

На правах рукописи

Алехина Ольга Михайловна

**КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ В
ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ**

03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2011

Работа выполнена в Институте белка РАН

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор,
академик

Спирин Александр Сергеевич

кандидат физико-математических наук

Василенко Константин Станиславович

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор,
член-корреспондент РАН

Донцова Ольга Анатольевна

доктор биологических наук, профессор

Морозов Сергей Юрьевич

Ведущая организация:

Институт химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН

Защита состоится 9 декабря 2011 года в 11⁰⁰ часов на заседании совета Д 501.001.76 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, ГСП-2, Ленинские горы, МГУ, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Лабораторный корпус «А», аудитория 536.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Автореферат разослан «__» ноября 2011 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



И.А. Крашенинников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Инициация трансляции является важнейшим этапом биосинтеза белка у эукариот, именно на этой стадии действуют основные механизмы регуляции белкового синтеза в клетке. Основным механизмом эукариотической инициации является так называемая 5'-концевая инициация, при которой 40S рибосомная субчастица связывается с кэпированным 5'-концом мРНК, а затем сканирует нуклеотидную последовательность до тех пор, пока не встретит инициаторный кодон в подходящем контексте. Далее на инициаторном кодоне происходит присоединение большой рибосомной субчастицы и формируется 80S рибосома, готовая к процессу элонгации. Предложенная более 30-ти лет назад М. Козак, эта простая и изящная модель позволила свести воедино большое количество накопленных экспериментальных данных и выдержала множество попыток опровержения. Однако, до последнего времени эта модель являлась не более чем гипотезой. Оставалось неясным, какие молекулярные процессы являются движущей силой инициации. Не удавалось получить прямые экспериментальные доказательства существования процесса сканирования – измерить его кинетические параметры или охарактеризовать промежуточные состояния.

В настоящее время существуют две наиболее общие модели поиска инициаторного кодона путем сканирования 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) мРНК, основанные на том факте, что этот процесс является АТФ-зависимым. Согласно первой, широко распространенной модели, считается, что энергия АТФ необходима лишь для функционирования РНК-хеликаз, расплетающих шпильки структурированных 5'-НТО перед рибосомой и таким образом освобождающих дорогу для движущихся 43S преинициаторных комплексов. В этом случае поиск инициаторного кодона рибосомной субчастицей происходит посредством АТФ-независимой одномерной диффузии, так называемого «бесфазного блуждания» по цепи мРНК.

Согласно альтернативной модели, 40S рибосомные субчастицы осуществляют более или менее равномерное, 5'→3' направленное движение вдоль 5'-нетранслируемой области мРНК, которое требует энергии само по себе, независимо от проблемы расплетания вторичной структуры, так как энергонезависимое однонаправленное движение даже вдоль неструктурированных (или расплавленных) участков мРНК нарушает второй закон термодинамики. До недавнего времени существовали лишь косвенные экспериментальные данные, не позволяющие сделать определенный выбор в пользу той или иной модели сканирования.

Цель и задачи исследования. Основной целью работы было получение новых знаний о механизмах инициации трансляции у эукариот. Первой задачей работы было получение ответа на вопрос: каким образом осуществляется поиск инициаторного кодона рибосомой в процессе сканирования? Является ли сканирование однонаправленным, энергетически зависимым движением

инициаторного комплекса вдоль цепи мРНК, или же поиск инициаторного кодона происходит путем стохастического случайного блуждания 40S субчастицы?

Чтобы убедиться в правильности той или иной модели, необходимо было установить взаимосвязь между длиной 5'-НТО и временем, необходимым для ее сканирования. В случае механизма случайного блуждания время сканирования должно быть пропорционально квадрату длины 5'-НТО, тогда как в случае однонаправленного движения эта зависимость должна быть линейной. В нашей работе мы анализировали время инициации как часть общей продолжительности эписикла трансляции. Для этого был применен уникальный метод *in situ* мониторинга синтеза люциферазы в бесклеточных системах трансляции, позволяющий получать гладкие кинетические кривые и определять время одного раунда трансляции с высокой точностью. Мы использовали набор конструкций мРНК люциферазы с различными длинами 5'-НТО, являющихся производными очень длинного природного лидера из мРНК ретротранспозона LINE-1 человека, для нахождения зависимости между временем сканирования и длиной 5'-нетранслируемой области мРНК.

При трансляции некоторых некэпированных мРНК люциферазы в бесклеточной системе из зародышей пшеницы нами был обнаружен интересный эффект – при высоких концентрациях мРНК скорость белкового синтеза заметно увеличивалась в процессе работы системы. Это проявлялось в виде четкого «излома» на кинетической кривой, который наблюдался примерно через 2 полных раунда трансляции. Второй задачей данной работы было попытаться установить, связано ли наблюдаемое увеличение скорости трансляции с включением некоего альтернативного механизма инициации в процессе работы бесклеточной системы, или же оно определяется какими-то другими внутренними изменениями в трансляционной системе.

Научная новизна работы. Для детального исследования кинетических параметров процесса эукариотической инициации трансляции нами был предложен и опробован метод точного измерения продолжительности синтеза белковой цепи *in vitro*, основанный на комплексной математической обработке кинетических кривых, полученных с помощью непрерывного мониторинга синтеза люциферазы в бесклеточных системах трансляции. С помощью данного метода, позволяющего оценивать время одного раунда трансляции с недостижимой ранее точностью порядка 5 секунд, было показано, что время сканирования в процессе кэп-зависимой инициации трансляции прямо пропорционально длине 5'-нетранслируемой области мРНК как в растительной бесклеточной системе, так и в системе из клеток млекопитающих. Эти результаты убедительно свидетельствуют в пользу того, что поиск инициаторного кодона в процессе 5'-концевой инициации трансляции происходит путем однонаправленного движения сканирующей рибосомной субчастицы вдоль цепи мРНК, а не стохастического случайного блуждания.

Также было обнаружено, что при трансляции некэппированных мРНК люциферазы в бесклеточной системе из зародышей пшеницы может происходить значительное увеличение скорости белкового синтеза приблизительно через один полный раунд трансляции. Было показано, что способность к ускорению трансляции определяется главным образом 5'-лидерной последовательностью мРНК, а также сильно зависит от концентрации мРНК в системе трансляции. Оказалось, что эффект ускорения трансляции определяется увеличением скорости инициации на мРНК при участии фактора инициации eIF4F. На основании этих данных была предложена модель альтернативных способов инициации, основанная на циклизации полисом в процессе белкового синтеза и постепенном включении более эффективного механизма реинициации трансляции.

Основные результаты работы не имеют аналогов в мировой литературе и вносят значительный вклад в понимание процессов, происходящих на стадии инициации белкового синтеза. В данной работе впервые были получены прямые экспериментальные доказательства, подтверждающие модель сканирования 5'-нетранслируемой области мРНК в ходе эукариотической инициации трансляции.

Апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах. Результаты исследований были представлены на российских и международных конференциях: «Конференция, посвященная 40-летию Института белка: Биосинтез, структура и функция белка» (Пушино, 2007 год), «Ежегодная научная конференция Института белка» (Пушино, 2002, 2004, 2007-2010 годы), «IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов» (Новосибирск, 2008 год), «13th Annual Meeting of the RNA Society» (Berlin, 2008 год), «EMBO Conference on Protein Synthesis and Translational Control» (Heidelberg, 2009, 2011 годы).

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 150 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, обсуждение результатов, выводы и список цитируемой литературы из 170 ссылок. Работа содержит 45 рисунков и 3 таблицы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Часть 1. Исследование кинетических параметров сканирования в процессе кЭП-зависимой инициации трансляции в эукариотических бесклеточных системах

1.1 Метод точного определения продолжительности синтеза одной белковой цепи

Общепринятой процедурой измерения кинетических параметров синтеза белка в бесклеточной системе является отбор проб в различных временных точках с последующим определением концентрации синтезированного белка по активности, либо по включению радиоактивной аминокислоты. Однако, недостаточная точность такого подхода не позволяет получать гладкие кинетические кривые с высоким информационным содержанием.

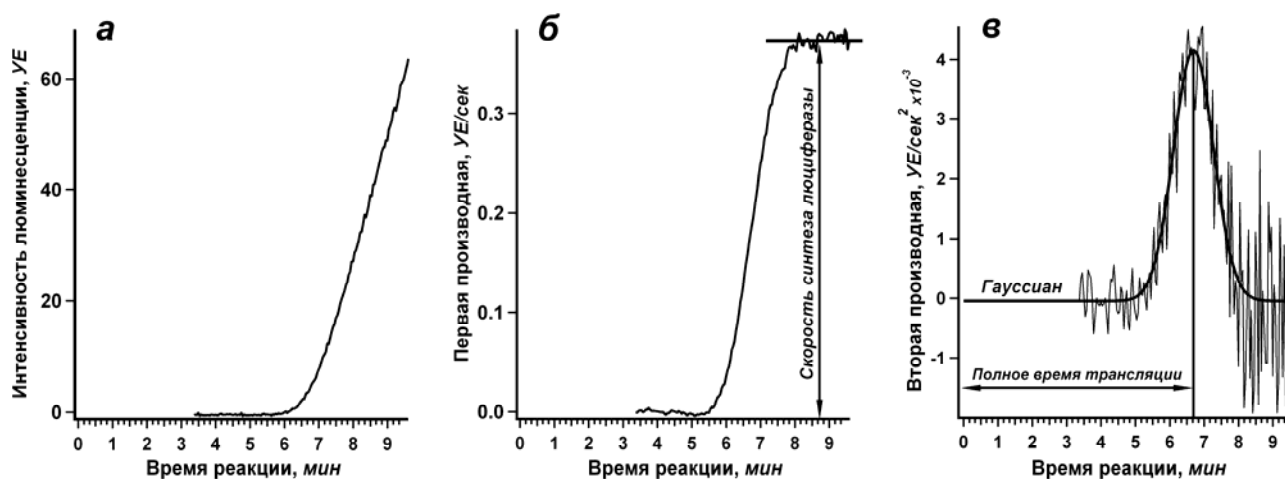


Рис. 1. Процедура измерения времени трансляции. (а) Кинетика накопления активной люциферазы в бесклеточной системе, измеренная с помощью *in situ* мониторинга синтеза белка. 25 нМ mL200Fluc мРНК транслировали в системе из зародышей пшеницы при 25°C. (б) Первая производная по времени кривой (а) отражает скорость накопления активной люциферазы. Область плато соответствует равновесной скорости синтеза. (в) Аппроксимация второй производной кривой (а) нормальным распределением Гаусса. Отмеченное положение гауссиана на оси абсцисс соответствует среднему времени трансляции мРНК, т. е. суммарному времени инициации, элонгации и терминации.

Ранее в нашей лаборатории был разработан уникальный метод *in situ* мониторинга синтеза фермента люциферазы из светлячка *Photinus pyralis* в бесклеточных системах трансляции (Kolb *et al.*, *EMBO J.*, 1994, **13**:3631), основанный на том факте, что люцифераза катализирует реакцию превращения субстрата люциферина в оксилуциферин в присутствии АТФ и молекулярного кислорода с излучением кванта света. Субстраты люциферазной реакции добавляются непосредственно в реакционную смесь, и количество синтезированного белка измеряется с помощью счетчика фотонов – люминометра – прямо в ходе работы бесклеточной системы трансляции. Данный метод позволяет получать гладкие кривые накопления активной

люциферазы с низким соотношением сигнал/шум, которые позволяют с высокой точностью оценивать кинетические параметры процесса трансляции (Рис. 1а).

Как было показано ранее в нашей лаборатории, сворачивание люциферазы происходит котрансляционно, и фермент проявляет свою активность сразу же после схода с рибосомы, то есть время появления первого активного продукта на кинетической кривой соответствует времени синтеза одной полноразмерной цепи белка, или, другими словами, суммарному времени инициации, элонгации и терминации трансляции. Точная оценка этого параметра затруднена, поскольку излом кривой в этой точке несколько размыт. Так как вторая производная кинетической кривой хорошо описывается функцией Гаусса, то это размытие отражает статистический разброс времен синтеза цепи белка, в этом случае положение пика гауссиана должно соответствовать среднему времени трансляции мРНК (Рис. 1в). Применяв подобный математический подход, мы получили возможность измерять время, требующееся для одного раунда трансляции, с очень высокой точностью порядка 5 секунд.

1.2 Зависимость полного времени трансляции от длины 5'-НТО мРНК

Для того чтобы исследовать зависимость полного времени трансляции от длины 5'-нетранслируемой области мРНК, был выбран длинный природный лидер из мРНК человеческого ретротранспозона LINE-1, полная длина которого составляла 913 нуклеотидов. Ранее было показано, что инициация трансляции на этом лидере осуществляется по кэп-зависимому механизму, и не

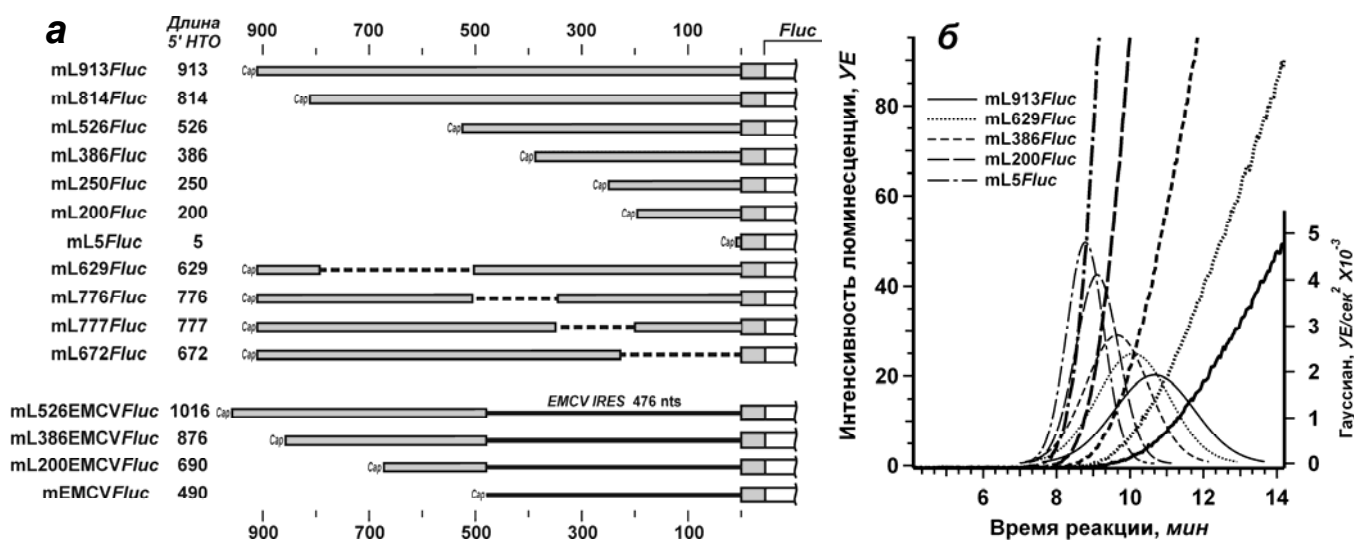


Рис. 2. (а) Схемы мРНК люциферазы с 5'-НТО различной длины. mL913Fluc, включающая полную последовательность лидера мРНК ретротранспозона LINE-1 человека, и 10 конструкций с делециями в 5'-НТО содержат одинаковые рамки считывания светлячковой люциферазы и 3'-НТО. Конструкции 12-15 были созданы путем вставки активного фрагмента IRES последовательности EMCV в соответствующие делеционные конструкции перед AUG кодоном. **(б)** Пример определения полного времени трансляции для мРНК с разной длиной 5'-НТО. Приведены кинетические кривые синтеза люциферазы в пшеничной системе, транслирующей указанные мРНК. Тонкие линии отражают аппроксимацию вторых производных по времени соответствующих кривых функцией Гаусса.

было обнаружено каких-либо указаний на существование сайтов внутренней посадки рибосом (IRES) (Dmitriev *et al*, *Mol. Cell. Biol.*, 2007, **27**:4685). Было сконструировано 10 различных делеционных мутантов таким образом, что делеции более или менее случайным образом перекрывали всю последовательность исходного лидера (Рис. 2а). Полученные с данных конструкций кэпированные мРНК люциферазы транслировали в двух бесклеточных системах – растительной (на основе экстракта из зародышей пшеницы) и из клеток млекопитающих (на основе лизата из асцитов мыши Krebs-2).

Оказалось, что время трансляции действительно увеличивается с увеличением длины 5'-нетранслируемой области мРНК (Рис. 2б). Как и ожидалось, максимальная задержка появления люциферазной активности после начала трансляции наблюдалась для мРНК с полноразмерным лидером в 913 нуклеотидов, причем разница во временах трансляции в сравнении с матрицей с самой короткой 5'-НТО составила примерно 2 и 2.5 минуты в пшеничной и асцитной бесклеточных системах, соответственно, что существенно превышает ошибку эксперимента.

На рисунке 3 приведены зависимости полного времени трансляции от длины 5'-нетранслируемой области мРНК в обеих использованных бесклеточных системах. Для всех проанализированных случаев полное время трансляции обнаружило положительную корреляцию с длиной 5'-лидера, и эта

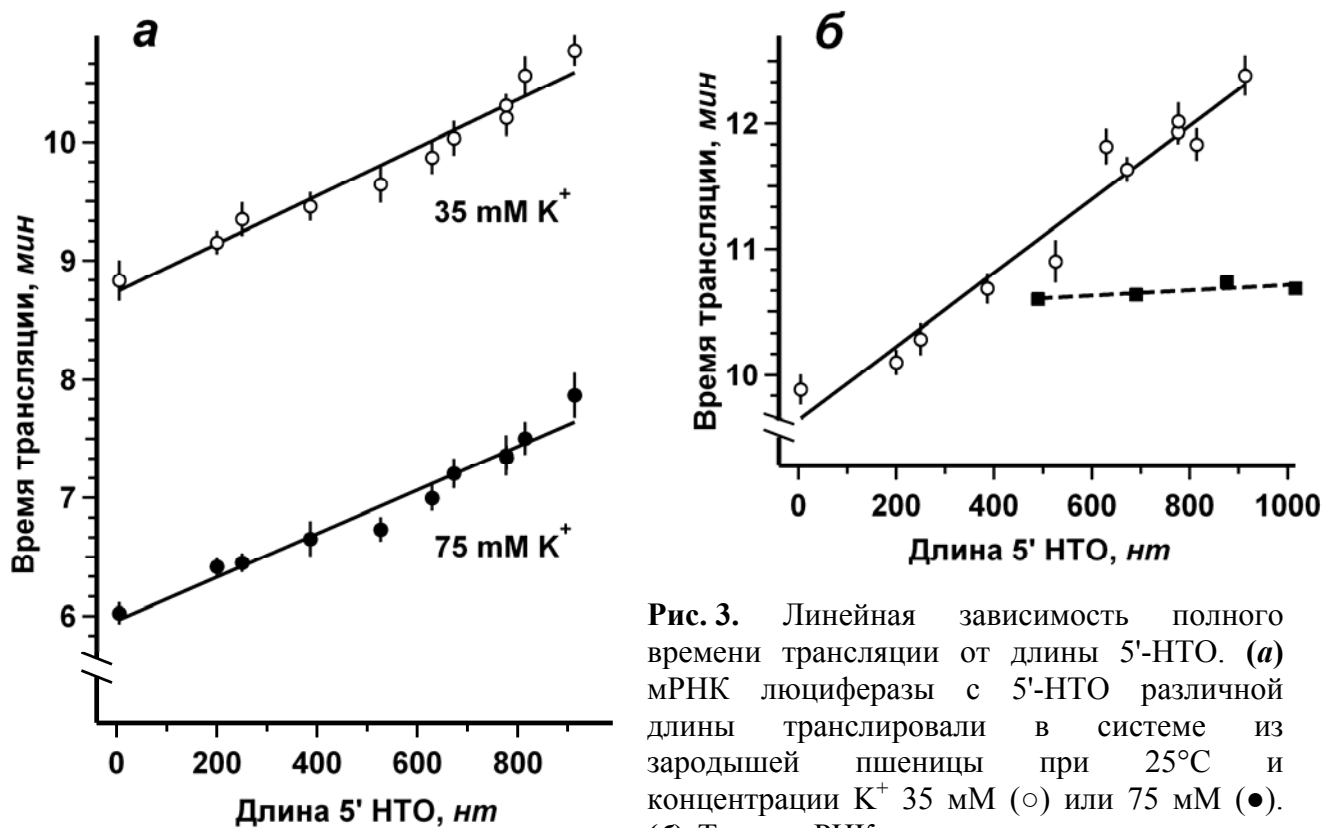


Рис. 3. Линейная зависимость полного времени трансляции от длины 5'-НТО. (а) мРНК люциферазы с 5'-НТО различной длины транслировали в системе из зародышей пшеницы при 25°C и концентрации K⁺ 35 мМ (○) или 75 мМ (●). (б) Те же мРНК транслировали в системе из асцита мыши Krebs-2 при 30°C (○). В той же системе транслировали мРНК со вставкой IRES последовательности EMCV перед AUG кодоном (■).

зависимость была близка к линейной. Так как кодирующая последовательность и 3'-НТО были одинаковыми для всех используемых матриц, то различия в полных временах трансляции, по-видимому, должны объясняться разницей во временах инициации. Также было продемонстрировано, что линейная зависимость времени трансляции от длины лидера является характерным свойством именно кэп-зависимой инициации трансляции. При переключении механизма инициации трансляции с 5'-концевой на внутреннюю путем вставки IRES последовательности из вируса энцефаломиокардита (EMCV) в 5'-НТО мРНК перед стартовым кодоном (конструкции 12-15 на Рис. 2а), было обнаружено, что время трансляции не зависит от длины последовательности лидера, предшествующей IRES (Рис. 3б).

1.3 Доказательство влияния длины 5'-НТО мРНК на продолжительность стадии инициации

Для того чтобы подтвердить, что наблюдаемые различия во временах трансляции для мРНК с разной длиной 5'-НТО определяются изменением времени инициации, а не какими-либо изменениями на стадии элонгации, мы воспользовались тем фактом, что концентрация ионов K^+ влияет на скорость эукариотической элонгации. Действительно, в наших экспериментах увеличение концентрации калия в бесклеточной системе трансляции приводило к уменьшению полного времени трансляции для всех проверенных конструкций мРНК люциферазы (Рис. 3а). При этом характер зависимости времени трансляции от длины 5'-НТО не изменялся при увеличении концентрации ионов калия. Вероятно, эта зависимость определялась процессом, слабо чувствительным к изменению концентрации моновалентных катионов.

Для того чтобы идентифицировать этот процесс, две мРНК люциферазы – с самой короткой и самой длинной из исследованных 5'-НТО – начинали транслировать в бесклеточной системе из зародышей пшеницы при низкой концентрации калия, а затем в порции трансляционной смеси добавляли дополнительный K^+ с интервалом в 30 секунд в ходе реакции трансляции. В результате, было обнаружено, что зависимость полного времени трансляции от времени добавления K^+ в систему для мРНК с самой короткой 5'-НТО в 5 нуклеотидов оказалась линейной на протяжении всего процесса биосинтеза белка. Совсем другая ситуация наблюдалась для мРНК с полноразмерным LINE-1 лидером в 913 нуклеотидов: на протяжении первых 2-х минут работы системы увеличение концентрации калия одинаково влияло на полное время трансляции, что отражено в плато на графике (Рис. 4). Следовательно, трансляция мРНК с длинной 5'-НТО начиналась со стадии, нечувствительной к концентрации K^+ , по-видимому, стадии инициации. Продолжительность этой стадии (примерно 100 секунд) практически совпала с разницей в полных временах трансляции, измеренных для мРНК люциферазы с самой короткой 5'-НТО и матрицы с самым длинным полноразмерным лидером. Этот результат подтверждает предположение, что влияние длины 5'-нетранслируемой области

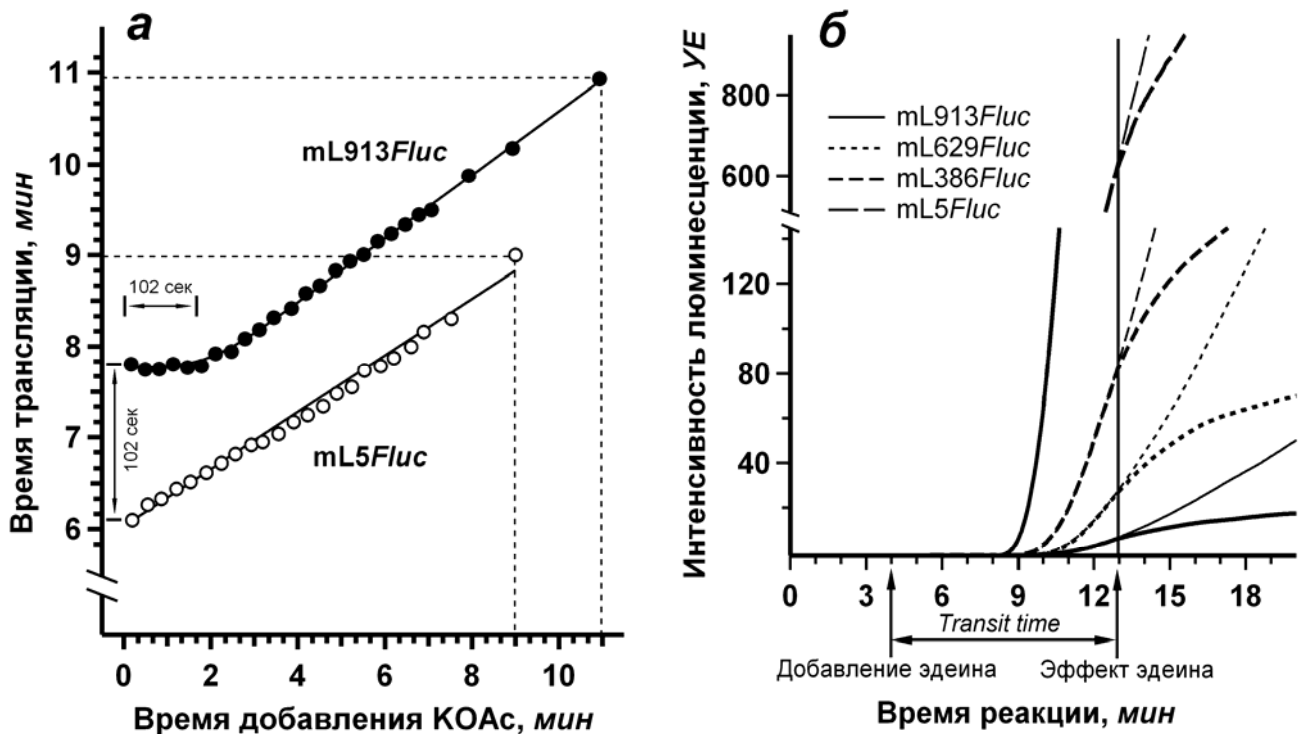


Рис. 4. (а) Зависимость полного времени трансляции от времени добавления K^+ в систему. В различные моменты времени после начала реакции в систему из зародышей пшеницы, транслирующую 25 нМ указанной мРНК, добавляли КОАс, повышая конечную концентрацию K^+ с 35 мМ до 75 мМ. **(б)** Доказательство постоянства суммарного времени элонгации и терминации при трансляции мРНК с 5'-НТО различной длины. В указанный момент времени с систему, транслирующую 25 нМ соответствующей мРНК, был добавлен эдеин до конечной концентрации 3 мкМ (жирные линии) или деионизованная вода (тонкие линии). Вертикальной линией отмечено совпадение моментов отклика системы на добавление антибиотика для всех мРНК.

на полное время трансляции осуществляется именно на уровне инициации трансляции и, вероятнее всего, на стадии сканирования.

В дополнение к этому, отсутствие влияния длины 5'-НТО на стадию элонгации было проверено прямым измерением так называемого *transit time*, то есть суммарного времени элонгации и терминации трансляции, для данных конструкций мРНК люциферазы. Для этого мы использовали метод ингибирования стадии инициации трансляции антибиотиком эдеином, который действует на поздней стадии эукариотической инициации, предотвращая формирование 80S инициаторных комплексов на AUG кодоне. Мы добавляли эдеин в бесклеточную систему из зародышей пшеницы, транслирующую мРНК люциферазы с различными длинами 5'-НТО, через 4 минуты после начала трансляционной реакции. Несмотря на то, что полные времена трансляции различались для используемых люциферазных матриц, ответ на добавление антибиотика происходил практически в один и тот же момент (Рис. 4б). Поскольку эта задержка реакции системы на добавление эдеина и соответствует *transit time*, то было доказано, что оно не зависит от длины 5'-лидерной последовательности мРНК. Таким образом, было подтверждено, что изменение длины 5'-НТО влияет только на продолжительность стадии инициации трансляции.

1.4 Влияние элементов вторичной структуры 5'-НТО на скорость сканирования

Считается, что в процессе сканирования рибосомный инициаторный комплекс может наталкиваться на различные элементы вторичной структуры, которые могут замедлять или даже блокировать его дальнейшее продвижение вдоль 5'-НТО при инициации трансляции. Однако наши эксперименты показали, что скорость сканирования была практически одинакова на всех исследованных 5'-лидерах из ретротранспозона LINE-1, которые обладали разным содержанием и стабильностью вторичной структуры. При этом необходимо отметить, что в использованных 5'-нетранслируемых областях нет предсказанных шпилек или других двуспиральных элементов с термодинамической стабильностью более -20 кКал/моль.

Для того чтобы исследовать возможное влияние стабильных элементов вторичной структуры на трансляцию в *in vitro* системах, в предположительно неструктурированный 3'-участок полноразмерного лидера из LINE-1 мы вставили 2 варианта шпилек с разной термодинамической стабильностью на небольшом расстоянии от инициаторного кодона. Последовательности обеих шпилек были взяты из работы М. Козак (Kozak M., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1986, **83**:2850).

В результате, было обнаружено, что вставка шпильки средней стабильности (около -30 кКал/моль) в 5'-нетранслируемую область мРНК практически не влияла на полное время трансляции и скорость белкового синтеза в сравнении с исходной матрицей без шпильки как в пшеничной, так и

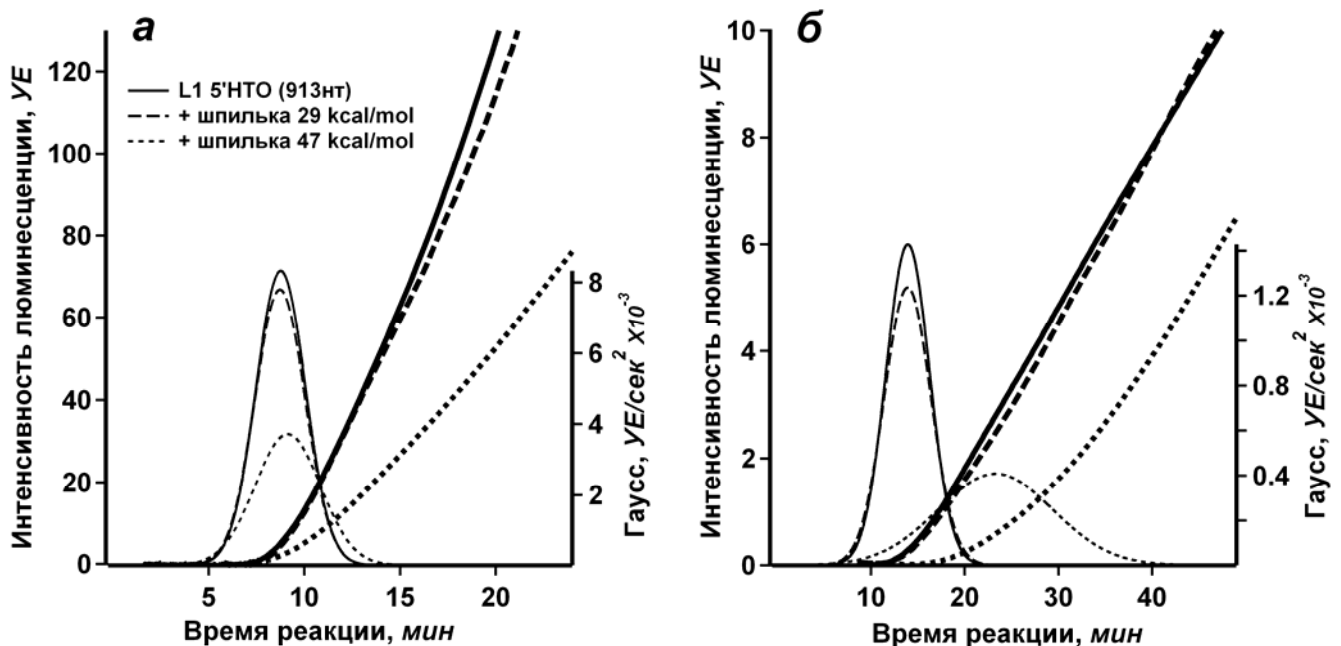


Рис. 5. Влияние стабильных элементов вторичной структуры на кинетические параметры трансляции. (а) Кинетические кривые трансляции в системе из зародышей пшеницы мРНК с полноразмерным лидером LINE-1, а также вариантов с добавлением в 5'-НТО шпилек указанной стабильности. (б) Трансляция тех же конструкций в системе из клеток асцита мыши.

в асцитной бесклеточных системах (Рис. 5), что полностью согласуется с данными Козак, полученными в COS клетках млекопитающих. Этот результат дает объяснение тому факту, что время сканирования 5'-НТО на основе LINE-1 зависело главным образом от длины, а не от локальной вторичной структуры данных лидеров. Иная ситуация наблюдалась, когда в 5'-НТО была добавлена более стабильная шпилька со свободной энергией плавления около -50 кКал/моль. В этом случае кинетика белкового синтеза изменялась по-разному в зависимости от бесклеточной системы трансляции. Так, в системе трансляции из зародышей пшеницы время инициации не менялось при добавлении шпильки, уменьшалась лишь скорость накопления активной люциферазы, отражающая эффективность инициации (Рис. 5а). Это можно объяснить уменьшением процессивности сканирования при наличии стабильной шпильки в лидерной последовательности мРНК. В системе трансляции из клеток асцитов мыши вставка стабильной шпильки в 5'-НТО заметно увеличивала время инициации, но не изменяла скорость накопления люциферазы. То есть, при наличии шпильки люциферазная активность в бесклеточной системе появлялась позже по сравнению с исходной мРНК, однако затем кинетические кривые трансляции шли параллельно друг другу (Рис. 5б).

Эти результаты свидетельствуют о том, что в природе могут существовать различные механизмы преодоления стерических препятствий в процессе сканирования 5'-НТО мРНК. В растительной системе скорость сканирования поддерживается на постоянном высоком уровне, при этом часть рибосом, наталкиваясь на стабильную шпильку, просто уходит с мРНК, и таким образом происходит уменьшение процессивности сканирования. В системе из клеток млекопитающих иницирующие рибосомные субчастицы, встречая на своем пути шпильку высокой стабильности, не соскакивают с матрицы, а лишь замедляют свое движение с тем, чтобы рано или поздно преодолеть это препятствие и продолжить процесс трансляции.

1.5 Определение скоростей сканирования 5'-НТО и элонгации в эукариотических бесклеточных системах трансляции

Скорость рибосомного сканирования можно оценить из наклона линейных зависимостей полного времени трансляции от длины 5'-НТО, представленных на рисунке 3. Так, было определено, что скорости сканирования 5'-лидерной последовательности мРНК в бесклеточных системах трансляции из зародышей пшеницы (при 25°C) и из асцитов мыши (при 30°C) составляли приблизительно 8 и 6 нуклеотидов в секунду, соответственно.

Ранее было показано, что полное время трансляции мРНК люциферазы с очень коротким лидером в 5 нуклеотидов практически совпадает со значением *transit time*, которое является преимущественно мерой продолжительности стадии элонгации (Рис. 4б). Это позволило определить скорость движения транслирующей рибосомы в процессе элонгации из полного времени трансляции «безлидерной» люциферазной матрицы в двух бесклеточных системах трансляции. Оказалось, что скорость элонгации составляла примерно

3 нуклеотида в секунду в Krebs-2 системе (при 30°C) и 3 или 4.5 нуклеотида в секунду (при концентрации K^+ 35 мМ и 75 мМ, соответственно) в бесклеточной системе из зародышей пшеницы (при 25°C). Таким образом, было обнаружено, что скорости движения сканирующих и транслирующих рибосом являются величинами одного порядка. Это означает, что инициация трансляции является довольно сложным процессом, который может вносить существенный вклад в общую продолжительность белкового синтеза.

1.6 Модель однонаправленного движения иницирующей рибосомной субчастицы в процессе сканирования

Полученная в наших экспериментах линейная зависимость между временем сканирования и длиной 5'-НТО мРНК позволяет сделать однозначный вывод о том, что миграция сканирующей рибосомной субчастицы вдоль лидерной последовательности представляет собой однонаправленное движение, а не стохастическое случайное блуждание. Это определенно указывает на существование специального, энергетически зависимого механизма. Такой механизм может быть реализован на молекулярном уровне в виде АТФ-зависимого устройства типа Броуновского храповика, который был предложен и для других двигающихся молекулярных машин, таких как миозин, динеин, кинезин, РНК-полимераза, а также транслирующая рибосома. Принципиальным моментом в таких молекулярных наномашинах является энергетически зависимое ограничение обратных диффузионных движений, тогда как диффузия вперед разрешена.

При обсуждении возможных механизмов сканирования 5'-НТО следует учитывать, что случайное плавление вторичной структуры мРНК АТФ-зависимыми хеликазами, не связанными с рибосомами, вряд ли может обеспечивать однонаправленное движение сканирующей субчастицы. Весьма привлекательной может быть модель, состоящая в том, что хеликаза, присоединенная впереди движущейся рибосомной субчастицы, расплетает вторичную структуру РНК и облегчает сканирование, тогда как позади субчастицы происходит быстрое восстановление спиралей, предотвращающее ее обратную диффузию. Однако недостатком этой модели является строгая необходимость хорошо развитой вторичной структуры вдоль 5'-нетранслируемой области мРНК.

Согласно другой модели, сканирующая 40S субчастица продвигается вдоль более или менее развернутой цепи РНК под воздействием Броуновского движения, а ее возможное обратное перемещение периодически блокируется благодаря АТФ-зависимому взаимодействию связанных с рибосомой факторов инициации eIF4A и eIF4B с участками мРНК, то есть, эти два белка играют роли «пружины» и «собачки», соответственно, в механизме храповика Фейнмановского типа (Spirin A.S., *Biochemistry*, 2009, **48**:10688). Так или иначе, обе вышеупомянутые модели принципиально согласуются с парадигмой АТФ-

зависимого однонаправленного движения сканирующей рибосомной субчастицы.

Часть 2. Исследование эффекта увеличения скорости белкового синтеза при трансляции некэпированных мРНК в бесклеточной системе из зародышей пшеницы

Применив метод *in situ* мониторинга для исследования трансляции некэпированных мРНК в бесклеточной системе из зародышей пшеницы, мы обнаружили интересный эффект. При трансляции мРНК люциферазы с очень короткой 5'-НТО в 4 нуклеотида (GGGA) происходило заметное увеличение скорости белкового синтеза в ходе работы бесклеточной системы. Это проявлялось в виде характерного «излома» на кинетической кривой накопления активной люциферазы (Рис. 6а). Причем наблюдаемое ускорение трансляции

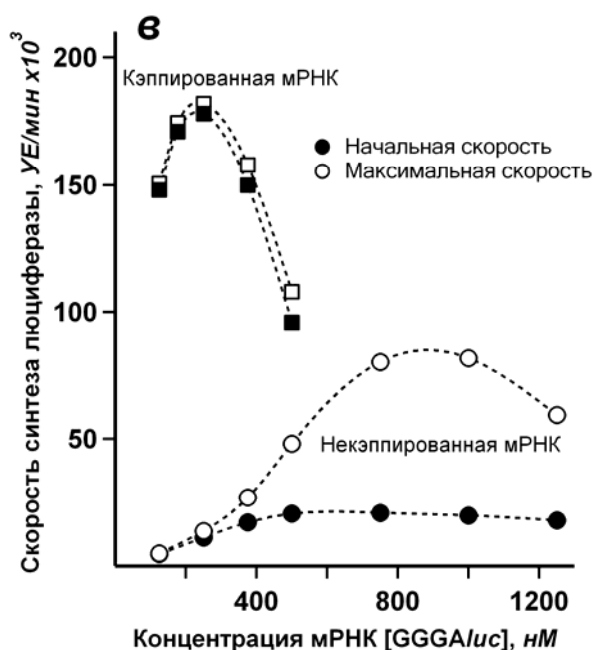
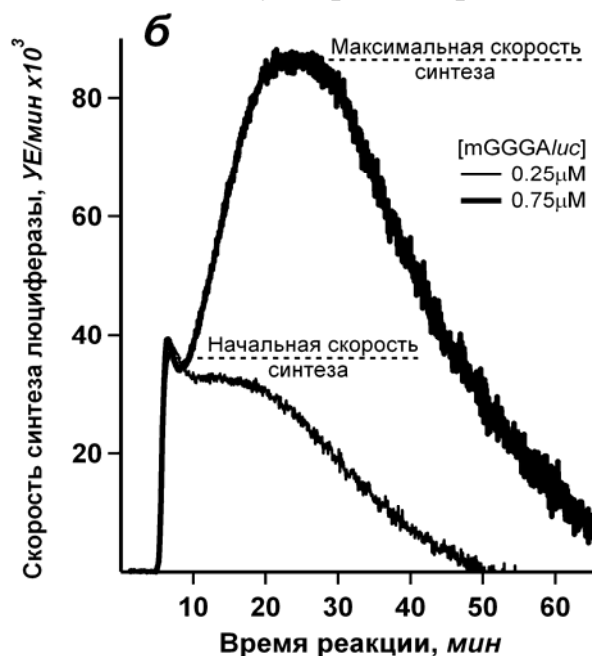
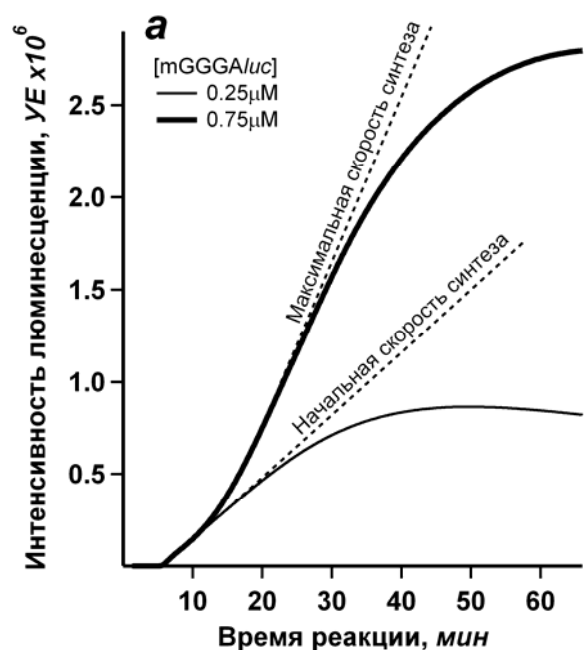


Рис. 6. Эффект «разгона» белкового синтеза. (а) Кинетические кривые трансляции указанных концентраций некэпированной мРНК люциферазы с короткой 5'-НТО (GGGA) в системе из зародышей пшеницы. (б) Производные тех же кривых по времени. Пунктирные линии определяют начальную и максимальную скорости синтеза. (в) Зависимость начальной (●) и максимальной (○) скоростей синтеза белка от концентрации мРНК в системе трансляции.

начиналось приблизительно через 2 времени полного прочтения мРНК рибосомами и достигало своего максимума через 20 – 25 минут работы системы, превышая начальную скорость трансляции в 2.5 раза.

Также оказалось, что этот так называемый «разгон» белкового синтеза происходил только при высоких концентрациях мРНК, добавленной в систему (> 500 нМ), а при низких концентрациях кинетические кривые имели классический мономодальный вид. Это хорошо заметно на графиках, отражающих зависимости начальной и максимальной скоростей белкового синтеза от концентрации мРНК в системе трансляции (Рис. 6в). За начальную скорость синтеза принимали среднюю скорость накопления люциферазы в течение первых 5 минут после появления активного продукта. Максимальную скорость трансляции определяли из максимального наклона кинетической кривой. Совпадение кривых начальной и максимальной скоростей при низких концентрациях мРНК означает отсутствие эффекта ускорения трансляции, а расхождение при более высоких концентрациях матрицы определяет степень выраженности разгона белкового синтеза.

2.1 Влияние структуры 5'-НТО на эффект ускорения трансляции

Чтобы проверить, является ли эффект ускорения трансляции, обнаруженный на «безлидерной» мРНК люциферазы, специфическим свойством данной мРНК, или же он характерен и для других матриц, мы провели трансляцию нескольких различных некэпированных конструкций мРНК люциферазы. Все проверенные мРНК имели одинаковую 3'-НТО и различные 5'-лидеры природного или искусственного происхождения. Оказалось, что эффект разгона реализуется в большинстве рассмотренных случаев, однако имеет разную степень выраженности.

Так, в случае мРНК люциферазы с β -глобиновым лидером эффект ускорения в процессе трансляции был очень похож на поведение «безлидерной» матрицы. То есть, начальная скорость трансляции была довольно низкой, однако ускорение при высоких концентрациях мРНК было очень четко выражено и достигало своего максимума при концентрации матрицы в 1000 нМ, после чего несколько снижалось за счет эффекта «самоингибирования» (Рис. 7а).

Несколько другой случай наблюдался при трансляции мРНК люциферазы с «псевдослучайным» лидером, взятым из последовательности коммерческой конструкции рGEMluc, где эффект разгона был наиболее резко выражен при любых концентрациях матрицы в бесклеточной системе из зародышей пшеницы. При этом синтез люциферазы начинался с очень низкой начальной скоростью, однако примерно через 2 раунда слабой трансляции происходило сильное ускорение даже при низких концентрациях мРНК в системе. В итоге, несмотря на слабый старт, конечный выход люциферазы был

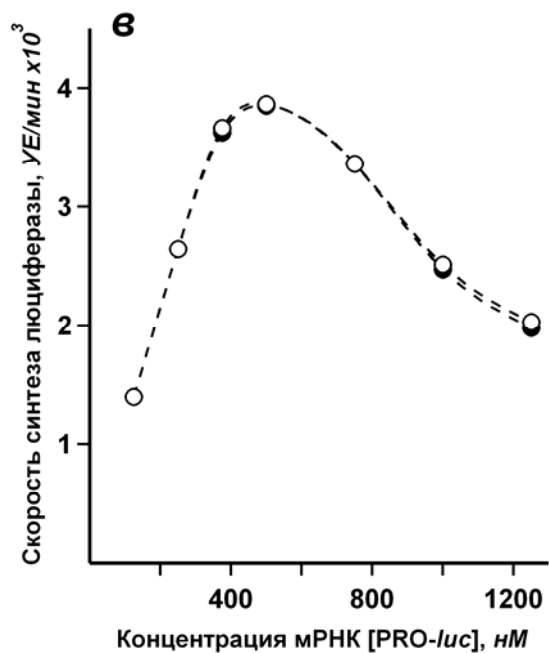
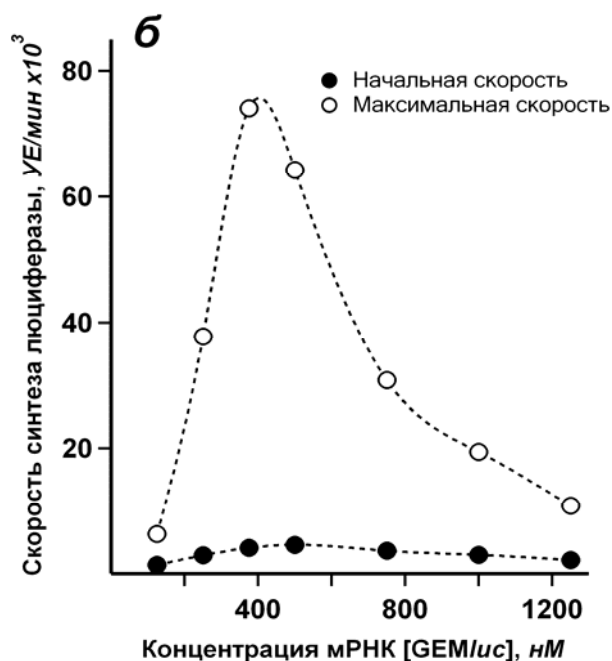
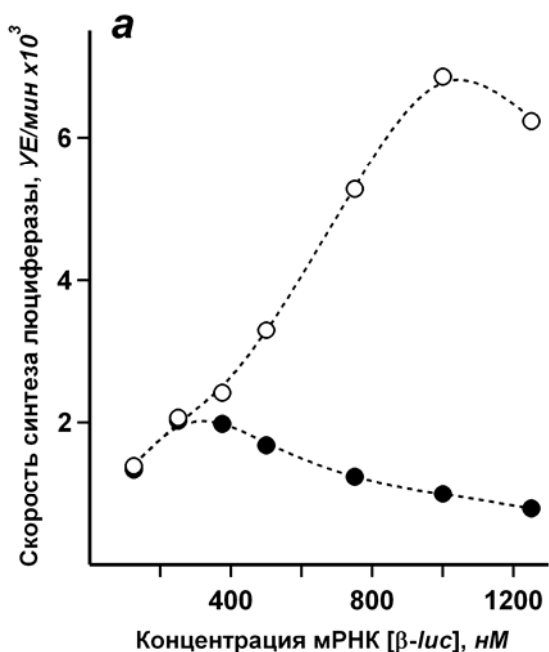


Рис. 7. Зависимость начальной (●) и максимальной (○) скоростей синтеза белка от концентрации матрицы при трансляции некэпированных мРНК с β-глобиновым (а), «псевдослучайным» (б) и прокариотическим (в) лидерами в системе из зародышей пшеницы.

сравним с выходом, полученным при трансляции других мРНК с эффективными лидерами (Рис. 7б).

Лишь одна из проверенных конструкций мРНК люциферазы, несущая прокариотический 5'-лидер, не выявила эффекта увеличения скорости белкового синтеза в ходе работы бесклеточной системы трансляции. То есть, при трансляции данной мРНК максимальная скорость синтеза достигалась сразу же после начала работы системы и уже далее не изменялась независимо от концентрации матрицы (Рис. 7в).

Таким образом, было выявлено два типа трансляции некэпированных мРНК в бесклеточной системе – это трансляция с постоянной скоростью при любых концентрациях матрицы или же трансляция с ускорением, которое достигает максимума при некоторых оптимальных количествах мРНК. Тот или

иной тип трансляции определяется структурой 5'-нетранслируемой области мРНК.

2.2 Установление постоянства скорости элонгации в течение работы бесклеточной системы из зародышей пшеницы

Одним из возможных объяснений наблюдаемого нами эффекта увеличения скорости белкового синтеза может быть уменьшение продолжительности стадии элонгации в процессе работы бесклеточной

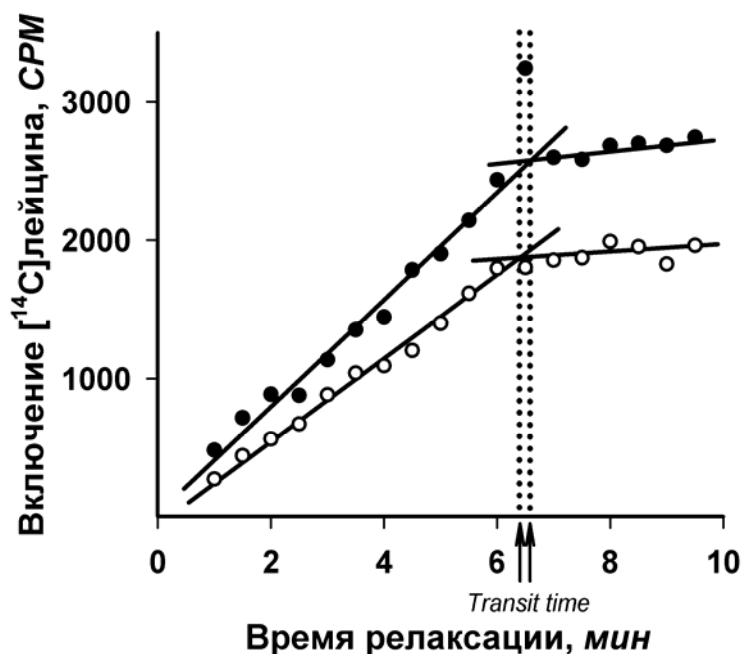


Рис. 8. Определение суммарного времени элонгации и терминации (*transit time*) через 4 (○) и 18 (●) минут трансляции 500 нМ мРНК люциферазы с коротким лидером (GGGA) в системе из зародышей пшеницы. Приведена кинетика накопления радиоактивности в полноразмерном белке после быстрого разбавления системы радиоактивной аминокислоты. Пунктирными линиями отмечены найденные значения *transit time*.

системы трансляции. Чтобы исключить такую возможность, необходимо было проверить, изменяется ли *transit time*, то есть суммарное время элонгации и терминации трансляции, в ходе белкового синтеза или же остается постоянным. Для этого мы использовали классический метод импульсной метки, разработанный ранее для *in vivo* систем, который был слегка модифицирован для нашей *in vitro* системы. В трансляционную смесь через 4 и 18 минут инкубации добавляли высокоомеченый [¹⁴C]-лейцин и через 2 минуты систему разбавляли большим избытком немеченого лейцина. В течение последующей инкубации бесклеточной системы из зародышей пшеницы определяли кинетику накопления радиоактивного полноразмерного белка. Временную точку, в которой радиоактивная метка достигает плато, следует интерпретировать как суммарное время элонгации и терминации, то есть *transit time*. Было обнаружено, что значения *transit time*, измеренные через 4 и 18 минут работы системы, практически одинаковы и составляют около 6 минут (Рис. 8). Из этих данных следует, что время элонгации остается постоянным в течение работы бесклеточной системы из зародышей пшеницы, и, таким образом, изменение скорости белкового синтеза (эффект ускорения) следует объяснять процессами, происходящими на стадии инициации трансляции.

2.3 Анализ распределения размеров полисом в ходе работы бесклеточной системы трансляции

Так как скорость элонгации постоянна в ходе экспериментов по трансляции, наблюдаемое ускорение белкового синтеза может объясняться как вовлечением в трансляцию новых молекул мРНК, в пользу чего свидетельствует зависимость наблюдаемых явлений от концентрации мРНК, так и увеличением эффективности инициации трансляции на одних и тех же матрицах. Анализ кинетических кривых не позволяет различить эти две возможности. Для того чтобы проверить оба предположения, мы проанализировали профили распределения размеров полисом в транслирующей системе в разные моменты времени. При условии постоянства скорости элонгации, которое мы подтвердили, размер полисом должен коррелировать со скоростью инициации трансляции на отдельной матрице.

Для анализа распределения полисом реакционные смеси, транслирующие мРНК люциферазы с коротким 5'-лидером в высокой и низкой концентрации, фракционировали методом ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы через 10 и 30 минут работы бесклеточной системы трансляции, то есть до и после разгона. В результате было обнаружено, что при трансляции мРНК люциферазы в низкой концентрации в ходе работы бесклеточной системы большая часть транслирующих рибосом находилась в составе ди- и трисом, и накопление полисом более высокого порядка было довольно слабым (Рис. 9а). В случае высокой концентрации матрицы, то есть в условиях ускорения белкового синтеза, в процессе работы трансляционной системы наблюдалось перераспределение значительной части рибосом в более крупные полисомы, состоящие из 6 – 8 рибосом на мРНК (Рис. 9б).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют в пользу того, что

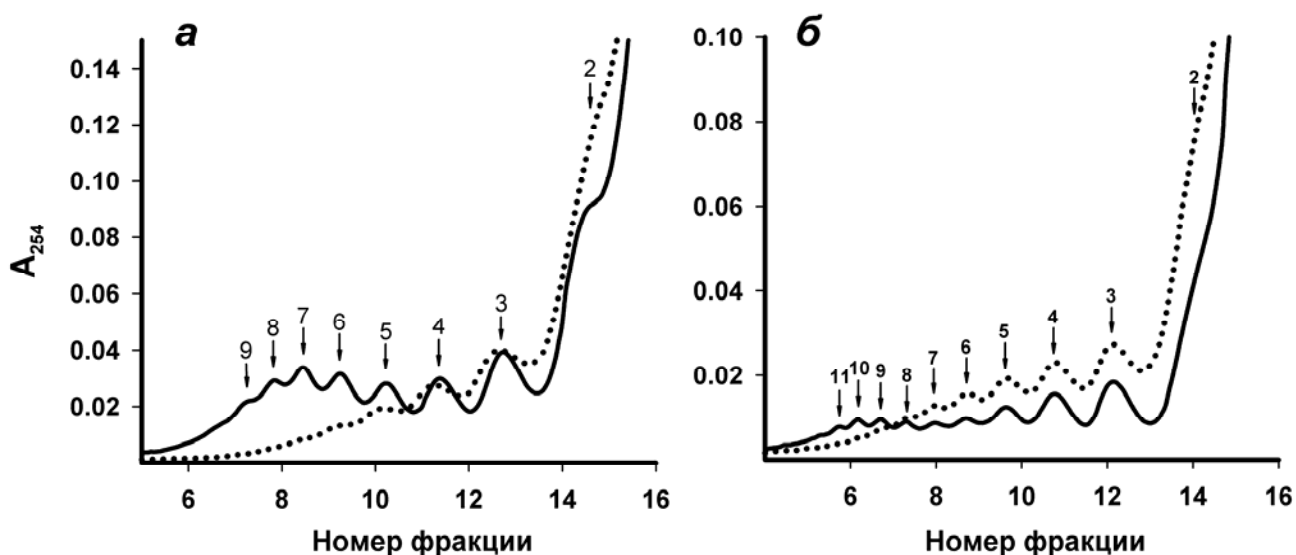


Рис. 9. Формирование полирибосом в системе из зародышей пшеницы при трансляции 750 нМ (а) и 250 нМ (б) мРНК люциферазы с короткой (GGGA) 5'-НТО. Через 10 (пунктирные кривые) или 30 (сплошные кривые) минут трансляции аликвоты реакционной смеси фракционировали путем центрифугирования в 15-45% градиенте сахарозы. Цифрами обозначен размер полисом в соответствующем пике.

наблюдаемый эффект увеличения скорости белкового синтеза в ходе работы бесклеточной системы трансляции объясняется увеличением скорости инициации на одних и тех же матрицах, а не вовлечением новых свободных мРНК в процесс трансляции. Концентрационная зависимость обнаруженных явлений может объясняться тем, что избыток матрицы специфически связывает какие-то факторы в системе трансляции, препятствующие увеличению скорости синтеза белка в ходе работы бесклеточной системы.

2.4 Влияние добавления кэп-аналога на эффект ускорения белкового синтеза

Считается, что добавление кэп-аналога в эукариотическую бесклеточную систему трансляции блокирует фактор инициации eIF4F и таким образом ингибирует инициацию трансляции на кэппированных матрицах. Мы решили проверить, требуется ли этот белковый фактор для инициации на некэппированных мРНК люциферазы с различными лидерами. Для этого в систему из зародышей пшеницы до начала трансляции добавляли различные количества кэп-аналога $m^7GpppGm$ и из полученных в результате кинетических кривых определяли начальную и максимальную скорости белкового синтеза.

На рисунке 10 приведены зависимости начальной и максимальной скорости трансляции двух конструкций мРНК люциферазы от количества добавленного в систему кэп-аналога. В случае матрицы с коротким 5'-лидером влияние кэп-аналога на начальную скорость синтеза люциферазы было довольно слабым (Рис. 10а). Даже при самой высокой концентрации $m^7GpppGm$ начальная скорость трансляции уменьшалась не более чем на 15 – 20% по сравнению с трансляцией мРНК без добавления кэп-аналога. Напротив, подавление максимальной скорости белкового синтеза было весьма

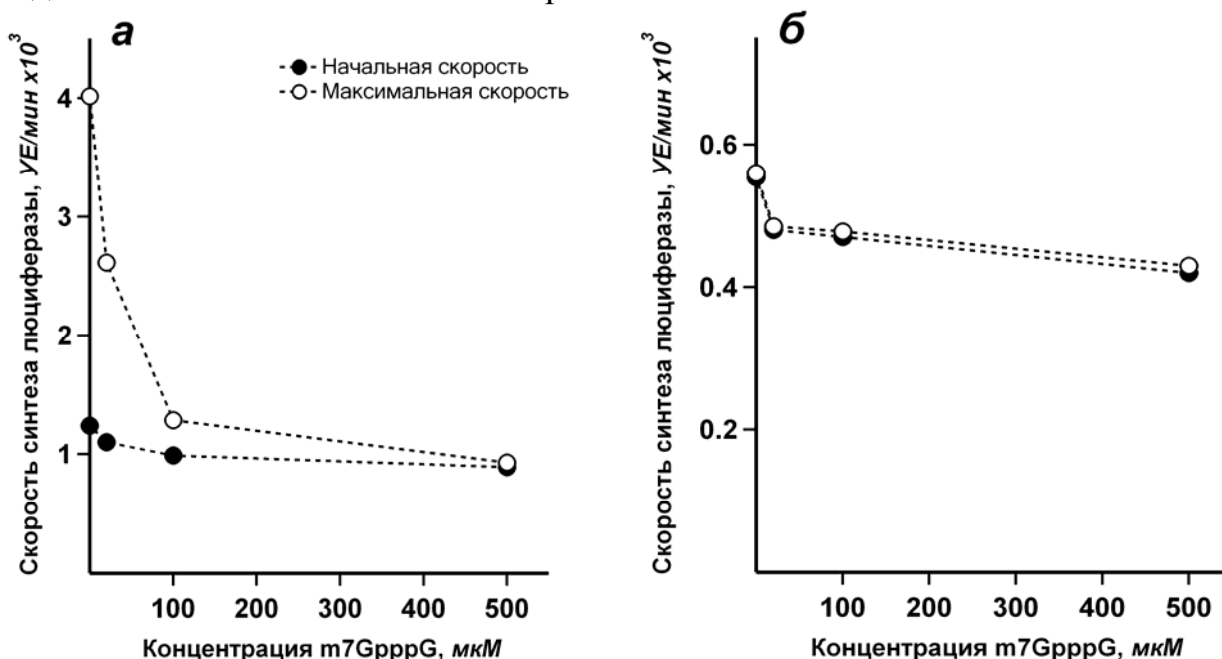


Рис. 10. Влияние кэп-аналога ($m^7GpppGm$) на начальную (●) и максимальную (○) скорости синтеза белка при трансляции 500 нМ некэппированной мРНК люциферазы с короткой (а) или прокариотической (б) 5'-НТО.

значительным – при высокой концентрации $m^7GpppGm$ она становилась равна начальной, и, таким образом, полностью выключался эффект ускорения трансляции. На трансляцию мРНК с прокариотическим лидером, которая имела только медленную фазу трансляции и не проявляла эффекта ускорения белкового синтеза, кэп-аналог действовал довольно слабо – форма кинетической кривой не изменялась, а скорость трансляции сокращалась лишь на 20% при самой высокой концентрации $m^7GpppGm$ (Рис. 10б).

Таким образом, было показано, что добавление кэп-аналога ингибирует именно стадию ускорения белкового синтеза и почти не влияет на первую медленную фазу трансляции. Эти результаты свидетельствуют о том, что при трансляции некоторых некэпированных мРНК могут сосуществовать или даже частично перекрываться два механизма инициации – eIF4F-независимый путь, осуществляющийся с самого начала белкового синтеза, и более эффективная инициация с участием фактора eIF4F, включающаяся на более поздней стадии после прочтения мРНК многими рибосомами.

2.5 Модель альтернативных механизмов инициации трансляции на некэпированных мРНК в эукариотической бесклеточной системе

На основании всех вышеизложенных данных можно сформулировать вероятную модель инициации трансляции на некэпированных мРНК в эукариотических бесклеточных системах. По-видимому, трансляция некэпированных мРНК начинается с eIF4F-независимой инициации на 5'-НТО, а затем, по мере образования нагруженных полисом, происходит сближение 5'- и 3'-концов мРНК и тесное взаимодействие между ними посредством субъединицы eIF4G фактора инициации eIF4F. Этот процесс запускает второй механизм инициации – реинициацию транслирующих рибосом на тех же самых матрицах. Таким образом, начиная с этой более поздней стадии трансляции, начинают сосуществовать два перекрывающихся способа инициации. Постепенное включение механизма реинициации проявляется как увеличение суммарной скорости инициации в ходе работы эукариотической *in vitro* системы трансляции, что и отражается в виде «излома» на кинетической кривой белкового синтеза.

Существенное наблюдение, сделанное из наших экспериментов, состоит в том, что для эффекта ускорения белкового синтеза требуется высокая концентрация мРНК в системе, большая часть которой, по-видимому, не транслируется. Это может объясняться тем, что эукариотические экстракты содержат большое количество мРНК-связывающих белков, которые могут формировать кооперативные комплексы с экзогенными матрицами, добавленными в экстракт. Образование таких комплексов с транслирующейся матрицей может предотвращать вышеупомянутую перестройку полисом и препятствовать ускорению трансляции, тогда как частичное депонирование мРНК-связывающих белков на избытке экзогенной матрицы и обеспечивает наблюдаемый нами эффект «разгона» белкового синтеза.

ВЫВОДЫ

1. Предложен и опробован метод точного измерения продолжительности синтеза белковой цепи *in vitro*.
2. В разных эукариотических системах показана линейная зависимость времени сканирования в процессе кэп-зависимой инициации трансляции от длины 5'-нетранслируемой области мРНК. Подтверждена модель однонаправленного движения иницирующей рибосомной субчастицы.
3. Показано, что скорость рибосомного сканирования 5'-нетранслируемой области мРНК сравнима со скоростью процесса элонгации белковой цепи.
4. Исследовано влияние вторичной структуры мРНК на процесс сканирования. Показано, что шпильки высокой стабильности уменьшают процессивность сканирования в растительной системе и уменьшают среднюю скорость сканирования в системе из клеток млекопитающих.
5. Обнаружен и охарактеризован эффект ускорения синтеза белка при трансляции некэпированных мРНК в системе из зародышей пшеницы.
6. Предложена модель альтернативных механизмов инициации трансляции, основанная на циклизации транслирующих полисом.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В рецензируемых журналах:

1. Vassilenko K.S., Alekhina O.M., Dmitriev S.E., Shatsky I.N., Spirin A.S. Unidirectional constant rate motion of the ribosomal scanning particle during eukaryotic translation initiation // *Nucleic Acids Res.* 2011. V. **39**. P. 5555-5567.
2. Shirokikh N.E., Alkalaeva E.Z., Vassilenko K.S., Afonina Zh.A., Alekhina O.M., Kisselev L.L., Spirin A.S. Quantitative analysis of ribosome-mRNA complexes at different translation stages // *Nucleic Acids Res.* 2010. V. **38**. P. e15.
3. Alekhina O.M., Vassilenko K.S., Spirin A.S. Translation of non-capped mRNAs in a eukaryotic cell-free system: acceleration of initiation rate in the course of polysome formation // *Nucleic Acids Res.* 2007. V. **35**. P. 6547-6559.

В сборниках тезисов докладов конференций:

4. Alekhina O.M., Vassilenko K.S., Spirin A.S. Precise evaluation of temporal parameters of eukaryotic translation initiation // EMBO Conference on Protein Synthesis and Translational Control, EMBL, Heidelberg, Германия, Abstract book, 2011. P. 73.
5. Vassilenko K.S., Alekhina O.M., Dmitriev S.E., Shatsky I.N., Spirin A.S. Eukaryotic translation initiation: Net-unidirectional constant rate motion of the ribosomal scanning particle // EMBO Conference on Protein Synthesis and Translational Control, EMBL, Heidelberg, Германия, Abstract book, 2011. P. 277.
6. Алехина О.М., Василенко К.С., Дмитриев С.Е., Спиринов А.С. Влияние структуры 5'-нетранслируемой области мРНК на инициацию трансляции у эукариот // Ежегодная научная конференция Института белка РАН, Институт белка РАН, Пущино, Московская область, Россия, Сборник тезисов, 2010. P. 6.
7. Shirokikh N.E., Alkalaeva E.Z., Vassilenko K.S., Afonina Z.A., Alekhina O.M., Kiselev L.L., Spirin A.S. Quantitative analysis of ribosome-mRNA complexes at different translation stages // EMBO Conference on Protein Synthesis and Translational Control, EMBL, Heidelberg, Германия, Abstract book, 2009. P. 236.
8. Alekhina O.M., Vassilenko K.S., Spirin A.S. *In situ* monitoring of protein synthesis in a cell-free system: an approach to the study of eukaryotic translation initiation // 13th Annual Meeting of the RNA Society, Berlin, Германия, Program and abstracts book, 2008. P. 613.
9. Vassilenko K.S., Alekhina O.M., Spirin A.S. Translation of non-capped mRNAs in a cell-free system: two concurrent initiation pathways // 13th Annual Meeting of the RNA Society, Berlin, Германия, Program and abstracts book, 2008. P. 685.

10. Алехина О.М., Василенко К.С., Спирин А.С. Мониторинг синтеза белка *in situ* как метод анализа параметров эукариотической трансляции // IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, Новосибирск, Россия, Сборник тезисов, 2008. Р. 108.
11. Василенко К.С., Широков В.А., Алехина О.М., Копейна Г.С., Афонина Ж.А., Громова К.В., Васильев В.Д., Спирин А.С. Инициация, формирование полирибосом и циркулярная трансляция в эукариотической бесклеточной белоксинтезирующей системе // IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, Новосибирск, Россия, Сборник тезисов, 2008. Р. 157.
12. Alekhina O.M., Vassilenko K.S., Spirin A.S. Translation of non-capped mRNAs in a eukaryotic cell free system: acceleration of initiation rate in the course of polysome formation // 40th Anniversary of the Institute of Protein Research meeting: Protein Biosynthesis, Structure and Function, Институт белка РАН, Пущино, Московская область, Россия, Conference abstracts book, 2007. Р. 12.