека происходит вследствие отсутствия тРНК, способных декодировать эти кодоны, приводящие к сдвигу рамки –1, который позиционирует кодон UAG в А-сайте для канонической терминации с помощью

mtRF1a [94]. Поскольку mtRF1 несёт консервативный каталитический домен с мотивом GGQ, mtRF1 может участвовать в механизме контроля качества, который распознает специфическую конформацию А-сайта рибосомы [92] и/или требует дополнительных факторов, которые ещё предстоит определить.

СПАСЕНИЕ ОСТАНОВИВШИХСЯ РИБОСОМ С ПОМОЩЬЮ МЕХАНИЗМОВ ТЕРМИНАЦИИ У БАКТЕРИЙ И МИТОХОНДРИЙ

Рибосомы останавливаются на молекулах мРНК, которые либо укорочены, не содержат стоп-кодон, либо же останавливают рибосомы с помощью других механизмов [95]. Недавние исследования выявили системы спасения рибосомы, которые высвобождают пептиды из остановившихся рибосом. У бактерий альтернативные факторы спасения А (ArfA) и В (ArfB) представляют собой независимые молекулярные механизмы, которые дополняют транс-трансляционную систему спасения [95–97]. Недавно в структурных исследованиях были визуализированы структурные механизмы этих факторов спасения. В митохондриях две системы спасения рибосомы включают RF-подобные белки, которые недавно были визуализированы с помощью крио-ЭМ: ICT1, который напоминает бактериальный ArfB и действует на миторибосомы, несущие укороченные молекулы мРНК [87], и mtRF-R (кодируемый *c12orf65*), который кооперирует с MTRES1 (кодируемый *cborf203*) в распознавании большой митохондриальной субъединицы с остановившейся пептидил-тРНК [98].

Бактериальный альтернативный фактор спасения А (ArfA). ArfA (ранее называвшийся YhdL) — это небольшой белок, состоящий из 70 а.о., который рекрутирует RF2 для высвобождения из рибосом пептидов, остановившихся на укороченных мРНК, не содержащих стоп-кодон (рис. 2, *a–c*; [99–101]). Пять крио-ЭМ-исследований продемонстрировали, что положительно заряженный С-концевой хвост ArfA связывается с мРНК-туннелем, образованным преимущественно рибосомной 16S РНК, таким образом «чувствуя» рибосомы, туннель которых свободен из-за укороченной молекулы мРНК [49, 50, 102–104]. *N*-Концевая часть белка сворачивается с образованием компактного домена вблизи декодирующего центра и взаимодействует с доменом распознавания кодонов RF2, хотя для этого взаимодействия не требуется консервативный мотив SPF белка RF2 (рис. 2, *c*). Во всех

этих исследованиях ArfA был связан с RF2 в открытой, каталитически компетентной конформации, сходной с конформацией рилизинг-факторов на стоп-кодоне (рис. 2, *b*). В этой конформации петля переключения RF2 стабилизируется гидрофобными взаимодействиями остатка Trp319 с ArfA. Кроме того, в двух исследованиях был обнаружен компактный RF2 (рис. 2, *a*), домен распознавания кодонов которого находится примерно на 5 Å дальше от А-сайта [49, 50]. Хотя взаимодействия RF2 с ArfA отличаются от взаимодействий RF2 со стоп-кодоном, полученные структуры подчёркивают сходство механизма активации RF через открытие RF2 после распознавания специфического сигнала в DC. Список ArfA-подобных факторов спасения продолжает расти, выявляя родовые особенности механизмов контроля качества [105]. Например, если BrfA *Bacillus subtilis* зависит от RF2 и подобен ArfA [106], то ArfT *Francisella tularensis* может рекрутировать как RF1, так и RF2 для высвобождения пептидов из остановленных рибосом [107, 108].

Бактериальный альтернативный фактор спасения В (ArfВ). ArfВ (ранее называвшийся YaeJ) — это рилизинг-фактор (~140 а.о.), который содержит как С-концевой хвост, связывающийся с рибосомным туннелем, так и RF-подобный каталитический домен, несущий мотив GGQ (рис. 2, *d–g*). Биохимические исследования показали, что ArfВ может спасти не только рибосомы с мРНК, укороченной сразу после кодона Р-сайта, но также и рибосомы с большими удлинениями мРНК [109], хотя каталитическая активность ArfВ снижается по мере увеличения длины мРНК и может зависеть от последовательности выступа мРНК [110, 111]. Кристаллографическая структура показала, что положительно заряженный хвост образует α -спираль в свободном туннеле, тогда как каталитический N-концевой домен стыкуется с РТС подобно тому, как это происходит у канонических RF [112]. Связывание ArfВ с не повернутой рибосомой напоминает связывание рилизинг-факторов, что соответствует распознаванию субстрата с остановленной пептидил-тРНК. Поскольку туннель для мРНК не может быть занят одновременно ArfВ и более длинным выступом мРНК, при исследованиях крио-ЭМ была получена структура 70S-рибосомы с ArfВ и мРНК, выступающей на 2 или 9 нуклеотидов за пределы Р-сайта [110, 111]. Показано, что нуклеотиды декодирующего центра (A1492 и A1493) взаимодействуют с ArfВ и мРНК, обеспечивая аккомодацию различных выступов мРНК посредством различных конформаций [111]. Эти результаты подчёркивают структурную пластичность DC

рибосомы и позволяют предположить, что другие пути спасения, такие как ArfA у бактерий и Dom34 у эукариот (обсуждается ниже), могут обнаруживать рибосомы с более широким диапазоном выступов и/или последовательностей мРНК.

В комплексах с мРНК, выступающей за пределы кодона Р-сайта, α -спиральный хвост ArfВ связывается в туннеле с мРНК, в то время как +9-выступ мРНК удалён из туннеля и либо не упорядочен в межсубъединичном пространстве [110], либо стабилизируется второй копией белка ArfВ (рис. 2, *e* и *f*) [111]. Эти наблюдения указывают на то, что ArfВ может обнаруживать остановившиеся рибосомы разными путями в зависимости от последовательности мРНК или структурной динамики, допускающей экскурсы мРНК за пределы туннеля. Кроме того, классификация данных крио-ЭМ выявила набор структур с каталитическим N-концевым доменом ArfВ внутри или вне РТС (рис. 2, *d* и *e*) [111]. Эта динамика согласуется с биохимическими наблюдениями и указывает на то, что механизм распознавания субстрата напоминает механизм канонических рилизинг-факторов, которые сначала распознают DC на малой субъединице, а затем перегруппировываются, чтобы закрепить каталитический домен рядом с расщепляемой связью в пептидил-тРНК.

С помощью крио-ЭМ на рибосомах были идентифицированы ArfВ с различной степенью межсубъединичного вращения в сочетании с образованием гибридного состояния Р/Е деацелированной тРНК (рис. 2, *f–g*). Было показано, что степень связывания димера ArfВ понижается по мере увеличения вращения 30S-субъединицы. Сильно повернутые рибосомы обнаруживают равновесие между частицами с мономерным ArfВ-связанным и вакантным А-сайтом (рис. 2, *g*) [111]. Спираль 69 свободных рибосом диссоциирует из DC и, скорее всего, будет мешать связыванию ArfВ с большой субъединицей. Эти результаты подтверждают, что ArfВ, подобно каноническим RF, диссоциирует после спонтанного межсубъединичного вращения и нарушения мостика H69–DC. Хотя компоненты параллельного пути спасения с участием ArfA и RF2 были визуализированы только на не повернутой рибосоме, консервативная рибосомная динамика комплексов, связанных с RF и ArfВ, предполагает, что аналогичный механизм может быть использован для высвобождения ArfA и RF2 и подготовки рибосомы к рециклингу.

Митохондриальный фактор спасения ICT1 (~200 а.о.), близкий гомолог бактериального ArfВ, катализирует высвобождение пептидов из остановившихся рибосом [113]. ICT1 («imma-

ture colon carcinoma transcript-1», также обозначаемый как MRPL58) необходим для роста клеток [113–115], и нарушение регуляции его синтеза связано с туморогенезом [116]. Интересно, что одна молекула ICT1 связывается с центральным выступом митохондриальной рибосомы [117], но эта позиция далека от А-сайта, указывая на то, что эта молекула не катализирует спасение рибосомы (рис. 2, *i*). Центральным выступом большой субъединицы взаимодействует с малой субъединицей и с молекулами тРНК, что делает его структуру критичной для правильной сборки рибосом и их функционирования во всех царствах жизни [118–122]. Хотя архитектурная функция ICT1 может частично вносить вклад в регуляцию митохондриальной трансляции, именно каталитическая функция другой – временно связанной – молекулы ICT1 важна для митохондриальной трансляции. Значимость каталитической функции была продемонстрирована с использованием мутационного анализа, показавшего прекращение роста клеток после изменения мотива GGQ в ICT1 [113].

В недавно созданной крио-ЭМ-структуре связанного с ICT1 спасательного комплекса [87] положительно заряженная С-концевая спираль ICT1 обнаруживается в мРНК-туннеле (рис. 2, *i*). Каталитический N-концевой домен стыкуется с РТС аналогично ArgV. Положение мотива GGQ поддерживает каталитическую роль остова глутамин, аналогичную роли RF. Крио-ЭМ-исследование было выполнено с использованием укороченной мРНК в Р-сайте. Остаётся визуализировать: если/как ICT1 распознает рибосомы с более длинными выступами мРНК [123] и отражает ли склонность изолированного ICT1 к димеризации [124] механистический сценарий, аналогичный сценарию димерного ArgV, который может стабилизировать длинные выступы мРНК [111].

Митохондриальный рилизинг-фактор mtRF-R (~170 а.о.) представляет собой митохондриальную пептидил-тРНК гидролазу, которая необходима для жизнеспособности клеток [125]. Мутации или дисрегуляция этого белка нарушают трансляцию в митохондриях и ассоциируются с заболеваниями [126–128]. Недавнее исследование крио-ЭМ визуализировало человеческий mtRF-R с пептидил-тРНК на большой митохондриальной субъединице рибосомы [98]. Связыванию mtRF-R в А-сайте способствует MTRES1, закреплённый со стеблем антикодона тРНК (рис. 2, *j*). Как ожидалось, каталитический домен mtRF-R входит в РТС и выдвигает мотив GGQ вблизи концевой нуклеотида Р-тРНК. Удивительно, но пептидил-тРНК остаётся

интактной, вероятно, из-за уникальной конформации концевой остатка лизина образующегося пептида, который, как было показано, является сигнатурой остановившихся рибосом [129, 130]. Хотя mtRF-R вместе с MTRES1 может гидролизовать пептидил-тРНК в модельных 50S-комплексах *E. coli in vitro* [98], ещё предстоит показать, спасает ли и как mtRF-R остановленные митохондриальные субъединицы с лизил-тРНК. Диссоциация mtRF-R и MTRES1 из большой субъединицы, необходимая для рециклинга рибосомы, вероятно, сопряжена с диссоциацией деацил-тРНК после гидролиза пептидил-тРНК. Не исключено, что в разборке этого спасательного комплекса помогают дополнительные факторы. Будущие исследования определяют субстратную специфичность mtRF-R и механизм диссоциации mtRF-R/MTRES1.

ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ ТЕРМИНАЦИЯ И СПАСЕНИЕ РИБОСОМЫ У ЭУКАРИОТ

Терминация трансляции с участием eRF1 • eRF3. Эукариотический фактор eRF1 (~440 а.о.) структурно отличается от бактериальных рилизинг-факторов, и его каталитическая функция зависит от ГТФазной активности eRF3 [23, 131–133]. Домен распознавания кодонов eRF1 (домен N) сложен иначе, чем у бактериальных RF, и несёт консервативные участки аминокислот, такие как мотив T⁵⁸ASNIKS⁶⁴, который необходим для распознавания всех трёх стоп-кодонов [134–136]. Кроме того, в отличие от бактериальных рилизинг-факторов, eRF1 распознает тетрауклеотид, включающий 3 нуклеотида стоп-кодона и последующий нуклеотид [137–139]. Профилирование рибосом и другие исследования показали, что стоп-кодон, за которым следует пиримидин, приводит к интенсивному считыванию аннотированного стоп-кодона [140] в соответствии с более низкой каталитической активностью eRF1 на тетрауклеотиде с концевым пиримидином [138]. Эта зависимость способствует переназначению стоп-кодонов в смысловые кодоны у инфузорий, хотя «четвёртый» нуклеотид не является исключительной детерминантой переназначения [141–143]. Дополнительные характеристики мРНК, такие как последовательность и структура вокруг стоп-кодона и ниже него, играют роль в эффективности терминации эукариот [144–147].

Несмотря на различия между эукариотическими и бактериальными рилизинг-факторами, эукариотическая терминация сходна с бактери-

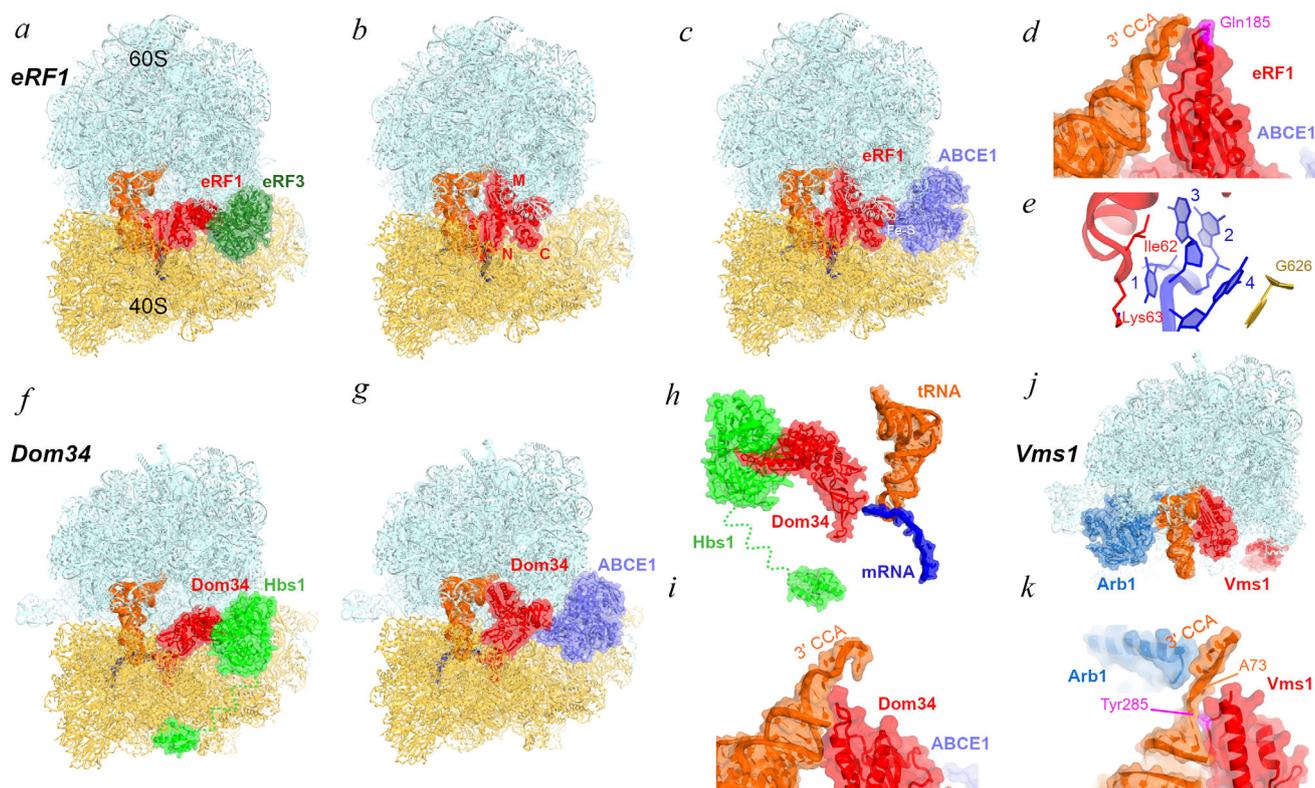


Рис. 3. Терминация трансляции эукариот и механизмы спасения цитоплазматических рибосом. *a–c* – Перестройка рилизинг-фактора eRF1 на 80S-рибосоме со стоп-кодоном после гидролиза ГТФ на eRF3 (*a–b*), и взаимодействие с фактором рециклинга ABCE1 (*c*; Rli1 у дрожжей). *d* – Взаимодействие каталитической конформации eRF1 с тРНК в Р-сайте [137]. *e* – Распознавание 4-нуклеотидного стоп-сигнала eRF1 происходит при участии аминокислотных остатков мотива TASNICKS (показаны Ile62 и Lys63) и G626 18S рРНК [137]. *f* и *g* – Перестройка Pelota (Dom34 у дрожжей) на 80S-рибосоме с укороченной мРНК после гидролиза ГТФ на Hbs1 [163] и связывания ABCE1 [164]. *h* – Распознавание укороченной мРНК белком Dom34 [163]. *i* – Взаимодействие открытой конформации Dom34 с тРНК в Р-сайте [164]. *j* – Спасательный 60S-комплекс с пептидил-тРНК гидролазой Vms1 и Arb1 [165]. *k* – Взаимодействие Vms1 и Arb1 с тРНК

альной тем, что её точность контролируется крупномасштабными конформационными изменениями белка eRF1. Крио-ЭМ-исследования показали eRF1 на рибосоме в трёх функциональных состояниях (рис. 3, *a–c*): с eRF3 (с компактным eRF1, неактивным в высвобождении пептида) [148–150], без eRF3 (с удлинённым eRF1, активированным для высвобождения пептида) [139, 151] и с АТФ-связывающим касетным белком ABCE1 (Rli1 в дрожжах) [137, 148, 152], фактором рециклинга, который разбирает рибосомы на субъединицы [153–155]. Эти структуры в сочетании с биохимическими и биофизическими данными позволяют реконструировать большинство этапов терминации у эукариот. После связывания eRF1 • eRF3 • ГТФ со стоп-кодоном А-сайта рибосомы [156] (рис. 3, *a*) гидролиз ГТФ высвобождает eRF3 и приводит к встраиванию каталитического домена М eRF1 с мотивом GGQ в РТС (рис. 3, *b* и *d*). Гидролиз ГТФ катализируется сарцин-рициновой петлёй большой субъединицы, где eRF3

связывается аналогично другим трансляционным ГТФазам, таким как факторы элонгации EF-Tu и eEF1A. Аминокислотные остатки распознавания кодонов eRF1 взаимодействуют со всеми четырьмя нуклеотидами сигнала терминации на мРНК, которая принимает конформацию U-поворота (рис. 3, *e*), приводящую к перемещению мРНК в рибосомный туннель [157]. Интересно, что несмотря на дивергенцию структуры и последовательности от бактериальной терминации (рис. 1, *c*), терминация эукариот и бактерий имеет сходные аспекты распознавания стоп-кодона, такие как распознавание пурина в положении 3 (R3) консервативными остатками Thr58 и Ile62 TASNICKS-мотива eRF1 (рис. 3, *e*; [137]) и Thr198 и Ile196 белка RF1 *E. coli* [158]. Кроме того, последний пурин в сигнале терминации (R4 у эукариот или R3 у бактерий) стабилизируется с нуклеотидом G626 (G530 у *E. coli*) декодирующего центра в соответствии с предпочтением пурина перед пиримидином в этом положении (рис. 1, *h* и 3, *e*).

В открытой каталитической конформации С-домен eRF1, который связывает N- и M-домены, может взаимодействовать с Fe-S-доме-ном ABCE1 и инициировать рециклинг рибосо-мы (рис. 3, с; [148, 152]). ABCE1, конформа-ционная динамика которого контролируется дву-мя сайтами связывания АТФ [159] и который обладает сродством как к 80S-рибосоме, так и к 40S-субъединице [160–162] помогает в расщеп-лении посттерминационной рибосомы через промежуточные состояния диссоциации eRF1. Эти состояния необходимо будет визуализиро-вать.

Спасение остановившихся рибосом с помощью Dom34 • Hbs1 и Vms1. Хотя эукариотических аналогов ArgA или ArgB пока не выявлено, было обнаружено несколько механизмов контроля качества, которые напоминают эукариотическую систему терминации [166]. Dom34 (Pelota у млекопитающих) и ГТФаза Hbs1 образуют гете-родимер, который спасает рибосомы, остано-вившиеся на укороченных мРНК, структуриро-ванные мРНК или 3'-UTR мРНК [167–170]. Dom34 и Hbs1 очень похожи на eRF1 и eRF3 со-ответственно (рис. 3, f и g). Однако у Dom34 от-сутствует каталитический мотив GGQ, поэтому он не гидролизует пептидил-тРНК, а вместо этого способствует диссоциации субъеди-ниц [170]. Крио-ЭМ-структуры показали, что связывание Dom34 и Hbs1 с рибосомой анало-гично связыванию eRF1 и eRF3 [148, 163, 171]. ГТФазный домен Hbs1 стыкуется с сарцин-ри-циновой петлёй, в то время как длинный N-кон-цевой хвост Hbs1 достигает туннеля входа мРНК (рис. 3, f и h), принимая участие в распоз-навании остановившихся мРНК-субстратов [163, 171]. β-Шпилька Dom34 входит в деко-дирующий центр, отдаленно напоминая бакте-риальные факторы спасения, которые связыва-ются в свободном мРНК-туннеле (рис. 3, h). Сравнение структуры рибосомы, связанной с тРНК, eRF1 и Dom34, выявило различную кон-формацию DC [148], подчёркивая пластичность эукариотического DC, напоминающую пла-стичность бактериальных рибосом [111]. Более того, Dom34 может быть связан в присутствии более длинных мРНК, включая поли-А-хвост, благодаря перенаправлению выступа мРНК в межсубъединичное пространство [148]. Это на-поминает комплексы спасения бактерий с ArgB [110, 111] и объясняет, как Dom34 может распознавать ряд субстратов, не ограничиваясь мРНК, укороченными после кодона Р-сайта. После открытия Dom34 (рис. 3, g) M-домен связывает ножку акцепторного плеча тРНК, чтобы способствовать вытеснению тРНК из ри-босомы (рис. 3, i). Аналогично канонической

терминации, разборка связанных с Dom34 ри-босом происходит с участием ABCE1 [172], ко-торый взаимодействует с Dom34 после диссоци-ации Hbs1 (рис. 3, g; [148, 164]). Будущие иссле-дования приведут к пониманию подробностей механизмов разборки рибосомы после канони-ческой терминации и связывания Dom34, кото-рые, вероятно, происходят в результате меж- и внутрисубъединичных структурных перестроек.

Пептидил-тРНК, связанная с большой 60S-субъединицей в результате действия механизмов контроля качества рибосомы, разделяется таки-ми механизмами, как добавление С-концевых аланил-треониновых повторов (CAT-хвост) к пептиду с помощью Rqc2, и его убиквитиниро-вание с помощью Ltn1 (Листерин у млекопита-ющих [173]) и расщепление пептидил-тРНК. Белок Vms1 (ANKZF1 у млекопитающих) пред-ставляет собой большую (~600–750 а.о.) пепти-дил-тРНК гидролазу, которая катализирует дис-социацию комплексов 60S • пептидил-тРНК [174, 175]. Последовательность его ката-литического домена напоминает последователь-ность eRF1 и содержит мотив GXQ (где X – это Ser294 у *Saccharomyces cerevisiae*) с функцио-нально важным остатком глутамина [165, 174, 175]. Несмотря на это сходство и на некоторое сходство с митохондриальным mtRF-R [98], Vms1 не гидролизует сложноэфирную связь в пептидил-тРНК. Вместо этого Vms1 расщепляет фосфодиэфирную связь между нуклеотидами 73 и 74 в тРНК, отделяя ССА-пептид от остальной тРНК [176, 177]. Фрагмент тРНК подвергается репарации с помощью ELAC1 и ССА-добавляю-щего фермента TRNT1 [176, 178]. Крио-ЭМ ви-зуализировала Vms1, связанный с 60S-субъеди-ницей, с АТФазой Arb1 ABCF-типа вблизи тРНК (рис. 3, j) [165]. Arb1, вероятно, способ-ствует позиционированию субстрата пептидил-тРНК, тем самым повышая эффективность ре-акции [165]. Каталитический домен Vms1 нахо-дится рядом с тРНК (рис. 3, k), подобно M-до-мену Dom34 (рис. 3, i). Петля GSQ не упорядо-чена вблизи ССА-конца тРНК. Консерватив-ный соседний остаток Tyr285 образует стэкинг-взаимодействие с нуклеотидом 72 молекулы тРНК, вытесняя нуклеотид 73 и экспонируя подлежащую расщеплению фосфодиэфирную связь для гидролиза (рис. 3, k). Vms1 охватывает большую площадь на межсубъединичном ин-терфейсе 60S-субъединицы в соответствии с ролью Vms1 в координации гидролиза пепти-дил-тРНК и деградации аномального пептида. Домены типа анкириновый повтор и спирали-зованная спираль (coiled-coil) направлены на выход из рибосомного туннеля, где VIM-домен, вероятно, способствует Cdc48-опосредованной

экстракции и клиренсу пептида протеасомой [179–181]. Будущие исследования позволят получить подробности того, как Vms1 кооперирует с другими белками в диссоциации ССА-пептида и фрагмента тРНК из 60S-субъединицы, позволяя рециркулировать последнюю для трансляции новой мРНК.

ВЫВОДЫ

Недавние исследования раскрыли многие детали механизмов терминации трансляции и спасения рибосомы во всех царствах жизни. Они продемонстрировали разнообразие сценариев высвобождения пептидов, катализируемых белками с различной архитектурой. Некоторые аспекты этих сценариев ещё предстоит визуализировать, однако ясно, что распознавание и принятие решения относительно терминации и судьбы остановившихся комплексов рибосомы

сильно зависит от её конформации и структурных перестроек, превращающих рибосому в активного участника всех этапов процесса трансляции и контроля качества образующейся молекулы белка.

Благодарности. Я благодарен Анне Лавлэнд и Даррилу Конте мл. за комментарии к данной статье.

Финансирование. Данная работа выполнена при финансовой поддержке Фонда кистозного фиброза (грант № 670773) и Национального Института Здоровья (грант № R35 GM127094).

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов в финансовой или иной сфере.

Соблюдение этических норм. В настоящей статье не содержится описание исследований с участием людей или животных, выполненных автором.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Brenner, S., Barnett, L., Katz, E. R., and Crick, F. H. (1967) UGA: a third nonsense triplet in the genetic code, *Nature*, **213**, 449-450.
- Brenner, S., Stretton, A. O., and Kaplan, S. (1965) Genetic code: the “nonsense” triplets for chain termination and their suppression, *Nature*, **206**, 994-998.
- Spirin, A. S. (1999) Termination of translation, in *Ribosomes. Cellular Organelles*, Springer, Boston, MA, pp. 261-270.
- Sogorin, E. A., Agalarov, S., and Spirin, A. S. (2016) Interpolysomal coupling of termination and initiation during translation in eukaryotic cell-free system, *Sci. Rep.*, **6**, 24518, doi: 10.1038/srep24518.
- Tompkins, R. K., Scolnick, E. M., and Caskey, C. T. (1970) Peptide chain termination. VII. The ribosomal and release factor requirements for peptide release, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **65**, 702-708.
- Scolnick, E., Tompkins, R., Caskey, T., and Nirenberg, M. (1968) Release factors differing in specificity for terminator codons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **61**, 768-774.
- Capecchi, M. R. (1967) Polypeptide chain termination in vitro: isolation of a release factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **58**, 1144-1151.
- Capecchi, M. R. (1967) A rapid assay for polypeptide chain termination, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 773-778.
- Nakamura, Y., Ito, K., Matsumura, K., Kawazu, Y., and Ebihara, K. (1995) Regulation of translation termination: conserved structural motifs in bacterial and eukaryotic polypeptide release factors, *Biochem. Cell. Biol.*, **73**, 1113-1122.
- Frischmeyer, P. A., and Dietz, H. C. (1999) Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease, *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 1893-1900.
- Spirin, A. S. (1969) A model of the functioning ribosome: locking and unlocking of the ribosome subparticles, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **34**, 197-207.
- Gavrilova, L. P., and Spirin, A. S. (1972) Mechanism of translocation in ribosomes. II. Activation of spontaneous (nonenzymic) translocation in ribosomes of *Escherichia coli* by *p*-chloromercuribenzoate, *Mol. Biol.*, **6**, 248-254.
- Van Dyke, N., and Murgola, E. J. (2003) Site of functional interaction of release factor 1 with the ribosome, *J. Mol. Biol.*, **330**, 9-13.
- Bouakaz, L., Bouakaz, E., Murgola, E. J., Ehrenberg, M., and Sanyal, S. (2006) The role of ribosomal protein L11 in class I release factor-mediated translation termination and translational accuracy, *J. Biol. Chem.*, **281**, 4548-4556.
- Ito, K., Uno, M., and Nakamura, Y. (2000) A tripeptide “anticodon” deciphers stop codons in messenger RNA, *Nature*, **403**, 680-684.
- Oparina, N. J., Kalinina, O. V., Gelfand, M. S., and Kisselev, L. L. (2005) Common and specific amino acid residues in the prokaryotic polypeptide release factors RF1 and RF2: possible functional implications, *Nucleic Acids Res.*, **33**, 5226-5234, doi: 10.1093/nar/gki841.
- Laurberg, M., Asahara, H., Korostelev, A., Zhu, J., Trakhanov, S., and Noller, H. F. (2008) Structural basis for translation termination on the 70S ribosome, *Nature*, **454**, 852-857.
- Korostelev, A., Asahara, H., Lancaster, L., Laurberg, M., Hirschi, A., et al. (2008) Crystal structure of a translation termination complex formed with release factor RF2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 19684-19689.
- Korostelev, A., Zhu, J., Asahara, H., and Noller, H. F. (2010) Recognition of the amber UAG stop codon by release factor RF1, *EMBO J.*, **29**, 2577-2585, doi: 10.1038/emboj.2010.139.
- Weixlbaumer, A., Jin, H., Neubauer, C., Voorhees, R. M., Petry, S., et al. (2008) Insights into translational termination from the structure of RF2 bound to the ribosome, *Science*, **322**, 953-956.
- Korkmaz, G., and Sanyal, S. (2017) R213I mutation in release factor 2 (RF2) is one step forward for engineering an omnipotent release factor in bacteria *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **292**, 15134-15142, doi: 10.1074/jbc.M117.785238.
- Field, A., Hetrick, B., Mathew, M., and Joseph, S. (2010) Histidine 197 in release factor 1 is essential for a site bind-

- ing and peptide release, *Biochemistry*, **49**, 9385-9390, doi: 10.1021/bi1012047.
23. Frolova, L., Le Goff, X., Rasmussen, H. H., Cheperegin, S., Drugeon, G., et al. (1994) A highly conserved eukaryotic protein family possessing properties of polypeptide chain release factor, *Nature*, **372**, 701-703.
 24. Frolova, L. Y., Tsivkovskii, R. Y., Sivolobova, G. F., Oparina, N. Y., Serpinsky, O. I., et al. (1999) Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis, *RNA*, **5**, 1014-1020.
 25. Shaw, J. J., and Green, R. (2007) Two distinct components of release factor function uncovered by nucleophile partitioning analysis, *Mol. Cell*, **28**, 458-467.
 26. Zavialov, A. V., Mora, L., Buckingham, R. H., and Ehrenberg, M. (2002) Release of peptide promoted by the GGQ motif of class 1 release factors regulates the GTPase activity of RF3, *Mol. Cell*, **10**, 789-798.
 27. Seit Nebi, A., Frolova, L., Ivanova, N., Poltarau, A., and Kiselev, L. (2000) Mutation of a glutamine residue in the universal tripeptide GGQ in human eRF1 termination factor does not cause complete loss of its activity, *Mol. Biol. (Mosk.)*, **34**, 899-900.
 28. Seit-Nebi, A., Frolova, L., Justesen, J., and Kisselev, L. (2001) Class-1 translation termination factors: invariant GGQ minidomain is essential for release activity and ribosome binding but not for stop codon recognition, *Nucleic Acids Res.*, **29**, 3982-3987.
 29. Santos, N., Zhu, J., Donohue, J. P., Korostelev, A. A., and Noller, H. F. (2013) Crystal structure of the 70S ribosome bound with the Q253P mutant form of release factor RF2, *Structure*, **21**, 1258-1263, doi: 10.1016/j.str.2013.04.028.
 30. Korostelev, A. A. (2011) Structural aspects of translation termination on the ribosome, *RNA*, **17**, 1409-1421.
 31. Dunkle, J. A., and Cate, J. H. (2010) Ribosome structure and dynamics during translocation and termination, *Annu. Rev. Biophys.*, **39**, 227-244, doi: 10.1146/annurev.biophys.37.032807.125954.
 32. Ramakrishnan, V. (2011) Structural studies on decoding, termination and translocation in the bacterial ribosome, in *Ribosomes: Structure, Function, and Dynamics* (Rodnina, M., Wintermeyer, W., and Green, R., eds.) Springer, pp. 19-30.
 33. Rodnina, M. V. (2018) Translation in prokaryotes, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **10**, doi: 10.1101/cshperspect.a032664.
 34. Youngman, E. M., McDonald, M. E., and Green, R. (2008) Peptide release on the ribosome: mechanism and implications for translational control, *Annu. Rev. Microbiol.*, **62**, 353-373.
 35. Adio, S., Sharma, H., Senyushkina, T., Karki, P., Maracci, C., et al. (2018) Dynamics of ribosomes and release factors during translation termination in *E. coli*, *Elife*, **7**, doi: 10.7554/eLife.34252.
 36. Prabhakar, A., Capece, M. C., Petrov, A., Choi, J., and Puglisi, J. D. (2017) Post-termination ribosome intermediate acts as the gateway to ribosome recycling, *Cell Rep.*, **20**, 161-172, doi: 10.1016/j.celrep.2017.06.028.
 37. Sternberg, S. H., Fei, J., Prywes, N., McGrath, K. A., and Gonzalez, R. L., Jr. (2009) Translation factors direct intrinsic ribosome dynamics during translation termination and ribosome recycling, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 861-868, doi: 10.1038/nsmb.1622.
 38. Indrisunaite, G., Pavlov, M. Y., Heurgue-Hamard, V., and Ehrenberg, M. (2015) On the pH dependence of class-1 RF-dependent termination of mRNA translation, *J. Mol. Biol.*, **427**, 1848-1860, doi: 10.1016/j.jmb.2015.01.007.
 39. Shin, D. H., Brandsen, J., Jancarik, J., Yokota, H., Kim, R., and Kim, S. H. (2004) Structural analyses of peptidyl release factor 1 from *Thermotoga maritima* reveal domain flexibility required for its interaction with the ribosome, *J. Mol. Biol.*, **341**, 227-239.
 40. Vestergaard, B., Van, L. B., Andersen, G. R., Nyborg, J., Buckingham, R. H., and Kjeldgaard, M. (2001) Bacterial polypeptide release factor RF2 is structurally distinct from eukaryotic eRF1, *Mol. Cell*, **8**, 1375-1382.
 41. Zoldak, G., Redecke, L., Svergun, D. I., Konarev, P. V., Voertler, C. S., et al. (2007) Release factors 2 from *Escherichia coli* and *Thermus thermophilus*: structural, spectroscopic and microcalorimetric studies, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 1343-1353.
 42. JCSG (2005) *Crystal structure of Peptide chain release factor 1 (RF-1) (SMU.1085) from Streptococcus mutans at 2.34 Å resolution*, Protein Data Bank.
 43. Rawat, U. B., Zavialov, A. V., Sengupta, J., Valle, M., Grassucci, R. A., et al. (2003) A cryo-electron microscopic study of ribosome-bound termination factor RF2, *Nature*, **421**, 87-90.
 44. Petry, S., Brodersen, D. E., Murphy, F. V., Dunham, C. M., Selmer, M., et al. (2005) Crystal structures of the ribosome in complex with release factors RF1 and RF2 bound to a cognate stop codon, *Cell*, **123**, 1255-1266.
 45. He, S. L., and Green, R. (2010) Visualization of codon-dependent conformational rearrangements during translation termination, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 465-470.
 46. Hetrick, B., Lee, K., and Joseph, S. (2009) Kinetics of stop codon recognition by release factor 1, *Biochemistry*, **48**, 11178-11184.
 47. Trappl, K., and Joseph, S. (2016) Ribosome induces a closed to open conformational change in release factor 1, *J. Mol. Biol.*, **428**, 1333-1344, doi: 10.1016/j.jmb.2016.01.021.
 48. Svidritskiy, E., and Korostelev, A. A. (2018) Conformational control of translation termination on the 70S ribosome, *Structure*, **26**, 821-828.
 49. Demo, G., Svidritskiy, E., Madireddy, R., Diaz-Avalos, R., Grant, T., et al. (2017) Mechanism of ribosome rescue by ArfA and RF2, *Elife*, **6**, doi: 10.7554/eLife.23687.
 50. James, N. R., Brown, A., Gordiyenko, Y., and Ramakrishnan, V. (2016) Translational termination without a stop codon, *Science*, **354**, 1437-1440, doi: 10.1126/science.aai9127.
 51. Fu, Z., Indrisunaite, G., Kaledhonkar, S., Shah, B., Sun, M., et al. (2019) The structural basis for release-factor activation during translation termination revealed by time-resolved cryogenic electron microscopy, *Nat. Commun.*, **10**, 2579, doi: 10.1038/s41467-019-10608-z.
 52. Fislage, M., Zhang, J., Brown, Z. P., Mandava, C. S., Sanyal, S., et al. (2018) Cryo-EM shows stages of initial codon selection on the ribosome by aa-tRNA in ternary complex with GTP and the GTPase-deficient EF-TuH84A, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 5861-5874, doi: 10.1093/nar/gky346.
 53. Ogle, J. M., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Jr., Tarry, M. J., Carter, A. P., and Ramakrishnan, V. (2001) Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit, *Science*, **292**, 897-902.
 54. Loveland, A. B., Demo, G., Grigorieff, N., and Korostelev, A. A. (2017) Ensemble cryo-EM elucidates the mechanism of translation fidelity, *Nature*, **546**, 113-117, doi: 10.1038/nature22397.
 55. Amort, M., Wotzel, B., Bakowska-Zywicka, K., Erlacher, M. D., Micura, R., and Polacek, N. (2007) An intact ribosome moiety at A2602 of 23S rRNA is key to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis during translation termination, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 5130-5140, doi: 10.1093/nar/gkm539.
 56. Polacek, N., Gomez, M. J., Ito, K., Xiong, L., Nakamura, Y., and Mankin, A. (2003) The critical role of

- the universally conserved A2602 of 23S ribosomal RNA in the release of the nascent peptide during translation termination, *Mol. Cell*, **11**, 103-112.
57. Youngman, E. M., Brunelle, J. L., Kochaniak, A. B., and Green, R. (2004) The active site of the ribosome is composed of two layers of conserved nucleotides with distinct roles in peptide bond formation and peptide release, *Cell*, **117**, 589-599.
 58. Graf, M., Huter, P., Maracci, C., Peterek, M., Rodnina, M. V., and Wilson, D. N. (2018) Visualization of translation termination intermediates trapped by the Apidaecin 137 peptide during RF3-mediated recycling of RF1, *Nat. Commun.*, **9**, 3053, doi: 10.1038/s41467-018-05465-1.
 59. Florin, T., Maracci, C., Graf, M., Karki, P., Klepacki, D., et al. (2017) An antimicrobial peptide that inhibits translation by trapping release factors on the ribosome, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 752-757, doi: 10.1038/nsmb.3439.
 60. Freistroffer, D. V., Pavlov, M. Y., MacDougall, J., Buckingham, R. H., and Ehrenberg, M. (1997) Release factor RF3 in *E. coli* accelerates the dissociation of release factors RF1 and RF2 from the ribosome in a GTP-dependent manner, *EMBO J.*, **16**, 4126-4133, doi: 10.1093/emboj/16.13.4126.
 61. Svidritskiy, E., Demo, G., Loveland, A. B., Xu, C., and Korostelev, A. A. (2019) Extensive ribosome and RF2 rearrangements during translation termination, *Elife*, **8**, e46850, doi: 10.7554/eLife.46850.
 62. Ling, C., and Ermolenko, D. N. (2016) Structural insights into ribosome translocation, *WIREs RNA*, **7**, 620-636, doi: 10.1002/wrna.1354.
 63. Noller, H. F., Lancaster, L., Zhou, J., and Mohan, S. (2017) The ribosome moves: RNA mechanics and translocation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 1021-1027, doi: 10.1038/nsmb.3505.
 64. Voorhees, R. M., and Ramakrishnan, V. (2013) Structural basis of the translational elongation cycle, *Annu. Rev. Biochem.*, **82**, 203-236, doi: 10.1146/annurev-biochem-113009-092313.
 65. Chen, J., Tsai, A., O'Leary, S. E., Petrov, A., and Puglisi, J. D. (2012) Unraveling the dynamics of ribosome translocation, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **22**, 804-814, doi: 10.1016/j.sbi.2012.09.004.
 66. Frank, J., and Gonzalez, R. L., Jr. (2010) Structure and dynamics of a processive Brownian motor: the translating ribosome, *Annu. Rev. Biochem.*, **79**, 381-412.
 67. Casy, W., Prater, A. R., and Cornish, P. V. (2018) Operative binding of Class I release factors and YaeJ stabilizes the ribosome in the nonrotated state, *Biochemistry*, **57**, 1954-1966, doi: 10.1021/acs.biochem.7b00824.
 68. Jin, H., Kelley, A. C., Loakes, D., and Ramakrishnan, V. (2010) Structure of the 70S ribosome bound to release factor 2 and a substrate analog provides insights into catalysis of peptide release, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 8593-8598.
 69. Wasserman, M. R., Alejo, J. L., Altman, R. B., and Blanchard, S. C. (2016) Multiperspective smFRET reveals rate-determining late intermediates of ribosomal translocation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **23**, 333-341, doi: 10.1038/nsmb.3177.
 70. Cornish, P. V., Ermolenko, D. N., Noller, H. F., and Ha, T. (2008) Spontaneous intersubunit rotation in single ribosomes, *Mol. Cell*, **30**, 578-588, doi: 10.1016/j.molcel.2008.05.004.
 71. Sharma, H., Adio, S., Senyushkina, T., Belardinelli, R., Peske, F., and Rodnina, M. V. (2016) Kinetics of spontaneous and EF-G-accelerated rotation of ribosomal subunits, *Cell Rep.*, **16**, 2187-2196, doi: 10.1016/j.celrep.2016.07.051.
 72. Blanchard, S. C., Kim, H. D., Gonzalez, R. L., Jr., Puglisi, J. D., and Chu, S. (2004) tRNA dynamics on the ribosome during translation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12893-12898, doi: 10.1073/pnas.0403884101.
 73. Agirrezabala, X., Lei, J., Brunelle, J. L., Ortiz-Meoz, R. F., Green, R., and Frank J. (2008) Visualization of the hybrid state of tRNA binding promoted by spontaneous ratcheting of the ribosome, *Mol. Cell*, **32**, 190-197, doi: 10.1016/j.molcel.2008.10.001.
 74. Julian, P., Konevega, A. L., Scheres, S. H., Lazaro, M., Gil, D., et al. (2008) Structure of ratcheted ribosomes with tRNAs in hybrid states, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 16924-16927, doi: 10.1073/pnas.0809587105.
 75. Zhou, J., Lancaster, L., Trakhanov, S., and Noller, H. F. (2012) Crystal structure of release factor RF3 trapped in the GTP state on a rotated conformation of the ribosome, *RNA*, **18**, 230-240, doi: 10.1261/rna.031187.111.
 76. Ermolenko, D. N., Majumdar, Z. K., Hickerson, R. P., Spiegel, P. C., Clegg, R. M., and Noller, H. F. (2007) Observation of intersubunit movement of the ribosome in solution using FRET, *J. Mol. Biol.*, **370**, 530-540.
 77. Gao, H., Zhou, Z., Rawat, U., Huang, C., Bouakaz, L., et al. (2007) RF3 induces ribosomal conformational changes responsible for dissociation of class I release factors, *Cell*, **129**, 929-941, doi: 10.1016/j.cell.2007.03.050.
 78. Jin, H., Kelley, A. C., and Ramakrishnan, V. (2011) Crystal structure of the hybrid state of ribosome in complex with the guanosine triphosphatase release factor 3, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 15798-15803, doi: 10.1073/pnas.1112185108.
 79. Leipe, D. D., Wolf, Y. I., Koonin, E. V., and Aravind, L. (2002) Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases, *J. Mol. Biol.*, **317**, 41-72, doi: 10.1006/jmbi.2001.5378.
 80. Mikuni, O., Ito, K., Moffat, J., Matsumura, K., McCaughan, K., et al. (1994) Identification of the prfC gene, which encodes peptide-chain-release factor 3 of *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5798-5802.
 81. Grentzmann, G., Brechemier-Baey, D., Heurgue, V., Mora, L., and Buckingham, R. H. (1994) Localization and characterization of the gene encoding release factor RF3 in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5848-5852.
 82. Pai, R. D., Zhang, W., Schuwirth, B. S., Hirokawa, G., Kaji, H., et al. (2008) Structural insights into ribosome recycling factor interactions with the 70S ribosome, *J. Mol. Biol.*, **376**, 1334-1347, doi: 10.1016/j.jmb.2007.12.048.
 83. Borovinskaya, M. A., Pai, R. D., Zhang, W., Schuwirth, B. S., Holton, J. M., et al. (2007) Structural basis for aminoglycoside inhibition of bacterial ribosome recycling, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 727-732, doi: 10.1038/nsmb1271.
 84. Ayyub, S. A., Gao, F., Lightowlers, R. N., and Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. (2020) Rescuing stalled mammalian mitoribosomes – what can we learn from bacteria? *J. Cell Sci.*, **133**, doi: 10.1242/jcs.231811.
 85. Soleimanpour-Lichaei, H. R., Kuhl, I., Gaisne, M., Passos, J. F., Wydro, M., et al. (2007) mtRF1a is a human mitochondrial translation release factor decoding the major termination codons UAA and UAG, *Mol. Cell*, **27**, 745-757.
 86. Nozaki, Y., Matsunaga, N., Ishizawa, T., Ueda, T., and Takeuchi, N. (2008) HMRFL is a human mitochondrial translation release factor involved in the decoding of the termination codons UAA and UAG, *Genes Cells*, **13**, 429-438.
 87. Kummer, E., Schubert, K. N., Schoenhut, T., Scaiola, A., and Ban, N. (2021) Structural basis of translation termination, rescue, and recycling in mammalian mitochondria, *Mol. Cell*, doi: 10.1016/j.molcel.2021.03.042.

88. Aibara, S., Singh, V., Modelska, A., and Amunts, A. (2020) Structural basis of mitochondrial translation, *Elife*, **9**, doi: 10.7554/eLife.58362.
89. Kummer, E., and Ban, N. (2020) Structural insights into mammalian mitochondrial translation elongation catalyzed by mtEFG1, *EMBO J.*, **39**, e104820, doi: 10.15252/embj.2020104820.
90. Zhang, Y., and Spremulli, L. L. (1998) Identification and cloning of human mitochondrial translational release factor 1 and the ribosome recycling factor, *Biochim. Biophys. Acta*, **1443**, 245-250, doi: 10.1016/s0167-4781(98)00223-1.
91. Lind, C., Sund, J., and Aqvist, J. (2013) Codon-reading specificities of mitochondrial release factors and translation termination at non-standard stop codons, *Nat. Commun.*, **4**, 2940, doi: 10.1038/ncomms3940.
92. Huynen, M. A., Duarte, I., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M., and Nabuurs, S. B. (2012) Structure based hypothesis of a mitochondrial ribosome rescue mechanism, *Biol. Direct.*, **7**, 14, doi: 10.1186/1745-6150-7-14.
93. Young, D. J., Edgar, C. D., Murphy, J., Fredebohm, J., Poole, E. S., and Tate, W. P. (2010) Bioinformatic, structural, and functional analyses support release factor-like MTRF1 as a protein able to decode nonstandard stop codons beginning with adenine in vertebrate mitochondria, *RNA*, **16**, 1146-1155.
94. Temperley, R., Richter, R., Dennerlein, S., Lightowlers, R. N., and Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. (2010) Hungry codons promote frameshifting in human mitochondrial ribosomes, *Science*, **327**, 301.
95. Ito, K., Chadani, Y., Nakamori, K., Chiba, S., Akiyama, Y., and Abo, T. (2011) Nascentome analysis uncovers futile protein synthesis in *Escherichia coli*, *PLoS One*, **6**, e28413, doi: 10.1371/journal.pone.0028413.
96. Hayes, C. S., and Keiler, K. C. (2010) Beyond ribosome rescue: tmRNA and co-translational processes, *FEBS Lett.*, **584**, 413-419, doi: 10.1016/j.febslet.2009.11.023.
97. Keiler, K. C. (2015) Mechanisms of ribosome rescue in bacteria, *Nat. Rev. Microbiol.*, **13**, 285-297, doi: 10.1038/nrmicro3438.
98. Desai, N., Yang, H., Chandrasekaran, V., Kazi, R., Minczuk, M., and Ramakrishnan, V. (2020) Elongational stalling activates mitoribosome-associated quality control, *Science*, **370**, 1105-1110, doi: 10.1126/science.abc7782.
99. Chadani, Y., Ito, K., Kutsukake, K., and Abo, T. (2012) ArfA recruits release factor 2 to rescue stalled ribosomes by peptidyl-tRNA hydrolysis in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.*, **86**, 37-50, doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08190.x.
100. Shimizu, Y. (2012) ArfA recruits RF2 into stalled ribosomes, *J. Mol. Biol.*, **423**, 624-631, doi: 10.1016/j.jmb.2012.08.007.
101. Zeng, F., and Jin, H. (2016) Peptide release promoted by methylated RF2 and ArfA in nonstop translation is achieved by an induced-fit mechanism, *RNA*, **22**, 49-60, doi: 10.1261/rna.053082.115.
102. Huter, P., Muller, C., Beckert, B., Arenz, S., Berninghausen, O., et al. (2017) Structural basis for ArfA-RF2-mediated translation termination on mRNAs lacking stop codons, *Nature*, **541**, 546-549, doi: 10.1038/nature20821.
103. Ma, C., Kurita, D., Li, N., Chen, Y., Himeno, H., and Gao, N. (2017) Mechanistic insights into the alternative translation termination by ArfA and RF2, *Nature*, **541**, 550-553, doi: 10.1038/nature20822.
104. Zeng, F., Chen, Y., Remis, J., Shekhar, M., Phillips, J. C., et al. (2017) Structural basis of co-translational quality control by ArfA and RF2 bound to ribosome, *Nature*, **541**, 554-557, doi: 10.1038/nature21053.
105. Muller, C., Crowe-McAuliffe, C., and Wilson, D. N. (2021) Ribosome rescue pathways in bacteria, *Front. Microbiol.*, **12**, 652980, doi: 10.3389/fmicb.2021.652980.
106. Shimokawa-Chiba, N., Muller, C., Fujiwara, K., Beckert, B., Ito, K., et al. (2019) Release factor-dependent ribosome rescue by BrfA in the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*, *Nat. Commun.*, **10**, 5397, doi: 10.1038/s41467-019-13408-7.
107. Goralski, T. D. P., Kirimanjeswara, G. S., and Keiler, K. C. (2018) A new mechanism for ribosome rescue can recruit RF1 or RF2 to nonstop ribosomes, *mBio*, **9**, doi: 10.1128/mBio.02436-18.
108. Burroughs, A. M., and Aravind, L. (2019) The origin and evolution of release factors: implications for translation termination, ribosome rescue, and quality control pathways, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, doi: 10.3390/ijms20081981.
109. Handa, Y., Inaho, N., and Nameki, N. (2011) YaeJ is a novel ribosome-associated protein in *Escherichia coli* that can hydrolyze peptidyl-tRNA on stalled ribosomes, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 1739-1748, doi: 10.1093/nar/gkq1097.
110. Chan, K. H., Petrychenko, V., Mueller, C., Maracci, C., Holtkamp, W., et al. (2020) Mechanism of ribosome rescue by alternative ribosome-rescue factor B, *Nat. Commun.*, **11**, 4106, doi: 10.1038/s41467-020-17853-7.
111. Carbone, C. E., Demo, G., Madireddy, R., Svidritskiy, E., and Korostelev, A. A. (2020) ArfB can displace mRNA to rescue stalled ribosomes, *Nat. Commun.*, **11**, 5552, doi: 10.1038/s41467-020-19370-z.
112. Gagnon, M. G., Seetharaman, S. V., Bulkley, D., and Steitz, T. A. (2012) Structural basis for the rescue of stalled ribosomes: structure of YaeJ bound to the ribosome, *Science*, **335**, 1370-1372, doi: 10.1126/science.1217443.
113. Richter, R., Rorbach, J., Pajak, A., Smith, P. M., Wessels, H. J., et al. (2010) A functional peptidyl-tRNA hydrolase, ICT1, has been recruited into the human mitochondrial ribosome, *EMBO J.*, **29**, 1116-1125.
114. Handa, Y., Hikawa, Y., Tochio, N., Kogure, H., Inoue, M., et al. (2010) Solution structure of the catalytic domain of the mitochondrial protein ICT1 that is essential for cell vitality, *J. Mol. Biol.*, **404**, 260-273.
115. Feaga, H. A., Quickel, M. D., Hankey-Giblin, P. A., and Keiler, K. C. (2016) Human cells require non-stop ribosome rescue activity in mitochondria, *PLoS Genet.*, **12**, e1005964, doi: 10.1371/journal.pgen.1005964.
116. Pan, X., Tan, J., Weng, X., Du, R., Jiang, Y., et al. (2021) ICT1 Promotes osteosarcoma cell proliferation and inhibits apoptosis via STAT3/BCL-2 pathway, *Biomed. Res. Int.*, **2021**, 8971728, doi: 10.1155/2021/8971728.
117. Greber, B. J., Boehringer, D., Leitner, A., Bieri, P., Voigts-Hoffmann, F., et al. (2014) Architecture of the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome, *Nature*, **505**, 515-519, doi: 10.1038/nature12890.
118. Kater, L., Mitterer, V., Thoms, M., Cheng, J., Berninghausen, O., et al. (2020) Construction of the central protuberance and L1 stalk during 60S subunit biogenesis, *Mol. Cell*, **79**, 615-628.e615, doi: 10.1016/j.molcel.2020.06.032.
119. Nikolay, R., Hilal, T., Qin, B., Mielke, T., Burger, J., et al. (2018) Structural visualization of the formation and activation of the 50S ribosomal subunit during *in vitro* reconstitution, *Mol. Cell*, **70**, 881-893.e883, doi: 10.1016/j.molcel.2018.05.003.
120. Davis, J. H., Tan, Y. Z., Carragher, B., Potter, C. S., Lyumkis, D., and Williamson, J. R. (2016) Modular assembly of the bacterial large ribosomal subunit, *Cell*, **167**, 1610-1622.e1615, doi: 10.1016/j.cell.2016.11.020.
121. Huang, S., Aleksashin, N. A., Loveland, A. B., Klepacki, D., Reier, K., et al. (2020) Ribosome engineering reveals the importance of 5S rRNA autonomy for ribosome assembly, *Nat. Commun.*, **11**, 2900, doi: 10.1038/s41467-020-16694-8.

122. Waltz, F., Soufari, H., Bochler, A., Giege, P., and Hashem, Y. (2020) Cryo-EM structure of the RNA-rich plant mitochondrial ribosome, *Nat. Plants*, **6**, 377-383, doi: 10.1038/s41477-020-0631-5.
123. Akabane, S., Ueda, T., Nierhaus, K. H., and Takeuchi, N. (2014) Ribosome rescue and translation termination at non-standard stop codons by ICT1 in mammalian mitochondria, *PLoS Genet.*, **10**, e1004616, doi: 10.1371/journal.pgen.1004616.
124. Vaishya, S., Kumar, V., Gupta, A., Siddiqi, M. I., and Habib, S. (2016) Polypeptide release factors and stop codon recognition in the apicoplast and mitochondrion of *Plasmodium falciparum*, *Mol. Microbiol.*, **100**, 1080-1095, doi: 10.1111/mmi.13369.
125. Kogure, H., Hikawa, Y., Hagihara, M., Tochio, N., Koshiha, S., et al. (2012) Solution structure and siRNA-mediated knockdown analysis of the mitochondrial disease-related protein C12orf65, *Proteins*, **80**, 2629-2642, doi: 10.1002/prot.24152.
126. Antonicka, H., Ostergaard, E., Sasarman, F., Weraarpachai, W., Wibrand, F., et al. (2010) Mutations in C12orf65 in patients with encephalomyopathy and a mitochondrial translation defect, *Am. J. Hum. Genet.*, **87**, 115-122, doi: 10.1016/j.ajhg.2010.06.004.
127. Wesolowska, M., Gorman, G. S., Alston, C. L., Pajak, A., Pyle, A., et al. (2015) Adult onset leigh syndrome in the intensive care setting: a novel presentation of a C12orf65 related mitochondrial disease, *J. Neuromuscul. Dis.*, **2**, 409-419, doi: 10.3233/JND-150121.
128. Zorkau, M., Albus, C. A., Berlinguer-Palmini, R., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. A., and Lightowlers, R. N. (2021) High-resolution imaging reveals compartmentalization of mitochondrial protein synthesis in cultured human cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, doi: 10.1073/pnas.2008778118.
129. Chandrasekaran, V., Juszkievicz, S., Choi, J., Puglisi, J. D., Brown, A., et al. (2019) Mechanism of ribosome stalling during translation of a poly(A) tail, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 1132-1140, doi: 10.1038/s41594-019-0331-x.
130. Tesina, P., Lessen, L. N., Buschauer, R., Cheng, J., Wu, C. C., et al. (2020) Molecular mechanism of translational stalling by inhibitory codon combinations and poly(A) tracts, *EMBO J.*, **39**, e103365, doi: 10.15252/embj.2019103365.
131. Frolova, L., Le Goff, X., Zhouravleva, G., Davydova, E., Philippe, M., and Kisselev, L. (1996) Eukaryotic polypeptide chain release factor eRF3 is an eRF1- and ribosome-dependent guanosine triphosphatase, *RNA*, **2**, 334-341.
132. Alkalaeva, E. Z., Pisarev, A. V., Frolova, L. Y., Kisselev, L. L., and Pestova, T. V. (2006) *In vitro* reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3, *Cell*, **125**, 1125-1136.
133. Salas-Marco, J., and Bedwell, D. M. (2004) GTP hydrolysis by eRF3 facilitates stop codon decoding during eukaryotic translation termination, *Mol. Cell Biol.*, **24**, 7769-7778.
134. Frolova, L., Seit-Nebi, A., and Kisselev, L. (2002) Highly conserved NIKS tetrapeptide is functionally essential in eukaryotic translation termination factor eRF1, *RNA*, **8**, 129-136.
135. Muramatsu, T., Heckmann, K., Kitanaka, C., and Kuchino, Y. (2001) Molecular mechanism of stop codon recognition by eRF1: a wobble hypothesis for peptide anticodons, *FEBS Lett.*, **488**, 105-109, doi: 10.1016/s0014-5793(00)02391-7.
136. Bulygin, K. N., Popugaeva, E. A., Repkova, M. N., Meschaninova, M. I., Ven'yaminova, A. G., et al. (2007) The C domain of translation termination factor eRF1 is close to the stop codon in the A site of the 80S ribosome, *Mol. Biol.*, **41**, 781-789.
137. Brown, A., Shao, S., Murray, J., Hegde, R. S., and Ramakrishnan, V. (2015) Structural basis for stop codon recognition in eukaryotes, *Nature*, **524**, 493-496, doi: 10.1038/nature14896.
138. Brown, C. M., Stockwell, P. A., Trotman, C. N., and Tate, W. P. (1990) Sequence analysis suggests that tetranucleotides signal the termination of protein synthesis in eukaryotes, *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6339-6345.
139. Matheisl, S., Berninghausen, O., Becker, T., and Beckmann, R. (2015) Structure of a human translation termination complex, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 8615-8626, doi: 10.1093/nar/gkv909.
140. Jungreis, I., Lin, M. F., Spokony, R., Chan, C. S., Negre, N., et al. (2011) Evidence of abundant stop codon readthrough in *Drosophila* and other metazoa, *Genome Res.*, **21**, 2096-2113, doi: 10.1101/gr.119974.110.
141. Swart, E. C., Serra, V., Petroni, G., and Nowacki, M. (2016) Genetic codes with no dedicated stop codon: context-dependent translation termination, *Cell*, **166**, 691-702, doi: 10.1016/j.cell.2016.06.020.
142. Heaphy, S. M., Mariotti, M., Gladyshev, V. N., Atkins, J. F., and Baranov, P. V. (2016) Novel ciliate genetic code variants including the reassignment of all three stop codons to sense codons in *Condyllostoma magnum*, *Mol. Biol. Evol.*, **33**, 2885-2889, doi: 10.1093/molbev/msw166.
143. Zahonova, K., Kostygov, A. Y., Sevcikova, T., Yurchenko, V., and Elias, M. (2016) An unprecedented non-canonical nuclear genetic code with all three termination codons reassigned as sense codons, *Curr. Biol.*, **26**, 2364-2369, doi: 10.1016/j.cub.2016.06.064.
144. Anzalone, A. V., Zairis, S., Lin, A. J., Rabadan, R., and Cornish, V. W. (2019) Interrogation of eukaryotic stop codon readthrough signals by *in vitro* RNA selection, *Biochemistry*, **58**, 1167-1178, doi: 10.1021/acs.biochem.8b01280.
145. Firth, A. E., Wills, N. M., Gesteland, R. F., and Atkins, J. F. (2011) Stimulation of stop codon readthrough: frequent presence of an extended 3' RNA structural element, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 6679-6691, doi: 10.1093/nar/gkr224.
146. Bonetti, B., Fu, L., Moon, J., and Bedwell, D. M. (1995) The efficiency of translation termination is determined by a synergistic interplay between upstream and downstream sequences in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Mol. Biol.*, **251**, 334-345.
147. Harrell, L., Melcher, U., and Atkins, J. F. (2002) Predominance of six different hexanucleotide recoding signals 3' of read-through stop codons, *Nucleic Acids Res.*, **30**, 2011-2017, doi: 10.1093/nar/30.9.2011.
148. Shao, S., Murray, J., Brown, A., Taunton, J., Ramakrishnan, V., and Hegde, R. S. (2016) Decoding mammalian ribosome-mRNA states by translational GTPase complexes, *Cell*, **167**, 1229-1240.e1215, doi: 10.1016/j.cell.2016.10.046.
149. Muhs, M., Hilal, T., Mielke, T., Skabkin, M. A., Sanbonmatsu, K. Y., et al. (2015) Cryo-EM of ribosomal 80S complexes with termination factors reveals the translocated cricket paralysis virus IRES, *Mol. Cell*, **57**, 422-432, doi: 10.1016/j.molcel.2014.12.016.
150. Des Georges, A., Hashem, Y., Unbehaun, A., Grassucci, R. A., Taylor, D., et al. (2014) Structure of the mammalian ribosomal pre-termination complex associated with eRF1.eRF3.GDPNP, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 3409-3418, doi: 10.1093/nar/gkt1279.
151. Li, W., Chang, S. T., Ward, F. R., and Cate, J. H. D. (2020) Selective inhibition of human translation termination by a drug-like compound, *Nat. Commun.*, **11**, 4941, doi: 10.1038/s41467-020-18765-2.

152. Preis, A., Heuer, A., Barrio-Garcia, C., Hauser, A., Eyler, D. E., et al. (2014) Cryoelectron microscopic structures of eukaryotic translation termination complexes containing eRF1-eRF3 or eRF1-ABCE1, *Cell Rep.*, **8**, 59-65, doi: 10.1016/j.celrep.2014.04.058.
153. Pisarev, A. V., Skabkin, M. A., Pisareva, V. P., Skabkina, O. V., Rakotondrafara, A. M., et al. (2010) The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling, *Mol. Cell*, **37**, 196-210.
154. Annibaldis, G., Domanski, M., Dreos, R., Contu, L., Carl, S., et al. (2020) Readthrough of stop codons under limiting ABCE1 concentration involves frameshifting and inhibits nonsense-mediated mRNA decay, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 10259-10279, doi: 10.1093/nar/gkaa758.
155. Young, D. J., Guydosh, N. R., Zhang, F., Hinnebusch, A. G., and Green, R. (2015) Rli1/ABCE1 recycles terminating ribosomes and controls translation reinitiation in 3'-UTRs *in vivo*, *Cell*, **162**, 872-884, doi: 10.1016/j.cell.2015.07.041.
156. Lawson, M. R., Lessen, L. N., Wang, J., Prabhakar, A., Corsepilus, N. C., et al. (2021) Mechanisms that ensure speed and fidelity in eukaryotic translation termination, *bioRxiv*, doi: 10.1101/2021.04.01.438116.
157. Kryuchkova, P., Grishin, A., Eliseev, B., Karyagina, A., Frolova, L., and Alkalaeva, E. (2013) Two-step model of stop codon recognition by eukaryotic release factor eRF1, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 4573-4586, doi: 10.1093/nar/gkt113.
158. Svidritskiy, E., Demo, G., and Korostelev, A. A. (2018) Mechanism of premature translation termination on a sense codon, *J. Biol. Chem.*, **293**, 12472-12479, doi: 10.1074/jbc.AW118.003232.
159. Gouridis, G., Hetzert, B., Kiosze-Becker, K., de Boer, M., Heinemann, H., et al. (2019) ABCE1 controls ribosome recycling by an asymmetric dynamic conformational equilibrium, *Cell Rep.*, **28**, 723-734.e726, doi: 10.1016/j.celrep.2019.06.052.
160. Heuer, A., Gerovac, M., Schmidt, C., Trowitzsch, S., Preis, A., et al. (2017) Structure of the 40S-ABCE1 post-splitting complex in ribosome recycling and translation initiation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 453-460, doi: 10.1038/nsm.3396.
161. Mancera-Martinez, E., Brito Querido, J., Valasek, L. S., Simonetti, A., and Hashem, Y. (2017) ABCE1: a special factor that orchestrates translation at the crossroad between recycling and initiation, *RNA Biol.*, **14**, 1279-1285, doi: 10.1080/15476286.2016.1269993.
162. Kratzat, H., Mackens-Kiani, T., Ameismeier, M., Potocnjak, M., Cheng, J., et al. (2021) A structural inventory of native ribosomal ABCE1-43S pre-initiation complexes, *EMBO J.*, **40**, e105179, doi: 10.15252/embj.2020105179.
163. Hilal, T., Yamamoto, H., Loerke, J., Burger, J., Mielke, T., and Spahn, C. M. (2016) Structural insights into ribosomal rescue by Dom34 and Hbs1 at near-atomic resolution, *Nat. Commun.*, **7**, 13521, doi: 10.1038/ncomms13521.
164. Becker, T., Franckenberg, S., Wickles, S., Shoemaker, C. J., Anger, A. M., et al. (2012) Structural basis of highly conserved ribosome recycling in eukaryotes and archaea, *Nature*, **482**, 501-506, doi: 10.1038/nature10829.
165. Su, T., Izawa, T., Thoms, M., Yamashita, Y., Cheng, J., et al. (2019) Structure and function of Vms1 and Arb1 in RQC and mitochondrial proteome homeostasis, *Nature*, **570**, 538-542, doi: 10.1038/s41586-019-1307-z.
166. Inada, T. (2020) Quality controls induced by aberrant translation, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 1084-1096, doi: 10.1093/nar/gkz1201.
167. Van den Elzen, A. M., Schuller, A., Green, R., and Seraphin, B. (2014) Dom34-Hbs1 mediated dissociation of inactive 80S ribosomes promotes restart of translation after stress, *EMBO J.*, **33**, 265-276, doi: 10.1002/embj.201386123.
168. Guydosh, N. R., and Green, R. (2014) Dom34 rescues ribosomes in 3'-untranslated regions, *Cell*, **156**, 950-962, doi: 10.1016/j.cell.2014.02.006.
169. Passos, D. O., Doma, M. K., Shoemaker, C. J., Muhrad, D., Green, R., et al. (2009) Analysis of Dom34 and its function in no-go decay, *Mol. Biol. Cell*, **20**, 3025-3032, doi: 10.1091/mbc.E09-01-0028.
170. Shoemaker, C. J., Eyler, D. E., and Green, R. (2010) Dom34:Hbs1 promotes subunit dissociation and peptidyl-tRNA drop-off to initiate no-go decay, *Science*, **330**, 369-372, doi: 10.1126/science.1192430.
171. Becker, T., Armache, J. P., Jarasch, A., Anger, A. M., Villa, E., et al. (2011) Structure of the no-go mRNA decay complex Dom34-Hbs1 bound to a stalled 80S ribosome, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 715-720, doi: 10.1038/nsm.2057.
172. Pisareva, V. P., Skabkin, M. A., Hellen, C. U., Pestova, T. V., and Pisarev, A. V. (2011) Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes, *EMBO J.*, **30**, 1804-1817, doi: 10.1038/emboj.2011.93.
173. Kostova, K. K., Hickey, K. L., Osuna, B. A., Hussmann, J. A., Frost, A., et al. (2017) CAT-tailing as a fail-safe mechanism for efficient degradation of stalled nascent polypeptides, *Science*, **357**, 414-417, doi: 10.1126/science.aam7787.
174. Verma, R., Reichermeier, K. M., Burroughs, A. M., Oania, R. S., Reitsma, J. M., et al. (2018) Vms1 and ANKZF1 peptidyl-tRNA hydrolases release nascent chains from stalled ribosomes, *Nature*, **557**, 446-451, doi: 10.1038/s41586-018-0022-5.
175. Zurita Rendon, O., Fredrickson, E. K., Howard, C. J., Van Vranken, J., Fogarty, S., et al. (2018) Vms1p is a release factor for the ribosome-associated quality control complex, *Nat. Commun.*, **9**, 2197, doi: 10.1038/s41467-018-04564-3.
176. Yip, M. C. J., Keszei, A. F. A., Feng, Q., Chu, V., McKenna, M. J., and Shao, S. (2019) Mechanism for recycling tRNAs on stalled ribosomes, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 343-349, doi: 10.1038/s41594-019-0211-4.
177. Kuroha, K., Zinoviev, A., Hellen, C. U. T., and Pestova, T. V. (2018) Release of ubiquitinated and non-ubiquitinated nascent chains from stalled mammalian ribosomal complexes by ANKZF1 and Pthr1, *Mol. Cell*, **72**, 286-302.e288, doi: 10.1016/j.molcel.2018.08.022.
178. Yip, M. C. J., Savickas, S., Gygi, S. P., and Shao, S. (2020) ELAC1 repairs tRNAs cleaved during ribosome-associated quality control, *Cell Rep.*, **30**, 2106-2114.e2105, doi: 10.1016/j.celrep.2020.01.082.
179. Defenouillere, Q., Yao, Y., Mouaikel, J., Namane, A., Galopier, A., et al. (2013) Cdc48-associated complex bound to 60S particles is required for the clearance of aberrant translation products, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 5046-5051, doi: 10.1073/pnas.1221724110.
180. Verma, R., Oania, R. S., Kolawa, N. J., and Deshaies, R. J. (2013) Cdc48/p97 promotes degradation of aberrant nascent polypeptides bound to the ribosome, *Elife*, **2**, e00308, doi: 10.7554/eLife.00308.
181. Brandman, O., Stewart-Ornstein, J., Wong, D., Larson, A., Williams, C. C., et al. (2012) A ribosome-bound quality control complex triggers degradation of nascent peptides and signals translation stress, *Cell*, **151**, 1042-1054, doi: 10.1016/j.cell.2012.10.044.

DIVERSITY AND SIMILARITY OF TERMINATION AND RIBOSOME RESCUE IN BACTERIAL, MITOCHONDRIAL, AND CYTOPLASMIC TRANSLATION

Review

A. A. Korostelev

RNA Therapeutics Institute, Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, UMass Medical School, Worcester, MA, USA; E-mail: Andrei.Korostelev@umassmed.edu

When a ribosome encounters the stop codon of an mRNA, it terminates translation, releases the newly made protein, and is recycled to initiate translation on a new mRNA. Termination is a highly dynamic process in which release factors (RF1 and RF2 in bacteria; eRF1 • eRF3 • GTP in eukaryotes) coordinate peptide release with large-scale molecular rearrangements of the ribosome. Ribosomes stalled on aberrant mRNAs are rescued and recycled by diverse bacterial, mitochondrial, or cytoplasmic quality control mechanisms. These are catalyzed by rescue factors with peptidyl-tRNA hydrolase activity (bacterial ArfA • RF2 and ArfB, mitochondrial ICT1 and mtRF-R, and cytoplasmic Vms1), that are distinct from each other and from release factors. Nevertheless, recent structural studies demonstrate a remarkable similarity between translation termination and ribosome rescue mechanisms. This review describes how these pathways rely on inherent ribosome dynamics, emphasizing the active role of the ribosome in all translation steps.

Keywords: translation, termination, ribosome, rescue

УДК 577.217.563

РОЛЬ ФАКТОРОВ ТЕРМИНАЦИИ В ГИДРОЛИЗЕ СЛОЖНОЭФИРНОЙ СВЯЗИ ПЕПТИДИЛ-тРНК У БАКТЕРИЙ

Мини-обзор

© 2021 С.М. Баласанянц, Е.В. Александрова, Ю.С. Поликанов*

*Департамент Биологических Наук, Университет штата Иллинойс в Чикаго,
60607 Чикаго, США; электронная почта: yuryp@uic.edu*

Поступила в редакцию 15.05.2021

После доработки 16.06.2021

Принята к публикации 16.06.2021

Факторы терминации первого класса (RF1 и RF2) распознают стоп-кодона в последовательностях матричных РНК и необходимы для гидролиза сложноэфирной связи пептидил-тРНК в Р-сайте рибосомы на завершающем этапе биосинтеза белка у бактерий, в результате чего готовый белок выходит из рибосомы. Ключевую роль в данной реакции высвобождения готового полипептида играет высококонсервативный мотив GGQ в аминокислотной последовательности этих факторов, некоторые мутации которого значительно понижают скорость гидролиза или даже полностью ингибируют его. Ранее было высказано предположение, что аминокислоты GGQ-фрагмента непосредственно координируют молекулу воды, которая располагается вблизи карбонильной группы пептидил-тРНК и непосредственно участвует в гидролизе сложноэфирной связи. Однако имеющиеся структуры терминационных комплексов бактериальной рибосомы не позволяют идентифицировать молекулу воды в активном центре рибосомы и определить точное расположение сложноэфирной связи пептидил-тРНК относительно GGQ и, следовательно, выяснить детальный механизм реакции, равно как и роль этой последовательности. Данный обзор суммирует опубликованные данные, а также высказанные ранее гипотезы о роли GGQ в реакции гидролиза пептидил-тРНК. Кроме того, в настоящей работе рассмотрены основные причины, препятствующие получению структурных данных высокого разрешения, необходимых для выяснения детального механизма катализа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: факторы терминации трансляции, рибосома, 70S, пептидил-тРНК, гидролиз, структурный анализ.

DOI: 10.31857/S0320972521090074

ВВЕДЕНИЕ

Для фундаментального понимания функционирования рибосомы необходимо знание детальных структур всех компонентов биосинтеза белка и понимание их взаимодействия на атомном уровне. Терминация трансляции является заключительной стадией биосинтеза белка в клетке, в основе которой лежит гидролиз сложноэфирной связи пептидил-тРНК в Р-сайте рибосомы с последующим высвобождением полипептидной цепи и деацелированной тРНК из рибосомы. Данный процесс катализируется факторами терминации первого класса (RF, release factor), которых у бактерий два – RF1 и RF2. Данные белки состоят из примерно 350–360 аминокислотных остатков и обладают молекулярной массой около 40 кДа [1–3]. Терминационный фактор RF1 распознает стоп-ко-

доны UAA и UAG, в то время как RF2 специфичен в отношении стоп-кодонов UAA и UGA [3]. Оба фактора терминации, RF1 и RF2, состоят из четырёх доменов и, связываясь в А-сайте рибосомы, по форме имитируют молекулу тРНК (рис. 1, *a* и *b*). За распознавание стоп-кодона отвечают сближенные друг с другом домены II и IV (рис. 1, *c*) [4, 5], в то время как в гидролизе пептидил-тРНК участвует домен III, содержащий высококонсервативный мотив GGQ (Gly-Gly-Gln) (рис. 1, *c*) [6–9]. Домен I терминационных факторов RF1 и RF2 (рис. 1, *c*) необходим для взаимодействия с терминационным фактором второго класса, RF3, который способствует высвобождению RF1/2 из рибосомы после реакции гидролиза [10, 11].

В то время как механизм распознавания стоп-кодонов факторами терминации первого класса детально изучен, роль данных факторов в каталитическом механизме гидролиза сложноэфирной связи пептидил-тРНК до сих пор остается невыясненной. Многочисленные исследования выявили критическую роль консерватив-

Принятые сокращения: ПТЦ – пептидилтрансферный центр; RF – фактор терминации.

* Адресат для корреспонденции.

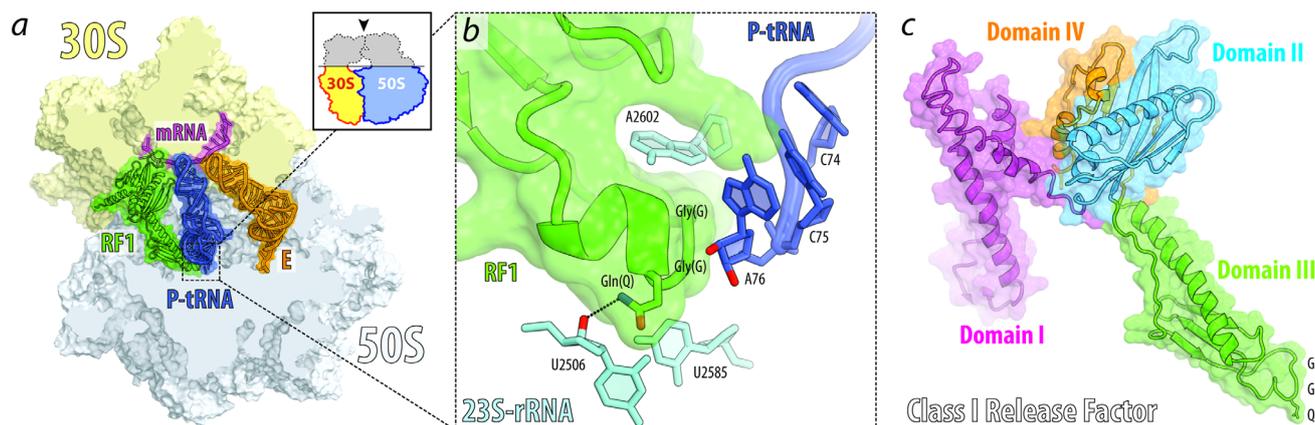


Рис. 1. Структура пост-терминационного комплекса 70S-рибосомы (*a* и *b*) и доменная организация терминационного фактора (*c*). Малая субъединица рибосомы (30S) показана светло-жёлтым, большая субъединица – голубым, мРНК – фиолетовым, терминационный фактор RF1 – зеленым, деацелированные тРНК в Р- и Е-сайтах – синим и оранжевым соответственно. Нумерация нуклеотидов 23S рРНК указана для *Escherichia coli*. Структура взята из Protein Data Bank (accession code 4V63 [5])

ной аминокислотной GGQ-последовательности факторов терминации первого класса в гидролизе пептидил-тРНК (рис. 1, *b*). При этом GGQ-мотив имеется у терминационных факторов первого класса не только бактерий [12], но и эукариот, включая человека [6, 13]. Однако, несмотря на обилие опубликованных структур факторов терминации в комплексе с бактериальной рибосомой, определить точное положение каталитической молекулы воды в активном центре, а также роль GGQ в этом процессе пока не удалось [4, 5, 14–19]. Более того, расположение сложноэфирной связи пептидил-тРНК относительно фрагмента GGQ в пептидилтрансферазном центре (ПТЦ) рибосомы также не известно. Предложен ряд гипотез, объясняющих механизм гидролиза сложноэфирной связи, и вклад GGQ-мотива факторов терминации в этот процесс. Данная работа посвящена краткому обзору известных гипотез, а также спектру задач, сопряжённых с изучением этой фундаментальной проблемы.

ВАЖНОСТЬ ФРАГМЕНТА GGQ В ГИДРОЛИЗЕ ПЕПТИДИЛ-тРНК

Высококонсервативная и функционально значимая последовательность GGQ расположена в факторах терминации RF1/2 в неструктурированной петле домена 3, которая обращена к ПТЦ и 3'-концу молекулы тРНК в Р-сайте (рис. 1, *b*) [20, 21]. Боковая цепь остатка глутамина в этой последовательности метилирована по атому азота специфичной для факторов терминации метилтрансферазой PrmC/HemK

[22–24]. При этом, с одной стороны, отсутствие метилирования остатка глутамина GGQ либо не снижает активности терминационных факторов, как у RF1 из *Escherichia coli*, либо незначительно снижает скорость, как у RF2 [23]. С другой стороны, метилирование глутамина GGQ примерно на 2 порядка ускоряет высвобождение синтезированных пептидов, связанных с тРНК через остаток глицина или пролина [18]. Кроме того, скорость гидролиза пептидил-тРНК существенно (на 4 порядка) снижается только при замене данного остатка на аспарагин (GGN), аспарагиновую кислоту (GGD) или пролин (GGP), в то время как все остальные замены оказывают незначительный эффект (в пределах одного порядка) [9]. В случае замены одного из остатков глицина в GGQ на другие аминокислоты скорость реакции существенно падает (примерно на 4 порядка), что свидетельствует о важной роли этих аминокислот в катализе [9]. Очевидно, за счёт расположения в гибкой петле остатка глицина формируют уникальную конформацию, которая, скорее всего, невозможна для других аминокислот.

Изначально была высказана гипотеза о том, что боковая цепь остатка глутамина в GGQ координирует каталитически активную молекулу воды вблизи от сложноэфирной связи пептидил-тРНК [14], тем самым ускоряя и контролируя процесс гидролиза. Однако имеющиеся структурные данные не подтверждают эту гипотезу. Более того, боковая цепь остатка глутамина в имеющихся структурах направлена в сторону от реакционного центра и, следовательно, физически не может участвовать в координации каталитической молекулы воды. Присутствие в

терминационном комплексе конкурентного нуклеофила гидросиламина подтверждает гипотезу, что N⁵-метилглутамин не участвует в катализе напрямую, а лишь является своеобразным фильтром, не позволяющим попасть в реакционный центр никаким нуклеофилам, кроме воды [9]. Этим же эффектом можно объяснить сохраняющуюся каталитическую активность у таких разных мутантов RF1/RF2, как GGF, GGK и GGW.

Исключив участие боковой цепи глутамина непосредственно в катализе гидролиза пептидил-тРНК, возникает вопрос об её иной возможной роли. В связи с этим было высказано предположение, что атом азота пептидной связи между остатками глицина и глутамина в GGQ играет в катализе ключевую роль, стабилизируя короткоживущий оксианион переходного состояния путём образования с ним водородной связи [5]. Это предположение косвенно подтверждается результатами экспериментов, показывающих, что мутантный вариант RF2 из *E. coli*, содержащий изменённую аминокислотную последовательность GGP, не обладает каталитической активностью, но при этом связывается с 70S-рибосомой аналогично нативному RF2 [17]. Очевидно, что азот главной цепи остатка пролина, не будучи донором водородной связи, не способен стабилизировать оксианион, и поэтому не может катализировать гидролиз пептидил-тРНК [15]. Однако ни одна из опубликованных работ не может объяснить практически полное отсутствие активности терминационных факторов при замене остатка глутамина в GGQ на химически сходный аспарагин (GGN) или аспарагиновую кислоту (GGD). Ответ на этот важный для понимания каталитического механизма терминации вопрос могли

бы дать до сих пор отсутствующие структуры высокого разрешения рибосомы в комплексе с пептидил-тРНК и нормальными или мутантными факторами терминации.

ОКРУЖЕНИЕ РЕАКЦИОННОГО ЦЕНТРА

Каталитический центр рибосомы (ПТЦ) катализирует две химические реакции — транспептидацию и гидролиз пептидил-тРНК, которые, по сути, очень похожи и различаются только участвующими в реакции нуклеофилами (рис. 2). При транспептидации нуклеофилом является аминогруппа аминоксил-тРНК, локализованной в А-сайте, которая осуществляет нуклеофильную атаку на углерод карбонильной группы пептидил-тРНК в Р-сайте, что приводит к образованию новой пептидной связи между азотом аминогруппы и углеродом карбонильной группы и переходу растущей полипептидной цепи на остаток новой аминокислоты в А-сайте (рис. 2, а) [25–27]. Таким образом, реакция транспептидации является аминолизом, который отличается от реакции гидролиза пептидил-тРНК только нуклеофилом, которым в случае гидролиза является молекула воды (рис. 2, б) [28]. По сравнению с аминогруппой приходящей аминоксил-тРНК молекула воды является значительно более слабым нуклеофилом и, следовательно, требует «активации», что создаёт необходимость правильного молекулярного окружения для эффективного протекания реакции гидролиза. Ранее высказанное предположение, что именно боковая цепь глутамина в GGQ активирует молекулу воды [14], не подтверждается структурными и биохимическими данными [9]. Необходимо подчеркнуть, что, кроме факторов

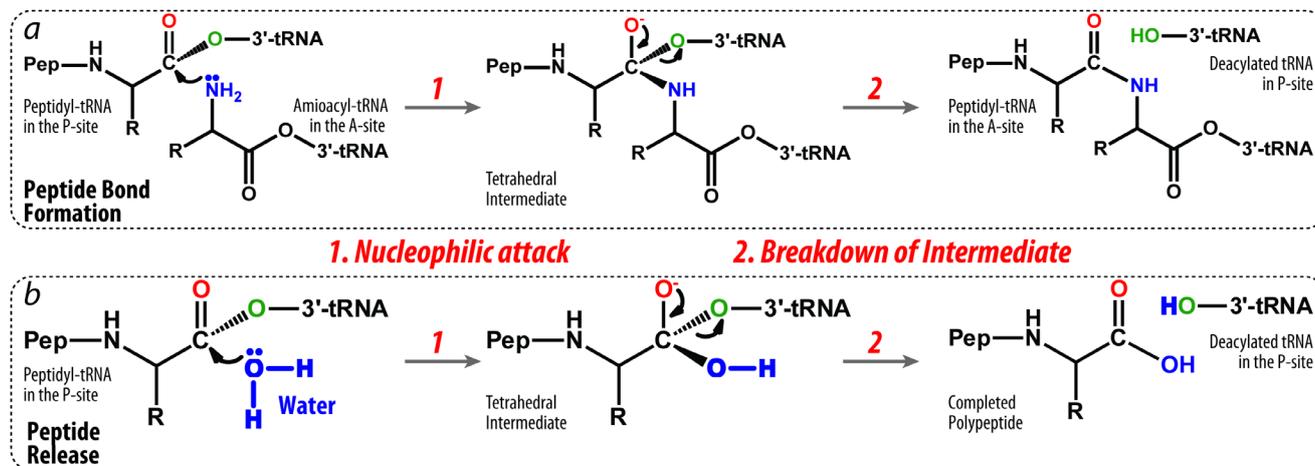


Рис. 2. Сравнение механизмов реакции транспептидации (а) и гидролиза пептидил-тРНК (б)

терминации первого класса, важную роль в реакции гидролиза пептидил-тРНК играют нуклеотиды C2063, A2451, U2506, U2585, A2602, входящие в состав 23S рРНК [29, 30], а также 2'-гидроксил последнего нуклеотида A76 в пептидил-тРНК [28, 31]. Мутации этих нуклеотидов рРНК, а также отсутствие 2'-гидроксила на A76 пептидил-тРНК свидетельствуют о том, что нуклеотид A2602, а также 2'-ОН A76 пептидил-тРНК являются ключевыми участниками реакции терминации, без которых процесс не протекает совсем. Интересно, что мутация A2602C специфически подавляет только гидролиз сложноэфирной связи, но не реакцию транспептидации (аминолиз) [30]. Данные факты позволяют предположить, что нуклеотид A2602, а также 2'-ОН пептидил-тРНК наравне с GGQ, скорее всего, формируют микроокружение карбонильной группы пептидил-тРНК, внутри которого возможно нахождение каталитической молекулы воды.

НЕДОСТАТКИ ПРЕДЫДУЩИХ РАБОТ

В настоящий момент существуют две ключевые проблемы, препятствующие использованию опубликованных структур терминационных факторов RF1/2 в комплексе с 70S-рибосомой для детального анализа механизма гидролиза пептидил-тРНК. Во-первых, подавляющее большинство имеющихся структур содержат деацилированную тРНК в Р-сайте и, таким образом, представляют собой пост-терминационные комплексы, в которых реакция гидролиза пептидил-тРНК уже произошла [4, 5, 14–18]. Не удивительно, что в таких структурах не удалось обнаружить каталитическую молекулу воды, поскольку она является одним из участников реакции, а не её продуктом (рис. 2). Более того, имеющиеся структуры рибосомных комплексов, содержащих только один продукт реакции (деацилированную тРНК в Р-сайте), априори не могут предоставить информацию о роли GGQ в механизме катализа за счёт возможных изменений пространственного расположения участвующих элементов до и после реакции. Кроме того, спонтанный гидролиз сложноэфирной связи за время роста рибосомных кристаллов (1–2 недели) делает невозможным использование нативных аминокислот- либо пептидил-тРНК в качестве субстратов для рибосомного Р-сайта при получении пре-терминационных комплексов. Данная проблема может быть решена за счёт замены нативной пептидил-тРНК на модифицированную пептидил-тРНК, в которой сложноэфирная связь заменена амид-

ной, не гидролизуемой в условиях, используемых для кристаллизации рибосом [26, 27, 32]. Использование таких пре-терминационных комплексов рибосомы для рентгеноструктурного анализа позволило бы локализовать точное расположение пептидил-тРНК и её молекулярное окружение, а также зафиксировать ПТЦ непосредственно перед началом реакции гидролиза и, вероятно, понять механизм запуска данной реакции.

Второй важной проблемой является низкое разрешение всех опубликованных на сегодняшний день структур терминационных комплексов (3–5 Å), не позволяющее однозначно определить ориентацию субстратов или продуктов реакции терминации относительно друг друга [4, 5, 14–19]. Увидеть координированные молекулы воды при таком разрешении крайне сложно. Поэтому для понимания взаимного расположения карбонильной группы и атакующей её молекулы воды необходимы структуры с высоким разрешением 2,5–2,7 Å, которые не только позволили бы визуализировать молекулы воды в активном центре, но также существенно расширили бы наши представления о роли GGQ в гидролизе пептидил-тРНК.

Единственная структура пре-терминационного комплекса с негидролизуемым аналогом аминокислот-тРНК в Р-сайте, полученная более 10 лет назад методом рентгеноструктурного анализа [19], потенциально могла бы прояснить взаимные ориентации субстратов реакции в ПТЦ. Однако невысокое разрешение данной структуры (3,1 Å) и, что более важно, плохое качество электронной плотности не позволяют сделать однозначные выводы (рис. 3) [19]. Серьезным недостатком данной работы является то, что авторы смоделировали карбонильную группу пептидил-тРНК не на основе экспериментально полученной карты электронной плотности, а на основе предположения о том, что эта группа должна быть расположена так же, как и при реакции транспептидации, а каталитическая молекула воды должна располагаться в той же точке, что и атакующий её амин, аминокислот-тРНК. Несмотря на всю логичность подобного предположения, никаких экспериментальных данных, указывающих на его правильность, до сих пор не получено. Поэтому, вполне возможно, что карбонильная группа и атакующая её молекула воды при терминации располагаются в ПТЦ совсем не так, как карбонил и атакующий амин при транспептидации. Таким образом, получение структуры сходного комплекса с улучшенной картой электронной плотности при более высоком разрешении (как минимум 2,7 Å) позволило бы явным и единственно верным об-

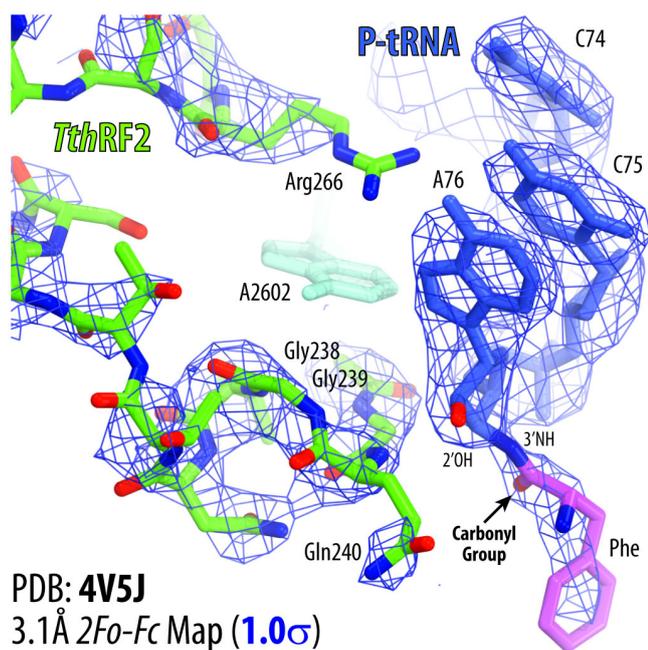


Рис. 3. Карта электронной плотности пре-терминационного комплекса 70S-рибосомы [19]

разом определить взаимное расположение всех участников реакции (прежде всего, карбонильной группы) и подтвердить или опровергнуть данную гипотезу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то, что до сих пор не существует чёткого понимания того, как именно протекает гидролиз сложноэфирной связи пептидил-тРНК во время терминации трансляции, очевидны основные направления дальнейших ис-

следований для решения этой проблемы. В первую очередь необходимо получить структуры пре-терминационных комплексов рибосомы с высоким разрешением (не менее 2,5–2,7 Å) для детального понимания локализации каталитической молекулы воды относительно карбонильной группы пептидил-тРНК непосредственно перед началом реакции гидролиза. Подобная структура также позволила бы ответить на вопрос о том, участвует ли GGQ в координации молекулы воды или данный элемент нужен только для надежного закоривания терминационных факторов в А-сайте рибосомы. Дополнительная информация о роли N⁵-метилглутамина GGQ в терминации может быть получена из структур высокого разрешения 70S-рибосомы в комплексе с неактивными мутантами терминационных факторов, в частности GGN и GGD. Также необходимо обосновать на структурном уровне полученные ранее биохимические данные о роли N⁵-метильной группы глутамина GGQ в гидролизе сложноэфирной связи [18]. Таким образом, получение структур физиологически значимых функциональных пре-терминационных комплексов рибосомы с высоким (вблизи атомного) разрешением позволит ответить на большинство нерешённых вопросов, связанных с терминацией биосинтеза белка в живых организмах.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Illinois State Start-up Funds, а также National Science Foundation.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Capecchi, M. R. (1967) Polypeptide chain termination *in vitro*: isolation of a release factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **58**, 1144-1151, doi: 10.1073/pnas.58.3.1144.
2. Capecchi, M. R., and Klein, H. A. (1969) Characterization of three proteins involved in polypeptide chain termination, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **34**, 469-477, doi: 10.1101/sqb.1969.034.01.053.
3. Scolnick, E., Tompkins, R., Caskey, T., and Nirenberg, M. (1968) Release factors differing in specificity for terminator codons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **61**, 768-774.
4. Petry, S., Brodersen, D. E., Murphy, F. V., Dunham, C. M., Selmer, M., et al. (2005) Crystal structures of the ribosome in complex with release factors RF1 and RF2 bound to a cognate stop codon, *Cell*, **123**, 1255-1266, doi: 10.1016/j.cell.2005.09.039.
5. Laurberg, M., Asahara, H., Korostelev, A., Zhu, J., Trakhanov, S., and Noller, H. F. (2008) Structural basis for translation termination on the 70S ribosome, *Nature*, **454**, 852-857, doi: 10.1038/nature07115.
6. Frolova, L. Y., Tsivkovskii, R. Y., Sivolobova, G. F., Oparina, N. Y., Serpinsky, O. I., et al. (1999) Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis, *RNA*, **5**, 1014-1020.
7. Seit-Nebi, A., Frolova, L., Justesen, J., and Kisselev, L. (2001) Class-1 translation termination factors: invariant GGQ minidomain is essential for release activity and ribosome binding but not for stop codon recognition, *Nucleic Acids Res.*, **29**, 3982-3987.

8. Mora, L., Heurgue-Hamard, V., Champ, S., Ehrenberg, M., Kisselev, L. L., and Buckingham, R. H. (2003) The essential role of the invariant GGQ motif in the function and stability *in vivo* of bacterial release factors RF1 and RF2, *Mol. Microbiol.*, **47**, 267-275.
9. Shaw, J. J., and Green, R. (2007) Two distinct components of release factor function uncovered by nucleophile partitioning analysis, *Mol. Cell*, **28**, 458-467, doi: 10.1016/j.molcel.2007.09.007.
10. Freistroffer, D. V., Pavlov, M. Y., MacDougall, J., Buckingham, R. H., and Ehrenberg, M. (1997) Release factor RF3 in *E. coli* accelerates the dissociation of release factors RF1 and RF2 from the ribosome in a GTP-dependent manner, *EMBO J.*, **16**, 4126-4133, doi: 10.1093/emboj/16.13.4126.
11. Zavialov, A. V., Buckingham, R. H., and Ehrenberg, M. (2001) A posttermination ribosomal complex is the guanine nucleotide exchange factor for peptide release factor RF3, *Cell*, **107**, 115-124, doi: 10.1016/s0092-8674(01)00508-6.
12. Baranov, P. V., Vestergaard, B., Hamelryck, T., Gesteland, R. F., Nyborg, J., and Atkins, J. F. (2006) Diverse bacterial genomes encode an operon of two genes, one of which is an unusual class-I release factor that potentially recognizes atypical mRNA signals other than normal stop codons, *Biol. Direct.*, **1**, 28, doi: 10.1186/1745-6150-1-28.
13. Heurgue-Hamard, V., Champ, S., Mora, L., Merkulova-Rainon, T., Kisselev, L. L., and Buckingham, R. H. (2005) The glutamine residue of the conserved GGQ motif in *Saccharomyces cerevisiae* release factor eRF1 is methylated by the product of the *YDR140w* gene, *J. Biol. Chem.*, **280**, 2439-2445, doi: 10.1074/jbc.M407252200.
14. Weixlbaumer, A., Jin, H., Neubauer, C., Voorhees, R. M., Petry, S., et al. (2008) Insights into translational termination from the structure of RF2 bound to the ribosome, *Science*, **322**, 953-956, doi: 10.1126/science.1164840.
15. Korostelev, A., Asahara, H., Lancaster, L., Laurberg, M., Hirschi, A., et al. (2008) Crystal structure of a translation termination complex formed with release factor RF2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 19684-19689, doi: 10.1073/pnas.0810953105.
16. Korostelev, A., Zhu, J., Asahara, H., and Noller, H. F. (2010) Recognition of the amber UAG stop codon by release factor RF1, *EMBO J.*, **29**, 2577-2585, doi: 10.1038/emboj.2010.139.
17. Santos, N., Zhu, J., Donohue, J. P., Korostelev, A. A., and Noller, H. F. (2013) Crystal structure of the 70S ribosome bound with the Q253P mutant form of release factor RF2, *Structure*, **21**, 1258-1263, doi: 10.1016/j.str.2013.04.028.
18. Pierson, W. E., Hoffer, E. D., Keedy, H. E., Simms, C. L., Dunham, C. M., and Zaher, H. S. (2016) Uniformity of peptide release is maintained by methylation of release factors, *Cell Rep.*, **17**, 11-18, doi: 10.1016/j.celrep.2016.08.085.
19. Jin, H., Kelley, A. C., Loakes, D., and Ramakrishnan, V. (2010) Structure of the 70S ribosome bound to release factor 2 and a substrate analog provides insights into catalysis of peptide release, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 8593-8598, doi: 10.1073/pnas.1003995107.
20. Rawat, U. B., Zavialov, A. V., Sengupta, J., Valle, M., Grassucci, R. A., et al. (2003) A cryo-electron microscopic study of ribosome-bound termination factor RF2, *Nature*, **421**, 87-90, doi: 10.1038/nature01224.
21. Rawat, U., Gao, H., Zavialov, A., Gursky, R., Ehrenberg, M., and Frank, J. (2006) Interactions of the release factor RF1 with the ribosome as revealed by cryo-EM, *J. Mol. Biol.*, **357**, 1144-1153, doi: 10.1016/j.jmb.2006.01.038.
22. Graille, M., Heurgue-Hamard, V., Champ, S., Mora, L., Scrima, N., et al. (2005) Molecular basis for bacterial class I release factor methylation by PrmC, *Mol. Cell*, **20**, 917-927, doi: 10.1016/j.molcel.2005.10.025.
23. Dincbas-Renqvist, V., Engstrom, A., Mora, L., Heurgue-Hamard, V., Buckingham, R., and Ehrenberg, M. (2000) A post-translational modification in the GGQ motif of RF2 from *Escherichia coli* stimulates termination of translation, *EMBO J.*, **19**, 6900-6907, doi: 10.1093/emboj/19.24.6900.
24. Heurgue-Hamard, V., Champ, S., Engstrom, A., Ehrenberg, M., and Buckingham, R. H. (2002) The *hemK* gene in *Escherichia coli* encodes the N(5)-glutamine methyltransferase that modifies peptide release factors, *EMBO J.*, **21**, 769-778, doi: 10.1093/emboj/21.4.769.
25. Schmeing, T. M., Huang, K. S., Strobel, S. A., and Steitz, T. A. (2005) An induced-fit mechanism to promote peptide bond formation and exclude hydrolysis of peptidyl-tRNA, *Nature*, **438**, 520-524, doi: 10.1038/nature04152.
26. Polikanov, Y. S., Steitz, T. A., and Innis, C. A. (2014) A proton wire to couple aminoacyl-tRNA accommodation and peptide-bond formation on the ribosome, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **21**, 787-793, doi: 10.1038/nsmb.2871.
27. Svetlov, M. S., Syroegin, E. A., Aleksandrova, E. V., Atkinson, G. C., Gregory, S. T., et al. (2021) Structure of Erm-modified 70S ribosome reveals the mechanism of macrolide resistance, *Nat. Chem. Biol.*, **17**, 412-420, doi: 10.1038/s41589-020-00715-0.
28. Brunelle, J. L., Shaw, J. J., Youngman, E. M., and Green, R. (2008) Peptide release on the ribosome depends critically on the 2'-OH of the peptidyl-tRNA substrate, *RNA*, **14**, 1526-1531, doi: 10.1261/rna.1057908.
29. Youngman, E. M., Brunelle, J. L., Kochaniak, A. B., and Green, R. (2004) The active site of the ribosome is composed of two layers of conserved nucleotides with distinct roles in peptide bond formation and peptide release, *Cell*, **117**, 589-599.
30. Polacek, N., Gomez, M. J., Ito, K., Xiong, L., Nakamura, Y., and Mankin, A. (2003) The critical role of the universally conserved A2602 of 23S ribosomal RNA in the release of the nascent peptide during translation termination, *Mol. Cell*, **11**, 103-112.
31. Zaher, H. S., Shaw, J. J., Strobel, S. A., and Green, R. (2011) The 2'-OH group of the peptidyl-tRNA stabilizes an active conformation of the ribosomal PTC, *EMBO J.*, **30**, 2445-2453, doi: 10.1038/emboj.2011.142.
32. Gamper, H., and Hou, Y. M. (2018) tRNA 3'-amino-tailing for stable amino acid attachment, *RNA*, doi: 10.1261/rna.068015.118.

**THE ROLE OF RELEASE FACTORS IN HYDROLYSIS
OF ESTER BOND OF PEPTIDYL-tRNA****Mini-Review****S. M. Balasanyants, E. V. Aleksandrova, and Y. S. Polikanov****University of Illinois at Chicago, Department of Biological Sciences, College of Liberal Arts and Sciences,
Chicago, Illinois, 60607, USA; e-mail: yuryp@uic.edu*

Bacterial class I release factors (RFs) recognize stop codons in the sequences of mRNAs and are required for hydrolysis of the peptidyl-tRNA in the ribosomal P site during the final step of protein synthesis resulting in the release of the complete polypeptide chain from the ribosome. A key role in this process is played by the extremely conservative GGQ motif of the RFs. Various mutations of this element can either reduce the rate of hydrolysis or even completely inhibit it. Previously it was hypothesized that the amino acid residues of GGQ (especially the glutamine) are required for proper coordination of the water molecule for subsequent hydrolysis of the ester bond. However, the available structures of the 70S ribosome termination complexes do not allow to unambiguously identify the exact orientation of the carbonyl group of the peptidyl-tRNA relative to the GGQ, as well as the position of the catalytic water molecule in the PTC. This mini-review summarizes key facts and previously proposed hypotheses on the role of GGQ in the catalysis of peptide release and also discusses and suggests the future experiments that will produce high-quality structural data allowing us to decipher the exact mechanism of catalysis by RFs.

Keywords: release factors, ribosome, 70S, peptidyl-tRNA, hydrolysis, structural analysis

УДК 577.21

VPg ВИРУСА PVY И КЭП-СВЯЗЫВАЮЩИЕ ФАКТОРЫ СЕМЕЙСТВА eIF4E КАРТОФЕЛЯ: ИЗБИРАТЕЛЬНОСТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И ЕГО ПРЕДПОЛАГАЕМЫЙ МЕХАНИЗМ

© 2021 М.В. Лебедева^{1*}, Е.Ю. Никонова², А.А. Терентьев^{3,4,5},
В.В. Таранов¹, А.В. Бабаков¹, О.С. Никонов²

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии
Российской академии наук, 127550 Москва, Россия; электронная почта: marilistik@mail.ru

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка Российской академии наук,
142290 Пущино, Московская область, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химической физики
Российской академии наук, 142432 Черноголовка, Московская область, Россия

⁴ Научно-образовательный центр «Медицинская химия» Московского государственного
областного университета, 141014 Мытищи, Московская область, Россия

⁵ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет фундаментальной физико-химической инженерии, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 18.05.2021

После доработки 30.05.2021

Принята к публикации 31.05.2021

Вирус картофеля Y (PVY) является одним из наиболее распространенных и вредоносных растительных вирусов. Трансляция вирусной РНК начинается с взаимодействия белка VPg, ковалентно связанного с вирусной РНК и растительными кЭп-связывающими факторами инициации трансляции семейства eIF4E. С нарушением этого взаимодействия связан один из основных механизмов устойчивости растений к вирусу картофеля Y. В геноме картофеля (*Solanum tuberosum* L.) мультигеновое семейство факторов eIF4E представлено тремя генами – *eIF4E1*, *eIF4E2* и *eIF(iso)4E*. До настоящего времени было неизвестно, с какими именно факторами мультигеновое семейство и каким образом связывается вирусный белок. В представленной работе показано, что наиболее распространённый вариант VPg штамма NTN взаимодействует с изоформами картофеля eIF4E1 и eIF4E2, но не взаимодействует с eIF(iso)4E. Были сконструированы модели белков картофеля eIF4E1 и eIF4E2 и VPg вируса Y, на основании которых с использованием данных о природном полиморфизме аминокислотных последовательностей белка VPg было выдвинуто предположение о ключевой роли остатка R104 в узнавании кЭп-связывающих факторов картофеля. Получены мутантные формы белка VPg с заменами в этом положении и проверена их способность связываться с eIF4E картофеля. С использованием полученных экспериментальных и известных структурных данных построена теоретическая модель комплекса VPg с eIF4E2. Предложенная модель существенно отличается от известных ранее моделей комплексов VPg вируса Y с eIF4E и хорошо соответствует имеющимся биохимическим данным.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: eIF4E, вирус Y картофеля, VPg, инициация трансляции.

DOI: 10.31857/S0320972521090086

ВВЕДЕНИЕ

Вирус картофеля Y (PVY) входит в топ 10 самых экономически значимых растительных вирусов [1, 2]. Он распространён по всему миру и имеет широкий круг хозяев, включающий в себя, кроме картофеля, такие экономически важные культуры, как табак, томат и перец. Картофель подвержен воздействию вируса в наибольшей степени, это обусловлено, прежде всего, вегетативным способом его размножения, что приводит к накоплению вирусов в поколениях.

Как и у всех потивирусов, геном PVY состоит из полиаденилированной одноцепочечной (+) РНК, к 5'-концу которой ковалентно присоединён белок VPg (viral genome-linked protein). Одной из ключевых функций этого белка является взаимодействие с кЭп-связывающими факторами инициации трансляции семейства eIF4E растения-хозяина для начала синтеза вирусных белков. Взаимодействие VPg и eIF4E является необходимым условием развития вирусной инфекции [3]. Показано, что существуют варианты факторов eIF4E, которые способны связывать кЭп-структуру клеточных мРНК, но при этом не взаимодействуют с VPg вируса, причём для нарушения взаимодействия с вирусным белком за-

* Адресат для корреспонденции.

частую достаточно единичных аминокислотных замен в инициаторном факторе [4–6]. Если растение содержит только такие факторы инициации трансляции, то оно будет устойчивым к вирусу. Такая устойчивость является рецессивной, так как присутствие хотя бы одной формы фактора, поддерживающей трансляцию вируса, делает её неэффективной.

У многих растений семейства Solanaceae eIF4E представлен мультисемейством белков, включающим в себя несколько факторов: eIF4E1, eIF4E2, eIF(iso)4E [6–10]. Эти белки рассматриваются как изоформы, любая из которых может быть использована для инициации трансляции как мРНК клетки-хозяина, так и мРНК потивирусов. Показано, например, что при заражении перца (*Capsicum annuum* L.) вирусом картофеля Y инициация трансляции вирусной мРНК происходит при помощи только eIF4E1. Наличие в перце мутантных вариантов eIF4E1 с единичными аминокислотными заменами, нарушающими взаимодействие с VPg, оказалось достаточным для возникновения долговременной полевой устойчивости сортов перца к PVY [11]. В то же время для томата (*Solanum lycopersicum* L.) устойчивость к PVY достигалась только нокаутом генов, кодирующих оба фактора, eIF4E1 и eIF4E2 [12, 13]. Устойчивость может возникнуть и за счёт полного отсутствия одной изоформы eIF4E, как, например, в случае культурного табака (*Nicotiana tabacum* L.), у которого встречаются устойчивые к PVY сорта, не содержащие eIF4E1 [14]. Однако вирус Y может преодолевать устойчивость за счёт возникновения так называемых «resistance-breaking» мутаций в VPg. Эти мутации позволяют VPg либо восстанавливать взаимодействие с мутировавшим eIF4E1, либо начинать использовать другие белки этого мультисемейства [5, 15–17]. На настоящий момент для картофеля природная eIF4E-опосредованная устойчивость не обнаружена [18]. Исследование полиморфизма фактора eIF4E1 среди диких видов картофеля [19] позволило выявить лишь один вариант этого белка, неспособный взаимодействовать с VPg вируса Y. Сверхэкспрессия такого фактора в растениях замедляла развитие вирусной инфекции, но тем не менее была недостаточна для её подавления. Однако в нескольких работах была показана принципиальная возможность реализации eIF4E-опосредованной устойчивости для картофеля. Так, сверхэкспрессия в растениях картофеля аллелей перца *pvr1*² [10] и томата *pot1* [20], обеспечивающих устойчивость этих растений к PVY, приводила к возникновению устойчивости и у картофеля.

Обычно аллели, обеспечивающие устойчивость, отличаются от остальных небольшим ко-

личеством замен [3, 21, 22], что делает возможным использование современных методов геномного редактирования для получения устойчивых картофеля, несущих только «устойчивые» факторы eIF4E. Однако до сих пор неизвестно, какие факторы семейства eIF4E картофеля могут рекрутировать PVY и какие именно замены в белках eIF4E картофеля нарушат взаимодействие с VPg, не влияя при этом на взаимодействие фактора с кэп-структурой мРНК самого растения. Кристаллическая структура комплекса VPg и eIF4E картофеля, с помощью которой можно было бы предсказать такие замены в факторе, на данный момент отсутствует. Также отсутствуют структуры комплексов представителей факторов этого мультисемейства и белка VPg из каких-либо потивирусов. Одна из причин этого может заключаться в слабой упорядоченности вирусного белка. Долгое время считалось, что VPg не имеет упорядоченной структуры [23], поэтому может взаимодействовать с большим количеством вирусных и растительных белков [24]. Однако недавно было показано [25, 26], что VPg имеет неупорядоченные N- и C-концы, тогда как центральная его часть имеет глобулярную структуру. Более того, имеющиеся данные указывают на то, что узнавание происходит за счёт взаимодействия eIF4E именно со структурированной частью VPg. Кроме того, в ряде работ [25–29] было показано, что для узнавания и связывания eIF4E VPg использует механизм, аналогичный механизму связывания фактора с кэпированным 5'-концом мРНК, а сайты узнавания кэп-структуры и белка VPg на последовательности eIF4E перекрываются. Экспериментальные структуры факторов инициации трансляции мультисемейства eIF4E картофеля в настоящее время также отсутствуют. Имеются только две теоретические модели [25, 26], построенные на основе экспериментальных структур фактора инициации трансляции eIF4E человека и VPg PVY, которые тем не менее не позволяют достаточно полно интерпретировать все имеющиеся биохимические данные.

Целью данной работы являлось установить, с какими изоформами eIF4E картофеля взаимодействует VPg наиболее агрессивного и распространённого штамма вируса Y NTN, выявить критичные для этого взаимодействия аминокислотные остатки и дать структурную интерпретацию полученных данных, позволяющую лучше понять его механизм.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный и вирусный материал. Образец вируса Y был получен с растения картофеля с

симптомами заражения вирусом штамма NTN с полевой станции Тимирязевской академии от М.В. Поляковой. Растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта «Жуковский ранний» выращивали в теплице при 25 °С.

Последовательности VPg вируса Y разных штаммов для анализа консервативности этого белка были взяты из базы данных NCBI, как отдельные VPg, так и извлечённые из полных геномов PVY. Анализ полиморфизма аминокислотных последовательностей VPg проводился в программе Unipro UGENE [30].

Секвенирование генов факторов мультисемейства eIF4E картофеля и VPg PVY. Тотальную РНК выделяли из листьев картофеля с помощью реагента ExtractRNA («Евроген», Россия), согласно инструкции производителя. кДНК была получена с помощью набора для синтеза кДНК Mint («Евроген») с олиго(dT)-праймера, согласно инструкции производителя. Амплификацию кодирующей части генов eIF4E картофеля и VPg осуществляли с помощью праймеров («Синтол», Россия), последовательности которых приведены в таблице в Приложении. Полученные ПЦР-продукты клонировали в вектор pAL2-T («Евроген», Россия), согласно инструкции производителя. Для того чтобы выявить все аллели eIF4E картофеля и все варианты VPg было отсеквенировано в ЦКП «Биотехнология» (ВНИИСБ) по 15 клонов для каждого фактора и 5 клонов – для VPg.

Комплементация факторов eIF4E. Функциональность факторов eIF4E картофеля оценивали по их способности поддерживать рост дрожжей штамма Jo55 [cdc33-D LEU2 leu2 ura3 his3 trp1 ade2 (YCr33supex-h4E URA3)] [31], любезно предоставленного Dr. J.-L. Gallois, INRA. Мутация cdc33-D обозначает инактивированный эндогенный фактор eIF4E. Этот штамм способен расти за счёт наличия плазмиды YCr33supex-h4E URA3, несущей ген eIF4E человека, экспрессия которого регулируется промотором, который активируется галактозой и подавляется в присутствии глюкозы.

Кодирующие области генов факторов eIF4E (eIF4E1 – MT828879, eIF4E2 – MT828873, eIF(iso)4E – MT828876) картофеля были клонированы в созданный нами вектор pJo55 (<https://www.addgene.org/159623/>) под контроль глюкозо-зависимого промотора. Дрожжи штамма Jo55 трансформировали полученными векторами в присутствии PEG/LiAc [32]. Для анализа функциональности факторов дрожжи выращивали на среде Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids («Sigma-Aldrich», США) с добавлением всех аминокислот, кроме гистидина, содержащей 2% глюкозы при 20 °С в течение недели.

В качестве положительного контроля использовали плазмиду pJo55, несущую ген фактора eIF4E1 *S. annuum* L., а в качестве отрицательного – пустую плазмиду pJo55.

Анализ взаимодействия белков eIF4E картофеля и VPg PVY. Для анализа взаимодействия белков использовали систему дрожжевого двугибридного анализа Matchmaker GAL4 («Clontech», США). Гены изоформ факторов eIF4E картофеля были клонированы в плазмиду pGADT7 («Clontech», США) по сайтам рестрикции NdeI/SacI либо NdeI/Sall, а гены всех использованных в работе вариантов VPg – в плазмиду pGBKT7 («Clontech») по сайтам рестрикции Sall/PstI.

Точечные замены S101G, R104K, R104T, R104M, R104E в VPg вносили с помощью метода сайт-направленного мутагенеза с перекрывающимися праймерами («Синтол»), которые приведены в таблице в Приложении.

Дрожжи штамма PJ69-4A (*MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ Met2::GAL7-lacZ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2*) трансформировали полученными плазмидами в присутствии PEG/LiAc [32]. После трансформации дрожжи высевали на селективную среду («Clontech»), не содержащую лейцин и триптофан (-LW) и инкубировали при 30 °С. Выросшие колонии дрожжей проверяли на наличие плазмид с помощью ПЦР. Проверенные колонии пересевали на жидкую LW-среду и выращивали при 30 °С до оптической плотности 2 (OD₆₀₀). Далее дрожжи промывали стерильной деионизированной водой и раскапывали в чашках разведениях на чашки с селективными средами: LWN + 1мМ 3АТ (среда без лейцина, триптофана и гистидина, с добавлением 1 мМ 3-амино-1,2,4-триазола, подавляющего автоактивацию репортерного гена *HIS3*) и LWNA (среда без лейцина, триптофана, аденина и гистидина). В качестве отрицательного контроля использовали дрожжи, трансформированные «пустыми» плазмидами pGADT7 и pGBKT7. В качестве положительного контроля использовали комбинацию плазмид, несущих гены фактора инициации трансляции eIF4E1 *Nicotiana tabacum* L. и VPg-NTN. Чашки инкубировали при 20 °С в течение недели.

Для вариантов, которые показали факт качественного взаимодействия на твёрдых средах, силу взаимодействия белков оценивали количественно с помощью набора Gal-Screen System Galacton-Plus («Applied Biosystems», США) по протоколу для дрожжевых клеток. Этот подход основан на оценке способности фермента β-галактозидазы расщеплять субстрат (Gal-Screen Substrate, «Applied Biosystems»), что приводит к

его люминесценции. При этом количество β -галактозидазы в клетках дрожжей коррелирует с силой взаимодействия белков интереса [33].

Клетки, несущие плазмиды, наращивали при 20 °С в течение ночи. Далее измеряли оптическую плотность образцов и разводили их до концентрации ~75 000 клеток в 100 мкл. После этого добавляли подготовленный субстрат и измеряли изменение люминесценции в течение 90 мин с интервалом в минуту с помощью планшетного люцинометра Alpha Fusion («Perkin Elmer», США). Время измерения одного образца составляло 0,6 с. Каждый образец анализировали в четырёх повторах.

Вестерн-блот-анализ. Плазида pGADT7, в которую клонировали гены факторов eIF4E картофеля, включает в себя нуклеотидную последовательность эпитопа HA, а плазида pGBKT7, в которую клонировали гены VPg, — C-MYC. Таким образом, возможна проверка наличия и количества белков, взаимодействие которых анализируется, с помощью иммуноблоттинга с коммерческими антителами.

Для выделения белков образцы дрожжей, использованные в двугибридном анализе, выращивали при 20 °С до оптической плотности 1,5 (OD₆₀₀). Далее клетки осаждали, удаляли среду, добавляли равный объём 2× буфера Laemmli [34] и кипятили на водяной бане в течение 10 мин. С полученными образцами белков проводили ПААГ-электрофорез (концентрация разделяющего геля — 10%) в присутствии SDS по методу Laemmli [34] в камере Mini Protean II («BioRad», США). Белки перенесли на нейлоновую мембрану Hybond-C Extra («Amersham Bioscience», Великобритания) с помощью камеры Mini Trans-Blot Cell («BioRad»). После переноса мембрану блокировали в 5%-ном растворе БСА в буфере TBST (100 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20) в течение часа при комнатной температуре.

Для выявления факторов eIF4E картофеля использовали первичные поликлональные антитела кролика на эпитоп HA (1 : 5000, «Abcam», Великобритания). Для детекции выявления белков VPg использовали первичные моноклональные антитела мыши на эпитоп C-MYC (1 : 500, «SCI-STORE», Россия). Для детекции выявления референсного белка тубулина использовали первичные моноклональные антитела мыши (1 : 5000, «Cloud-Clone», США).

В качестве вторичных антител использовали поликлональные антитела козы против иммуноглобулинов кролика или мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (1 : 5000, «R&D Systems», США).

Антитела, связавшиеся с мембраной, детектировали с помощью смеси хемилюминесцентного субстрата, содержащего 100 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 1,25 мМ люминол, 6,8 мкМ р-кумаровую кислоту и 0,01% H₂O₂. Мембраны инкубировали в смеси в течение 1 мин при комнатной температуре и сканировали на приборе C-DiGit Blot Scanner («Li-Cor», США).

Конструирование модели eIF4E картофеля. Для получения стартовых моделей факторов инициации трансляции картофеля eIF4E1 и eIF4E2 был использован метод гомологичного моделирования, представленный на сервере swiss model [35]. Для более точной оценки возможной вариативности структуры были построены модели с использованием в качестве шаблона структур белков из различных организмов, а именно из дыни (*Cucumis melo*) (PDB-коды использованных структур: 5me5, 5me6, 5me7), пшеницы (*Triticum aestivum*) (PDB-коды использованных структур: 2idv, 2idr), человека (*Homo sapiens*) (PDB-коды использованных структур: 2w97, 3am7, 5ehc, 4tpw, 5t46), дрозофилы (*Drosophila melanogaster*) (PDB-код использованной структуры: 4axg), дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) (PDB-код использованной структуры: 1rf8). Сравнительный анализ и ручную правку моделей проводили в программе молекулярной графики COOT [36]. Множественные перекрестные наложения структур и их фрагментов с использованием метода наименьших квадратов и алгоритма SSM [37] показали, что пространственные структуры на уровне α -атомов во всех моделях, полученных на базе разных шаблонов, оказались очень похожи, что говорит о высокой структурной консервативности фактора eIF4E.

Аминокислотная последовательность факторов инициации трансляции картофеля наиболее близка к последовательности фактора дыни (81,3% идентичности для упорядоченной C-концевой части, содержащей 176 а.о.). В PDB банке eIF4E фактор дыни представлен тремя структурами, одна из которых (PDB id 5me6) содержит аналог кэп мРНК. Каждая структура представлена четырьмя молекулами в асимметричной части элементарной ячейки кристалла. Ни одна молекула не является абсолютно полной, однако они дополняют друг друга и использование их всех позволяет построить полную модель eIF4E2 картофеля.

В структурах фактора из дыни хуже всего представлена петля β 1- β 2, которая полностью видна только в молекуле C. В структуре eIF4E1 из пшеницы (76,0% идентичности по последовательности с eIF4E2 картофеля) эта петля представлена полностью, однако конформация

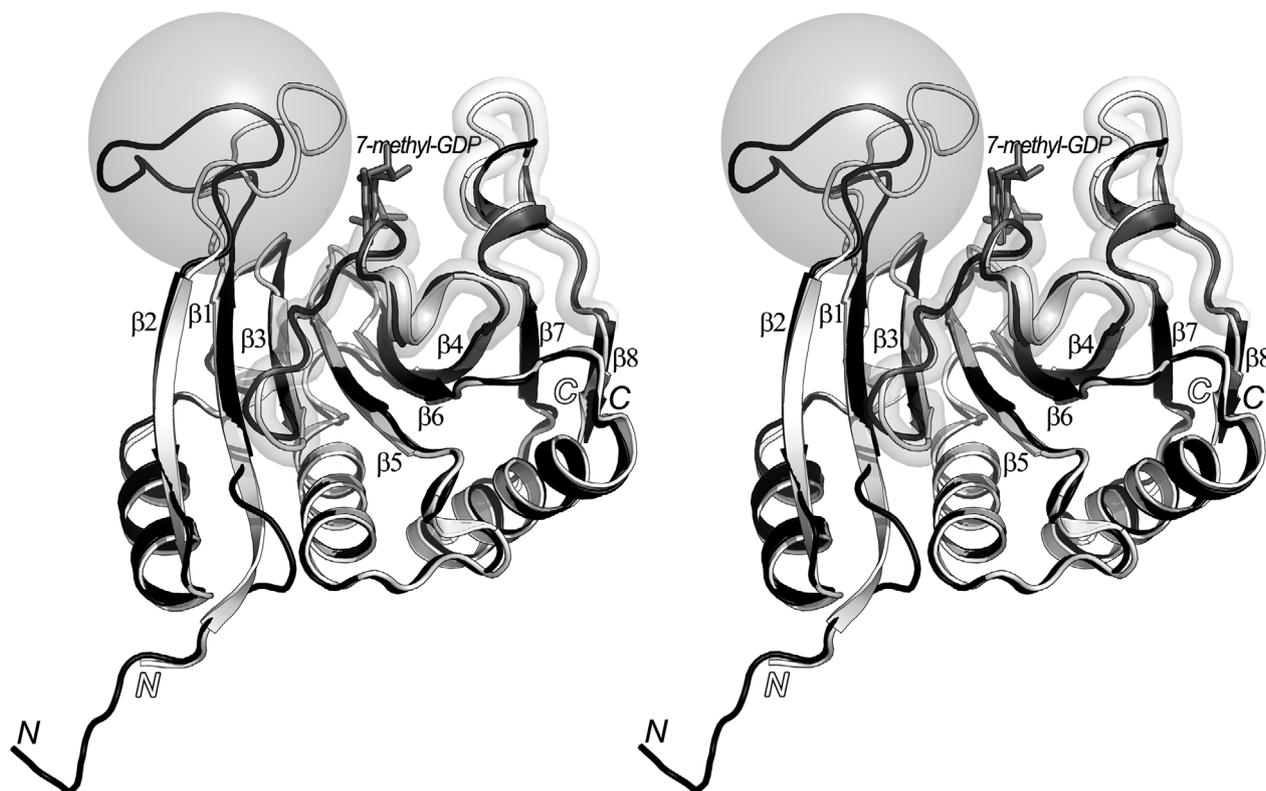


Рис. 1. Стереорезультат наложения структур фактора инициации трансляции eIF4E, соответствующих его открытой и закрытой конформациям

её значительно изменена в результате взаимодействия с кэпом. Структуры из дыни и пшеницы представляют два состояния молекулы eIF4E: открытое и закрытое. В свободном состоянии фактор находится в открытом состоянии, в связанном с лигандом — в закрытом (рис. 1).

Открытая конформация представлена структурой фактора из дыни (PDB ID 5ME6 [38], молекула С, выделено черным цветом), закрытая конформация представлена структурой фактора в комплексе с аналогом кэп (7-метил-ГДФ, показан серым) из пшеницы (PDB ID 2IDV [39], показана белым цветом). Положение петли $\beta 1$ – $\beta 2$, определяющее закрытую и открытую конформацию выделено полупрозрачной сферой. Положение шпилек $\beta 3$ – $\beta 4$ и $\beta 7$ – $\beta 8$ выделено полупрозрачной окантовкой. β -Тяжи промаркированы.

Участок $\beta 7$ – $\beta 8$ не принимает участия в связывании кэпа. Он виден полностью почти во всех представленных структурах, за исключением молекулы С в структурах из дыни. В исходной форме модели eIF4E2 из картофеля конформация этого участка соответствует молекуле А структуры 5me6. Конформация остальных частей молекулы eIF4E практически идентична

в структурах из дыни и пшеницы и в модели из картофеля VPg–eIF4E. Для проверки стабильности полученной модели, а также для выявления её конформационной подвижности она была подвергнута молекулярно-динамическому моделированию и уточнению. Наложение полученной модели на структуру фактора инициации трансляции eIF4E из дыни дает среднее квадратичное отклонение 0,722 Å для 136 C α -атомов.

Конструирование модели комплекса eIF4E2–VPg из картофеля. В основе нашей модели VPg в составе комплекса лежит экспериментальная структура этого белка, полученная методом ЯМР (PDB ID: bnfw). Полученная модель была укорочена с N- и C-концов и содержала а.о. 72–183. Таким образом, мы убрали из рассмотрения неструктурированные участки. Построение модели комплекса VPg–eIF4E производили вручную, исходя из предположения, что R104 VPg узнает остатки eIF4E, аналогичные тем, что узнает кэп, и завязывает аналогичные водородные связи. Конформация боковой цепи аргинина выбиралась так, чтобы избежать пересечений и близких контактов между молекулами. Построение модели осуществлялось

методами молекулярного моделирования с помощью программы Coot [36]. Исходная модель была подвергнута процедурам молекулярной динамики и уточнена на временном интервале 200 нс.

Уточнение моделей методами молекулярной динамики. Молекулярно-динамическое моделирование структур белка eIF4E2 и его комплекса с VPg PVY проведено в программном пакете Gromacs 2020.4 [40] с использованием силового поля Charmm36 [41]. Кислые остатки были депротонированы и несли заряд -1 , основные – протонированы и несли заряд $+1$. Водное окружение моделировалось с использованием трёхточечной модели воды CHARMM TIP3P (TIP3P). Общий заряд системы был нейтрализован за счёт добавления ионов Na^+ и Cl^- .

Минимизация энергии модели проводилась методом быстрого спуска. Система была уравновешена с достижением постоянной температуры 310 К и постоянного давления 1 бар, после чего была рассчитана молекулярно-динамическая траектория во временном интервале длиной 200 нс при данных постоянном давлении и температуре с шагом 2 фс. Для расчёта дальнедействующих электростатических взаимодействий применен алгоритм PME (Particle Mesh Ewald) [42]. Температура и давление контролировались с помощью масштабирования скоростей со стохастическим членом (модифицированный термостат Берендсена) и алгоритмом Парринелло–Рамана (баростат Парринел-

ло–Рамана) соответственно. Координаты сохранялись каждые 10 пс. Анализ молекулярно-динамических траекторий выполнен в программах Gromacs и Pymol (<https://www.pymol.org>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация и исследование функциональности факторов eIF4E картофеля. Известно, что в листьях картофеля экспрессируются гены трёх факторов инициации трансляции семейства eIF4E – eIF4E1, eIF4E2 (eIF4E1-like) и eIF(iso)4E (eIF4E2-like) [10]. Секвенирование кДНК изоформ eIF4E в сорте «Жуковский ранний» (номера последовательностей в базе данных NCBI, GenBank: eIF4E1 (MT828879, MT828880), eIF4E2 (MT828873, MT828874, MT828875), eIF(iso)4E (MT828876, MT828877, MT828878)) показало их высокую консервативность (выравнивание транслированных аминокислотных последовательностей показано на рис. S1–S3 в Приложении). Способность этих изоформ eIF4E иницировать трансляцию была проверена комплементацией роста дрожжей штамма Jo55 [31, 43]. Такая система позволяет *in vivo* оценить функциональность гена *eIF4E*, кодирующая область которого находится в плазмиде под контролем глюкозо-зависимого промотора. Комплементарный анализ показал, что все три изоформы eIF4E картофеля функционально активны (рис. 2).

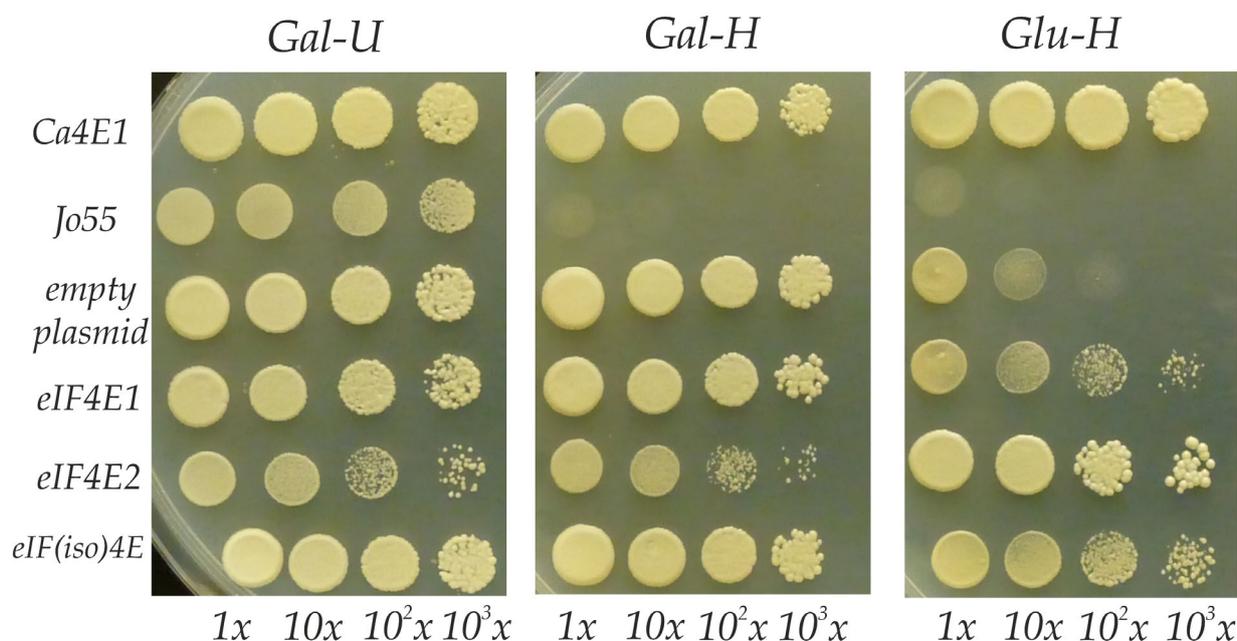


Рис. 2. Комплементация роста дрожжей штамма Jo55 за счёт экспрессии генов факторов инициации трансляции семейства eIF4E картофеля

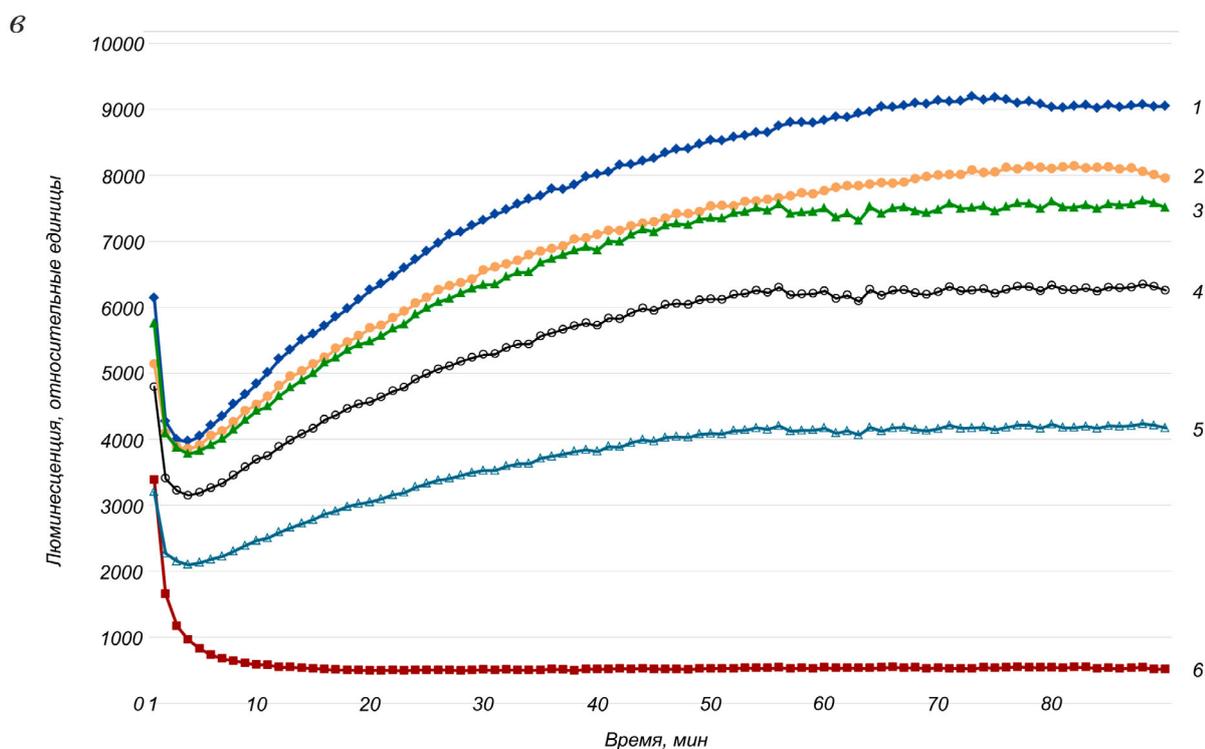
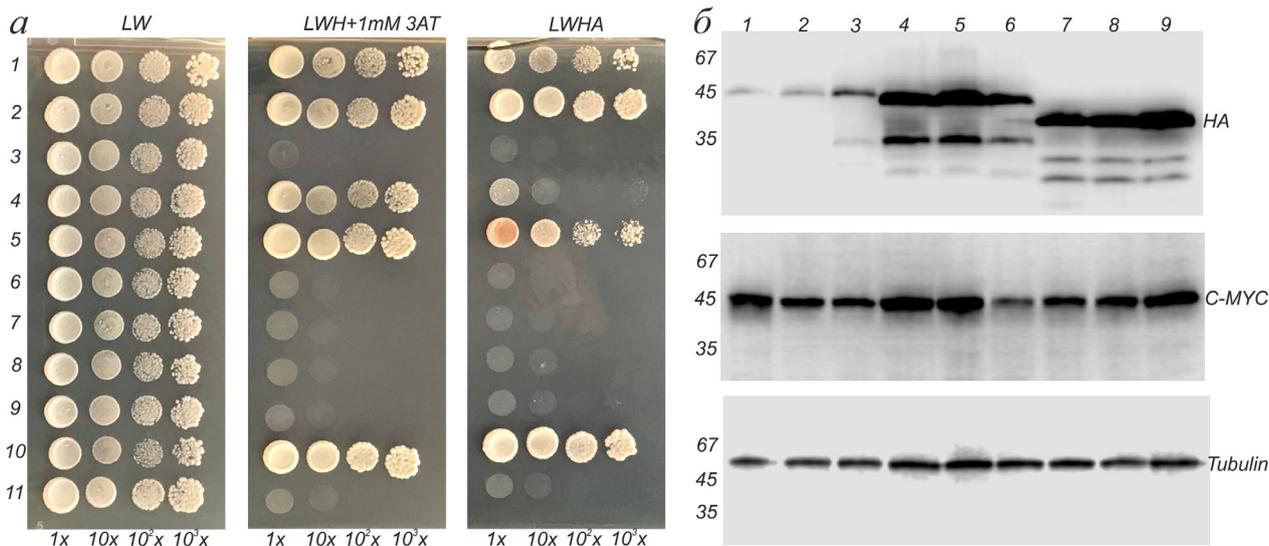


Рис. 3. Анализ взаимодействия белков eIF4E картофеля и VPg вируса Y штамма NTN. *a* – Анализ взаимодействия белков eIF4E картофеля и VPg PVY с помощью дрожжевой двугибридной системы. LW – среда без лейцина и триптофана. LWH + 1мМ 3АТ – среда без лейцина, триптофана и гистидина, с добавлением 1 мМ 3-амино-1,2,4-триазола, подавляющего автоактивацию репортерного гена *HIS3*. LWHА – среда без лейцина, триптофана, аденина и гистидина. 1 – eIF4E1 + VPg-base, 2 – eIF4E1 + VPg-S101G, 3 – eIF4E1 + VPg-R104K, 4 – eIF4E2 + VPg-base, 5 – eIF4E2 + VPg-S101G, 6 – eIF4E2 + VPg-R104K, 7 – eIF(iso)4E + VPg-base, 8 – eIF(iso)4E + VPg-S101G, 9 – eIF(iso)4E + VPg-R104K, 10 – положительный контроль (eIF4E1 *N. tabacum* + VPg-base), 11 – отрицательный контроль (пустые плазмиды pGADT7 и pGBKT7). *b* – Детекция в дрожжах белков eIF4E картофеля с помощью эпитопа HA и белка VPg с помощью эпитопа С-МУС. Образцы 1–9 соответствуют обозначению на панели (*a*). *в* – Количественный анализ взаимодействия белков eIF4E картофеля и VPg PVY с помощью оценки активности β-галактозидазы в дрожжевых клетках. Каждый образец анализировался в четырёх повторах. 1 – положительный контроль (eIF4E1 *N. tabacum* + VPg-base), среднее стандартное отклонение значений люминесценции – 110,91 ое; 2 – eIF4E1 + S101G, среднее стандартное отклонение значений люминесценции – 139,32 ое; 3 – eIF4E2 + S101G, среднее стандартное отклонение значений люминесценции – 213,47 ое; 4 – eIF4E1 + VPg-base, среднее стандартное отклонение значений люминесценции – 59,51 ое; 5 – eIF4E2 + VPg-base, среднее стандартное отклонение значений люминесценции – 174,2 ое; 6 – отрицательный контроль (пустые плазмиды pGADT7 и pGBKT7), среднее стандартное отклонение значений люминесценции – 19,22 ое

Анализ взаимодействия факторов eIF4E картофеля с белком VPg-NTN. Из базы данных NCBI была собрана выборка из 828 последовательностей белка VPg, 480 из которых были извлечены из полных геномов вирусов PVY. Примерно половина выборки – 418 вариантов – относится к VPg штамма NTN, который считается наиболее распространённым и вредоносным. Вариант VPg-NTN, наиболее часто встречающийся в выборке из 418 вариантов (более 50%), был принят как базовый, остальные, отличающиеся единичными аминокислотными заменами, были названы мутантными.

Анализ взаимодействия с базовым вариантом VPg штамма NTN показал, что в условиях дрожжевой двугибридной системы с ним взаимодействуют eIF4E1 и eIF4E2, но не eIF(iso)4E (рис. 3, а). Причём первый фактор (eIF4E1) взаимодействует лучше второго (eIF4E2), так как рост дрожжей наблюдается не только на среде с низкой степенью селективности – LWH, но и на среде с высокой селективностью – LWHА. Вестерн-анализ показал, что в клетках дрожжей при сравнительно одинаковом количестве белка VPg белка eIF4E1 существенно меньше, чем eIF4E2 и eIF(iso)4E (рис. 3, б). Возможно, по каким-то причинам белок eIF4E1 картофеля менее стабилен в клетках дрожжей. Однако, несмотря на меньшее количество eIF4E1, он взаимодействует лучше, что было подтверждено путём количественной оценки взаимодействия eIF4E1 и eIF4E2 с базовым вариантом VPg (рис. 3, в).

Вовлечённость двух изоформ eIF4E картофеля во взаимодействие с VPg PVY, показанная в данной работе, совпадает с аналогичными данными, полученными на томате, для которого методом интерференции [12] и с использованием нокаут-мутантов по генам eIF4E1 и eIF4E2 [13, 44] показано участие двух изоформ eIF4E в распространении PVY. Для некоторых других потивирусов также показана способность использовать несколько изоформ факторов eIF4E. Например, потивирус PVMV (Pepper veinal mottle virus) использует eIF4E1 и eIF(iso)4E для заражения перца, а eIF4E2 – для заражения томата [4, 45].

Конструирование модели комплекса eIF4E–VPg. Экспериментальная структурная информация о факторе инициации трансляции из картофеля в настоящее время отсутствует, но по аминокислотной последовательности он близок к факторам инициации трансляции из дыни и пшеницы, для которых такая информация доступна. Подробное описание построения модели фактора eIF4E из картофеля дано в разделе «Материалы и методы». Анализ полученных данных показывает, что, подобно структурам eIF4E из

дыни и пшеницы, фактор инициации из картофеля может быть в двух состояниях: открытом и закрытом, в зависимости от конформации петли $\beta 1$ – $\beta 2$ (рис. 1).

Структура VPg вируса картофеля Y определена методом ЯМР два года назад [25]. Ранее в ряде работ [25–29] было показано, что для узнавания и связывания eIF4E вирус использует механизм, аналогичный механизму, используемому при взаимодействии eIF4E с кэпом. Поэтому имеет смысл подробно рассмотреть структуру интерфейса eIF4E–кэп в соответствующем комплексе из дыни. На поверхности структуры eIF4E имеется глубокая впадина, образованная петлями $\beta 1$ – $\beta 2$, $\beta 3$ – $\beta 4$, $\beta 7$ – $\beta 8$ и торцевой частью β -листа (рис. 1). Во всех известных структурах фактора кэп мРНК размещается между вершинами петель $\beta 1$ – $\beta 2$, $\beta 3$ – $\beta 4$, $\beta 7$ – $\beta 8$. Фосфатный хвост кэпа направлен в сторону торца β -листа. Для узнавания eIF4E пуриновым основанием кэпа используются, по-видимому, рядом расположенные W128 и E129 (номенклатура eIF4E2 из дыни). Эти два остатка отвечают за стекинг-взаимодействие и формирование двух водородных связей межмолекулярного интерфейса. Оба остатка принадлежат петле $\beta 3$ – $\beta 4$, которая сохраняет свою конформацию во всех известных структурах, где на неё не оказывается дополнительного внешнего воздействия за счёт кристаллических контактов, как, например, происходит в случае структуры 5me5. Две другие петли, формирующие впадину, лабильны. В структурах eIF4E из дыни петля $\beta 1$ – $\beta 2$ либо отсутствует, либо отвернута в сторону. В последнем случае строго консервативный W82 направлен в растворитель, тогда как в других кэп-содержащих структурах (2idv, 3am7) он осуществляет стекинг-взаимодействие с основанием кэпа с другой стороны от W128, а петля $\beta 1$ – $\beta 2$ прикрывает кэп. Наложение модели eIF4E2 из картофеля на модель фактора из пшеницы показывает, что координаты остатков 53 и 73 и остатков 47 и 68 соответствующих факторов практически совпадают. Области 53–73 и 47–68 по последовательности идентичны на 76,2%. Это позволяет использовать данную область из структуры 2idv для построения закрытой конформации eIF4E2 картофеля. В этой модели, как и в кэп-содержащих структурах из других организмов, основание кэпа находится между триптофанами 114 и 68, а его атомы N1 и N2 образуют водородные связи с OE1 и OE2 E115. Кроме того, K64, R164 и K169 формируют H-связи с кислородами фосфатной части кэпа. Таким образом, лабильная петля $\beta 1$ – $\beta 2$ закрывает и стабилизирует кэп на поверхности eIF4E.

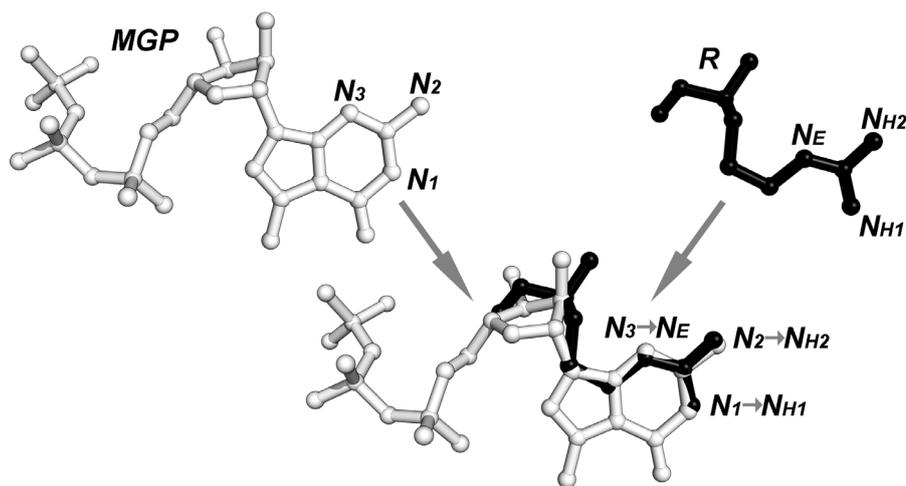


Рис. 4. Наложение 7-метил-гуанозин-5'-трифосфата (PDB ID: 5ABX) (аналог кэп структуры) на аминокислотный остаток аргинина. Боковая цепь аргинина может принять конформацию, повторяющую очертания гуанинового основания 7-метил-гуанозин-5'-трифосфата и позволяющую совместить положения узнающих атомов N1 и N2 аналога кэп и NH1 и NH2 атомов аргинина

Из всех аминокислотных остатков структуру кэпа лучше всего может имитировать аргинин (рис. 4). Этот остаток способен обеспечить стекинг-взаимодействие с триптофаном и две водородные связи с глутаминовой кислотой, подобно тому, как это делает кэп. Фрагмент VPg (88–120 а.о.), который связывается с eIF4E2 [26], содержит аргинин в положениях 94, 99 и 104. На основании данных модели комплекса VPg PVY с фактором eIF4E человека нами было сделано предположение, что роль аналога кэп-структуры играет аргинин VPg в положении 94. Поскольку остаток аргинина, имитирующий кэп, имеет ключевое значение для взаимодействия eIF4E с VPg, этот остаток должен быть строго консервативным. Однако анализ природного разнообразия последовательностей VPg PVY разных штаммов (всего 828 последовательностей) показал, что в существенной доле образцов (4,1%) на месте R94 находится G. Любопытно, что R99 был существенно более консервативен, но тем не менее встречалось несколько последовательностей с заменами в этой позиции. Тогда как R104 был строго консервативен во всех VPg разных штаммов PVY.

Для того чтобы исследовать, насколько присутствие остатка аргинина в положении 104 необходимо для связывания VPg с eIF4E картофеля, был получен вариант VPg, в котором R104 был заменён на лизин. Лизин обладает схожими химическими свойствами, однако со структурной точки зрения не может успешно выполнять функцию аналога кэпа. С помощью дрожжевого двугибридного анализа было установлено, что

мутантная форма VPg с заменой R104K полностью теряла способность взаимодействовать с обоими изоформами eIF4E1 и eIF4E2 картофеля (рис. 3, а). Аналогичный эффект наблюдался при замене аргинина 104 на треонин, глутаминовую кислоту и метионин (рис. S4 в Приложении).

Исходя из всех полученных нами данных, мы предположили, что R104 играет ту же роль в комплексе eIF4E–VPg, что и кэп в комплексе eIF4E–кэп. В стартовой модели VPg остаток R104 был ориентирован относительно eIF4E таким образом, чтобы его боковая цепь лежала в плоскости основания кэпа, а положения атомов NH1, NH2 и NE были близки к положению атомов N1, N2 и N3 кэпа, что позволяет аргинину сформировать две межмолекулярные водородные связи, имеющиеся в комплексах eIF4E–кэп. Стартовая модель eIF4E–VPg содержит eIF4E2 в открытой конформации и VPg, длинная спираль которого имеет направление PA–PB в структуре кэпа. Построенная структура комплекса уточнена методами молекулярной динамики во временном интервале 200 нс.

Комплекс eIF4E–VPg после MD симуляции и уточнения. Описание модели. Модель комплекса eIF4E2–VPg показана на рис. 5. Структура eIF4E из картофеля в целом близка к структуре этого фактора из дыни. Наложение друг на друга β -листов обеих структур даёт среднее квадратичное отклонение 0,97 Å для 54 C α -атомов. Значительные смещения отмечены в петлях β 4–

$\beta 2$, $\beta 7$ - $\beta 8$ и $\beta 1$ - $\beta 2$, причём последняя приобрела конформацию, соответствующую закрытому состоянию фактора eIF4E. Существенно большие изменения претерпела структура VPg, которая стала более компактной. В ней сохранился только β -лист, спирали $\alpha 1$ и $\alpha 2$ сблизилась и образовали шпильку, которой VPg внедрил в во впадину на поверхности eIF4E.

Межмолекулярный интерфейс включает область 95–122 и остатки 145 и 148 петли $\beta 3$ - $\beta 4$ VPg. Он содержит 13 водородных связей (таблица), в том числе связи R104 NH1–E115 OE1 и R104 NH2–E115 OE2, которые вместе со стекингом боковых цепей R104 VPg и W114 eIF4E (нумерация по eIF4E2 картофеля) обеспечивают узнавание фактора вирусом. Следует отметить, что строго консервативный W68 eIF4E в структурах, содержащих кэп, участвует в стекинг-взаимодействии с последним, формируя закрытое состояние фактора eIF4E. В модели комплекса eIF4E–VPg из картофеля он участвует в стекинг-взаимодействии с R99 VPg, что также приводит к закрытому состоянию eIF4E.

Влияние замены S101G на взаимодействие eIF4E и VPg в дрожжевой двугибридной системе. Значительная часть природных мутаций VPg располагается в регионе белка, участвующем во взаимодействии с eIF4E. Таким образом, аминокислотные замены в этой области могут влиять на это взаимодействие, усиливая или ослабляя его. Особый интерес представляют мутации, приводящие к преодолению устойчивости у разных растений («resistance-breaking» мутации). Анализ нашей модели показал, что замена S101G может приводить к усилению взаимодействия с eIF4E1 и eIF4E2 картофеля, поскольку исключает Н-связь R104–S101, затрудняющую узнавание фактора инициации трансляции. Выполненный нами анализ взаимодействия в дрожжевой двугибридной системе показал (рис. 3, а), что замена S101G в VPg действительно усиливает его взаимодействие с eIF4E1 и eIF4E2 картофеля. Этот эффект особенно хорошо заметен при количественной оценке их взаимодействия (рис. 3, в, сравните кривые 2 и 4, 3 и 5). Тем не менее такой вариант VPg по-преж-

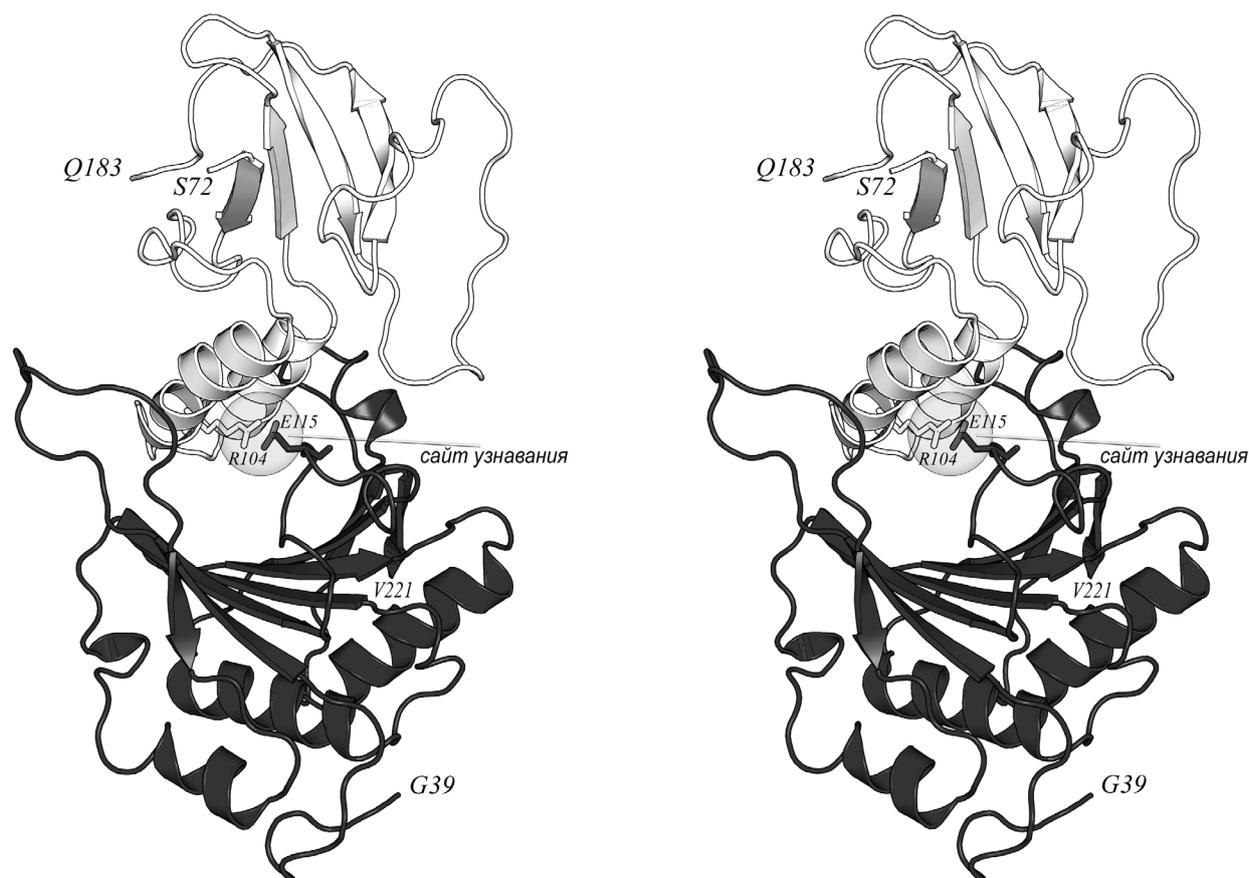


Рис. 5. Стереорепрезентация модели комплекса eIF4E–VPg. Темным цветом показан eIF4E, светлым – VPg. Сайт узнавания отмечен прозрачной сферой

Водородные связи между VPg и eIF4E в комплексе eIF4E–VPg

VPg		eIF4E		Расстояние, Å
Остаток	Атом	Атом	Остаток	
E98	OE2	N	S70	2,84
R104	NH1	OE1	E115	3,07
R104	NH2	OE2	E115	2,57
K105	NZ	OD2	D102	2,41
D111	OD1	NH1	R164	2,62
D111	OD2	NH2	R164	2,80
D111	OD2	NZ	K169	3,01
E112	OE1	NH2	R213	2,64
E114	OE1	NZ	K169	2,72
E114	OE2	NZ	K169	3,15
N145	OD1	NZ	K209	2,77
K148	NZ	OD1	D206	3,04
K148	NZ	OD2	D206	2,82

нему не взаимодействовал с eIF(iso)4E (рис. 3, а). Исходя из анализа полученной нами методом гомологичного моделирования модели eIF(iso)4E (данные не приведены), последний факт можно объяснить за счёт сужения контактной полости eIF(iso)4E в результате изменения его поверхности в области шпильки $\beta 7$ - $\beta 8$, что, в свою очередь, может препятствовать правильному позиционированию в ней узнающей шпильки $\alpha 1$ - $\alpha 2$ VPg. Однако уточнения этой модели ещё не проводилось, ввиду чего данный вопрос требует дальнейших комплексных исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы показали, что eIF4E1 и eIF4E2 картофеля взаимодействуют с VPg PVY штамма NTN, а eIF(iso)4E – не взаимодействует. Кроме того, на основании взаимодополняющих подходов – анализа природного полиморфизма целевых белков, экспериментального анализа белок-белкового взаимодействия и молекулярного моделирования – нам впервые удалось построить модель комплекса фактора инициации трансляции eIF4E2 картофеля и вирусного белка VPg. Полученная модель не только хорошо объяснила со структурной точки зрения

полученные биохимические данные, но и позволила достоверно предсказать эффект замены одного из остатков узнающего модуля. Это говорит о том, что данная модель достаточно близка к истинной структуре комплекса и может быть использована для поиска аминокислотных замен в последовательности фактора eIF4E2 картофеля, которые будут препятствовать его взаимодействию с различными формами VPg PVY.

Финансирование. Исследование было выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-29-08024 офи_м). Вестерн-анализ был выполнен в рамках госзадания (№ госрегистрации АААА-А19-119092390041-5).

Благодарности. Авторы благодарят Козлова Д.Г., зав. лаб. НИЦ «Курчатовский институт», и Губайдуллина И.И., сотрудника НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, Курчатовский геномный центр, за ценные консультации по культивированию дрожжей. Авторы благодарят Dr. J.-L. Gallois (INRA) за предоставление дрожжей штамма Jo55 для эксперимента по комплементации. Работа выполнялась с использованием оборудования ЦКП «Биотехнология» ВНИИСБ (Москва, Россия; договор RFMEFI62114×0003).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (www.springer.com/journal/10541), том 86, вып. 9, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Scholthof, K.-B. G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., et al. (2011) Top 10 plant viruses in molecular plant pathology, *Mol. Plant Pathol.*, **12**, 938-954, doi: 10.1111/J.1364-3703.2011.00752.X.
- Quenouille J., Vassilakos, N., and Moury, B. (2013) Potato virus Y: a major crop pathogen that has provided major insights into the evolution of viral pathogenicity, *Mol. Plant Pathol.*, **14**, 439-452, doi: 10.1111/mpp.12024.
- Robaglia, C., and Caranta, C. (2006) Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection, *Trends Plant Sci.*, **11**, 40-45, doi: 10.1016/j.tplants.2005.11.004.
- Ruffel, S., Dussault, M. H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., et al. (2002) A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E), *Plant J.*, **32**, 1067-1075, doi: 10.1046/j.1365-313x.2002.01499.x.
- Charron, C., Nicolai, M., Gallois, J. L., Robaglia, C., Moury, B., et al. (2008) Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg, *Plant J.*, **54**, 56-68, doi: 10.1111/j.1365-313x.2008.03407.x.
- Lebaron, C., Rosado, A., Sauvage, C., Gauffier, C., German-Retana, S., et al. (2016) A new eIF4E1 allele characterized by RNAseq data mining is associated with resistance to PVY in tomato albeit with a low durability, *J. Gen. Virol.*, **97**, 3063-3072.
- Rubio, M., Nicolai, M., Caranta, C., and Palloix, A. (2009) Allele mining in the pepper gene pool provided new complementation effects between pvr2-eIF4E alleles and pvr6-eIF (iso) 4E for resistance to the Pepper veinal mottle virus, *J. Gen. Virol.*, **90**, 2808-2814, doi: 10.1099/vir.0.013151-0.
- Julio, E., Cotucheau, J., Decorps, C., Volpatti, R., Sentenac, C., et al. (2015) A eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) is responsible for the "va" tobacco recessive resistance to potyviruses, *Plant Mol. Biol. Report.*, **33**, 609-623, doi: 10.1007/s11105-014-0775-4.
- Cavatorta, J., Perez, K. W., Gray, S. M., Van Eck, J., Yeam, I., and Jahn, M. (2011) Engineering virus resistance using a modified potato gene, *Plant Biotechnol. J.*, **9**, 1014-1021.
- Gutierrez Sanchez, P., Babujee, L., Mesa, H. J., Arcibal, E., Gannon, M., et al. (2020) Overexpression of a modified eIF4E regulates potato virus Y resistance at the transcriptional level in potato, *BMC Genomics*, **21**, doi: 10.1186/s12864-019-6423-5.
- Poulicard, N., Pacios, L. F., Gallois, J. L., Piñero, D., and García-Arenal, F. (2016) Human management of a wild plant modulates the evolutionary dynamics of a gene determining recessive resistance to virus infection, *PLoS Genet.*, **12**, doi: 10.1371/journal.pgen.1006214.
- Mazier, M., Flamain, F., Nicolai, M., Sarnette, V., and Caranta, C. (2011) Knock-down of both eIF4E1 and eIF4E2 genes confers broad-spectrum resistance against potyviruses in tomato, *PLoS One*, **6**, doi: 10.1371/journal.pone.0029595.
- Gauffier, C., Lebaron, C., Moretti, A., Constant, C., Moquet, F., et al. (2016) A TILLING approach to generate broad-spectrum resistance to potyviruses in tomato is hampered by eIF4E gene redundancy, *Plant J.*, **85**, 717-729, doi: 10.1111/tpj.13136.
- Michel, V., Julio, E., Candresse, T., Cotucheau, J., Decorps, C., et al. (2019) A complex *eIF4E* locus impacts the durability of *va* resistance to *Potato virus Y* in tobacco, *Mol. Plant Pathol.*, **20**, 1051-1066, doi: 10.1111/mpp.12810.
- Masuta, C., Nishimura, M., Morishita, H., and Hataya, T. (1999) A single amino acid change in viral genome-associated protein of potato virus Y Correlates with resistance breaking in 'virgin a mutant' tobacco, *Phytopathology*, **89**, 118-123, doi: 10.1094/PHYTO.1999.89.2.118.
- Ayme, V., Petit-Pierre, J., Souche, S., Palloix, A., and Moury, B. (2007) Molecular dissection of the potato virus Y VPg virulence factor reveals complex adaptations to the pvr2 resistance allelic series in pepper, *J. Gen. Virol.*, **88**, 1594-1601, doi: 10.1099/vir.0.82702-0.
- Takakura, Y., Udagawa, H., Shinjo, A., and Koga, K. (2018) Mutation of a *Nicotiana tabacum* L. eukaryotic translation-initiation factor gene reduces susceptibility to a resistance-breaking strain of Potato virus Y, *Mol. Plant Pathol.*, **19**, 2124-2133, doi: 10.1111/mpp.12686.
- Baebler, S., Coll, A., and Gruden, K. (2020) Plant molecular responses to potato virus Y: a continuum of outcomes from sensitivity and tolerance to resistance, *Viruses*, **12**, 217, doi: 10.3390/v12020217.
- Duan, H., Richael, C., and Rommens, C. (2012) Overexpression of the wild potato eIF4E-1 variant Eval elicits Potato virus Y resistance in plants silenced for native eIF4E-1, *Transgenic Res.*, **21**, 929-938, doi: 10.1007/s11248-011-9576-9.
- Zhang, C., Zarka, K., Zarka, D., Whitworth, J., and Douches, D. (2021) Expression of the tomato pot-1 gene confers potato virus Y (PVY) resistance in susceptible potato varieties, *Am. J. Potato Res.*, **98**, 42-50, doi: 10.1007/s12230-020-09815-y.
- Cavatorta, J. R., Savage, A. E., Yeam, I., Gray, S. M., and Jahn, M. (2008) Positive Darwinian selection at single

- amino acid sites conferring plant virus resistance, *J. Mol. Evol.*, **67**, 551-559, doi: 10.1007/s00239-008-9172-7.
22. Wang, A., and Krishnaswamy, S. (2012) Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement, *Mol. Plant Pathol.*, **13**, 795-803, doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00791.x.
 23. Grzela, R., Szolajska, E., Ebel, C., Madern, D., Favier, A., et al. (2008) Virulence Factor of potato virus Y, genome-attached terminal protein VPg, is a highly disordered protein, *J. Biol. Chem.*, **283**, 213-221, doi: 10.1074/jbc.M705666200.
 24. Moury, B., Charron, C., Janzac, B., Simon, V., Gallois, J. L., et al. (2014) Evolution of plant eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) and potyvirusgenome-linked protein (VPg): a game of mirrors impacting resistance spectrum and durability, *Infect. Genet. Evol.*, **27**, 472-480, doi: 10.1016/j.meegid.2013.11.024.
 25. De Oliveira, L., Volpon, L., Rahardjo, A. K., Osborne, M. J., Culjkovic-Kraljacic, B., et al. (2019) Structural studies of the eIF4E-VPg complex reveal a direct competition for capped RNA: implications for translation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 24056-24065, doi: 10.1073/pnas.1904752116.
 26. Walter, J., Barra, A., Charon, J., Tavert-Roudet, G., and Michon, T. (2020) Spectroscopic Investigation of the kinetic mechanism involved in the association of potyviral VPg with the host plant translation initiation factor eIF4E, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 5618-5633, doi: 10.3390/ijms21165618.
 27. Leonard, S. P., D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M. G., and Laliberte, J. F. (2000) Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity, *J. Virol.*, **74**, 7730-7737, doi: 10.1128/jvi.74.17.7730-7737.2000.
 28. Ayme, V., Souche, S., Caranta, C., Jacquemond, M., Chadoeuf, J., et al. (2007) Different mutations in the genome-linked protein VPg of potato virus Y confer virulence on the pvr2-3 resistance in pepper, *Mol. Plant Microbe Interact.*, **19**, 557-563, doi: 10.1094/MPMI-19-0557.
 29. Roudet-Tavert, G., Michon, T., Walter, J., Delaunay, T., Redondo, E., and Le Gall, O. (2007) Central domain of a potyvirus VPg is involved in the interaction with the host translation initiation factor eIF4E and the viral protein HcPro, *J. Gen. Virol.*, **88**, 1029-1033, doi: 10.1099/vir.0.82501-0.
 30. Okonechnikov, K., Golosova, O., and Fursov, M. (2012) Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit, *Bioinformatics*, **28**, 1166-1167, doi: 10.1093/bioinformatics/bts091.
 31. Hughes, J. M., Ptushkina, M., Karim, M. M., Koloteva, N., von der Haar, T., and McCarthy, J. E. (1999) Translational repression by human 4E-BP1 in yeast specifically requires human eIF4E as target, *J. Biol. Chem.*, **274**, 3261-3264, doi: 10.1074/jbc.274.6.3261.
 32. Gietz, R., Schiestl, R. (2007) High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method, *Nat. Protoc.*, **2**, 31-34, doi: 10.1038/nprot.2007.13.
 33. Aho, S., Arffman, A., Pummi, T., and Uitto, J. (1997) A novel reporter gene *MEL1* for the yeast two-hybrid system, *Anal. Biochem.*, **253**, 270-272, doi: 10.1006/abio.1997.2394.
 34. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
 35. Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., et al. (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 296-303, doi: 10.1093/nar/gky427.
 36. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W., and Cowtan, K. (2010) Features and development of coot, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **66**, 486-501, doi: 10.1107/S0907444910007493.
 37. Krissinel, E., and Henrick, K. (2004) Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **60**, 2256-2268, doi: 10.1107/S0907444904026460.
 38. Miras, M., Truniger, V., Silva, C., Verdaguier, N., Aranda, M. A., and Querol-Audi, J. (2017) Structure of eIF4E in complex with an eIF4G peptide supports a Universal bipartite binding mode for protein translation, *Plant Physiol.*, **174**, 1476-1491, doi: 10.1104/pp.17.00193.
 39. Monzingo, A. F., Dhaliwal, S., Dutt-Chaudhuri, A., Lyon, A., Sadow, J. H., et al. (2007) The structure of eukaryotic translation initiation factor-4E from wheat reveals a novel disulfide bond, *Plant Physiol.*, **143**, 1504-1518, doi: 10.1104/pp.106.093146.
 40. Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D., and Lindahl, E. (2008) GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation, *J. Chem. Theory Comput.*, **4**, 435-447, doi: 10.1021/ct700301q.
 41. MacKerell, A. D. Jr., Feig, M., and Brooks, C. L. (2004) Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations, *J. Comput. Chem.*, **25**, 1400-1415, doi: 10.1002/jcc.20065.
 42. Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M., Darden, T., Lee, H., and Pedersen, L. (1995) A smooth particle mesh Ewald method, *J. Chem. Physics*, **103**, 8577, doi: 10.1063/1.470117.
 43. Altmann, M., Sonenberg, N., and Trachsel, H. (1989) Translation in *Saccharomyces cerevisiae*: initiation factor 4E-dependent cell-free system, *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 4467-4472, doi: 10.1128/mcb.9.10.4467.
 44. Piron, F., Nicolaï, M., Minoia, S., Piednoir, E., Moretti, A., et al. (2010) An induced mutation in tomato eIF4E leads to immunity to two potyviruses, *PLoS One*, doi: 10.1371/journal.pone.0011313.
 45. Moury, B., Lebaron, C., Szadkowski, M., Khalifa, M. B., Girardot, G., et al. (2020) Knock-out mutation of eukaryotic initiation factor 4E2 (eIF4E2) confers resistance to pepper vein mottle virus in tomato, *Virology*, **539**, 11-17, doi: 10.1016/j.virol.2019.09.015.

**VPg OF PVY AND POTATO CAP-BINDING eIF4E FACTORS:
SELECTIVE INTERACTION AND ITS SUPPOSED MECHANISM**

**M. V. Lebedeva^{1*}, E. Y. Nikonova², A. A. Terentiev^{3,4,5},
V. V. Taranov¹, A. V. Babakov¹, and O. S. Nikonov²**

¹ *All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Russian Academy of Sciences,
127550 Moscow, Russia; E-mail: marilistik@mail.ru*

² *Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia*

³ *Institute of Problems of Chemical Physics of the Russian Academy of Sciences,
142432 Chernogolovka, Moscow Region, Russia*

⁴ *Scientific and Educational Center in Chernogolovka of Moscow Region State University,
141014 Mytishchi, Moscow Region, Russia*

⁵ *Faculty of Fundamental Physical and Chemical Engineering, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia*

Potato virus Y (PVY) is one of the most distributed and harmful plant viruses. Translation of viral RNA starts with interaction between the plant cap-binding translation initiation factors eIF4E and covalently bound to the viral RNA viral protein VPg. One of the natural mechanisms of host plant resistance to PVY is based on this interaction disrupting. Potato (*Solanum tuberosum* L.) eIF4E multigene family contains genes of 3 translation initiation factors – *eIF4E1*, *eIF4E2* и *eIF(iso)4E*. However, until now, it was unknown, which factors can be recruited by PVY and how this happens exactly. In this study we have shown that the most common VPg of PVY-NTN strain interacts with potato eIF4E1 and eIF4E2 proteins, but doesn't interact with eIF(iso)4E. The models of potato eIF4E1 and eIF4E2 and PVY VPg were constructed. Using data from the natural VPg amino acid polymorphism and constructed models, we proposed, that R104 plays a key role in recognition of potato cap-binding factors. In order to check it, we created mutant forms of VPg protein with substitutions in position 104 and examined their ability to interact with potato eIF4E factors. As a result, theoretical model of VPg-eIF4E2 complex was build. Suggested model significantly differs from already known models of complexes of potyvirus VPg with eIF4E and is in good agreement with current biochemical data.

Keywords: eIF4E, potato virus Y, VPg, translation initiation

УДК 577.21

МАЛ, ДА УДАЛ. РАЗНООБРАЗИЕ ФУНКЦИЙ МАЛЫХ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ – ПРОДУКТОВ ТРАНСЛЯЦИИ КОРОТКИХ РАМОК СЧИТЫВАНИЯ

Обзор

© 2021 П.В. Сергиев^{1,2,3*}, М.П. Рубцова^{1*}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: petya@genebee.msu.ru, mprubtsova@gmail.com

² Центр наук о жизни Сколковского института науки и технологий, 143025 дер. Сколково, Россия

³ Институт функциональной геномики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 27.04.2021

После доработки 27.05.2021

Принята к публикации 27.05.2021

Функционирование клетки является сложно регулируемым процессом. Долгие годы исследования в областях протеомики и функциональной геномики были сфокусированы на роли белков в жизнедеятельности клетки. Развитие науки привело к пониманию того, что короткие открытые рамки считывания, ранее считавшиеся нефункциональными, в действительности выполняют разнообразные функции. В составе полицистронных мРНК короткие рамки считывания часто регулируют их стабильность и эффективность трансляции основной рамки считывания. Совершенствование методов протеомного анализа позволило идентифицировать продукты трансляции коротких рамок считывания в количествах, позволяющих предположить существование функциональной роли у синтезируемых пептидов и коротких белков. Их изучение открывает новый уровень регуляции функционирования клетки и ее адаптации к изменяющимся условиям. Настоящий обзор посвящен анализу функций недавно открытых пептидов и коротких белков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пептиды, малые рамки считывания, длинные некодирующие РНК, альтернативные белки.

DOI: 10.31857/S0320972521090098

ВВЕДЕНИЕ

Разнообразие белков предопределяет функционирование живых существ, а для таких сложных организмов, как млекопитающие, даже простая каталогизация протеома является нетривиальным и далеко не законченным процессом. В результате развития системной биологии стало очевидным, что транскрипции подвергается много больше участков генома, чем предполагалось ранее [1, 2]. С возникновением методов высокопроизводительного секвенирования РНК [3] описание транскриптов достигло небывалых ранее масштабов. Поскольку многие из выявленных транскриптов не содержали протяженных рамок считывания, их в большинстве своем аннотировали как длинные некодирующие РНК (см. [4, 5] для обзора). Короткие рамки считывания, обнаруживаемые в этих тран-

скриптах, на первых порах считали случайностью и игнорировали. С развитием методов системного исследования биосинтеза белка в клетках, в первую очередь рибосомного профилирования [6], а также в результате совершенствования методов протеомного анализа [7–10] научное сообщество с удивлением обнаружило, что и трансляция транскриптома не ограничена каноническими длинными рамками считывания, начинающимися непременно с инициаторного AUG-кодона. Результатом такой «всеобщей» трансляции являются короткие белки и пептиды (sPEP), продукты трансляции т.н. коротких открытых рамок считывания (кОРС), а также длинные белки, необычные продукты трансляции известных мРНК, часто называемые альтернативными белками (alt-PROT), или некодирующих РНК.

Не акцентируя чрезмерно внимание на современных методах выявления кодирующих последовательностей в геномах и транскриптомах, авторы рекомендуют заинтересованным в методологической стороне вопроса читателям обра-

Принятые сокращения: НТО – нетранслируемая область; ОРС – открытая рамка считывания.

* Адресат для корреспонденции.

таться к нескольким обзорным статьям на эту тему [11, 12]. В данном обзоре мы остановимся на результатах исследований последних лет, посвященных поиску функциональной роли малых белков.

ГДЕ НАХОДЯТ НОВЫЕ ТРАНСЛИРУЕМЫЕ ОРС?

Где же закодированы неизвестные ранее белки, обнаруживаемые с помощью современных компьютерных и экспериментальных методов, и в чем их особенности, позволившие им оставаться в тени столько времени? Во-первых, большая часть этих белков, хотя и не все, имеет небольшие размеры, до 100 аминокислотных остатков (а.о.). Поскольку в любой некодирующей последовательности можно встретить случайно присутствующие нефункциональные короткие рамки считывания, исследователю достаточно сложно выявить ту небольшую долю рамок считывания, которые транслируются с образованием функциональных коротких белков и пептидов. Во-вторых, новые белки образуются при трансляции, которая начинается с неканонических инициаторных кодонов. Так, помимо AUG, который остается наиболее распространенным инициаторным кодоном (с него начинается трансляция в 64% случаев, по данным [13], в 43% – по данным [9]), у эукариот трансляция часто начинается с CUG (в 3% – по данным [9]; в 23% – [13]), GUG (в 6% – [9]; в 9% – [13]) и UUG (в 4% – [13]) кодонов. Довольно большой разброс частот использования различных кодонов в качестве инициаторных объясняется использованием разных выборок ОРС, содержащих разные соотношения канонических и альтернативных белков, а также, возможно, различным процентом включения ложноположительных результатов. Подробное сопоставление обсуждаемых частот использования кодонов для инициации трансляции можно найти в отдельной работе [14].

В-третьих, неизвестные ранее белки и пептиды могут быть закодированы в мРНК ранее аннотированных генов так, что их рамки считывания располагаются в 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) или 3'-НТО, а также в рамке считывания, частично или полностью перекрывающейся, но не совпадающей с ранее аннотированной. В этой группе наиболее часто встречаются ОРС в 5'-НТО – по разным данным, от 40 [9] до 68% [13] всех неаннотированных ранее ОРС. Такой высокий процент может объясняться тем, что сам факт считывания 5'-ОРС, даже если продукт этого процесса нефункционален,

может служить механизмом регуляции трансляции «основной» рамки считывания. Этот процесс хорошо изучен для мРНК *GCN4* дрожжей, содержащей несколько 5'-ОРС, наличие которых обеспечивает селективную трансляцию этой мРНК в условиях аминокислотного голодания [15]. В дальнейших исследованиях было показано, что подобный тип регуляции очень распространен [16]. В случае 5'-ОРС *MIEF1*, *DDIT3*, *FBXO9*, *HMG2* и *HAUS6* обнаружено взаимодействие продуктов трансляции «основной» рамки считывания и ОРС, расположенной ближе к 5'-концу соответствующих мРНК [13]. В этих случаях, возможно, расположение двух рамок на одной мРНК необходимо для координированного синтеза соответствующих белков, как это происходит в случае бактериальных оперонов. При этом остается открытым вопрос о механизмах эффективной трансляции обеих рамок считывания в системе трансляции эукариот.

Можно предположить, что повышенная частота использования отличающихся от AUG кодонов в качестве инициаторных для 5'-ОРС имеет «механистическое» объяснение. Использование AUG-кодона в данном случае приведет к стабильному ингибированию трансляции основной рамки. Против такого варианта, если он возникнет в ходе случайной мутации, будет действовать отбор, связанный с функционированием основной ОРС. Напротив, использование инициаторного кодона, который может с некоторой вероятностью пропускаться сканирующим комплексом, будет закрепляться отбором, поскольку способствует синтезу обоих белковых продуктов, закодированных в мРНК [17].

Значительная доля выявленных функциональных ОРС, по некоторым данным – 24% [13], находится в транскриптах, аннотированных ранее как некодирующие. При этом новые транслируемые ОРС обнаруживаются как в транскриптах, функция которых ранее не была известной [18–24], так и в РНК, имеющих другую охарактеризованную функцию, например, белок TERP, закодированный в теломеразной РНК [25], Humanin – в митохондриальной 16S рРНК [26], E-пептид – в бактериальной 23S рРНК [27]. Описаны случаи, когда новые функции имеет и длинная некодирующая РНК, и кодируемый ею белок. Например, РНК *AW112010* кодирует небольшой белок, стимулирующий синтез IL-12p40. Мутантные мыши с нарушением синтеза пептида, закодированного в *AW112010*, демонстрируют большую скорость распространения сальмонелл и большую бактериоциемия, а также ускоренную смертность от сальмонеллеза [22]. В последующей работе обнаружена самостоятельная роль РНК *AW112010*,

закрывающаяся в привлечении KDM5A и последующем деметилировании остатков H3K4me3 гена, кодирующего IL-10 [28]. Сходным образом, после обнаружения функциональной роли пептида SPAR (другое название – SPAAR), закодированного в *LINC00961*, заключающейся в подавлении активности mTORC1-киназного комплекса [24] (см. более подробное описание ниже), выявлено, что *LINC00961* как РНК имеет отдельную функцию в ангиогенезе, причем ее активность противоположна таковой для пептида SPAR [29].

Транслируемые ОРС находят в таких необычных РНК, как кольцевые (circRNA), образующиеся в результате ошибочного сплайсинга [30–32] (см. обзор [33]), и примикроРНК (pri-miRNA) [34]. В случае кольцевых РНК встает вопрос о механизме инициации трансляции, поскольку классическая модель сканирования, очевидно, для них не подходит. Авторы соответствующих работ объясняют взаимодействие рибосом с кольцевыми РНК-участками внутренней посадки рибосом (IRES, internal ribosome entry site) и привлечением инициаторных факторов модифицированными остатками m⁶A; предложенные модели требуют дальнейшей тщательной проверки (см. рассуждения на эту тему в [35]). Таким образом, разнообразие кодирующих РНК значительно выходит за рамки наших обычных представлений. Это, с одной стороны, ошеломляет, а с другой стороны, вызывает определенную долю скепсиса.

В чем же может заключаться функциональная роль продуктов трансляции недавно открытых ОРС, малых и альтернативных белков? Хотя общего ответа на этот вопрос нет, мы рассмотрим несколько интересных частных случаев, описанных в современной научной литературе.

РОЛЬ МАЛЫХ БЕЛКОВ В БИОСИНТЕЗЕ ДНК И РНК

Практически во всех экспериментах по исследованию функциональной роли вновь открываемых малых белков определяют их внутриклеточную локализацию. Например, в работе Chen et al. [13] локализацию малых белков изучали с помощью их гибридов с пептидным «довеском» зеленого флуоресцентного белка GFP11, который при взаимодействии с оставшейся частью GFP1-10 образует функциональный флуорофор, детекцию которого можно осуществить при помощи микроскопии. Так, например, обнаружена ядерная локализация продукта трансляции 5'-ОРС *HMG2*. Хотя функциональная роль этого пептида не определена, в науч-

ной литературе имеются сведения о других, более тщательно исследованных малых белках, чья функция в ядре связана с репликацией и репарацией ДНК, а также с процессом транскрипции (рис. 1, а).

Белок SHPRH-146aa, закодированный в кольцевой РНК, проявляет онкосупрессорные свойства, способствуя деградации необходимого для пролиферации ядерного белка PCNA, обеспечивающего процессивность репликативных ДНК-полимераз [30]. AltMRV11 длиной 134 а.о. закодирован в 3'-НТО гена *MRV11*. Продукт трансляции этой рамки имеет ядерную локализацию и взаимодействует с BRCA1 [36], белком-онкосупрессором, участвующим в репарации разрывов ДНК. Интересно, что ранее это взаимодействие определили с помощью дрожжевой двугибридной системы, но посчитали ложноположительным [37]. Кроме AltMRV11, в регуляции репарации двуцепочечных разрывов принимает участие пептид CYREN-2 [38], по сути, являющийся короткой изоформой ранее аннотированного белка CYREN/MRI (модулятор ретровирусной инфекции) [39], образующейся в результате альтернативного сплайсинга. Обе формы CYREN взаимодействуют с Ku70/Ku80-субъединицами ДНК-зависимой протеинкиназы, участвующей в репарации двуцепочечных разрывов ДНК по механизму негомологичного соединения концов (NHEJ, nonhomologous end joining). Известно, что работа NHEJ может вызывать мутации, но не имеет альтернативы в G1-фазе клеточного цикла, когда ДНК еще не реплицирована с образованием сестринских хроматид. В поздней S- и G2-фазах, когда двуцепочечные разрывы ДНК могут быть исправлены с помощью более точного механизма гомологичной рекомбинации (HR, homologous recombination), активность NHEJ подавляется, в том числе и с помощью прямого взаимодействия CYREN и Ku70/Ku80 (рис. 1, б). При инактивации CYREN повышается частота слияния теломерных участков хромосом [38], а инактивация CYREN/MRI вместе с одним из основных участников системы NHEJ – XLF – приводит к эмбриональной летальности мышей из-за полного блокирования системы NHEJ [40].

Согласно нескольким недавним публикациям, продукты трансляции малых рамок считывания участвуют в регуляции транскрипции. Например, пептид Pgc, состоящий из 71 а.о., подавляет транскрипцию в предшественниках зародышевых клеток дрозофилы, взаимодействуя с киназой pTEFb (рис. 1, в). pTEFb осуществляет фосфорилирование белка NELF, а также остатка Ser2 C-концевого домена РНК-полимеразы II [41]. Подобное фосфорилирование приво-

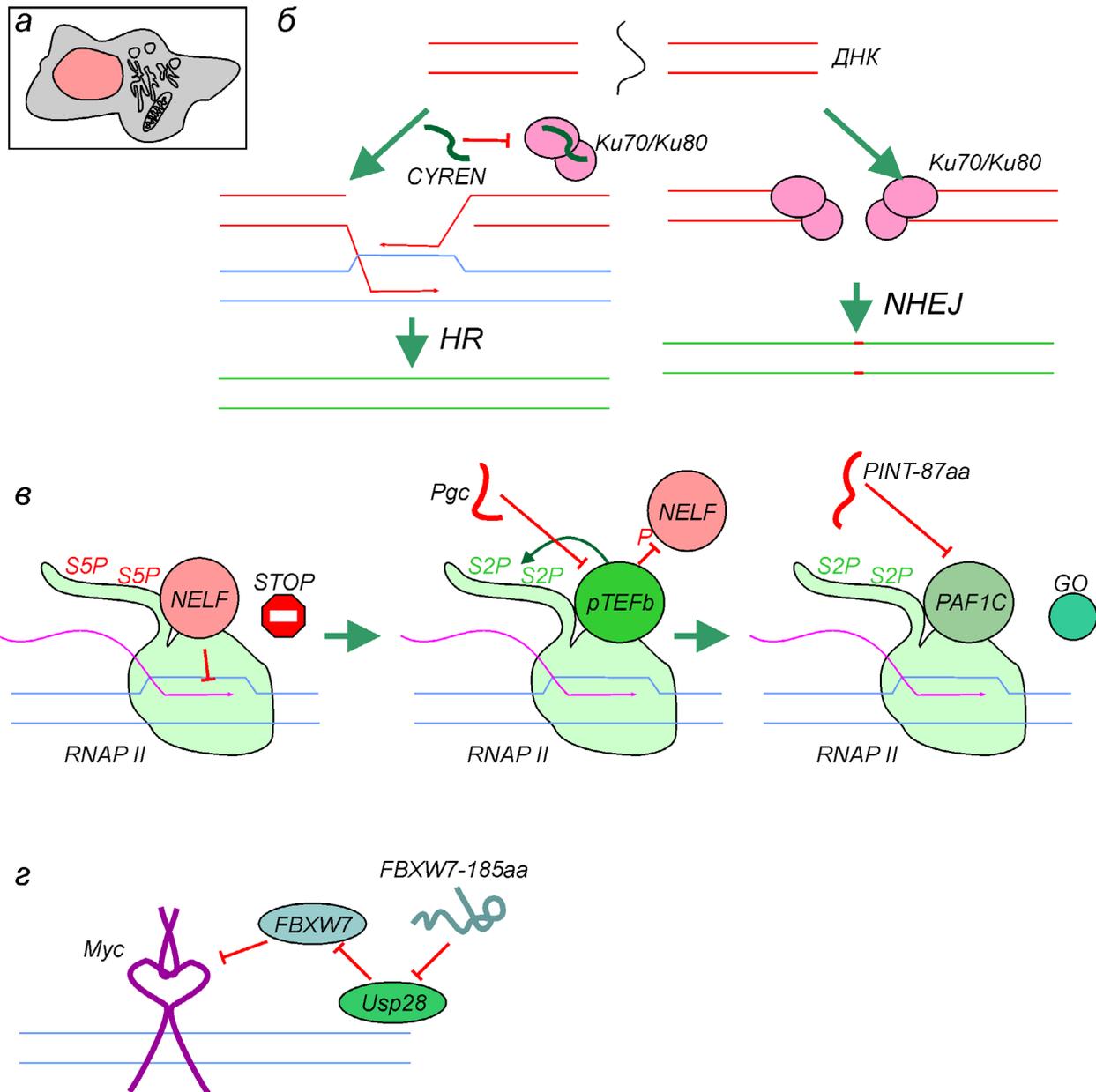


Рис. 1. Функционирование малых белков в ядре, участие в процессах репарации ДНК и транскрипции. *а* – Схема строения эукариотической клетки. Цветом выделено ядро, в котором осуществляется функционирование показанных на рисунке белков. *б* – Пептид CYREN ингибирует репарацию двуцепочечных разрывов ДНК по пути негомологичного соединения концов ДНК (NHEJ, nonhomologous end joining), подавляя активность Ku70/Ku80 (на рисунке HR – homologous recombination). *в* – Остановка РНК-полимеразы II, вызванная белком NELF и обусловленная фосфорилированием остатков Ser5 (S5P) гептааминокислотных повторов С-концевого домена (CTD) RNAP II (слева). Киназный комплекс рTEFb фосфорилирует NELF и остатки Ser2 (S2P) гептааминокислотных повторов CTD RNAP II, что обуславливает связывание PAF1C и переход к процессивной элонгации (по центру). Пептид Pgc ингибирует рTEFb, а пептид PINT-87aa подавляет активность PAF1C, что приводит к репрессии транскрипции (справа). *г* – Влияние белка FBXW7-185 aa на стабильность транскрипционного фактора Мус. FBXW7-185 aa конкурирует с FBXW7 за взаимодействие с Usp28-деубиквитиназой, что приводит к повышению активности FBXW7 и дестабилизации Мус

дит к снятию ингибирования и увеличивает эффективность транскрипции. После действия рTEFb активность РНК-полимеразы II увеличивается под действием другого фактора элонгации, PAF1c [42]. Пептид PINT-87aa, закодиро-

ванный в кольцевой РНК, проявляет онкосупрессорные свойства, взаимодействуя с PAF1c (рис. 1, в) и замедляя таким образом транскрипцию онкогенов [31]. Еще одним малым белком, взаимодействующим с транскрипционным фак-

тором и проявляющим онкосупрессорные свойства, является FBXW7-185 aa [43]. FBXW7-185 aa конкурирует с полноразмерным FBXW7 за взаимодействие с Usp28-деубиквитиназой, стабилизирующей транскрипционный фактор Мус. Таким образом, действие FBXW7-185 aa противоположно активности FBXW7 и приводит к дестабилизации Мус (рис. 1, з).

РОЛЬ МАЛЫХ БЕЛКОВ В СОЗРЕВАНИИ РНК, СИНТЕЗЕ И СВРАЧИВАНИИ БЕЛКОВ

В научной литературе можно найти множество примеров регуляции созревания мРНК и трансляции с помощью малых белков (рис. 2, а). Некоторые из этих исследований демонстрируют пока довольно поверхностные данные. Так, описано взаимодействие белков altSETD1B и altLINC00624 с аминоксил-тРНК синтетазами [44], однако функциональные последствия этих взаимодействий исследованы не были. Значительно более подробно исследованы функции других малых белков в процессинге РНК и биосинтезе белка. Пептид, состоящий из 53 а.о., закодированный в транскрипте *HOXB-AS3*, взаимодействует с hnRNP A1 и рядом других факторов процессинга РНК [45]. Экспрессия *HOXB-AS3* падает в клетках раковых опухолей, например, при раке прямой кишки. Подобное снижение экспрессии предвещает плохой прогноз для пациентов. Инактивация рамки считывания при сохранении большей части РНК *HOXB-AS3* приводит к повышению колониеобразования, стимуляции роста и миграции клеток. Эктопическая экспрессия данного гена в клетках рака прямой кишки, соответственно, наоборот, замедляет пролиферацию клеток. Онкосупрессорная природа *HOXB-AS3* объясняется его антагонизмом с hnRNP A1. Пептид *HOXB-AS3* «отменяет» включение экзона 10 в мРНК пируваткиназы, обусловленное активностью hnRNP A1. Фетальная сплайс-форма пируваткиназы содержит экзон 10 и участвует в аэробном гликолизе, в то время как сплайс-форма, содержащая экзон 9, экспрессируется в тканях взрослого организма и участвует в окислительном фосфорилировании. Раковые клетки, возвращаясь к гликолитическому метаболизму в результате эффекта Варбурга, начинают экспрессировать фетальную форму пируваткиназы [46], что обусловлено активностью hnRNP A1 [47]. Пептид *HOXB-AS3* подавляет эффект Варбурга и рост клеток опухоли, являясь антагонистом hnRNP A1 и способствуя экспрессии пируваткиназы с включенным экзон 9 [45] (рис. 2, б).

Помимо участия в созревании мРНК, малые белки принимают участие в созревании рибосом, одним из них является пептид MIEF1-MP/L0R8F8 длиной 70 а.о. Этот пептид закодирован в 5'-ОПС гена белка MID51. «Основной» продукт трансляции этой мРНК, MID51, локализуется во внешней мембране митохондрий и регулирует их слияние [48]. Функциональность соответствующей 5'-ОПС, *MIEF1-MP/L0R8F8*, предсказана на основе данных рибосомного профилирования и анализа консервативности последовательности [16]. Дальнейшее исследование показало, что *MIEF1-MP* взаимодействует с миторибосомами и способствует митохондриальной трансляции [49]. Суперэкспрессия *MIEF1-MP* повышает, а нокдаун – снижает эффективность митохондриальной трансляции практически всех белков, синтезируемых миторибосомами. Примечательно, что уровень трансляции *MIEF1* превышает таковой для основной аннотированной рамки этого гена, белка MID51 [50]. Пространственное расположение пептида MIEF1-MP/L0R8F8 в структуре интермедиата сборки миторибосомы определено в лаборатории В. Рамакришнана с помощью криоэлектронной микроскопии [51]. В этой структуре MIEF1-MP соединяет гомолог бактериального фактора сборки рибосом RsfS, MALSU1, и митохондриальный носитель жирных кислот mt-ACP. Предположительно, эта белковая пирамидка предотвращает преждевременное взаимодействие интермедиата сборки большой субъединицы миторибосомы с малой субъединицей (рис. 2, в).

Взаимодействие белка altATAD2 длиной 139 а.о. с цитоплазматическим рибосомным белком RPL10 обнаружено с помощью пришивок с последующей масс-спектрометрической идентификацией [52]. Помимо взаимодействия с рибосомным белком, обнаружен контакт altATAD2 с AUF1/hnRNP D, узнающим AU-богатые последовательности РНК. Как предполагают исследователи, altATAD2 может служить посредником в привлечении рибосом на мРНК, имеющие AU-богатые нуклеотидные последовательности, хотя молекулярный механизм функционирования altATAD2 пока так и остается гипотетическим (рис. 2, г).

Деградация мРНК, несущих AU-богатые последовательности и другие дестабилизирующие сигналы, происходит в специализированных компартментах цитоплазмы, называемых Р-тельцами (P-bodies). В этих структурах локализован продукт трансляции *LINC01420* – пептид Nobody длиной 68 а.о. Анализ белок-белковых взаимодействий выявил его ассоциацию с аппаратом декэпирования, причем прямое взаи-

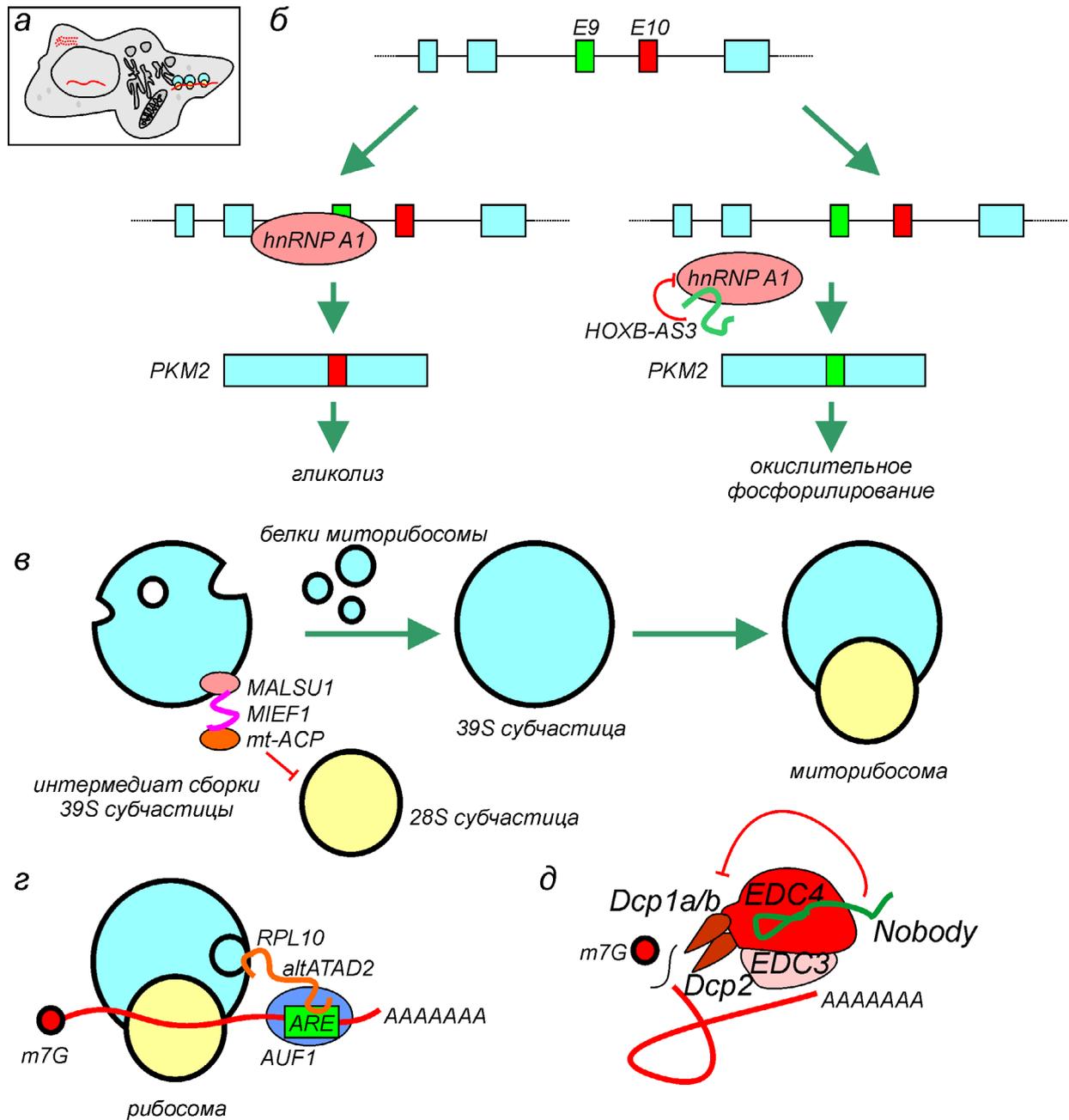


Рис. 2. Функционирование малых белков в процессах созревания, трансляции и деградации РНК в клетке. *а* – Схема локализации процессов созревания, трансляции и деградации РНК в клетке. *б* – Регулируемый альтернативный сплайсинг пре-мРНК пируваткиназы. В эмбриональных и раковых клетках повышенная концентрация hnRNP A1 подавляет включение экзона 9 и способствует включению экзона 10, что приводит к синтезу PKM2-изоформы. В большинстве клеток взрослого организма пептид HOXB-AS3 подавляет активность hnRNP A1, что приводит к включению экзона 9, но не 10 – и появлению изоформы PKM1, способствующей окислительному фосфорилированию. *в* – Пептид MIEF1 вместе с MALSU1 и mt-ACP взаимодействует с интермедиатом сборки большой субчастицы (39S) митохондриальной рибосомы, чтобы не допустить преждевременного взаимодействия с малой (28S) субчастицей. *г* – Белок altATAD2 взаимодействует с AUF1, узнающим мРНК с AU-богатыми последовательностями (ARE), и рибосомным белком RPL10 (на рисунке m7G – 5'-кэп). *д* – Пептид Nobody напрямую взаимодействует с EDC4 и опосредованно – с другими компонентами комплекса, декэпирующего мРНК, в результате чего подавляет их активность

модействие Nobody с EDC4 важно для опосредованного сближения этого пептида с EDC3, Dcp1A, Dcp1B и Dcp2. При этом Nobody является отрицательным регулятором сборки Р-телца,

которые исчезают при его суперэкспрессии (рис. 2, д). Одновременно с исчезновением Р-телца при суперэкспрессии Nobody в клетке возрастает количество мРНК, являющихся субстратом

нонсенс-опосредованной деградации (NMD, nonsense-mediated mRNA decay) [53].

После синтеза белки часто становятся субстратами шаперонов, которые способствуют формированию правильной пространственной структуры. Роль малых белков в этом процессе также имеет существенное значение. Так, недавно определена функциональная роль пептида, закодированного в 5'-ОПС мРНК *ASNSD1*, названного ASDURF [54]. Как оказалось, этот пептид длиной 96 а.о. является компонентом комплекса шаперонов PAQсомы, похожего на комплекс префолдинов. Наличие ASDURF и его взаимодействие с другими компонентами PAQсомы объясняет существовавшее ранее противоречие в предполагаемом белковом составе PAQсомы – тогда были известны лишь 5 субъединиц этого комплекса, при том, что сходные структуры содержат, как правило, 6 субъединиц. Как компонент PAQсомы, ASDURF принимает участие в формировании структур мРНК и компонентов сигнального пути mTOR.

МАЛЫЕ БЕЛКИ В СИСТЕМЕ ВЕЗИКУЛЯРНОГО ТРАНСПОРТА

Значительная доля малых белков и пептидов имеет трансмембранные сегменты и встраивает-

ся в различные мембранные структуры клетки и/или взаимодействует с мембранными белковыми комплексами (рис. 3, а). Например, в ходе скринингового исследования функциональной роли и белковых партнеров малых белков выявлено, что пептид, закодированный в *LINC00998*, совыделяется с группой белков эндоплазматического ретикулума, а инактивация этого гена приводит к изменению, по-видимому, компенсаторному, экспрессии генов, имеющих отношение к процессу гликозилирования, также происходящему в данном клеточном компартменте [13]. Согласно той же работе [13], пептид длиной 70 а.о., закодированный в гене *RP11-84A1.3*, локализуется в цитоплазматической мембране и взаимодействует с группой белков той же локализации.

Пептид длиной 54 а.о. закодирован в РНК, транскрибирующейся с цепи ДНК, комплементарной гену *PIBG*, в связи с чем получил курьезное название PIGBOS [21]. Исследование этого пептида показало, что он локализуется на внешней мембране митохондрии и взаимодействует с белком CLCC1, расположенном в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), в местах контакта ЭР с митохондриями. Взаимодействие с CLCC1 важно для функционирования PIGBOS. Нокаут *PIGBOS*, как и нокаут *CLCC1*, приводит к усугублению стресса ЭР, ответу развернутого белка (UPR, unfolded protein response) при обработке

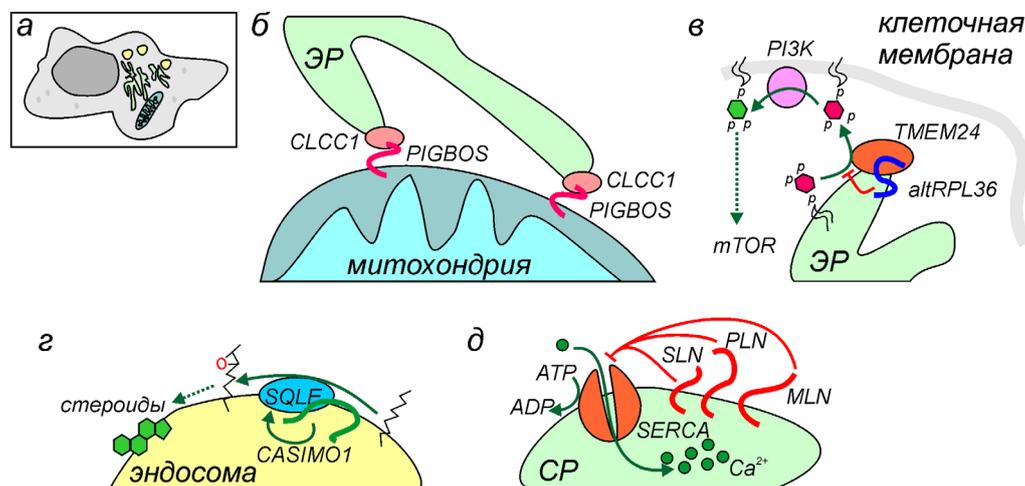


Рис. 3. Функционирование малых белков в системе везикулярного транспорта. а – Схема клетки с выделением органелл, показанных на следующих панелях. б – Взаимодействие пептида PIGBOS, локализованного во внешней митохондриальной мембране в местах контакта эндоплазматического ретикулума (ЭР) и митохондрии с белком ЭР CLCC1. Данное взаимодействие предотвращает стресс ЭР (UPR, unfolded protein response). в – Белок altRPL36, локализованный в местах контакта ЭР и цитоплазматической мембраны, взаимодействует с TMEM24 и ингибирует перенос PI(4,5)P2 из ЭР на внешнюю мембрану. Таким образом, это ингибирование приводит к активации mTOR-киназы через образование PI(3,4,5)P3 (фосфатидилинозитолтрифосфата) киназой PI3K. г – Расположенный в мембране эндосом пептид CASIMO1 стимулирует сквален-эпоксидазу SQLE, способствуя повышенному синтезу различных стероидных соединений. д – Пептиды фосфоламбан (PLN), сарколипин (SLN) и миорегулин (MLN), локализованные в саркоплазматическом ретикулуме (CP) различных типов мышц, подавляют активность АТФ-зависимой кальциевой помпы SERCA

туникамицином и усилению апоптоза, вызванного этим стрессом (рис. 3, б).

Белок altRPL36 закодирован в мРНК рибосомного белка RPL36, причем область, кодирующая альтернативный белок, начинается раньше, а заканчивается позже «основной» ОРС. Поскольку эти кодирующие области сдвинуты друг относительно друга со сдвигом рамки считывания (на некротное трем число нуклеотидов), соответствующие аминокислотные последовательности не похожи друг на друга. В отличие от RPL36, являющегося компонентом рибосомы, altRPL36 взаимодействует с трансмембранным белком ЭР TMEM24, локализованным в местах контактов ЭР и цитоплазматической мембраны. AltRPL36 ингибирует активность TMEM24, направленную на транспорт фосфатидилинозитолдифосфата, PI(4,5)P₂, из ЭР во внешнюю мембрану. Функция как altRPL36, так и TMEM24 состоит в регулировании фосфорилирования. Инактивация altRPL36 приводит к активации TMEM24, увеличению концентрации субстрата киназы PI3K, PI(4,5)P₂, и, таким образом, к активации mTOR сигнализации (рис. 3, в).

В эндосомах локализован пептид длиной 83 а.о., CASIMO1, который является продуктом трансляции рамки считывания, находящейся в небольшой РНК NR_029455. Экспрессия этого гена возрастает в клетках рака молочной железы с высоким уровнем экспрессии ядерных рецепторов стероидных гормонов ER/PR [55]. Инактивация кодирующего CASIMO1 гена замедляла, а повышенная экспрессия — ускоряла рост клеток. Эксперименты по коиммунопреципитации продемонстрировали, что CASIMO1 взаимодействует с другим онкогенным белком, сквален-эпоксидазой SQLE, и стимулирует ее активность. Повышенную экспрессию SQLE также наблюдают в клетках рака молочной железы. По всей видимости, функция CASIMO1 заключается в стимуляции активности сквален-эпоксидазы (рис. 3, г).

Группа малых белков встречается в специализированном типе ЭР, саркоплазматическом ретикулуме, клеток различных типов мышц. Пептиды фосфоламбан (PLN) [56, 57] длиной 52 а.о. и сарколипин (SLN) [58] длиной 31 а.о. присутствуют в сердечной мышце и медленных мышцах соответственно. Их активность направлена на ингибирование АТФ-зависимой кальциевой помпы саркоплазматического ретикулума SERCA (для обзора см., например, [59]), работа которой способствует расслаблению мышц после сокращения. SERCA также может генерировать тепло при ингибировании транспорта ионов кальция без снижения ее АТФазной активности. SLN, взаимодействуя с SERCA, может

способствовать такого рода термогенезу [60]. Миорегулин (MLN), пептид длиной 46 а.о., взаимодействует с SERCA в мышцах всех типов. Так же как сарколипин и фосфоламбан, миорегулин содержит трансмембранную альфа-спираль в N-концевой части молекулы. Взаимодействие миорегулина с насосом SERCA отрицательно регулирует активность последнего. Инактивация гена миорегулина приводит к более эффективному закачиванию ионов кальция в саркоплазматический ретикулум, что стимулирует работу мышц [23] (рис. 3, д).

Помимо функционирования пептидов и малых белков в различных компартментах системы везикулярного транспорта, известны примеры пептидов/малых белков, экспортируемых через эту систему во внеклеточное пространство. Так, пептид Humanin длиной 24 а.о. закодирован в гене 16S митохондриальной рРНК. Учитывая, что митохондриальная рРНК содержит множество гипотетических рамок считывания, предшествующих рамке, кодирующей Humanin, маловероятно, чтобы считывание этой рамки считывания происходило в ходе трансляции в митохондриях. Возможно, экспрессия этого гена может осуществляться с копий митохондриальной ДНК, присутствующих в ядерном геноме в виде псевдогенов. Согласно оригинальной статье [26], продукт экспрессии этого гена секретируется в межклеточную среду и подавляет токсичность бета-амилоида, основного агента патогенеза болезни Альцгеймера, в отношении культуры нейронов. В последующие годы, несмотря на открытые вопросы о механизме экспрессии, у пептида обнаружили ряд других «чудодейственных» свойств в отношении остеопороза, сердечно-сосудистых заболеваний, диабета и рака, наряду с первоначально обнаруженной активностью в отношении нейродегенеративных заболеваний (для обзора см. [61]).

МАЛЫЕ БЕЛКИ МИТОХОНДРИЙ

В протеоме митохондрий (рис. 4, а) значительную долю (до 5%) составляют малые белки длиной до 100 а.о. [62]. Выше мы уже обсуждали функциональную роль недавно открытого митохондриального белка MIEF1/LOR8F8, участвующего в сборке митохондриальных рибосом [49, 51]. Более широко в научной литературе представлены недавно открытые пептиды, влияющие на работу комплексов дыхательной цепи митохондрий. Например, выполненное в лаборатории Дж. Вейсмана исследование множества малых ОРС выявило митохондриальную локализацию продукта трансляции РНК

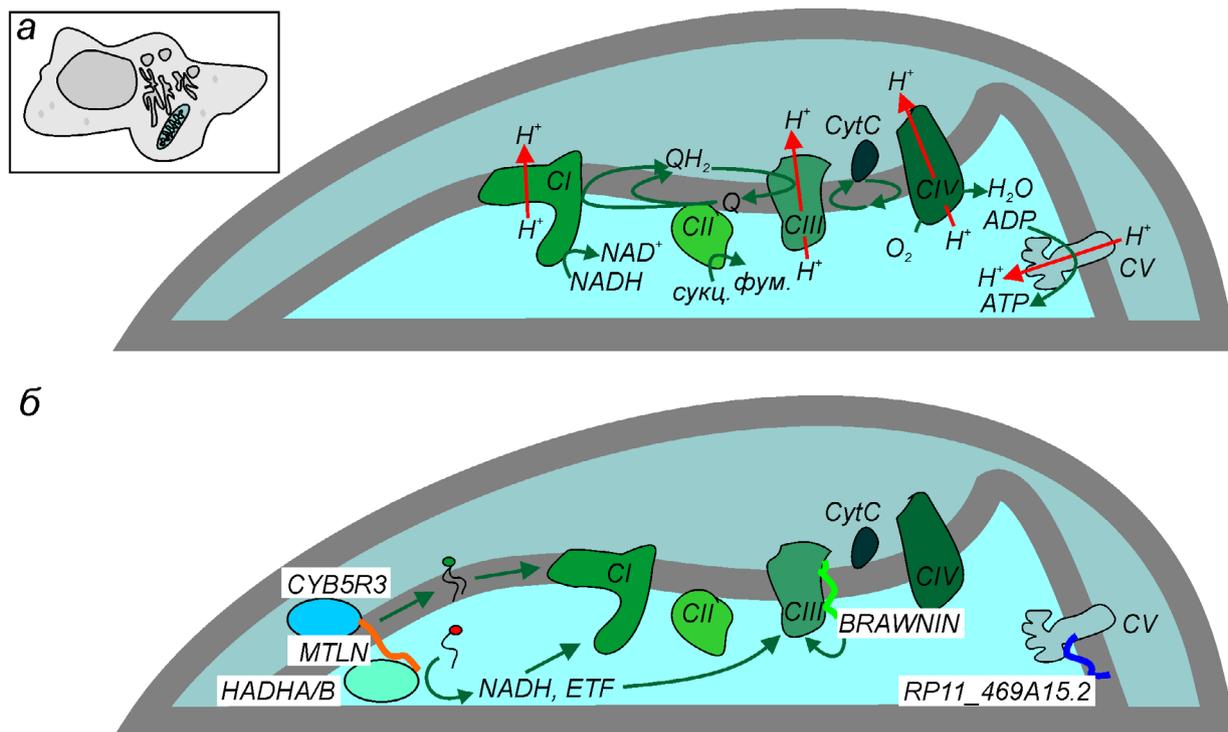


Рис. 4. Функционирование малых белков в мембранах митохондрий. *а* – Схема клетки с указанием митохондрий и схема работы окислительного фосфорилирования. Показаны комплексы дыхательной цепи I–IV (CI–CIV), комплекс V (CV) АТФ-синтазы, цепь переноса восстановительных эквивалентов и направление переноса протонов. *б* – Функционирование недавно открытых митохондриальных пептидов. Показано взаимодействие RP11_469A15.2 с цитохромом *С* оксидазой, стимуляция цитохромом *С* редуктазы пептидом BRAWNIN и взаимодействие пептида MTLN с цитохромом *B5* редуктазой 3 (CYB5R3) и компонентами трифункционального комплекса окисления жирных кислот HADHA/B. Активность MTLN влияет на липидный состав мембран и эффективность дыхания

RP11_469A15.2, ранее считавшейся некодирующей [13]. Соответствующий пептид длиной 62 а.о. взаимодействует с комплексом IV дыхательной цепи, цитохромом *С* оксидазой. Молекулярный механизм функционирования данного пептида остается пока неизвестным (рис. 4, б).

Более подробно исследована функция еще одного недавно открытого митохондриального пептида, получившего название BRAWNIN. Этот пептид состоит из 71 а.о., консервативен у позвоночных и локализуется во внутренней мембране митохондрий [63]. Экспрессия гена этого пептида находится под контролем основного транскрипционного фактора, отвечающего за биогенез митохондрий, PGC1 α , и регулируется киназой AMPK, активирующейся в условиях нехватки АТФ. У рыб *Danio rerio* с инактивированным геном, кодирующим BRAWNIN, наблюдается лактазный ацидоз, характерный для многих митохондриальных заболеваний. Как показали опыты по коиммунопреципитации, BRAWNIN взаимодействует с комплексом III (СIII) дыхательной цепи, цитохромом *С* редуктазой. Фенотипическое проявление инактивации гена этого пептида, согласно анализу метаболо-

ма, соответствует дефектам функционирования СIII (рис. 4б).

В нашей лаборатории [18], как и в нескольких других [19, 20], была исследована функция малого белка митохондрий миторегулина (MTLN), закодированного в транскрипте, ранее аннотированном как длинная некодирующая РНК LINC00116. Присутствие MTLN продемонстрировано в клетках человека [19, 20], мыши [18, 64] и рыбы *D. rerio* [65]. Последовательность этого белка длиной 56 а.о. весьма консервативна у позвоночных и содержит трансмембранный сегмент, закоривающий MTLN во внутренней митохондриальной мембране [20]. Данные о партнерах MTLN, полученные в разных лабораториях, несколько отличаются друг от друга. Так, в работах Makarewicz et al. [20] и Friesen et al. [66] продемонстрировано взаимодействие MTLN с компонентами комплекса β -окисления жирных кислот HADHA и HADHB, а в последней работе – также и взаимодействие с АТФ-синтазой. Наши эксперименты по коиммунопреципитации выявили взаимодействие MTLN с цитохромом *B5* редуктазой, CYB5R3. Практически все исследова-

тели сходятся в том, что MTLN способствует работе комплексов респираторной цепи, однако, опять же, нюансы этого влияния видятся ими по-разному. В нашей работе [18] и работе Lin et al. [64] было продемонстрировано снижение эффективности работы комплекса I (СI) дыхательной цепи, NADH-дегидрогеназы. По результатам других исследований было выдвинуто предположение, что наблюдаемый при инактивации MTLN дефект функционирования дыхательной цепи проявляется только при окислении пальмитоилкарнитина, субстрата системы β -окисления жирных кислот [19, 20, 66]. Хотя мы и наблюдали снижение активности СI комплекса дыхательной цепи, это явление проявлялось только на уровне пермеабилезованных клеток и выделенных митохондрий, но не очищенного СI. Поэтому мы сделали вывод о том, что MTLN не является ни компонентом СI, ни фактором его сборки. Поскольку известно, что работа СI сильно зависит от липидного состава мембран, а партнер MTLN, СУВ5R3, участвует в метаболизме липидов, мы изучили изменения липидного состава клеток с инактивированным геном, кодирующим MTLN. Оказалось, что отсутствие функционального митогенрегулина действительно снижало количество необходимого для работы СI фосфатидилхолина и повышало содержание в клетке триглицеридов. Таким образом, функциональная роль MTLN связана, на наш взгляд, с формированием липидного состава клеточных мембран посредством взаимодействия с СУВ5R3. В свою очередь, правильная работа данной системы обеспечивает работу комплекса СI дыхательной цепи за счет благоприятного липидного окружения (рис. 4, б).

МАЛЫЕ БЕЛКИ В РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА

Несколько малых белков вовлечено в сигнальные пути, регулирующие метаболизм. Ключевая роль в этих сигнальных путях отводится киназным комплексам mTOR, стимуляция которых приводит к более активному биосинтезу белков, а ингибирование — к усилению аутофагии, регулируемого распаду компонентов клетки (см. [67] в качестве актуального обзора). Выше упомянуто, что белок altRPL36 является негативным регулятором mTOR-пути, поскольку ингибирует белок TMEM24, который транспортирует PI(4,5)P2. В свою очередь, PI(4,5)P2 является субстратом киназы PI3K, активирующей mTOR через несколько белков-посредников [7].

В РНК *LINC00961*, изначально аннотированной как длинная некодирующая, обнаружена ОРС, соответствующая пептиду длиной 75–90 а.о. в зависимости от используемого старт-кодона. Этот пептид, названный SPAR, имеет трансмембранный домен, с помощью которого он взаимодействует с мембраной позднего эндосом и лизосом [24]. Аффинное совыделение показало, что SPAR взаимодействует с v-АТФазой, протонным насосом, отвечающим за понижение рН в эндосомах и лизосомах. Оказалось, что SPAR ингибирует активацию mTORC1 киназного комплекса, привлекаемого к мембране лизосомы комплексом v-АТФазы, Ragulator и GTPаз семейства Rag при экспорте аминокислот из лизосомы в цитозоль. Этот эффект проявлялся при увеличении концентрации аминокислот после голодания. В клетках с избыточной экспрессией *LINC00961*, кодирующей SPAR, mTORC1 киназный комплекс не мог связаться с мембраной лизосом и оставался диффузно локализованным в цитозоле. Активация mTORC1 при помощи внешнего сигнального пути от рецепторных тирозинкиназ через PI3K не зависит от SPAR [24]. Поскольку известно, что активация mTOR-пути способствует восстановлению мышц после повреждения, у мышей с инактивированным геном *5430416009Rik*, кодирующим SPAR, была протестирована способность мышц к регенерации после повреждения кардиотоксином. Оказалось, что мышцы мышей без SPAR восстанавливаются быстрее, что вполне укладывается в модель гиперстимуляции mTOR-пути в отсутствие данного ингибиторного пептида [24]. Интересно отметить, что в последующих работах также обнаружены отдельные, не связанные с кодированием SPAR, функции РНК *LINC00961* [29] (рис. 5, а).

Регулятором метаболического ответа оказался малый белок hTERP (human TERP), продукт трансляции предшественника теломеразной РНК человека [25]. В процессе транскрипции гена теломеразной РНК, регулируемой мульти-субъединичным комплексом Integrator [68], синтезируется удлиненный предшественник, содержащий открытую рамку считывания, трансляция которой приводит к образованию белка длиной 121 а.о. Оказалось, что белок hTERP способствует выживанию клеток в условиях индукции апоптоза, а мутации в нем приводят к нарушениям протекания аутофагии (рис. 5, б). В отсутствие белка hTERP происходит активация киназы p70S6K1 (неопубликованные данные), что согласуется с данными, полученными при изучении мышей, в организме которых произведена делеция гена теломеразной РНК [69].

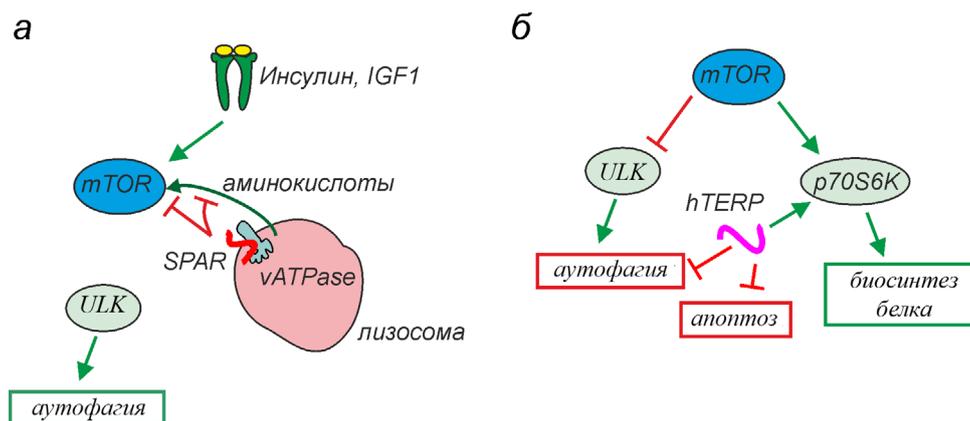


Рис. 5. Функционирование малых белков в регуляции аутофагии и биосинтеза белка. *a* – Пептид SPAR, взаимодействующий с протонной помпой лизосомы, подавляет активацию киназы mTOR аминокислотами, экспортируемыми из лизосомы. При этом SPAR не влияет на активацию mTOR через сигнальный путь от рецепторных тирозинкиназ. *б* – Белок hTERP, закодированный в теломеразной РНК, участвует в регуляции переключения метаболизма клетки, воздействуя на аутофагию и биосинтез белка, а также подавляет апоптоз (подробнее – в тексте)

Участие белка hTERP в модуляции киназных каскадов, регулирующих метаболизм клеток, приоткрывает неизведанный уровень стимуляции пролиферации, ассоциированный как правило с активацией теломеразного комплекса, одним из основных компонентов которого является теломеразная РНК. Известно, что стимуляция клеток иммунной системы, онкотрансформация клеток и другие процессы, требующие повышенной скорости пролиферации и, следовательно, ресурсов, сопровождаются переключением метаболической программы, а также повышением активности теломеразы. Для активации теломеразного комплекса требуется повышенная экспрессия гена обратной транскриптазы, а также эффективный процессинг теломеразной РНК с образованием формы, ассоциированной с теломеразным комплексом. Можно предположить, что выбор одного из двух путей экспрессии гена теломеразной РНК должен зависеть от метаболического состояния клеток и скорости их пролиферации, а также влиять на эти процессы. Таким образом, белок hTERP может функционировать либо как регулятор метаболической программы клетки, либо как сенсор переключения окислительного фосфорилирования и гликолиза. Роль белка TERP в регуляции метаболизма клеток требует дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Малый размер, низкая консервативность последовательностей и незначительные количе-

ства продуктов трансляции коротких рамок считывания затрудняют их идентификацию и изучение функциональной роли. Развитие методов исследования позволило открыть новый уровень регуляции внутриклеточных процессов при помощи пептидов и малых белков. Исследования последних лет демонстрируют участие продуктов трансляции малых рамок считывания во всех процессах функционирования клеток, а истинное количество кодируемых ими белковых продуктов трудно оценить. Постоянно появляющиеся публикации, демонстрирующие разнообразные функции продуктов трансляции коротких рамок считывания, приоткрывают до сих пор нераскрытый мощный регуляторный потенциал «серой материи» протеома. Исследования, направленные на идентификацию и выяснение роли компонентов «альтернативного» протеома, абсолютно необходимы для получения полной картины регуляторных событий, лежащих в основе как поддержания гомеостаза клетки, так и развития патологических процессов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-64-00006).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Numata, K., Kanai, A., Saito, R., Kondo, S., Adachi, J., et al. (2003) Identification of putative noncoding RNAs among the RIKEN mouse full-length cDNA collection, *Genome Res.*, **13**, 1301-1306.
- Okazaki, Y., Furuno, M., Kasukawa, T., Adachi, J., Bono, H., et al. (2002) Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs, *Nature*, **420**, 563-573.
- Wilhelm, B. T., Marguerat, S., Watt, S., Schubert, F., Wood, V., et al. (2008) Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution, *Nature*, **453**, 1239-1243.
- Ulitsky, I., and Bartel, D. P. (2013) lincRNAs: Genomics, evolution, and mechanisms, *Cell*, **154**, 26-46.
- Kopp, F., and Mendell, J. T. (2018) Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs, *Cell*, **172**, 393-407.
- Ingolia, N. T., Ghaemmaghami, S., Newman, J. R. S., and Weissman, J. S. (2009) Genome-wide analysis *in vivo* of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling, *Science*, **324**, 218-223.
- Cao, X., Khitun, A., Na, Z., Dumitrescu, D. G., Kubica, M., et al. (2020) Comparative proteomic profiling of unannotated microproteins and alternative proteins in human cell lines, *J. Proteome Res.*, **19**, 3418-3426.
- Ma, J., Ward, C. C., Jungreis, I., Slavoff, S. A., Schwaib, A. G., et al. (2014) Discovery of human sORF-encoded polypeptides (SEPs) in cell lines and tissue, *J. Proteome Res.*, **13**, 1757-1765.
- Slavoff, S. A., Mitchell, A. J., Schwaib, A. G., Cabili, M. N., Ma, J., et al. (2013) Peptidomic discovery of short open reading frame-encoded peptides in human cells, *Nat. Chem. Biol.*, **9**, 59-64.
- Cardon, T., Hervé, F., Delcourt, V., Roucou, X., Salzet, M., et al. (2020) Optimized sample preparation workflow for improved identification of ghost proteins, *Anal. Chem.*, **92**, 1122-1129.
- Cardon, T., Fournier, I., and Salzet, M. (2021) Shedding light on the ghost proteome, *Trends Biochem. Sci.*, **46**, 239-250.
- Chugunova, A., Navalayeu, T., Dontsova, O., and Sergiev, P. (2018) Mining for small translated ORFs, *J. Proteome Res.*, **17**, 1-11.
- Chen, J., Brunner, A.-D., Cogan, J. Z., Nuñez, J. K., et al. (2020) Pervasive functional translation of noncanonical human open reading frames, *Science*, **367**, 1140-1146.
- Cao, X., and Slavoff, S. A. (2020) Non-AUG start codons: expanding and regulating the small and alternative ORFeome, *Exper. Cell Res.*, **391**, 111973.
- Hinnebusch, A. G. (1997) Translational regulation of yeast GCN4, *J. Biol. Chem.*, **272**, 21661-21664.
- Andreev, D. E., O'Connor, P. B., Fahey, C., Kenny, E. M., Terenin, I. M., et al. (2015) Translation of 5' leaders is pervasive in genes resistant to eIF2 repression, *eLife*, **4**, e03971.
- Michel, A. M., Andreev, D. E., and Baranov, P. V. (2014) Computational approach for calculating the probability of eukaryotic translation initiation from ribo-seq data that takes into account leaky scanning, *BMC Bioinformatics*, **15**, 380.
- Chugunova, A., Loseva, E., Mazin, P., Mitina, A., Navalayeu, T., et al. (2019) LINC00116 codes for a mitochondrial peptide linking respiration and lipid metabolism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 4940-4945.
- Stein, C. S., Jadya, P., Zhang, X., McLendon, J. M., Abouassaly, G. M., et al. (2018) Mitoregulin: a lincRNA-encoded microprotein that supports Mitochondrial super-complexes and respiratory efficiency, *Cell Rep.*, **23**, 3710-3720.e8.
- Makarewich, C. A., Baskin, K. K., Munir, A. Z., Bezprozvannaya, S., Sharma, G., et al. (2018) MOXI is a mitochondrial micropeptide that enhances fatty acid β -oxidation, *Cell Rep.*, **23**, 3701-3709.
- Chu, Q., Martinez, T. F., Novak, S. W., Donaldson, C. J., Tan, D., et al. (2019) Regulation of the ER stress response by a mitochondrial microprotein, *Nat. Commun.*, **10**, 4883.
- Jackson, R., Kroehling, L., Khitun, A., Bailis, W., Jarret, A., et al. (2018) The translation of non-canonical open reading frames controls mucosal immunity, *Nature*, **564**, 434-438.
- Anderson, D. M., Anderson, K. M., Chang, C.-L., Makarewich, C. A., Nelson, B. R., et al. (2015) A micropeptide encoded by a putative long noncoding rna regulates muscle performance, *Cell*, **160**, 595-606.
- Matsumoto, A., Pasut, A., Matsumoto, M., Yamashita, R., Fung, J., et al. (2017) mTORC1 and muscle regeneration are regulated by the LINC00961-encoded SPAR polypeptide, *Nature*, **541**, 228-232.
- Rubtsova, M., Naraykina, Y., Vasilkova, D., Meerson, M., Zvereva, M., et al. (2018) Protein encoded in human telomerase RNA is involved in cell protective pathways, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 8966-8977.
- Hashimoto, Y., Niikura, T., Tajima, H., Yasukawa, T., Sudo, H., et al. (2001) A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and A, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 6336-6341.
- Tenson, T., DeBlasio, A., and Mankin, A. (1996) A functional peptide encoded in the Escherichia coli 23S rRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5641-5646.
- Yang, X., Bam, M., Becker, W., Nagarkatti, P. S., and Nagarkatti, M. (2020) Long Noncoding RNA AW112010 Promotes the differentiation of inflammatory T Cells by suppressing IL-10 expression through histone demethylation, *J. Immunol.*, **205**, 987-993.
- Spencer, H. L., Sanders, R., Boulberdaa, M., Meloni, M., Cochrane, A., et al. (2020) The LINC00961 transcript and its encoded micropeptide, small regulatory polypeptide of amino acid response, regulate endothelial cell function, *Cardiovasc. Res.*, **116**, 1981-1994.
- Zhang, M., Huang, N., Yang, X., Luo, J., Yan, S., et al. (2018) A novel protein encoded by the circular form of the SHPRH gene suppresses glioma tumorigenesis, *Oncogene*, **37**, 1805-1814.
- Zhang, M., Zhao, K., Xu, X., Yang, Y., Yan, S., et al. (2018) A peptide encoded by circular form of LINC-PINT suppresses oncogenic transcriptional elongation in glioblastoma, *Nat. Commun.*, **9**, 4475.
- Yin, H., Shen, X., Zhao, J., Cao, X., He, H., et al. (2020) Circular RNA CircFAM188B encodes a protein that regulates proliferation and differentiation of chicken skeletal muscle satellite cells, *Front. Cell Dev. Biol.*, **8**, 522588.
- Wang, J., Zhu, S., Meng, N., He, Y., Lu, R., and Yan, G.-R. (2019) ncRNA-encoded peptides or proteins and cancer, *Mol. Ther.*, **27**, 1718-1725.
- Fang, J., Morsalin, S., Rao, V. N., and Reddy, E. S. P. (2017) Decoding of non-coding DNA and non-coding RNA: Pri-micro RNA-encoded novel peptides regulate migration of cancer cells, *J. Pharmaceut. Sci. Pharmacol.*, **3**, 23-27.
- Shi, Y., Jia, X., and Xu, J. (2020) The new function of circRNA: translation, *Clin. Transl. Oncol.*, **22**, 2162-2169.
- Vanderperre, B., Lucier, J.-F., Bissonnette, C., Motard, J., Tremblay, G., et al. (2013) Direct detection of alternative

- open reading frames translation products in human significantly expands the proteome, *PLoS One*, **8**, e70698.
37. Liu, Y., Woods, N. T., Kim, D., Sweet, M., Monteiro, A. N. A., and Karchin, R. (2011) Yeast two-hybrid junk sequences contain selected linear motifs, *Nucleic Acids Res.*, **39**, e128-e128.
 38. Arnoult, N., Correia, A., Ma, J., Merlo, A., Garcia-Gomez, S., et al. (2017) Regulation of DNA repair pathway choice in S and G2 phases by the NHEJ inhibitor CYREN, *Nature*, **549**, 548-552.
 39. Agarwal, S., Harada, J., Schreifels, J., Lech, P., Nikolai, B., et al. (2006) Isolation, characterization, and genetic complementation of a cellular mutant resistant to retroviral infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15933-15938.
 40. Hung, P. J., Johnson, B., Chen, B.-R., Byrum, A. K., Bredemeyer, A. L., et al. (2018) MRI is a DNA damage response adaptor during classical non-homologous end joining, *Mol. Cell*, **71**, 332-342.e8.
 41. Hanyu-Nakamura, K., Sonobe-Nojima, H., Tanigawa, A., Lasko, P., and Nakamura, A. (2008) Drosophila Pgc protein inhibits P-TEFb recruitment to chromatin in primordial germ cells, *Nature*, **451**, 730-733.
 42. Hou, L., Wang, Y., Liu, Y., Zhang, N., Shamovsky, I., et al. (2019) Paf1C regulates RNA polymerase II progression by modulating elongation rate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 14583-14592.
 43. Yang, Y., Gao, X., Zhang, M., Yan, S., Sun, C., et al. (2018) Novel role of FBXW7 circular RNA in repressing glioma tumorigenesis, *JNCI: J. Natl. Cancer Institute*, **110**, 304-315.
 44. Cardon, T., Franck, J., Coyaud, E., Laurent, E. M. N., Damato, M., et al. (2020) Alternative proteins are functional regulators in cell reprogramming by PKA activation, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 7864-7882.
 45. Huang, J.-Z., Chen, M., Chen, D., Gao, X.-C., Zhu, S., et al. (2017) A peptide encoded by a putative lncRNA HOXB-AS3 suppresses colon cancer growth, *Mol. Cell*, **68**, 171-184.e6.
 46. Christofk, H. R., Vander Heiden, M. G., Harris, M. H., Ramanathan, A., Gerszten, R. E., et al. (2008) The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth, *Nature*, **452**, 230-233.
 47. Chen, M., Zhang, J., and Manley, J. L. (2010) Turning on a fuel switch of cancer: hnRNP proteins regulate alternative splicing of pyruvate kinase mRNA: Figure 1. *Cancer Res.*, **70**, 8977-8980.
 48. Palmer, C. S., Osellame, L. D., Laine, D., Koutsopoulos, O. S., Frazier, A. E., and Ryan, M. T. (2011) MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery, *EMBO Rep.*, **12**, 565-573.
 49. Rathore, A., Chu, Q., Tan, D., Martinez, T. F., Donaldson, C. J., et al. (2018) MIEF1 microprotein regulates mitochondrial translation, *Biochemistry*, **57**, 5564-5575.
 50. Delcourt, V., Brunelle, M., Roy, A. V., Jacques, J.-F., Salzet, M., et al. (2018) The protein coded by a short open reading frame, not by the annotated coding sequence, is the main gene product of the dual-coding gene MIEF1, *Mol. Cell. Proteomics*, **17**, 2402-2411.
 51. Brown, A., Rathore, S., Kimanius, D., Aibara, S., Bai, X., et al. (2017) Structures of the human mitochondrial ribosome in native states of assembly, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 866-869.
 52. Cardon, T., Salzet, M., Franck, J., and Fournier, I. (2019) Nuclei of HeLa cells interactomes unravel a network of ghost proteins involved in proteins translation. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subjects*, **1863**, 1458-1470.
 53. D'Lima, N. G., Ma, J., Winkler, L., Chu, Q., Loh, K. H., et al. (2017) A human microprotein that interacts with the mRNA decapping complex, *Nat. Chem. Biol.*, **13**, 174-180.
 54. Cloutier, P., Poitras, C., Faubert, D., Bouchard, A., Blanchette, M., et al. (2020) Upstream ORF-encoded ASDURF is a novel prefoldin-like subunit of the PAQosome, *J. Proteome Res.*, **19**, 18-27.
 55. Polycarpou-Schwarz, M., Groß, M., Mestdagh, P., Schott, J., Grund, S. E., et al. (2018) The cancer-associated microprotein CASIMO1 controls cell proliferation and interacts with squalene epoxidase modulating lipid droplet formation, *Oncogene*, **37**, 4750-4768.
 56. Kranias, E. G., and Hajjar, R. J. (2012) Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulome, *Circ. Res.*, **110**, 1646-1660.
 57. MacLennan, D. H., and Kranias, E. G. (2003) Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 566-577.
 58. Tupling, A. R., Bombardier, E., Gupta, S. C., Hussain, D., Vigna, C., et al. (2011) Enhanced Ca²⁺ transport and muscle relaxation in skeletal muscle from sarcolipin-null mice, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **301**, C841-C849.
 59. Gorski, P. A., Ceholski, D. K., and Young, H. S. (2017) Structure-function relationship of the SERCA Pump and its regulation by phospholamban and sarcolipin, in *Membrane Dynamics and Calcium Signaling*, vol. 981, Springer International Publishing, Cham, pp. 77-119.
 60. Bal, N. C., and Periasamy, M. (2020) Uncoupling of sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase pump activity by sarcolipin as the basis for muscle non-shivering thermogenesis, *Phil. Trans. R. Soc. B*, **375**, 20190135.
 61. Hazafa, A., Batool, A., Ahmad, S., Amjad, M., Chaudhry, S. N., et al. (2021) Humanin: a mitochondrial-derived peptide in the treatment of apoptosis-related diseases, *Life Sci.*, **264**, 118679.
 62. Calvo, S. E., Clauser, K. R., and Mootha, V. K. (2016) MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins, *Nucleic Acids Res.*, **44**, D1251-D1257.
 63. Zhang, S., Reljić, B., Liang, C., Kerouanton, B., Francisco, J. C., et al. (2020) Mitochondrial peptide BRAWNIN is essential for vertebrate respiratory complex III assembly, *Nat. Commun.*, **11**, 1312.
 64. Lin, Y.-F., Xiao, M.-H., Chen, H.-X., Meng, Y., Zhao, N., et al. (2019) A novel mitochondrial micropeptide MPM enhances mitochondrial respiratory activity and promotes myogenic differentiation, *Cell Death Dis.*, **10**, 528, doi: 10.1038/s41419-019-1767-y.
 65. Wang, L., Fan, J., Han, L., Qi, H., Wang, Y., et al. (2020) The micropeptide LEMP plays an evolutionarily conserved role in myogenesis, *Cell Death Dis.*, **11**, 357, doi: 10.1038/s41419-020-2570-5.
 66. Friesen, M., Warren, C. R., Yu, H., Toyohara, T., Ding, Q., et al. (2020) Mitoregulin controls β -oxidation in human and mouse adipocytes, *Stem Cell Rep.*, **14**, 590-602.
 67. Liu, G. Y., and Sabatini, D. M. (2020) mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21**, 183-203.
 68. Rubtsova, M. P., Vasilkova, D. P., Moshareva, M. A., Malyavko, A. N., Meerson, M. B., et al. (2019) Integrator is a key component of human telomerase RNA biogenesis, *Sci. Rep.*, **9**, 1701.
 69. Ferrara-Romeo, I., Martinez, P., Saraswati, S., Whittemore, K., Graña-Castro, O., et al. (2020) The mTOR pathway is necessary for survival of mice with short telomeres, *Nat. Commun.*, **11**, 1168.

**LITTLE BUT LOUD. THE DIVERSITY OF FUNCTIONS
OF SMALL PROTEINS AND PEPTIDES –
TRANSLATIONAL PRODUCTS OF SHORT READING FRAMES**

Review

P. V. Sergiev^{1,2,3*} and M. P. Rubtsova^{1*}

¹ *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, 119991 Moscow, Russia;
e-mail: petya@genebee.msu.ru, mprubtsova@gmail.com*

² *Center of Life Sciences, Skolkovo Institute of Sciences and Technology, 143025 Skolkovo, Russia*

³ *Institute of Functional Genomics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Moscow, Russia*

Cell functioning is a tightly regulated process. For many years, research in the fields of proteomics and functional genomics has been focused on the role of proteins in cell functioning. The advances in science have led to the uncovering that short open reading frames, previously considered non-functional, serve a variety of functions. Short reading frames in polycistronic mRNAs often regulate their stability and translation efficiency of the main reading frame. The improvement of proteomic analysis methods has made it possible to identify the products of translation of short reading frames in quantities that suggest the existence of functional role of those peptides and short proteins. Studies demonstrating their role unravel a new level of the regulation of cell functioning and its adaptation to changing conditions. This review is devoted to the analysis of functions of recently discovered peptides and short proteins.

Keywords: peptides, short open reading frame, long noncoding RNAs, alternative proteins

УДК 577.23

ТРАНСЛЯЦИОННЫЙ АКТИВАТОР Mss51p ДРОЖЖЕЙ И БЕЛОК ZMYND17 ЧЕЛОВЕКА – ОБЩНОСТЬ ПРОИСХОЖДЕНИЯ, РАЗЛИЧИЕ ФУНКЦИЙ

© 2021 М.В. Балева, У.Е. Пиунова, И.В. Чичерин,
Д.Г. Красавина, С.А. Левицкий*, П.А. Каменский

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический факультет,
кафедра молекулярной биологии, 119234 Москва, Россия; электронная почта: sergey.levitskii@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.05.2021

После доработки 19.07.2021

Принята к публикации 19.07.2021

Трансляция в митохондриях современных эукариот, несмотря на сходство с биосинтезом белка у бактерий, имеет ряд особенностей. Одной из таких уникальных черт является необходимость координации трансляции отдельных митохондриальных мРНК, кодирующих субъединицы комплексов цепи окислительного фосфорилирования, с трансляцией других компонентов этих комплексов в цитозоле. В митохондриях пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* такая координация осуществляется посредством системы белков – трансляционных активаторов, преимущественно взаимодействующих с 5'-нетранслируемыми областями митохондриальных мРНК. В митондриях человека подобной системы не обнаружено, хотя и выявлен один трансляционный активатор TACO1. В данной работе мы изучили влияние на митохондриальную трансляцию в клетках человека делеции гена *ZMYND17*, кодирующего ортолог дрожжевого трансляционного активатора Mss51p. Нам удалось продемонстрировать, что делеция *ZMYND17* не влияет на трансляцию в митохондриях, однако снижает активность цитохром *c*-оксидазы и увеличивает количество свободной F₁-субъединицы АТФ-синтазы. Помимо этого, мы изучили эволюционную историю Mss51p и ZMYND17 и выявили путь расхождения функций этих ортологических белков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: митохондрии, трансляция, активаторы трансляции, регуляция трансляции.

DOI: 10.31857/S0320972521090104

ВВЕДЕНИЕ

Митохондрии являются облигатными органеллами большинства эукариотических клеток, выполняющими множество важнейших функций. Помимо обеспечения клеток энергией путём синтеза АТФ в результате окислительного фосфорилирования, митохондрии участвуют в образовании FeS-кластеров, метаболизме липидов, аминокислот и нуклеотидов, регуляции апоптоза, а также и во многих других процессах. Согласно общепринятой эндосимбиотической теории, митохондрии произошли путём поглощения их предка, родственного современным α -протеобактериям, археоподобным предшественником эукариот [1]. В ходе эволюции подавляющее большинство генов предка митондрий элиминировались или были перенесены в ядро. Таким образом, большинство митондриальных белков кодируется в ядре, синтезируется в цитозоле, а затем импортируется в мито-

хондрии с использованием особого аппарата транслокации. Тем не менее митохондрии современных организмов, как правило, имеют свой сравнительно небольшой геном, а также аппараты его поддержания, транскрипции и трансляции.

Несмотря на общую схожесть процессов трансляции у бактерий и митондрий, аппарат биосинтеза белка в этих органеллах имеет ряд существенных отличий от аппарата митондриальной трансляции [2]. В первую очередь следует отметить существенно большее содержание белка относительно рРНК в митондриальных рибосомах, предположительно, обусловленное замещением функций отдельных участков рРНК синтезируемыми в цитозоле белками. Кроме этого, митондриальные рибосомы строго ассоциированы с внутренней мембраной митондрий [3]. Важной особенностью митондриальной трансляции является необходимость её точной взаиморегуляции с биосинтезом митондриально-адресованных белков в цитозоле для обеспечения правильных стехиометрических соотношений новосинтезируемых и импортируемых белков, обуславливающих

Принятые сокращения: 5'-НТО – 5'-нетранслируемая область; CIV – комплекс IV цитохром *c*-оксидазы.

* Адресат для корреспонденции.

корректную сборку комплексов и суперкомплексов электрон-транспортной цепи на внутренней мембране митохондрий. По всей видимости, в ходе эволюции механизмы такой тонкой регуляции биосинтеза белка в митохондриях возникали и развивались параллельно и независимо у разных групп эукариот [4]. В наиболее степени особенности митохондриальной трансляции и её регуляции изучены у двух объектов — пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и млекопитающих.

Геном современных митохондрий представляет собой кольцевую или линейную молекулу ДНК, несущую несколько генов, кодирующих преимущественно субъединицы комплексов цепи окислительного фосфорилирования, гены рНК митохондриальных рибосом, а также гены тРНК. У пекарских дрожжей *S. cerevisiae* геном митохондрий содержит гены семи белков (субъединиц комплексов электрон-транспортной цепи), одного белка малой субъединицы митохондриальной рибосомы, гены 15S и 21S рНК митохондриальных рибосом, ген рНК-компонента митохондриальной рНКазы Р, а также 24 гена тРНК [5]. Регуляция экспрессии митохондриального генома дрожжей в основном осуществляется на пост-транскрипционном уровне [6]. Матричные рНК митохондрий дрожжей имеют протяжённые 5'-нетранслируемые области (НТО), с которыми взаимодействуют участники сложной системы регуляции трансляции — трансляционные активаторы. Подробно система трансляционных активаторов *S. cerevisiae* рассмотрена в недавнем обзоре [7]. Особенно изыщно осуществляется регуляция трансляции мРНК COX1. Для этой мРНК обнаружено 4 трансляционных активатора: Pet309p, Mss51p, Mam33p и Mss116p. Содержащий 12 пентатрикопептидных повторов белок внутренней мембраны Pet309p взаимодействует с 5'-НТО мРНК COX1, причём такое взаимодействие является абсолютно необходимым для трансляции этой мРНК [8]. Помимо этого, Pet309p стабилизирует предшественника мРНК COX1 [9]. Также с 5'-НТО мРНК COX1 взаимодействует активатор Mam33p, помимо этого участвующий в регуляции сборки митохондриальных рибосом [10]. Третий трансляционный фактор мРНК COX1, белок Mss166p, относится к семейству DEAD-бокс хеликаз. В условиях холодового шока он является фактором элонгации транскрипции, а в нормальных условиях — фактором сплайсинга митохондриальных пре-мРНК. Помимо этого, он взаимодействует с Pet309p, причём делеция кодирующего Mss116p гена приводит к отсутствию Pet309p в митохондриях, что существенно снижает эффективность трансляции COX1 [11].

Ключевым компонентом системы регуляции трансляции мРНК COX1 у *S. cerevisiae* является четвёртый трансляционный активатор — белок Mss51p. Его функционирование осуществляется по принципу обратной связи. Mss51p изначально взаимодействует с 5'-НТО и кодирующей частью мРНК COX1, опосредуя биосинтез соответствующего белка, а также непосредственно с новосинтезируемым полипептидом Cox1p [12]. По завершении трансляции связанный с Cox1p Mss51p включается в состав интермедиата сборки комплекса цитохром *c*-оксидазы (комплекса IV CIV), содержащего ряд других факторов — регуляторов. В случае остановки корректной сборки CIV на этой стадии Mss51p остаётся связанным с интермедиатом и не способен заново участвовать в активации трансляции мРНК COX1 [13]. Если же на внутренней мембране митохондрий присутствует достаточное количество необходимых для сборки субъединиц CIV, Mss51p диссоциирует из интермедиата и становится доступным для следующего раунда активации трансляции мРНК COX1. Помимо этого, Mss51p является гем-связывающим белком, причём недостаток гема приводит к значительным нарушениям биосинтеза Cox1p [14]. По всей видимости, связывание гема белком Mss51p является необходимым условием для ассоциации упоминавшегося интермедиата сборки CIV и не играет значительной роли в активации трансляции мРНК COX1 [7, 15]. Таким образом, Mss51p играет ключевую роль в регуляции трансляции Cox1p в митохондриях, определяя интенсивность биосинтеза этого белка в зависимости от эффективности сборки цитохром *c*-оксидазы.

В геноме митохондрий млекопитающих закодировано 13 белков, являющихся субъединицами комплексов цепи окислительного фосфорилирования I, III, IV и V [16]. Это гены COB (апоцитохром *b*), COX1,2,3 (субъединицы цитохром *c*-оксидазы), ATP6,8 (субъединицы АТФ-синтазы), а также ND1,2,3,4,4L,5,6 (субъединицы NADH-дегидрогеназы), кодируемые одиннадцатью мРНК [17]. Трансляция соответствующих мРНК в митохондриях млекопитающих, по всей видимости, регулируется отличным от *S. cerevisiae* способом. В первую очередь это обусловлено практически полным отсутствием 5'-НТО у митохондриальных мРНК млекопитающих. Более того, добавление всего лишь нескольких нуклеотидов к 5'-концу мРНК существенно снижает эффективность образования инициаторных комплексов на них *in vitro* [18]. Недавние структурные исследования, проведённые с помощью криоэлектронной микроскопии, показали, что важную роль в связыва-

нии безлидерной мРНК малой субъединицей митохондриальной рибосомы играет рибосомный PPR-белок mS39, располагающийся у места входа мРНК. Важно, что контакт мРНК с mS39, по всей видимости, не является структурно специфичным, а также не может быть зависимым от последовательности, поскольку сколько-либо значимого консенсуса в 11 митохондриальных мРНК не обнаруживается, как и значимых вторичных структур в 5'-фланговых областях мРНК [19, 20]. Предполагается, что это взаимодействие обусловлено частым появлением нуклеотида U во втором положении кодонов всех мРНК, начиная с седьмого кодона. Возможно, наличие часто повторяющихся U является своего рода мишенью для связывания PPR-доменами и образования инициаторного комплекса [19]. Однако эти данные не объясняют, каким именно образом осуществляется регуляция трансляции различных мРНК, а также то, как осуществляется взаимосвязь биосинтеза митохондриально-закодированных субъединиц комплексов цепи окислительного фосфорилирования с трансляцией других субъединиц в цитозоле.

Отсутствие 5'-НТО, казалось бы, отвергает возможность существования у млекопитающих системы трансляционных активаторов, сходных с таковой у *S. cerevisiae*. Однако в 2009 году был идентифицирован первый трансляционный активатор в митохондриях человека – TACO1 [21]. Авторам указанной работы удалось продемонстрировать, что мутации в гене этого белка в клетках пациента с синдромом Лея приводят к существенному снижению эффективности трансляции COX1 в митохондриях. При этом эффективность биосинтеза COX1 восстанавливалась при крайне слабом уровне экспрессии экзогенного TACO1, а также ингибировалась при сверхэкспрессии кодирующего TACO1 гена [21]. Тем не менее молекулярные механизмы влияния TACO1 на трансляцию COX1 остаются неизученными, хотя и показана взаимосвязь мутаций в гене этого белка с тяжёлыми митохондриальными заболеваниями [22, 23].

Кроме этого, методами биоинформатики было предсказано, что белок человека с неизвестной функцией, ZMYND17, является ортологом уже упоминавшегося трансляционного регулятора *S. cerevisiae* Mss51p [24]. При дальнейшем изучении было продемонстрировано, что этот белок локализован в митохондриях, кодирующий его ген, преимущественно экспрессируется в скелетной мускулатуре, а подавление его экспрессии приводит к увеличению уровня клеточной АТФ, увеличению эффективности гликолиза и окислительного фосфорилирова-

ния [25]. В более позднем исследовании, проведённом на лабораторных животных, нокаутных по гену *ZMYND17*, было показано, что, несмотря на нормальное развитие таких мышей, у них наблюдались морфологические и функциональные нарушения митохондрий мышц. Кроме того, у нокаутных по *ZMYND17* мышей среднего возраста отмечены сниженная производительность аэробных упражнений, плохая усвояемость глюкозы и инсулинорезистентность. Авторы предположили, что ZMYND17 является стресс-индуцируемым метаболическим регулятором, поддерживающим целостность митохондрий, отсутствие которого приводит к нарушениям метаболизма глюкозы во всем организме [26]. Интересно, что в другой работе на сходных нокаутных по *ZMYND17* мышцах были получены другие результаты. Оказалось, что лишённые ZMYND17 мыши были устойчивы к набору веса на высокожировой диете, обладали повышенной скоростью метаболизма глюкозы, увеличенной чувствительностью к инсулину и ускоренным β -окислением жирных кислот [27]. В последующем исследовании той же группы авторов на мышинной модели мышечной дистрофии Дюшенна было показано, что удаление гена *ZMYND17* приводит к увеличению поглощения кислорода миофибриллами, а также снижению гистологической патологии. Делеция гена, кодирующего ортолог Mss51p, снижала обусловленные заболеванием дефекты митохондриального дыхания и увеличивала устойчивость к усталости, однако не увеличивала силу мышц [28].

Таким образом, ортолог гена трансляционного активатора Mss51p *S. cerevisiae* у человека, белок ZMYND17, несмотря на митохондриальную локализацию, по всей видимости, имеет отличную от дрожжевого белка функцию. В данной работе для сравнительной функциональной характеристики этих белков мы решили оценить влияние делеции гена *ZMYND17* в линии клеток HeLa человека на митохондриальную трансляцию и функциональность митохондрий, а также проследить эволюционную историю Mss51p и ZMYND17.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и линии клеток, среды для культивирования. В работе использовали штамм *Escherichia coli* TOP10 OneShot («Invitrogen», США), культивируемый в среде LB, а также адгезионную линию клеток HeLa человека (ATCC CCL-2, «ATCC», США), культивируемую в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

Использованные в работе нуклеотиды

Наименование	Последовательность 5'–3'	Назначение
MSS51-3Fwd	CACCgTCCACGGTCCCGGCGACGA	сборка sgRNA 3
MSS51-3Rev	AAACTCGTCGCCGGACCGTGGAc	сборка sgRNA 3
MSS51-17Fwd	CACCgCCTTGGATGATAATGTTCC	сборка sgRNA 17
MSS51-17Rev	AAACGGAACATTATCATCCAAGGc	сборка sgRNA 17
ZMYND-1Fwd	CCTGGGTCTGAGAGACTGG	анализ клонов на прохождение редактирования
ZMYND-1Rev	CTGTACTCCCTCTCCACCTTC	анализ клонов на прохождение редактирования

Примечание. Серым выделены участки для создания липких концов, соответствующих образуемым эндонуклеазой *BbsI*.

с глюкозой (4,5 г/л) и аланил-глутамином («ПанЭко», Россия).

Плазмидные векторы и олигонуклеотиды. Для получения делеции гена *ZMYND17* использовали плазмиду pCas9-ires-EGFP, содержащую гены РНК-направляемой эндонуклеазы Cas9 и зелёного флуоресцирующего белка (EGFP), разделённые IRES под контролем CMV-промотора, полученную ранее [29]. Плазида pU6-gRNA была любезно предоставлена доктором Скрыбиным, Университет Мюнстера, Германия [30]. Использованные в работе олигонуклеотиды приведены в таблице.

Делеция гена *ZMYND17*. Для получения линии клеток HeLa с делецией в гене *ZMYND17* были получены векторы, содержащие гены двух одиночных направляющих РНК (sgRNA) под контролем промотора U6. Для этого олигонуклеотиды, соответствующие sgRNA 3 и 17 (таблица), отжигали попарно друг на друга, фосфорилировали полинуклеотидкиназой (PNK, «ThermoFisher Scientific», США), следуя рекомендациям производителя, а затем лигировали в предварительно гидролизованые эндонуклеазой *BbsI* («ThermoFisher Scientific») плазмидные векторы pU6-gRNA. Лигазными смесями трансформировали компетентные клетки *E. coli*. После отбора трансформантов и выделения плазмид корректность сборки векторов подтверждали секвенированием по Сэнгеру («Евроген», Россия).

Клетки HeLa трансфицировали плазмидами, которые содержали компоненты системы CRISPR/Cas9 (2 плазмиды на основе pU6-gRNA, содержавших гены sgRNA 3 и 17, pCas9-ires-EGFP) при помощи реагента Lipofectamine 3000 («Invitrogen», США), следуя рекомендациям производителя. Через 48 ч трансфицированные клетки анализировали с помощью системы мультифотонной и конфокальной микроскопии Nikon A1 MP+ («Nikon», Япония) и проводили отбор флуоресцирующих клеток с помощью

сортирующей цитофлуоретрической системы FACS Aria SORP («Beckton Dickinson», США). После подсчёта клеток в камере Горяева 100 клеток помещали в 10 мл DMEM и высевали на 96-луночный планшет по 100 мкл в лунку. Далее клетки пересевали на 12-луночный планшет, культивировали до 50–70% конfluence, выделяли ДНК и проверяли на наличие делеции с помощью заранее подобранной и протестированной пары олигонуклеотидов (таблица).

Анализ митохондриальной трансляции *in vivo*. Для одного анализа использовали ~10⁶ клеток. Клетки промывали раствором PBS (1,7 мМ КН₂Р₄, 5,2 мМ Na₂НР₄, 150 мМ NaCl, pH 7,4), добавляли среду DMEM без метионина, содержащую 10% диализованной сыворотки крупного рогатого скота и 5 мМ циклогексимида, и инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 15 мин. Далее к клеткам добавляли 0,1 мкКю метионина («Perkin Elmer», США) и инкубировали 45 мин при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Реакцию мечения останавливали добавлением холодного L-метионина до 4 мМ и пурамицина до 30 мкг/мл. Клетки промывали раствором PBS, диссоциировали 0,25%-ным раствором Трипсин-EDTA («ПанЭко», Россия) и центрифугировали 4 мин при 400 g. Клетки промывали раствором PBS, а затем лизировали ультразвуком («Branson Scientific», США) в PBS. По 25 мкг суммарного белка разделяли в 18%-ном денатурирующем ПААГ. Гель окрашивали Кумасси, высушивали на приборе Gel Dryer System («Hoefel», Германия) при 80 °С в течение часа. Продукты митохондриальной трансляции визуализировали радиоавтографически на приборе Storm865 («GE Healthcare», США). Анализ распределения продуктов митохондриальной трансляции проводили с помощью программного обеспечения ImageJ («NIH», США).

Измерение скорости поглощения кислорода. Поглощение клетками кислорода определяли полярографически при помощи электрода

Кларка на приборе Oxygraph Plus («Hansatech», Великобритания) при 37 °С в среде DMEM. Для каждого измерения использовали $\sim 4 \times 10^6$ клеток. Для установления базального уровня дыхания измерения проводили в суспензии клеток на протяжении 5 мин, затем в ячейку добавляли разбавитель СССР до концентрации 10 мкМ для измерения истинного дыхания; измерения проводили ещё 2 мин, после чего активность цитохром *c*-оксидазы ингибировали добавлением KCN до 1 мМ. Эксперименты проводили в трёх независимых повторах. Скорость поглощения кислорода клетками высчитывалась как производная функции, выражающей зависимость концентрации кислорода от времени.

Выделение митохондрий. Митохондрии выделяли из $\sim 2 \times 10^7$ клеток. Клетки ресуспендировали в 2 мл охлажденного RSB-буфера (10 мМ NaCl, 1,5 мМ MgCl₂, 10 мМ Tris-HCl pH, 7,5), переносили в 7-мл гомогенизатор Даунса и инкубировали 5 мин на льду. Клетки лизировали семью ударами и немедленно добавляли 1,455 мл 2,5× MS-буфера (525 мМ маннитола, 175 мМ сахарозы, 2,5 мМ EDTA, 12,5 мМ Tris-HCl, pH 7,5). Лизат клеток центрифугировали 5 мин при 1300 g и 4 °С. Митохондрии осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 17 000 g и 4 °С. Концентрацию митохондриального белка измеряли методом Бредфорда.

Измерение активности комплекса IV. В качестве субстрата для измерения активности комплекса IV использовали раствор восстановленного цитохрома *c*. Для его приготовления 2,7 мг сухого цитохрома *c* («Sigma Aldrich», США) растворяли в 1 мл воды, после чего добавляли 5 мкл 0,1 М DTT и инкубировали 15–30 минут при комнатной температуре. Исходный раствор разбавляли в 20 раз и измеряли разницу поглощения A_{550}/A_{565} . Соотношение A_{550}/A_{565} должно быть 10–20. Для измерения активности 1 мкг митохондрий, растворенных в 40 мкл буфера, содержащего 10 мМ Tris-HCl, pH 7,0 и 250 мМ сахарозы, добавляли в 180 мкл буфера, содержащего 10 мМ Tris-HCl, 125 мМ KCl, pH 7,0; митохондрии пермеабелизовали добавлением 1 мМ додецилмальтозида. К полученной суспензии добавляли 20 мкл раствора субстрата и измеряли поглощение цитохрома *c* при 550 нм каждые 10 с в течение 3 мин в планшетном спектрофотометре («Тесла», Швейцария). Реакцию ингибировали добавлением 1 мкл 1 М KCN, специфически блокирующем комплекс IV, и продолжали измерение в тех же временных интервалах. При расчётах скорость изменения поглощения после добавления KCN вычитали из скорости изменения поглощения без KCN для исключения влияния активности комплекса III. Активность ци-

тохром *c*-оксидазы выражали в единицах активности (U) на мг митохондриального белка, где одна единица активности окисляет 1 мкмоль ферроцитохрома *c* в минуту.

Blue-Native-электрофорез. Митохондрии ресуспендировали в буфере для солиubilизации (50 мМ имидазол, 50 мМ NaCl, 2 мМ 6-аминогексановая кислота, 1 мМ EDTA; pH 7,0) до конечной концентрации митохондриального белка 10 мкг/мкл. Далее добавляли 20%-ный дигитонин (в расчёте 6 мг дигитонина на 1 мг митохондриального белка) и инкубировали 15 мин на льду. Суспензию митохондрий центрифугировали в течение 1 ч при 25 000 g и 4 °С. К супернатанту добавляли 50%-ный глицерин (в расчёте 1 мкл/2,4 мкл дигитонина) и 5%-ный Кумаси G-250 (в расчёте 1 мкл/2 мкл детергента), центрифугировали 5 мин при 25 000 g и наносили на 4–10%-ный Blue-Native полиакриламидный гель, согласно ранее опубликованному протоколу [31]. Электрофоретическое разделение проводили в течение 30 мин при постоянном напряжении 75 В, используя катодный буфер, содержащий 7,5 мМ имидазол, 50 мМ Tricine, 0,02% Кумаси G-250, pH 7,0, а затем 1,5 ч при постоянном напряжении 125 В, используя катодный буфер, содержащий 7,5 мМ имидазол, 50 мМ Tricine, 0,002% Кумаси G-250, pH 7,0. В качестве анодного буфера использовали 25 мМ имидазол-HCl, pH 7,0.

Измерение активностей комплекса I и АТФ-синтазы в геле. Активность НАДН-дегидрогеназы в геле анализировали, согласно ранее опубликованному протоколу [32]. Кратко, Blue-Native-гель после электрофореза инкубировали при комнатной температуре в растворе, содержащем 100 мМ Tris-HCl, pH 7,4, 1 мг/мл NBT (нитросиний тетразолий) и 0,14 мМ НАДН, до появления специфической окраски. Обсчёт распределения активности по суперкомплексам проводили с использованием программы ImageJ. Активность комплекса V (АТФ-синтазы) исследовали непосредственно в геле, согласно ранее опубликованному протоколу [32]. Гель инкубировали в буфере, содержащем 35 мМ Tris-HCl, pH 7,8, 270 мМ глицин, 14 мМ MgSO₄, 5 мМ АТФ и 0,2% Pb(NO₃)₂ при 37 °С при постоянном помешивании до проявления характерной окраски. Реакцию останавливали инкубацией геля в 1 М растворе глицина.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение линии клеток HeLa с делецией в гене ZMYND17. Для получения линии клеток HeLa с делецией в гене ZMYND17 (далее –

$\Delta ZMYND17$) была использована система CRISPR/Cas9, которая позволила направленно внести в геном двуцепочечные разрывы с последующей их репарацией с помощью негомологичного соединения концов. Делетируемый участок выбирали, учитывая следующие условия: а) делеция должна возникнуть в одном из первых экзонов; б) для предотвращения возникновения в отредактированном гене альтернативных стартовых кодонов исходный стартовый кодон должен сохраняться; в) длина делетируемого участка должна быть не кратна 3 для того, чтобы обеспечить сбой рамки считывания и невозможность синтеза «укороченной» формы белка; г) делеция должна возникать в участке, содержащемся во всех возможных изоформах мРНК, возникающих в результате альтернативного сплайсинга. Для получения клонов с нефункциональным белком ZMYND17 в качестве мишени для sgRNA был выбран участок первого экзона соответствующего гена (рис 1, а). Подбор направляющих последовательностей одиночных гидовых РНК осуществляли с помощью онлайн-сервиса genscript.com. Гены, кодирующие комплементарные мишени участки sgRNA, клонировали в составе плазмидного вектора pU6-gRNA. После трансфекции клеток HeLa компонентами системы CRISPR/Cas9, отбора трансфицированных клеток и их клонирования из потомства трансфицированных моноклонов выделяли ДНК и оценивали эффективность редактирования с помощью ПЦР. Полученные в ходе ПЦР фрагменты, соответствующие по длине ожидаемым в результате корректного редактирования обоим аллелям, выделяли, после чего определяли их нуклеотидную последовательность. В результате секвенирования таких фрагментов были отобраны 2 клон, содержавшие делеции в первом экзоне гена ZMYND17 протяженностью в 137 нуклеотидов, которые приводили к сдвигу рамки считывания и образованию стоп-кодона через 40 нуклеотидов после места сдвига рамки (рис 1, а).

Делеция в гене ZMYND17 не влияет на эффективность трансляции в митохондриях. После получения линий клеток с делецией в гене ZMYND17, приводящей к отсутствию возможности синтеза полноценного белка, мы оценили влияние такой делеции на эффективность трансляции в митохондриях. Для этого цитозольная трансляция блокировалась добавлением циклогексимида, после чего к клеткам в среде без метионина добавляли L-[35 S]-метионин. Реакцию останавливали добавлением холодного метионина и пуромицина, анализ включения радиоактивной метки проводили после разделения продуктов трансляции в 18%-ном ПААГ (рис. 1, б).

Количественный анализ эффективности трансляции проводили по результатам шести независимых экспериментов (по 3 эксперимента для каждого из полученных клонов). Согласно результатам количественного анализа, делеция в гене ZMYND17 не приводила к значимым изменениям эффективности трансляции ни одного из 13 митохондриально кодируемых белков.

Анализ скорости поглощения кислорода и активности цитохром с-оксидазы в клетках с делецией гена ZMYND17. Для того чтобы выяснить, влияет ли делеция гена ZMYND17 на митохондриальную функцию, мы измерили скорость поглощения кислорода в нокаутных линиях и клетках дикого типа. Измерение скорости поглощения кислорода проводили поляриграфически с использованием электрода Кларка. Измеряли как базальное клеточное дыхание, так и истинное, определяемое в присутствии разобщителя СССР (карбонилцианид м-хлорфенилгидразона). Последнее значение отражает максимально возможное для исследуемого образца поглощение кислорода, не зависящее от протонного градиента на внутренней мембране митохондрий. Для нормирования результатов до измерения подсчитывали количество клеток, скорость поглощения выражали в нМ/10⁶ клеток/мин. На рис. 2, а представлены обобщенные результаты по данным четырех независимых экспериментов.

Согласно полученным нами данным, уровень базального дыхания у клеток с делецией в гене ZMYND17 не отличался от такового у клеток исходной линии HeLa. Тем не менее уровень истинного дыхания, измеряемого при разобщении работы электрон-транспортной цепи и электрохимического градиента с помощью СССР, у клеток исходной линии был больше на ~27%. Последнее может быть обусловлено сниженной активностью цитохром с-оксидазы у клеток с делецией.

Для проверки этого предположения мы спектрофотометрически измерили активность CIV в изолированных митохондриях из клеток исходной линии HeLa и $\Delta ZMYND17$ (рис. 2, б). Действительно, согласно полученным нами данным, активность цитохром с-оксидазы в митохондриях клеток $\Delta ZMYND17$ была снижена в среднем на 23% от таковой в митохондриях клеток исходной линии HeLa.

Распределение активности НАДН-дегидрогеназы в суперкомплексах цепи окислительного фосфорилирования в митохондриях клеток $\Delta ZMYND17$ и исходной линии HeLa. Ранее было показано, что организация отдельных комплексов дыхательной цепи в структуры более высокого порядка – суперкомплексы – может влиять

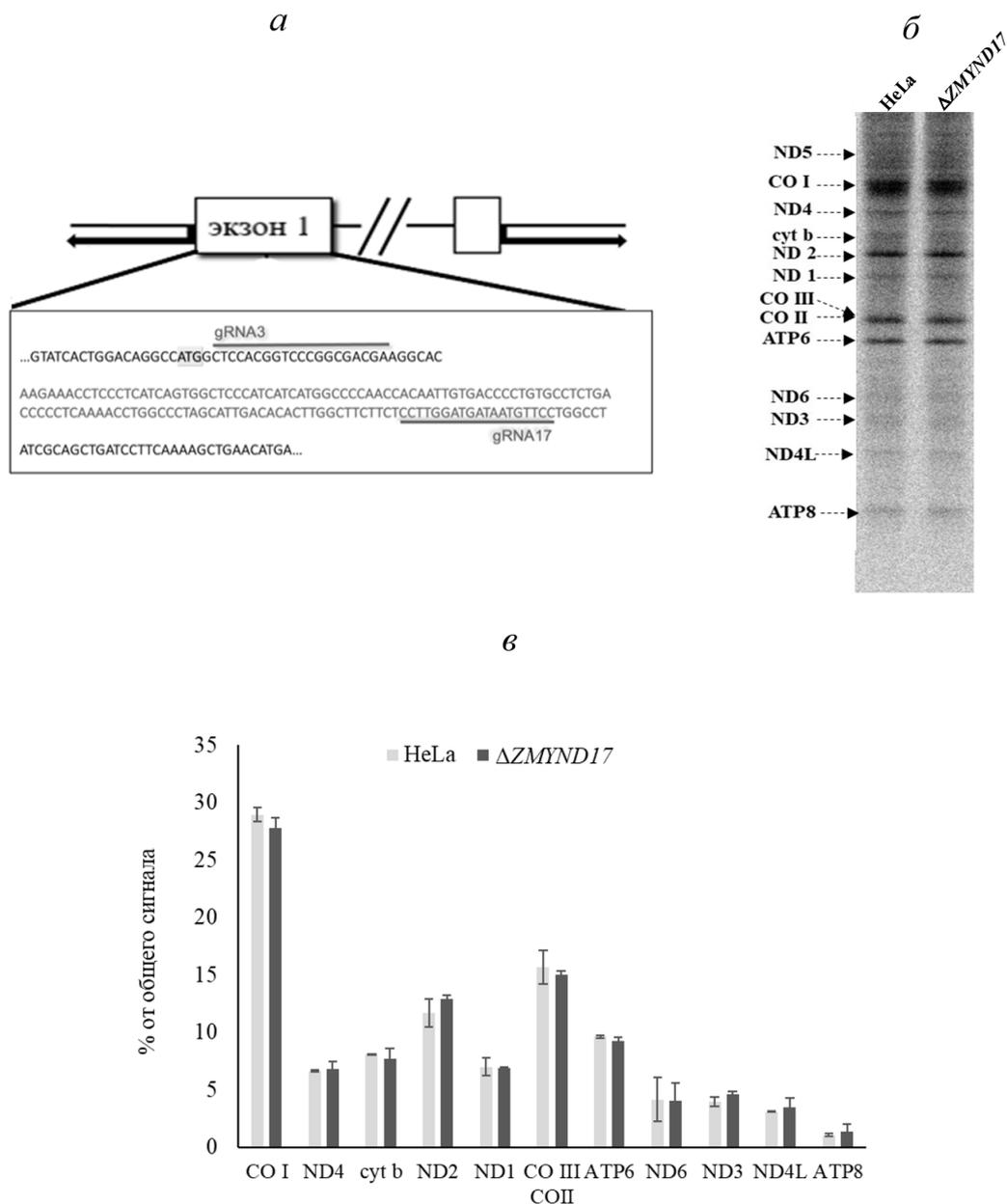


Рис. 1. Делеция гена *ZMYND17* не влияет на эффективность трансляции в митохондриях человека. *а* – Схема редактирования *ZMYND17* для получения нефункциональных генов, *gRNA3* и *gRNA17* – отмечены комплементарные участки sgRNA, серым цветом выделена последовательность, удаленная из генома в результате редактирования. *б* – Радиоавтограф разделённых продуктов митохондриальной трансляции в клетках исходной линии HeLa и клетках с делецией в гене *ZMYND17* ($\Delta ZMYND17$). Стрелками указаны продукты трансляции. Эксперимент проводился в трёх независимых биологических повторах для каждого из двух полученных клонов, представлен результат типичного эксперимента. *в* – Результат количественной оценки эффективности трансляции отдельных белков. Планки погрешностей отражают среднее значение и стандартное отклонение ($M \pm SD$) по результатам шести независимых экспериментов

на их активность [33]. Таким образом, наблюдаемые нами снижения активности комплекса IV в митохондриях клеток $\Delta ZMYND17$ могут быть обусловлены изменениями состава суперкомплексов внутренней мембраны митохондрий данной клеточной линии. Для проверки данного предположения нами были выделены митохон-

дрии из клеток исходной линии HeLa и линии с делецией в гене *ZMYND17*, после чего суперкомплексы были разделены с помощью Blue-Native-электрофореза с последующим анализом активности комплекса I, который является коровым для всех суперкомплексов (рис. 3, *а*). Согласно полученным нами данным, существ-

венных различий в составе суперкомплексов и распределения активности НАДН-дегидрогеназы между суперкомплексами различного порядка не обнаружено (рис. 3, б).

Анализ активности в геле АТФ-синтазы в митохондриях клеток $\Delta ZMYND17$ и клеток исходной линии HeLa. В одной из работ, направленной на изучение влияния подавления экспрессии гена

ZMYND17 на функциональность митохондрий, было показано, что митохондрии таких клеток имеют морфологические дефекты, а именно, снижение количества крист [26]. Помимо этого, имеется ряд противоречивых данных, свидетельствующих об увеличении клеточной продукции АТФ при делеции *ZMYND17* [27] или же её снижении [26]. Мы решили проанализиро-

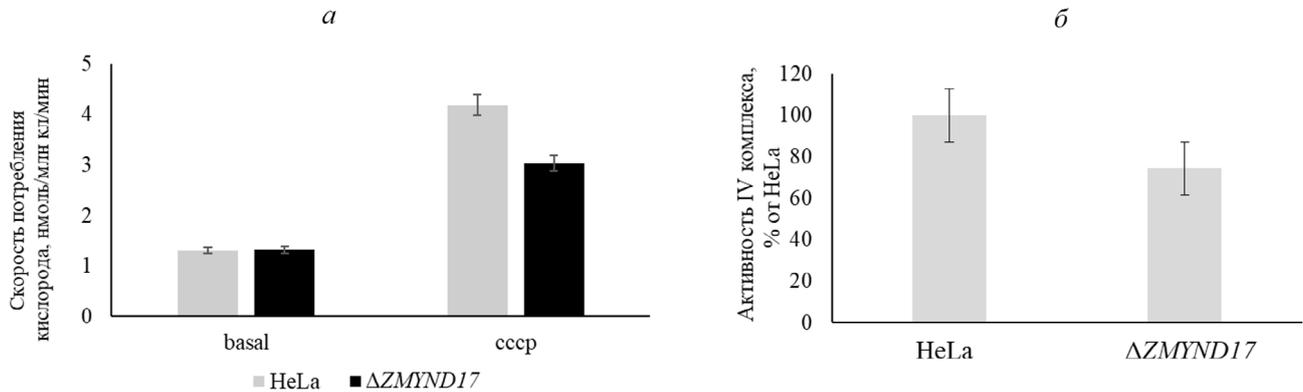


Рис. 2. Делеция гена *ZMYND17* приводит к снижению истинного дыхания клеток и уменьшению активности цитохром *c*-оксидазы. *а* – Скорость потребления кислорода клетками с делецией в гене *ZMYND17* и клетками исходной линии HeLa. Скорость потребления кислорода измеряли поляриграфически с использованием электрода Кларка. basal – Базальный уровень поглощения кислорода при 37 °С; CCCP – уровень поглощения кислорода при добавлении разобщителя CCCP. Планки погрешностей отражают среднее значение и стандартное отклонение ($M \pm SD$) по результатам четырёх независимых экспериментов. *б* – Активность цитохром *c*-оксидазы в митохондриях клеток с делецией в гене *ZMYND17* и клеток исходной линии HeLa. Активность измеряли спектрофотометрически по снижению поглощения при 550 нм. Планки погрешностей отражают среднее значение и стандартное отклонение ($M \pm SD$) по результатам пяти независимых экспериментов

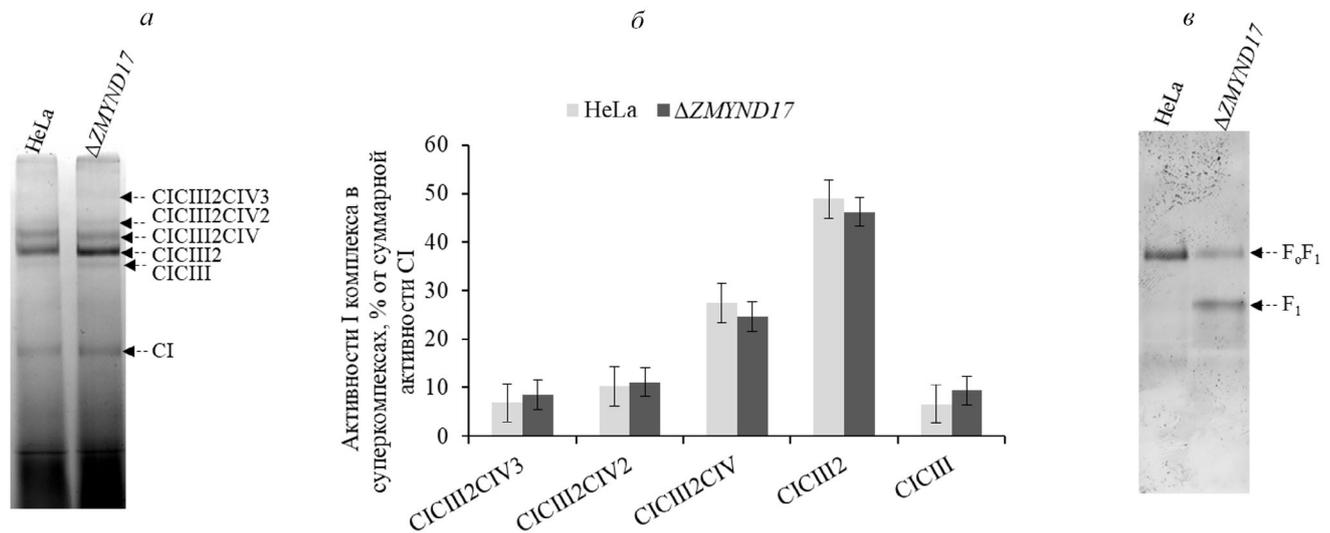


Рис. 3. Активности НАДН-дегидрогеназы и АТФ-синтазы митохондрий клеток исходной линии HeLa и $\Delta ZMYND17$ в геле после Blue-Native-электрофореза. Изолированные митохондрии из клеток исходной линии HeLa и $\Delta ZMYND17$ (по 100 мкг) солибилизировали дигитонином, осветленные лизаты разделяли на 4–10%-ном Blue-Native ПААГ. *а* – Окрашивание на активность НАДН-дегидрогеназы (CI), стрелками обозначены суперкомплексы различной стехиометрии. Представлен результат типичного эксперимента. *б* – Количественная оценка распределения активности CI по суперкомплексам различного стехиометрического состава. Планки погрешностей отражают среднее значение и стандартное отклонение ($M \pm SD$) по результатам трёх независимых экспериментов. *в* – Анализ активности АТФ-синтазы в геле после Blue-Native-электрофореза. F₀F₁ – АТФ-синтаза, F₁ – матриксный домен фермента

вать субъединичный состав АТФ-синтазы в митохондриях из клеток исходной линии HeLa и линии с делецией в гене *ZMYND17*. Оказалось, что в митохондриях клеток $\Delta ZMYND17$ количество полного F_0F_1 -фермента снижено относительно такового в митохондриях дикого типа, в то время как существенно увеличено количество свободной F_1 -субъединицы.

Биоинформатический анализ эволюции белков Mss51p и ZMYND17. Белок Mss51p *S. cerevisiae*, предположительно, является ортологом белка ZMYND17 человека [24], однако подробное изучение эволюционного происхождения этих белков не проводилось. Мы решили проследить эволюцию этих полипептидов с помощью методов биоинформатики. Глобальное парное выравнивание с использованием алгоритма Needleman-Wunsch первичных структур дрожжевого белка Mss51p (NCBI RefSeq: NP_013304.1) и белка ZMYND17 человека (NCBI RefSeq: NP_001019764.1) показало, что они имеют всего 19% идентичных аминокислот (94/504). Белок Mss51p содержит одноименный домен, а ZMYND17 – домен zf-MYND, относящиеся к суперсемейству TRASH (Pfam ID: CL0175). Суперсемейство объединяет домены, содержащие консервативные остатки цистеина, включая домены типа «цинковый палец», в том числе zf-Mss51 (Pfam ID: PF13824) и zf-MYND (Pfam ID: PF01753). В ходе биоинформатического анализа, проведённого с использованием алгоритмов BLAST на сайте NCBI и веб-сервиса HMMER (<http://hmmer.org>), белки, гомологичные дрожжевому Mss51p и ZMYND17 человека, были найдены в транслированных геномах представителей всех супергрупп эукариот (Archaeplastida, Excavata, «SAR», Unikonta), что может указывать на то, что последний общий предок эукариот также имел белок, гомологичный исследуемым.

Далее внимание было сосредоточено на супергруппе Unikonta, а именно на группе Obazoa, объединяющей таксоны Breviatea, Apusomonadida и Opisthokonta, к последнему из которых относятся и *S. cerevisiae*, и *Homo sapiens*. Белки, гомологичные Mss51p и ZMYND17, были найдены в транслированных геномах различных представителей группы Opisthokonta и транслированном геноме одного представителя Apusomonadida – *Thecamonas trahens*. На основании анализа этих белковых последовательностей был восстановлен предположительный сценарий эволюции данных белков. Для этого были выбраны 24 последовательности гомологичных белков, принадлежащих представителям различных групп царства Грибов, а также представителям таксона Apusomonadida (*Thecamonas*

trahens) и таксона Ichthyosporea (*Sphaeroforma arctica*) и представителю Choanoflagellata (*Monosiga brevicollis*). При помощи алгоритма Mafft было получено множественное выравнивание отобранных последовательностей. На рис. 4, а представлено дерево гомологичных белков, построенное методом Maximum likelihood в программе MEGA 7.0.21, укоренённое в среднюю точку и визуализированное при помощи сервиса iTOL.

На рис. 4, б схематично изображена эволюционная история белков, гомологичных Mss51p и ZMYND17 (слева), а также доменная архитектура белков, характерная для различных групп (справа). Вероятно, белок общего предка групп Apusomonadida и Opisthokonta имел 2 домена zf-Mynd (на рис. 4, б обозначены чёрными овалами). Основываясь на анализе последовательностей одного белка *Sphaeroforma arctica*, представителя Ichthyosporea, и одного белка *Monosiga brevicollis*, представителя Choanoflagellata (единственные найденные белки из этих групп, гомологичные исследуемым), можно предположить, что в рано дивергировавших ветвях клады Holozoa гомологичные исследуемым белки сохраняют также 2 домена zf-Mynd. Далее в процессе эволюции один из доменов zf-Mynd был потерян, причём точно установить, какой из zf-Mynd-доменов утерян в ходе нашего анализа не удалось.

Таким образом, согласно результатам нашего исследования, можно предположить, что белки ZMYND17 человека и Mss51p *S. cerevisiae* действительно имеют общее эволюционное происхождение, однако нетривиальную эволюционную историю, включающую дубликацию гена предкового белка с последующей редукцией одной из его копий и различные перестройки доменных архитектур. Таким образом, ортологичные белки ZMYND17 и Mss51p имеют различные функциональные домены и, по всей видимости, выполняют различные функции.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Биосинтез белка в митохондриях, несмотря на очевидное сходство с бактериальной трансляцией, имеет ряд уникальных особенностей, возникших в ходе эволюции эукариот. К таким особенностям можно отнести отличия в белковом составе митохондриальных рибосом, изменения в структуре рРНК, неканонические функции факторов инициации трансляции и другие [2, 34]. По всей видимости, такие эволюционные изменения обусловлены не только переносом множества генов митохондриальных белков в ядро и заменой некоторых функций

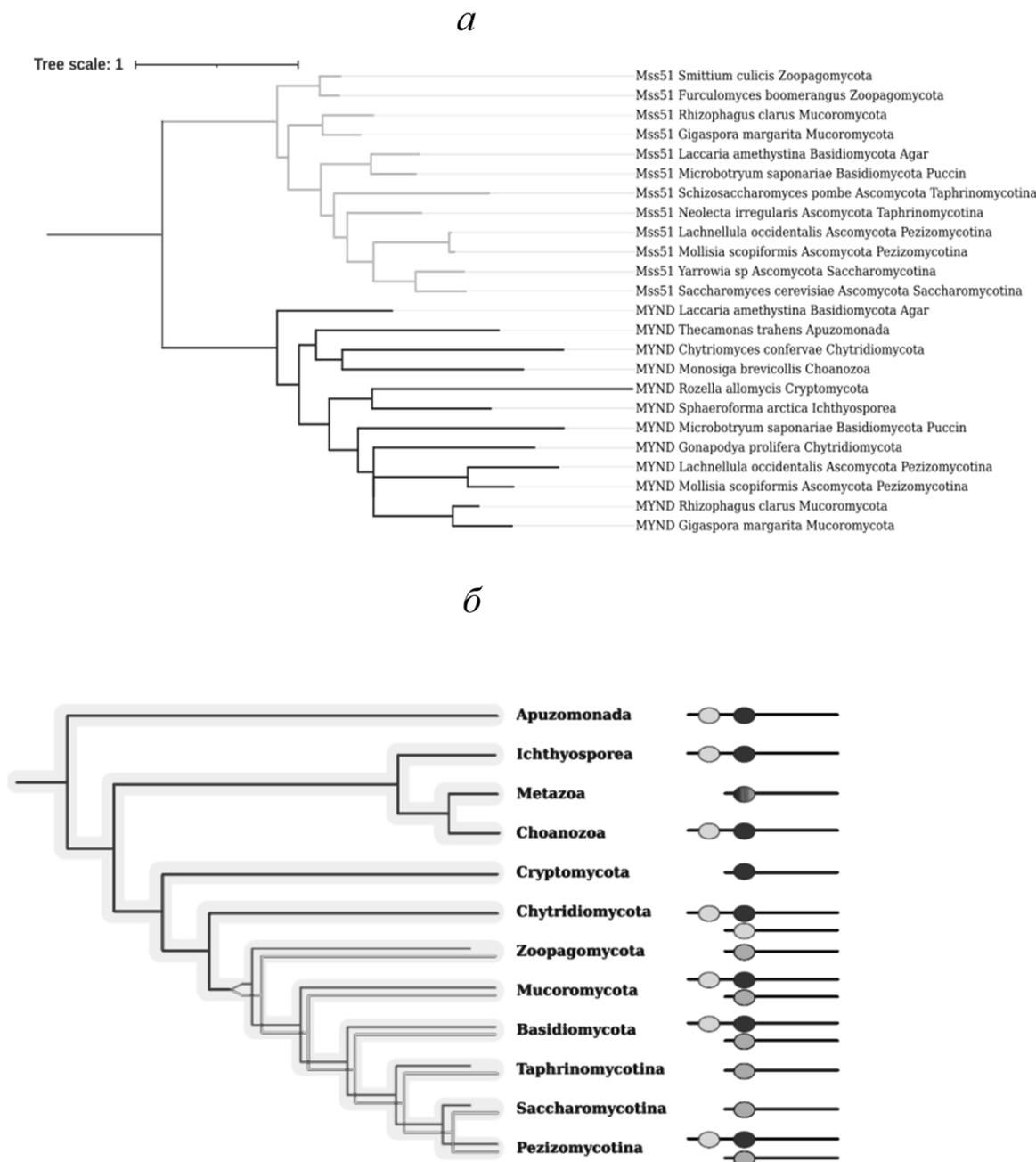


Рис. 4. Биоинформатический анализ белков гомологичных Mss51p и ZMYND17. *a* – Дерево гомологичных белков. Клада, объединяющая белки, содержащие домен Mss51, выделена светло-серым; белки, содержащие домен zf-MYND – черным, точка укоренения – серым. *б* – Схема эволюционной истории гомологичных Mss51p и ZMYND17 белков. Чёрные ветви – ген архаичного белка, не претерпевший дупликации. Серая и светло-серая ветви – две независимые копии гена, возникшие в результате дупликации. Чёрные и светло-серые овалы – домены zf-Mynd, серые овалы – домены zf-Mss51. На дереве выделяются две клады: клада белков, содержащих домен zf-Mss51 (включает и дрожжевой белок Mss51p), и клада белков, содержащих домен zf-Mynd. Первая клада включает только белки представителей царства грибов, во время как во второй кладе присутствуют как белки грибов, так и видов других групп. Такая топология дерева гомологичных белков говорит о дупликации гена предкового белка, произошедшей внутри клады грибов после дивергенции с группой Holozoa

митохондриальных рРНК синтезируемыми в цитозоле белками, но и необходимостью строгой взаимокоординации митохондриальной трансляции с синтезом и импортом в митохонд-

рии кодируемых в ядре белков митохондрий. Для осуществления такой координации у дрожжей *S. cerevisiae* имеется система трансляционных активаторов, которые представляют собой

группу белков, регулирующих трансляцию отдельных митохондриальных мРНК [7, 35].

Особенностью митохондриального биосинтеза белка у млекопитающих является отсутствие 5'-НТО у митохондриальных мРНК. Исходя из этого факта, предполагалось, что системы, подобной трансляционным активаторам дрожжей, у млекопитающих существовать не может, поскольку регуляция биосинтеза белка в митохондриях *S. cerevisiae* в значительной степени обусловлена взаимодействиями с 5'-НТО мРНК. Однако в митохондриях человека был выявлен белок TACO1, являющийся активатором трансляции мРНК COI. Механизм его действия пока не изучен, однако достоверно показано его влияние именно на процесс трансляции отдельной мРНК [21]. Помимо этого, у человека найден ортолог дрожжевого Mss51p, белок ZMYND17 [24]. В ряде работ, посвящённых его изучению, были получены противоречивые данные. Согласно одним авторам, подавление кодирующего его гена приводило к увеличению клеточного АТФ и повышению скорости метаболизма глюкозы [25]. В то же время данные других исследователей показывают, что делеция этого гена, напротив, приводит к снижению эффективности метаболизма глюкозы, изменению морфологии митохондрий и увеличению резистентности к инсулину [26].

Основываясь на перечисленных фактах, мы решили выяснить, участвует ли ортолог Mss51p белок ZMYND17 в регуляции трансляции в митохондриях клеток человека. Для этого мы провели функциональную делецию гена *ZMYND17*, внося с помощью системы CRISPR/Cas9 делецию в первый кодирующий экзон. Получив такую линию клеток с делецией, мы проанализировали эффективность трансляции отдельных мРНК в митохондриях. Как оказалось, отсутствие белка ZMYND17 не повлияло на эффективность биосинтеза белка в митохондриях. После этого мы проанализировали функциональность митохондрий в линии клеток с делецией, измерив скорость потребления кислорода, а также активности цитохром *c*-оксидазы, НАДН-дегидрогеназы и АТФ-синтазы. Согласно полученным нами данным, в митохондриях клеток с делецией *ZMYND17* отмечено снижение активности цитохром *c*-оксидазы на ~25% относительно клеток исходной линии HeLa. Причём такое снижение не сказывается на базальном уровне потребления клетками кислорода, однако проявляется при разобщении работы электрон-транспортной цепи и электрохимического градиента. Наши данные хорошо согласуются с результатами работы Fujita et al. [26] и указывают на то, что ZMYND17 не является ре-

гулятором трансляции, однако тем или иным образом участвует в регуляции метаболической активности митохондрий. Ещё одним интересным результатом стало исследование активности АТФ-синтазы в геле. Оказалось, что при делеции гена *ZMYND17* в митохондриях снижается количество F_0F_1 -фермента и накапливается свободная F_1 -субъединица. Подобный эффект нередко наблюдается при нарушении баланса синтеза митохондриально и ядерно закодированных белков, например, при делеции третьего фактора инициации трансляции [29]. Логично предположить, что увеличение количества свободной F_1 -субъединицы приведёт к усилению гидролиза этим ферментом АТФ. Это может привести к компенсационному увеличению синтеза АТФ полноразмерной F_0F_1 -АТФ-синтазой, что позволит снизить эффект ингибирования электрон-транспортной цепи высоким трансмембранным потенциалом. Последнее, в свою очередь, должно приводить к увеличению скорости поглощения кислорода, что не подтверждается полученными нами данными (рис. 2, а). Вероятно, отсутствие увеличения скорости потребления кислорода обусловлено тем, что, помимо накопления свободной F_1 -субъединицы, наблюдается и снижение количества полноразмерного F_0F_1 -фермента. Это может приводить к недостаточности активности АТФ-синтазы для снижения трансмембранного потенциала.

Наконец, мы решили изучить эволюционную историю Mss51p и ZMYND17, чтобы попытаться выяснить, почему продукты ортологичных генов выполняют, очевидно, различные функции. Согласно полученным нами результатам, исследуемые белки имеют общее эволюционное происхождение, однако нетривиальную эволюционную историю, включающую дупликацию гена предкового белка с последующей редукцией одной из его копий и различные перестройки доменных архитектур. Таким образом, полученные нами данные однозначно указывают на различие функций Mss51p и ZMYND17 в митохондриях дрожжей и человека соответственно. По всей видимости, ZMYND17 является своего рода метаболическим регулятором митохондрий, однако механизм его действия нуждается в дальнейшем изучении.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-07002) (практическая часть), а также в рамках государственного задания МГУ, тема 24-2-21 (биоинформационная часть).

Благодарности. Работа частично выполнена на научном оборудовании, закупленном в рамках реализации Программы развития МГУ имени М.В. Ломоносова. Авторы статьи – участники коллектива Научно-образовательной школы МГУ «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lazcano, A., and Peretó, J. (2021) Prokaryotic symbiotic consortia and the origin of nucleated cells: a critical review of Lynn Margulis hypothesis, *BioSystems*, **204**, doi: 10.1016/j.biosystems.2021.104408.
- Levitskii, S. A., Baleva, M. V., Chicherin, I. V., Krashennnikov, I. A., and Kamenski, P. A. (2020) Protein biosynthesis in mitochondria: past simple, present perfect, future indefinite, *Biochem.*, **85**, 257-263, doi: 10.1134/S0006297920030013.
- Kuzmenko, A. V., Levitskii, S. A., Vinogradova, E. N., Atkinson, G. C., Hauryliuk, V., et al. (2013) Protein biosynthesis in mitochondria, *Biochemistry*, **78**, 855-866.
- Al-Faresi, R. A. Z., Lightowlers, R. N., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. A. (2019) Mammalian mitochondrial translation-revealing consequences of divergent evolution, *Biochem. Soc. Trans.*, **47**, 1429-1436, doi: 10.1042/BST20190265.
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., and Purnelle, B. (1998) The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett.*, **440**, 325-331, doi: 10.1016/S0014-5793(98)01467-7.
- Lipinski, K. A., Kaniak-Golik, A., and Golik, P. (2010) Maintenance and expression of the *S. cerevisiae* mitochondrial genome – from genetics to evolution and systems biology, *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 1086-1098, doi: 10.1016/j.bbabi.2009.12.019.
- Derbikova, K. S., Levitsky, S. A., Chicherin, I. V., Vinogradova, E. N., and Kamenski, P. A. (2018) Activation of yeast mitochondrial translation: who is in charge? *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 87-97, doi: 10.1134/S0006297918020013.
- Zamudio-Ochoa, A., Camacho-Villasana, Y., García-Guerrero, A. E., Pérez-Martínez, X. (2014) The Pet309 pentatricopeptide repeat motifs mediate efficient binding to the mitochondrial COX1 transcript in yeast, *RNA Biol.*, **11**, 953-967, doi: 10.4161/rna.29780.
- Manthey, G. M., and McEwen, J. E. (1995) The product of the nuclear gene PET309 is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial COX1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*, *EMBO J.*, **14**, 4031-4043, doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb00074.x.
- Hillman, G. A., and Henry, M. F. (2019) The yeast protein Mam33 functions in the assembly of the mitochondrial ribosome, *J. Biol. Chem.*, **294**, 9813-9829, doi: 10.1074/jbc.RA119.008476.
- De Silva, D., Poliquin, S., Zeng, R., Zamudio-Ochoa, A., Marrero, N., et al. (2017) The DEAD-box helicase Mss116 plays distinct roles in mitochondrial ribogenesis and mRNA-specific translation, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 6628-6643, doi: 10.1093/nar/gkx426.
- Perez-Martinez, X., Broadley, S. A., and Fox, T. D. (2003) Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p, *EMBO J.*, **22**, 5951-5961, doi: 10.1093/emboj/cdg566.
- Perez-Martinez, X., Butler, C. A., Shingu-Vazquez, M., and Fox, T. D. (2009) Dual functions of Mss51 couple synthesis of Cox1 to assembly of cytochrome *c* oxidase in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria, *Mol. Biol. Cell*, **20**, 4371-4380, doi: 10.1091/mbc.E09-06-0522.
- Soto, I. C., Fontanesi, F., Myers, R. S., Hamel, P., and Barrientos, A. (2012) A heme-sensing mechanism in the translational regulation of mitochondrial cytochrome *c* oxidase biogenesis, *Cell Metab.*, **16**, 801-813, doi: 10.1016/j.cmet.2012.10.018.
- Khalimonchuk, O., Bestwick, M., Meunier, B., Watts, T. C., and Winge, D. R. (2010) Formation of the redox cofactor centers during cox1 maturation in yeast cytochrome oxidase, *Mol. Cell. Biol.*, **30**, 1004-1017, doi: 10.1128/mcb.00640-09.
- Scheffler, I. E. (2007) *Mitochondria: Second Edition*, John Wiley and Sons, doi: 10.1002/9780470191774.
- Gissi, C., Iannelli, F., and Pesole, G. (2008) Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species, *Heredity (Edinb.)*, **101**, 301-320, doi: 10.1038/hdy.2008.62.
- Christian, B. E., Spremulli, L. L. (2010) Preferential selection of the 5'-terminal start codon on leaderless mRNAs by mammalian mitochondrial ribosomes, *J. Biol. Chem.*, **285**, 28379-28386, doi: 10.1074/jbc.M110.149054.
- Kummer, E., Leibundgut, M., Rackham, O., Lee, R. G., Boehringer, D., et al. (2018) Unique features of mammalian mitochondrial translation initiation revealed by cryo-EM, *Nature*, **560**, 263-267, doi: 10.1038/s41586-018-0373-y.
- Jones, C. N., Wilkinson, K. A., Hung, K. T., Weeks, K. M., and Spremulli, L. L. (2008) Lack of secondary structure characterizes the 5'-ends of mammalian mitochondrial mRNAs, *RNA*, **14**, 862-871, doi: 10.1261/rna.909208.
- Weraarpachai, W., Antonicka, H., Sasarman, F., Seeger, J., Schrank, B., et al. (2009) Mutation in TACO1, encoding a translational activator of COX I, results in cytochrome *c* oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome, *Nat. Genet.*, **41**, 833-837, doi: 10.1038/ng.390.
- Richman, T. R., Spahr, H., Ermer, J. A., Davies, S. M. K., Viola, H. M., et al. (2016) Loss of the RNA-binding protein TACO1 causes late-onset mitochondrial dysfunction in mice, *Nat. Commun.*, **7**, doi: 10.1038/ncomms11884.
- Sferruzza, G., Del Bondio, A., Citterio, A., Vezzulli, P., Guerrieri, S., et al. (2021) U-fiber leukoencephalopathy due to a novel mutation in the TACO1 gene, *Neurol. Genet.*, **7**, e573, doi: 10.1212/nxg.0000000000000573.
- Szklarczyk, R., Wanschers, B. F. J., Cuyper, T. D., Esseling, J. J., Riemersma, M., et al. (2012) Iterative orthology prediction uncovers new mitochondrial proteins and identifies C12orf62 as the human ortholog of COX14, a protein involved in the assembly of cytochrome *c* oxidase, *Genome Biol.*, **13**, R12, doi: 10.1186/gb-2012-13-2-r12.
- Moyer, A. L., and Wagner, K. R. (2015) Mammalian Mss51 is a skeletal muscle-specific gene modulating cellular metabolism, *J. Neuromuscul. Dis.*, **2**, 371-385, doi: 10.3233/JND-150119.
- Fujita, R., Yoshioka, K., Seko, D., Suematsu, T., Mitsuhashi, S., et al. (2018) Zmynd17 controls muscle

- mitochondrial quality and whole-body metabolism, *FASEB J.*, **32**, 5012-5025, doi: 10.1096/fj.201701264R.
27. Rovira Gonzalez, Y. I., Moyer, A. L., LeTexier, N. J., Bratti, A. D., Feng, S., et al. (2019) Mss51 deletion enhances muscle metabolism and glucose homeostasis in mice, *JCI Insight*, **4**, e122247, doi: 10.1172/jci.insight.122247.
 28. Rovira Gonzalez, Y. I., Moyer, A. L., LeTexier, N. J., Bratti, A. D., Feng, S., et al. (2021) Mss51 deletion increases endurance and ameliorates histopathology in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy, *FASEB J.*, **35**, e21276, doi: 10.1096/fj.202002106RR.
 29. Chicherin, I. V., Baleva, M. V., Levitskii, S. A., Dashinimaev, E. B., Krashennikov, I. A., and Kamenski, P. (2020) Initiation Factor 3 is dispensable for mitochondrial translation in cultured human cells, *Sci. Rep.*, **10**, doi: 10.1038/s41598-020-64139-5.
 30. Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., et al. (2013) Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system, *Nat. Biotechnol.*, **31**, 686-688, doi: 10.1038/nbt.2650.
 31. Wittig, I., Braun, H.-P., and Schägger, H. (2006) Blue native PAGE, *Nat. Protoc.*, **1**, 418-428, doi: 10.1038/nprot.2006.62.
 32. Jha, P., Wang, X., Auwerx, J. (2016) Analysis of mitochondrial respiratory chain supercomplexes using blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE), in *Curr. Protoc. Mouse Biol.*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 1-14, doi: 10.1002/9780470942390.mo150182.
 33. Schafer, E., Seelert, H., Reifschneider, N. H., Krause, F., Dencher, N. A., and Vonck, J. (2006) Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes, *J. Biol. Chem.*, **281**, 15370-15375, doi: 10.1074/jbc.M513525200.
 34. Kuzmenko, A., Atkinson, G. C., Levitskii, S., Zenkin, N., Tenson, T., et al. (2014) Mitochondrial translation initiation machinery: conservation and diversification, *Biochimie*, **100**, 132-140, doi: 10.1016/j.biochi.2013.07.024.
 35. Herrmann, J. M., Woellhaf, M. W., and Bonnefoy, N. (2013) Control of protein synthesis in yeast mitochondria: the concept of translational activators, *Biochim. Biophys. Acta*, **1833**, 286-294, doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.03.007.

YEAST TRANSLATIONAL ACTIVATOR Mss51p AND HUMAN ZMYND17 – TWO PROTEINS WITH A COMMON ORIGIN, BUT DIFFERENT FUNCTIONS

M. V. Baleva, U. Piunova, I. Chicherin, D. Krasavina, S. Levitskii*, and P. Kamenski

*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Department of Molecular Biology,
119234 Moscow, Russia; E-mail: sergey.levitskii@yandex.ru*

Despite the similarity with protein biosynthesis in bacteria, translation in the mitochondria of modern eukaryotes has several unique features. One of these features is the necessity to coordinate translation of individual mitochondrial mRNAs encoding subunits of complexes of the oxidative phosphorylation chain with translation of other components of these complexes in the cytosol. In the mitochondria of the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, this coordination is carried out through a system of translational activators, proteins that predominantly interact with the 5'-untranslated regions of mitochondrial mRNAs. No such system has been found in human mitochondria, although one translational activator, TACO1, has been identified. In this work, we studied the effect of deletion of the *ZMYND17* gene, an ortholog of the yeast translational activator Mss51p, on mitochondrial translation in human cells. We demonstrated that deletion of *ZMYND17* does not affect translation in mitochondria but leads to decrease in the activity of cytochrome *c* oxidase and increase in the amount of free F1 subunit of ATP synthase. In addition, we studied the evolutionary history of Mss51p and *ZMYND17* and identified a pathway for the divergence of functions of these orthologous proteins.

Keywords: mitochondria, translation, translational activators, translation regulation

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

1. Общие положения

1.1. Ежемесячный международный журнал «Биохимия»/Biochemistry (Moscow), учредителем которого является Российская академия наук, издается и распространяется одновременно на русском и английском языках.

1.2. Журнал «Биохимия» публикует работы по всем разделам биохимии, а также концептуально важные работы по биохимическим аспектам смежных областей (молекулярной биологии, биоорганической химии, микробиологии, иммунологии, физиологии, нейробиологии, биомедицинских наук и др.), направленные на понимание молекулярных и клеточных основ биологических процессов. Тематика журнала также охватывает новые экспериментальные методики в области биохимии, теоретические достижения, имеющие значение для биохимии, обзоры современных биохимических тем исследования и мини-обзоры. **Журнал не рассматривает** чисто феноменологические работы, которые описывают изменения биохимических параметров или маркеров биологических процессов **без связи с механизмами**, вызвавшими эти изменения или являющимися следствием таких изменений, а также работы по клонированию и экспрессии (в том числе в трансгенных животных и растениях) индивидуальных генов и материалы по анализу геномных полиморфизмов.

1.3. К публикации принимаются законченные оригинальные работы, содержащие новые экспериментальные результаты; методические работы, включающие описание новых методов биохимических исследований; материалы теоретического характера с изложением новых принципов, подходов для решения тех или иных биохимических задач.

Раздел «**Краткие сообщения**» публикует короткие экспериментальные статьи заявочного, приоритетного характера, требующие скорейшей публикации. В сопроводительном письме в редакцию авторам следует мотивировать необходимость ускоренного прохождения материала. Срок публикации таких сообщений 3–4 месяца.

Журнал печатает заказанные редколлегией (или предлагаемые авторами и одобренные редколлегией) **обзоры** по наиболее актуальным проблемам биохимии и смежных наук. К обзор-

ным статьям предъявляются следующие требования: 1) у авторов должны быть **свои работы** по теме обзора; 2) список цитированной литературы должен включать **работы**, опубликованные по данной теме в течение последних 5 лет; 3) обзор не должен быть пересказом и, подчас, дословным цитированием кусков ранее опубликованных работ, в нем должен быть критический разбор цитируемых материалов и своя концепция, свое видение проблемы, побудившее авторов написать данный обзор! Редакция и рецензенты строго следят за плагиатом!

Раздел «**Дискуссии**» предоставляет авторам возможность опубликовать комментарии, критические замечания и иные соображения по поводу напечатанных ранее на страницах журнала работ, выступить с новой гипотезой. Раздел носит полемический характер и печатает ответные реплики затронутых в публикациях сторон.

1.4. Журнал индексируется и включен в библиографические базы данных Web of Sciences, Biochemistry and Biophysics Citation Index, Biological Abstracts, BIOSIS Database, Chemical Abstracts, Chemical Titles, Current Contents/Life Science, Excerpta Medica, Index Internacional de Cardiologia, Index Medicus (MEDLINE/Pubmed), International Abstracts of Biological Sciences, The ISI Alerting Service, Science Citation Index, Science Citation Index Expanded, SCOPUS, Compendx; РИНЦ. Журнал включен в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК.

1.5. Правила для авторов и информацию о журнале можно найти на сайтах журнала <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya> и <https://biochemistrymoscow.com>, а также на порталах издательств Pleiades <http://pleiades.online/ru/journal/biochmsc/> и Springer <https://link.springer.com/journal/10541>. На сайте журнала на английском языке представлены содержания всех выпусков, начиная с 1996 г., с резюме статей, ключевыми словами и адресами авторов. В свободном доступе также находятся две-три лучшие полнотекстовые статьи каждого выпуска, а также в полном объеме тематические выпуски журнала, посвященные наиболее актуальным проблемам биохимии. Кроме того, в рубрике «Papers in Press» размещаются до выхода в свет принятые к публикации рукописи, получившие высшие оценки при рецензировании.

1.6. Импакт-фактор Biochemistry (Moscow) в 2020 г. составил 2.487, импакт-фактор РИНЦ для «Биохимии» – 2.435. По данным Scopus журнал находится во 2-й квартили (Q2) среди журналов биохимического и медико-биологического профилей.

1.7. Для увеличения охвата читательской аудитории и повышения цитируемости своей работы вы можете опубликовать статью в Biochemistry (Moscow) в режиме открытого доступа (Open Access). В этом случае в статье необходимо указать тип лицензии Creative Commons. Всю информацию о публикации статьи в свободном доступе можно найти на сайте издательства: <http://pleiades.online/ru/authors/openaccess/>.

2. Порядок подачи рукописей

2.1. Редакция принимает на рассмотрение рукописи, присланные по электронной почте в форме присоединенных файлов (attachment) на адреса редакции: editorial@biochemistrymoscow.com или ozrina@bio.chem.msu.ru.

2.2. Материал статьи – текст, включая резюме на русском и английском языках, список литературы, рисунки с подписями и таблицы – оформляется одним файлом; каждый рисунок дополнительно оформляется отдельным файлом. Если пересылаемый материал велик по объему, следует использовать программы для архивирования.

Все страницы рукописи, в том числе содержащие список литературы, таблицы и подписи к ним, следует пронумеровать; номера строк также следует пронумеровать.

На отдельной странице прилагаются сведения об авторах с указанием адресов, контактных телефонов, факса и электронной почты, а также указывается автор, ответственный за переписку с редакцией и работу с корректурой.

2.3. Одновременно с русским желателно представить аутентичный английский вариант рукописи.

2.4. При подаче рукописи авторам следует прислать в редакцию **сопроводительное письмо**, в котором надо указать, что: 1) представленный материал (или его части) не был ранее нигде опубликован и не находится на рассмотрении на предмет публикации в других изданиях; 2) авторы ознакомились с этическими нормами, предписанными международными соглашениями о публикациях научных статей, и соблюдают их;

3) авторами представлена информация о потенциальных конфликтах интересов; 4) авторы ознакомились с правилами проведения исследований с участием человека и/или животных и соблюдают их; 5) каждый соавтор сообщает о своем согласии на авторство в статье (см. соответствующие Положения на сайтах журнала и на порталах Springer и Pleiades).

3. Требования к оформлению рукописей

3.1. Текст статьи должен быть изложен по возможности сжато и тщательно отредактирован, но без ущерба для ее понимания и воспроизведения результатов.

3.2. Рукопись должна быть построена следующим образом: 1) индекс УДК; 2) заглавие; 3) инициалы и фамилии авторов; 4) полные названия учреждений, индекс, город и электронная почта (аффилиация); 5) резюме на русском языке; 6) ключевые слова; 7) краткое заглавие статьи (колонтитул); 8) текст статьи, включающий список цитированной литературы, таблицы, подписи к рисункам; 9) резюме на английском языке (с переводом названия статьи, фамилий авторов, аффилиации и ключевых слов).

Индекс УДК выделяется курсивом и ставится в верхнем левом углу первой страницы.

Заглавие должно быть максимально кратким, информативным и без сокращений.

Если авторы статьи являются сотрудниками разных учреждений, то учреждения следует пронумеровать и после каждой *фамилии* надстрочным знаком указать соответствующий номер; звездочкой справа от цифры необходимо отметить автора, ответственного за переписку с редакцией. Для каждого из авторов приводится полное название учреждения с индексом, городом и страной; для автора, ответственного за переписку, указывается также адрес электронной почты.

Резюме должно быть кратким (не более 250 слов), сжато и ясно описывающим основные конкретные результаты работы и вытекающие из них выводы.

Ключевых слов – не более 7.

При использовании нестандартных сокращений должен быть добавлен раздел *Принятые сокращения*.

Текст статьи следует разбить на разделы: 1) Введение, 2) Методы исследования, 3) Результаты исследования, 4) Обсуждение результатов (объединенный раздел «Результаты и их обсуждение» допускается в тех случаях, когда обсуж-

дение невелико по объему), 5) Список литературы; 6) Резюме на английском языке.

Во *введении* кратко излагается история вопроса с обязательным рассмотрением работ, в которых аналогичные или близкие исследования уже проводились, и формулируется цель исследования.

Основное требование к изложению *методов исследования* состоит в том, чтобы процедуры были описаны максимально кратко, но по описанию можно было воспроизвести эксперименты; сюда же должны быть включены использованные в работе материалы, реактивы и приборы с указанием фирмы и страны-производителя, например: глицерин («Sigma-Aldrich», США), электронный микроскоп JEM 100C («JEOL», Япония). Только новые методы следует детально описывать; на ранее опубликованные и общеизвестные достаточно сослаться в списке литературы, указав автора и/или название метода (например, концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [7]). Если метод известен не слишком широко, желательно изложить его принцип и указать автора. **Не допускаются** ссылки на методы по типу «нуклеазу измеряли методом [7]» или «по [7]» (ссылка не может быть самостоятельным членом предложения).

Результаты исследования обычно представлены рисунками и таблицами; те эксперименты, которые не нуждаются в документации, описываются в тексте. В этом разделе не следует приводить обсуждение результатов, можно ограничиться объяснением причинно-следственных связей между описываемыми экспериментами.

Раздел «*Обсуждение результатов*» должен содержать интерпретацию результатов (но не их повторение) и сравнение с ранее опубликованными результатами. Желательно основные результаты иллюстрировать простой и наглядной схемой.

В случае необходимости рукопись завершается *заключением*, которое отделяется от раздела «Обсуждение результатов» отбивкой.

В связи с участием журнала в международном Комитете по этике публикаций (Committee on Publication Ethics – COPE) авторам следует внести в конце статьи несколько фраз, демонстрирующих приверженность международным этическим стандартам. Ниже приведены образцы представления соответствующих разделов в заключительной части статьи.

1) Если работа выполнена при поддержке какой-либо организации, в разделе «Финансирование» следует указать, каким фондом и грантом поддержано данное исследование и каждая часть работы в отдельности, если источники финансирования разные. Следует приводить пол-

ные названия институтов и организаций-спонсоров.

2) В разделе «Благодарности» по желанию авторов сообщается информация о любой помощи в проведении работы и подготовке статьи: о полезных обсуждениях и дискуссиях, благодарности коллегам; о предоставлении материалов, научных данных, компьютерного оборудования, приборов; о проведении исследований в центрах коллективного пользования; о помощи в технической подготовке текста. Приветствуется описание роли каждого из авторов публикации.

3) В разделе «Конфликт интересов» авторы заявляют о наличии или отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере. Данный раздел является обязательным.

4) Обязательным является также раздел «Соблюдение этических норм». Если исследования проводились на животных, то в данном разделе указывается: «Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводились исследования, и утвержденным правовым актам РФ и международных организаций».

Если исследования проводились с участием людей, то в разделе «Соблюдение этических норм» указывается: «Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие».

Если в статьях не содержится описания исследований с участием людей или использованием животных и выполненных кем-либо из авторов, в разделе «Соблюдение этических норм» указывается: «Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов».

5) Если статья содержит персональную информацию об участниках исследования, то необходимо включить следующее положение в раздел «Информированное согласие»: «От всех участников, чья персональная информация содержится в этой статье, получено дополнительное письменное добровольное согласие».

Список цитируемой литературы должен быть максимально кратким (не более 100 ссылок), но содержащим ссылки на все принципиально важные последние публикации по данному вопросу. В журнале принята последователь-

ная нумерационная система цитирования, т.е. по ходу изложения указывается порядковый номер процитированного источника (в квадратных скобках), соответствующий номеру в Списке литературы. Авторам следует очень внимательно проверить последовательность нумерации ссылок в тексте и соответствие номера каждой ссылки в тексте и списке литературы. **Не допускается** включение в список литературы ссылок на веб-сайты, необходимо ссылаться на публикации авторов, предлагающих эти электронные ресурсы (программы/базы данных). Если такие публикации отсутствуют, ссылка дается в тексте так же, как на другие неопубликованные материалы (например, База данных структур бактериальных углеводов, [csdb/glycoscience.ru/bacterial](http://csdb.glycoscience.ru/bacterial)).

Список литературы печатается как отдельный раздел рукописи с указанием фамилий и инициалов всех авторов, названия цитируемой статьи и выходных данных. Кроме этого, желательно дать DOI статьи. Ниже приводятся примеры ссылок на журналы, книги, сборники, диссертации.

1. Beltrami, C., Besnier, M., Shantikumar, S., Shearn, A.I.U., Rajakaruna, C., et al. (2017) Human pericardial fluid contains exosomes enriched with cardiovascular-expressed microRNAs and promotes therapeutic angiogenesis, *Mol. Ther.*, **25**, 679-693, doi: 10.1016/j.ymthe.2016.12.022.

2. Sloan-Dennison, S., and Schultz, Z.D. (2018) Label-free plasmonic nanostar probes to illuminate *in vitro* membrane receptor recognition, *Chem. Sci.*, **10**, 1807-1815, doi: 10.1039/c8sc05035j.

3. Анисимов В.Н. (2008) *Молекулярные и физиологические механизмы старения*, Наука, СПб.

4. Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.

5. Tanphaichitr, V. (2001) in *Handbook of vitamins* (Rucker, R., and Suttie, J., eds), Marcell Dekker, N.Y., pp. 275-316.

6. Гендролис А.А., Серебрянников Н.В., Гандель В.Г. (1978) В кн. *Простагландины* (под ред. Ажгихина И.С.), Медицина, Москва, с. 332-347.

7. Гандельман О.А. (1992) *Кинетика и механизм биолюминесцентного окисления люциферина светляков*. Дис. канд. хим. наук, МГУ, Москва.

8. Rosenkranz, A.A., Slastnikova, T.A., Durymanov, M.O., and Sobolev, A.S. (2013) Malignant melanoma and melanocortin 1 receptor, *Biochemistry (Moscow)*, **11**, 1228-1237, doi: 10.1134/S00062979-13110035.

Для авторов, использующих систему EndNote, редакция предоставляет стиль, который поддер-

живает форматирование цитат в тексте и список литературы. Стилевой файл можно найти на сайтах журнала <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya> и <https://biochemistrymoscow.com> в разделах для авторов.

В конце статьи дается *резюме на английском языке*, являющееся аутентичным переводом заглавия статьи, инициалов и фамилий авторов в английской транскрипции, названий учреждений с индексами, названиями городов и адресами электронной почты, текста аннотации и ключевых слов.

3.3.1. Объем экспериментальной статьи, включая список литературы, таблицы, рисунки (3 рисунка считаются за 1 страницу) и подписи к ним, резюме на английском языке, не должен превышать 20 машинописных страниц, количество рисунков – не более 8; **краткое сообщение** – не более 12 страниц (включая не более 4 рисунков и/или таблиц); **мини-обзор** – не более 16 страниц (включая не более 5 рисунков); **обзор** – не более 35 страниц (включая не более 8 рисунков); сообщения в разделе «**Дискуссии**» – до 4 страниц.

3.3.2. Текстовые файлы следует представлять в формате Microsoft Word (версия 6.0 и более поздние), шрифты для основного текста – Times New Roman и Symbol, размер букв 12, полтора интервала, в одну колонку без выравнивания по правому краю, без переноса слов, с полями 3 см с левой стороны, на странице – не более 30 строк.

Для оформления текста можно использовать курсив, полужирные начертания, подстрочные и надстрочные индексы, греческие и математические символы (шрифт Symbol) в соответствии со стилевым оформлением журнала.

Стиль оформления текстового материала должен быть простым: **без запрограммированных заголовков, вставок, шаблонов, ссылок на литературные источники (гиперссылок)**; без увеличения межстрочных и межбуквенных интервалов; без использования шаблонов – в окне «стиль» должно быть «обычный». Особенно это относится к «Списку литературы», т.к. запрограммированные порядковые номера при переносе в издательскую программу исчезают.

Авторы не должны использовать такие функции программы Word, как «Закладка», «Примечание», «Сноска», «Концевая сноска», потому что они неправильно интерпретируются издательской программой. Если в тексте встречается сноска (или концевая сноска), то сразу после предложения или абзаца с ее номером, следует набрать «{Footnote}», т.е. «{Сноска}», и далее непосредственно текст сноски.

Если при подготовке статьи была использована функция «Рецензирование», то перед сохранением файла нужно отменить функцию «Рецензирование» и затем использовать функцию «Принять все изменения в документе».

3.3.3. Таблицы следует приводить в тех случаях, когда данные не могут быть приведены в тексте.

Каждая таблица оформляется на отдельной странице и имеет свой заголовок. Колонки в таблице должны быть озаглавлены, с указанием через запятую размерности приводимых величин. Необходимо стремиться к максимальной краткости заголовков колонок, не давать величин, легко выводимых из имеющихся (например, разность или проценты). Повторение одних и тех же данных в тексте, в таблицах или на рисунках не допускается.

Таблицы принимаются только в формате Word (doc, docx). Если таблицы содержат графические вставки, эти вставки следует прислать в виде отдельных графических файлов высокого качества.

3.3.4. Рисунки с подрисуночными подписями следует располагать в тексте по месту ссылки на каждый рисунок. Кроме того, рисунки должны быть представлены в виде отдельных файлов, удовлетворяющих следующим требованиям:

– для схем и графиков **без полутоновых вставок**: файлы в формате tiff, jpg или pdf, в черно-белом режиме (Line-art, Black-and-White, Bitmap). Пикселизированные (растровые) рисунки принимаются только в форматах tiff или jpg;

– для **полутоновых рисунков** или графиков **с полутоновыми вставками**: файлы в формате tiff, jpg или pdf, в полутоновом черно-белом режиме (градации серого – Grayscale). Пикселизированные (растровые) рисунки принимаются только в форматах tiff или jpg;

– для **цветных рисунков**: файлы в формате tiff, jpg или pdf, в цветном режиме CMYK (для цветной печати), RGB (для цветных рисунков в электронной версии). Пикселизированные (растровые) рисунки принимаются только в форматах tiff или jpg.

– независимо от типа графики, рисунок должен обладать **высоким реальным разрешением**: не ниже 300 dpi для полутоновых иллюстраций; не ниже 600 dpi для штриховых и смешанных (полутоновых/штриховых) иллюстраций. Пикселизация изображений в форматах растровой графики не должна быть грубой. Линии рисунков должны быть толщиной не менее 3 пунктов (point). Следует избегать чрезмерно мелких обозначений (букв, цифр, значков и т.д.). Пикселизированные (растровые) рисунки не следует вставлять в документ Word или переводить в формат PDF, так как это ухудшает их качество;

– рисунки должны иметь размеры, соответствующие их информативности. Размер рисунка на одну колонку не должен быть менее 8 см; на две колонки – менее 17 см. Рисунки не должны быть чрезмерно крупными;

– векторные иллюстрации не должны содержать точечных закрасок, таких как «Noise», «Black&white noise», «Top noise». Для векторной графики все использованные шрифты должны быть включены в файл;

– шрифты внутри рисунков выбираются из гарнитуры Arial размером 9 пунктов;

– следует избегать сканирования рисунков из книг и других печатных изданий, так как такие файлы дают низкое качество при печати и имеют неоправданно большой размер.

Общие требования к подготовке графиков, диаграмм и формул:

– **график** должен содержать обозначения координатных осей (измеряемый параметр и единица измерения), а также кривых и других деталей. Надписи по осям выполняются вдоль осей шрифтом Arial с заглавной буквы, единица измерения отделяется запятой, а не скобками (например, Объем элюента, мл). Линии внутри рисунка следует пронумеровать (цифры выполняются *курсивом* – 1, 2 и т.д.), и в подрисуночной подписи (не на рисунке) дать пояснения к каждой линии. Экспериментальные точки предпочтительно представлять заштрихованными и незаштрихованными кружками, квадратами, треугольниками, ромбами. Отдельные кривые могут различаться также сплошным или штриховым изображением. Все линии должны быть изображены четко с толщиной линий (обычно 3 пункта), позволяющей уменьшить рисунок до конечного размера в журнале. Координатные оси в большинстве случаев необходимо отображать черными (не серыми) линиями. Фон графика или диаграммы должен быть белым, без линий координатной сетки (за исключением случаев, когда иной цвет фона или наличие сетки необходимы для правильного восприятия);

– на **диаграммах** и **фотографиях** отдельные элементы (столбцы, дорожки геля и пр.) следует пронумеровать *курсивными* арабскими цифрами (1, 2 и т.д.) и в подрисуночной подписи (не на рисунке) дать пояснения к каждой цифре. Если помимо арабских требуется введение римских цифр (I, II, III и т.д.), эти цифры должны быть прямого начертания.

– если рисунок состоит из нескольких частей (диаграмм, графиков, схем, структур белков, фотографий, в т.ч. электрофореграмм), их нужно обозначить строчными *курсивными* буквами (a, b, в и т.д.) гарнитурой Times, размером большим, чем основной текст, и поместить эти бук-

вы в верхних левых углах соответствующих частей. В подрисуночной подписи следует дать пояснение к каждой части рисунка;

– для написания **химических формул** в тексте используется программа ChemWindows;

– длинные и сложные **математические формулы** следует представлять в виде рисунков без подписей в одном из допустимых форматов (pdf, tiff или jpg). Каждую формулу нужно дать отдельным файлом, название которого соответствует номеру формулы; при подготовке данных файлов следует руководствоваться правилами подготовки графических материалов. Функцией «Редактор уравнений» надо пользоваться **только для развернутых уравнений** (как нумерованных, так и встречающихся в тексте), но не для небольших выражений (обозначений), вкрапленных в текст, например, ΔG , $T\Delta S$, K_m . (Для таких небольших выражений должны использоваться основные функции программы Word, как и для всего остального текста статьи.) Для выражений, в которых требуется «кернинг» (нижний и верхний индексы, расположенные один под другим), надо использовать только надстрочные и подстрочные знаки (например, NH_3^+), а «кернинг» будет выполнен макетчиком. Эти требования обусловлены тем, что издательская программа неправильно воспринимает данные, полученные с помощью функции «Редактор уравнений»;

– в ширину формула не должна превышать 8,5 см (ширина колонки журнала). Более длинные формулы должны быть разбиты автором на несколько строк. Формулы должны быть набраны шрифтами Times New Roman и Symbol. В случае если формулы представляются в виде пикселизированных (растровых) изображений, они должны быть представлены в черно-белом режиме (Line-art, Black-and-White, Bitmap) в формате tiff или jpg. Такие изображения должны обладать **высоким реальным разрешением** (пикселизация не должна быть грубой). Особое внимание следует уделять качеству графической передачи надписей, цифр и мелких элементов пикселизированного изображения. Пикселизированные (растровые) изображения не стоит вставлять в документ Word или переводить в формат PDF, так как это зачастую ухудшает их качество;

– **аминокислотные, нуклеотидные и пр. последовательности** часто изображаются в форме, требующей строго вертикального расположения компонентов. Поэтому во избежание ошибок и необходимости проверять большие количества сложной информации авторы должны представлять в редакцию материалы такого рода в виде, пригодном для репродукции.

Обращаем внимание на общие условия публикации иллюстраций:

– надписи и обозначения на рисунках могут меняться в русской и английской версиях при переводе, поэтому для фотографий и рисунков, где надписи наложены на сложный, неоднотонный фон, желательно предоставить второй вариант без текста и всех обозначений, для остальных иллюстраций – располагать надписи на иллюстрации так, чтобы они не соприкасались с другими ее частями. Авторы также могут сами подготовить версии рисунков с английскими надписями;

– рисунок должен иметь заголовок и информативную подрисуночную подпись, делающую его смысл понятным без обращения к тексту – указываются условия, специфические для данного эксперимента; ссылки на основной текст допускаются только чтобы избежать повторений и неясностей;

– цветные иллюстрации публикуются **бесплатно для авторов** в том случае, если они будут размещены **только в электронной версии статьи**, а в печатной версии журнала они будут в черно-белом исполнении. При этом авторы должны иметь в виду, что в печатной версии с черно-белыми рисунками сохраняются подрисуночные подписи из цветной электронной версии, поэтому следует избегать указаний на цвет в подрисуночных подписях. Авторам необходимо подбирать цвета таким образом, чтобы при черно-белой печати не утратилась информативность. Цветные линии графиков желательно размечать обозначениями, цифрами или спецсимволами, или делать различающиеся типы линий для каждого цвета. Цветные области на иллюстрациях желательно размечать различающимися обозначениями или спецсимволами, а не одинаковыми символами разных цветов. Если цветовое разделение областей находится примерно в одном цветовом тоне, то желательно провести тонкую линию границы между ними. При большом количестве цветных областей в схожих цветовых тонах желательно дополнительно обозначить области символами или штриховкой. Все надписи и обозначения желательно делать не цветными, а черными или белыми, в зависимости от подложки;

– если электронная версия статьи содержит несколько цветных рисунков, в печатной версии возможна платная публикация всех этих рисунков в цвете, либо бесплатная публикация всех этих рисунков в черно-белом исполнении. Публикация в печатной версии только части цветных рисунков в цветном исполнении невозможна;

– подготовленные рисунки желательно распечатать, чтобы убедиться, что они хорошо вы-

глядят в напечатанном виде: все элементы рисунка должны быть хорошо видны на распечатке, фон должен быть чистым, надписи и цифры должны легко читаться. Зачастую бывает достаточно сложно оценить качество рисунка только по тому, как он выглядит на экране компьютера.

— подписи к рисункам следует сгруппировать в последовательном порядке и оформить как отдельный раздел в конце рукописи;

— если авторы используют в своей рукописи иллюстрации или таблицы из других публикаций (в том числе своих собственных), то им необходимо запросить у Издателей этих публикаций разрешение на перепечатку или использование материалов.

Несоблюдение правил подготовки графического материала приводит к необходимости переработки рисунков авторами и задержке публикации рукописи.

3.3.5. Дополнительные материалы к статьям.

Для более полного описания исследования к статье могут прилагаться дополнительные материалы (аудио- и видеофайлы, презентации, дополнительные таблицы, рисунки и пр.) при условии, что автор является правообладателем прилагаемых материалов, и автором ранее не были переданы авторские права на их использование иным (кроме издателя) лицам, либо автор имеет письменное разрешение правообладателя на их использование в целях опубликования и распространения в журнале. Дополнительные материалы публикуются только в электронной версии журнала на сайте: <http://link.springer.com>, а также на сайте журнала: <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>. При наличии дополнительных материалов в тексте необходимо разместить ссылку на Приложение к статье.

3.3.6. Все физические величины рекомендуются приводить в международной системе СИ.

4. Порядок работы с рукописями (рецензирование, редакционная подготовка, корректура)

4.1. Поступившей в редакцию правильно оформленной рукописи присваивается регистрационный номер и фиксируется дата поступления, о чем редакция информирует авторов по электронной почте. **Рукописи, оформленные не по правилам, возвращаются авторам без рассмотрения.**

4.2. **Рецензирование.** При подаче рукописи авторы могут указать двух потенциальных ре-

цензентов (ФИО, адрес электронной почты) из числа специалистов в данной области исследований, а также тех, чье участие в рецензировании нежелательно.

Все рукописи рассматривает Ответственный ученый секретарь (Executive Editor-in-Chief) и направляет Ответственному Редактору по соответствующей конкретной области исследований; он, в свою очередь, указывает двух-трех специалистов для рецензирования рукописи. Список Ответственных Редакторов и членов редколлегии размещен на сайте журнала, а также на сайтах Biochemistry (Moscow) на порталах Pleiades и Springer.

На основании экспертных заключений редколлегия определяет дальнейшую судьбу рукописи и в спорных случаях привлекает дополнительных рецензентов. По решению редколлегии рукопись может быть принята к публикации в представленном виде, отправлена авторам на доработку или отклонена. Основанием для отклонения рукописи являются недостаточно высокие оценки при рецензировании вследствие несоответствия профилю или уровню публикаций журнала.

Рукопись, получившая высшую оценку двух независимых рецензентов, печатается со специальной пометкой «Ускоренная публикация» (срок публикации — 3–4 месяца).

В случае необходимости рукопись направляется авторам на доработку по замечаниям рецензентов и редакторов, после чего она повторно рецензируется, и редколлегия вновь решает вопрос о приемлемости рукописи для публикации. В начале публикуемой статьи приводятся даты первоначального поступления рукописи в редакцию, поступления после окончательной доработки и принятия к публикации.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение трех месяцев после получения авторами отзывов; в противном случае рукопись рассматривается как вновь поступившая — ей присваивается новый регистрационный номер и ставится новая дата поступления в редакцию.

В журнале принято «одностороннее слепое рецензирование» (single blind review), т.е. авторам недоступны имена рецензентов, и редакция строго соблюдает конфиденциальность рецензентов. Все редакционные письма авторам идут за подписью Ответственного ученого секретаря журнала.

4.3. С 2003 г. редакция приступила к практике предварительной публикации рукописей (*Papers in Press*) на сайте *Biochemistry (Moscow)* (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) до выхода в свет статьи.

На сайте размещаются экспериментальные статьи на английском языке, получившие высокие оценки при рецензировании и принятые к публикации.

4.4. На всех стадиях работы с рукописями, а также для общения с авторами, редакторами и рецензентами редакция использует электронно-почтовую связь, поэтому авторы должны быть очень внимательны к указанному в рукописи адресу электронной почты и должны своевременно сообщать о произошедших изменениях.

4.5. Через месяц после сдачи очередного выпуска журнала в печать редакция рассылает авторам по электронной почте корректуру статьи в виде PDF-файла и инструкцию по работе с ней.

На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если все же это необходимо, то вопрос решается редколлегией; в крайнем случае, статья переносится в другой номер.

5. Англоязычный вариант журнала

5.1. Каждый выпуск журнала готовится одновременно на русском и английском языках.

Перевод статей осуществляет группа высококвалифицированных переводчиков-биохимиков. В ходе работы у переводчиков часто возникает необходимость связаться с авторами и устранить неточности в русском тексте статьи. Согласованные с авторами исправления вносятся и в русский, и в английский тексты на стадии корректуры.

Авторы, достаточно хорошо владеющие профессиональным английским языком, представляют в редакцию свой **аутентичный** перевод статьи.

5.2. Переводы редактируются английской редакцией журнала, и подготовленный текст направляется авторам для корректировки.

5.3. После выхода журнала в свет редакция рассылает авторам оттиски русского и английского вариантов статей в виде PDF-файлов.