

## Полиаденилирование про-мРНК. 2. Образование 3'-концевых поли(А)-последовательностей мРНК дрожжей, растений, прокариотов и вирусов

М. И. Зарудная

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

*Данная работа является второй заключительной частью обзора, посвященного полиаденилированию про-мРНК разных категорий организмов. В ней рассмотрены процессы образования 3'-концевых поли(А)-последовательностей мРНК дрожжей, растений, бактерий и вирусов. Предложена модель образования комплекса расщепления на сайте полиаденилирования про-мРНК дрожжей.*

**Образование 3'-концов мРНК дрожжей.** Белки, участвующие в реакции полиаденилирования про-мРНК. В первой части обзора [1] подробно проанализирован процесс полиаденилирования про-мРНК животных. Процессы образования 3'-концов мРНК дрожжей и позвоночных отличаются друг от друга, но не принципиально, как это будет видно из настоящей работы.

3'-Концевые поли(А)-последовательности мРНК дрожжей так же, как и поли(А)-тракты мРНК позвоночных, образуются в результате добавления адениловых остатков к вновь образовавшемуся 3'-концу специфически расщепленного транскрипта. Однако эта реакция осуществляется иным аппаратом полиаденилирования [2].

Напомним, что для образования 3'-концевых поли(А)-последовательностей мРНК позвоночных требуются как минимум шесть белков: фактор специфичности расщепления и полиаденилирования (CPSF), фактор стимуляции расщепления (CstF), факторы расщепления (CF I<sub>m</sub> и CF II<sub>m</sub>), поли(А)-полимераза (PAP) и поли(А)-связывающий белок (PABP2). Реакцию полиаденилирования направляют две сигнальные последовательности, находящиеся в 3'-нетранслируемой области (UTR) про-мРНК: высококонсервативный гексамер

AAUAAA и менее консервативный U/GU-богатый элемент. Расщепление происходит между ними. Для первой стадии реакции — расщепления про-мРНК — требуются CPSF, узнающий гексамер AAUAAA, CstF, взаимодействующий с нижним сигналом полиаденилирования, оба фактора расщепления и в большинстве случаев PAP. Синтез поли(А)-тракта осуществляется PAP в комплексе с CPSF и PABP2.

В реакции полиаденилирования про-мРНК дрожжей также участвуют шесть основных белков: три фактора расщепления (CF IA, CF IB и CF II<sub>y</sub>; у — yeast), фактор полиаденилирования (PF I), поли(А)-полимераза (Pap 1p) и поли(А)-связывающий белок (Pab 1p) [2]. Эти белки охарактеризованы в табл. 1. Факторы расщепления, а также PF I [13] участвуют в осуществлении первой стадии реакции полиаденилирования — расщеплении, а для синтеза поли(А)-тракта, как показали исследования Зао и соавт. [14], требуются все шесть белков. Следует отметить, что эти авторы, по-видимому, окончательно разрешили вопрос о составе факторов CF II<sub>y</sub> и PF I. Они полностью очистили белок CF II<sub>y</sub> и идентифицировали все его субъединицы (см. табл. 1), а также показали, что этот фактор может быть найден в экстракте в составе стабильного комплекса, включающего субъединицы фактора PF I (Fip 1p и Yth 1p) и Pap 1p. Вероятно, существование такого комплекса и является причи-

Таблица 1  
Характеристики белков дрожжей, участвующих в реакции полиаденилирования про-мРНК ([2], а также ссылки в таблице)

Белок	Субъединица, кДа	Гомологи среди белков позвоночных (степень идентичности, %)	Обнаруженные специфические мотивы	Полинуклеотиды, с которыми выявлены специфические взаимодействия	Белки, с которыми выявлены контакты
CF IA	Rna 14p-76	CstF-77 (23,5)	Десять полутетратрикопептидных повторов (HAT) [3]	—	Rna 15p, Fip 1p, Nab 4p/Hrp 1p [4]
	Pcf 11p-72	—	Q-Участок/«лейциновая застежка»	—	—
	Clp 1p-50	—	Фосфатсвязывающая петля (P-loop)	—	—
	Rna 15p-38	CstF-64 (43 в RBD)	RBD типа RNP2/RNP1, Q/N-участок	Поли(U) [5]	Rna 14p, Nab 4p/Hrp 1p [4], Pab 1p [6]
CF IB	Nab 4p/Hrp 1p-73 [4]	—	Два RBD типа RNP2/RNP1, RGGF/Y-повторы	мРНК и про-мРНК, содержащие (UA) <sub>6</sub> -элемент	Rna 14p, Rna 15p,
CF II <sub>γ</sub> [7]	Yhh 1p/Cft 1p-150	CPSF-160 (24)	—	—	—
	Ydh 1p/Cft 2p-105	CPSF-100 (25)	Два предполагаемых NLS	Про-мРНК, содержащая (UA) <sub>6</sub> -элемент (АТР-зависимое связывание)	—
	Brr 5p/Ysh 1p-100	CPSF-73 (53)	Фосфатсвязывающая петля (P-loop)	—	—
	Pta 1p-90	—	—	—	—
PF I	Pfs 1p-58	—	Цинксвязывающий мотив (цинковый сустав)	—	—
	Fip 1p-55	—	—	—	Pap 1p, Yth 1p/Cft 1p [8], Rna 14p
	Pfs 2p-53	—	Повторы WD-40	—	—
	Yth 1p-26	CPSF-30 (40)	Пять предполагаемых цинксвязывающих мотивов (цинковые пальцы)	Поли(U) [8]	Fip 1p
Pap 1p	Pap 1p-64	PAP (47)	Предполагаемый RBD типа RNP1 [9]; нуклеотидилтрансферазный мотив; RBD [9]; NSL [10]	—	Fip 1p
Pab 1p	Pab 1p-70	PABP1 (51)	Четыре RBD типа RNP2/RNP1, P- и M-богатая область [11]	Поли(G), поли(U), поли(A) [12]	Rna 15p

Примечание. RBD — РНК-связывающий домен, NLS — сигнал ядерной локализации.

ной, по которой субъединицы CF II<sub>γ</sub> (по отдельности [15] или все вместе [16]) относили ранее к фактору PF I.

Хотя белковые факторы полиаденилирования позвоночных и дрожжей различны, многие их субъединицы гомологичны друг другу. Как видно из табл. 1, гомологичными являются отдельные

субъединицы фактора позвоночных CstF (состоящего из трех субъединиц с молекулярными массами 77, 64 и 50 кДа) и дрожжевого фактора CF IA, а также фактора позвоночных CPSF (состоящего из четырех субъединиц с молекулярными массами 160, 100, 73 и 30 кДа) и фактора дрожжей CF II<sub>γ</sub>. Барабино и соавт. [8] полагают, что гены субъеди-

ниц факторов полиаденилирования про-мРНК дрожжей и животных эволюционировали из общих древних генов, и кодируемые ими полипептиды сохранили аналогичные функции, несмотря на то, что они распределились различным образом между белками в результате разной эволюции сигналов полиаденилирования про-мРНК позвоночных и дрожжей. Кроме того, могла происходить реорганизация независимых белковых доменов в результате «перемешивания» экзонов (exon shuffling). Например [8], CPSF-30 имеет шесть цинксвязывающих доменов: пять «цинковых пальцев» и «цинковый сустав», существенных для связывания РНК (последний мотив более существен). Дрожжевой гомолог этой субъединицы Yth 1p, входящий в состав фактора PF I, имеет пять цинксвязывающих мотивов — «цинковых пальцев» (табл. 1), но в составе PF I есть еще один белок — Pfs 1p, содержащий домен «цинковый сустав» (табл. 1).

Другой пример [3]: субъединица белка позвоночных CstF — CstF-77 — осуществляет белково-белковые взаимодействия как с другими субъединицами этого же фактора, так и с фактором CPSF [17] и содержит область с полутетратрикопептидными (НАТ) повторами, возможно, существенную для образования мультибелковых комплексов [3]. При этом один из полипептидов, с которыми взаимодействует CstF-77, а именно — CstF-50, входящий в состав этого же фактора, содержит повторы WD-40. Дрожжевой гомолог CstF-77 — субъединица Rpa 14p, входящая в состав фактора CF IA, — также осуществляет множественные белково-белковые контакты как внутри фактора — с Rpa 15p, так и с другими факторами — CF I B и PF I (через субъединицу Fir 1) (табл. 1) и также содержит НАТ-повторы. И в этом случае имеется полипептид с повторами WD-40 — Pfs 2p, но он входит в состав не того же самого фактора, что и Rpa 14p, а в состав белка PF I.

Гомологами являются также поли(А)-полимеразы дрожжей и позвоночных. Область гомологии охватывает ~ 400 N-концевых аминокислотных остатков [18]. Дрожжевой полипептид короче и в отличие от фермента позвоночных не содержит на С-конце S/T-богатого домена. Кроме того, РАР позвоночных имеет на С-конце несущественную для основной функции короткую последовательность, через которую она взаимодействует со спаренным белком U1 А; это взаимодействие приводит к ингибированию реакции полиаденилирования [19].

Интересно отметить, что в отличие от немодифицированного фермента гибридная поли(А)-полимераза дрожжей, к которой искусственно присоеди-

нен ингибиторный С-концевой фрагмент белка животных, ингибируется спаренными белками U1 А. Авторы работы [19] полагают, что хотя дрожжевая полимеразы не имеет участка, взаимодействующего с белками U1 А, тем не менее, в ее консервативном каталитическом домене так же, как и в аналогичном домене РАР животных, должна содержаться область, ответственная за ингибиторный эффект.

Рар 1p дрожжей, как и РАР животных, содержит два РНК-связывающих домена (табл. 1): один из них находится в С-концевой части фермента, а второй, по-видимому, перекрывается с каталитическим доменом. Желковский и соавт. [20] определили функции этих RBD в реакции полиаденилирования про-мРНК дрожжей. Они показали, что С-концевой домен Рар 1p, взаимодействующий с матрицей на некотором расстоянии от ее 3'-конца, необходим для работы фермента в процессивном режиме, он может быть заблокирован в результате взаимодействия с Fir 1p (субъединица фактора PF I). Следует отметить, что в Рар 1p имеются два места связывания Fir 1p [20], причем второе место, существенное для специфической реакции полиаденилирования про-мРНК (зависящей от наличия в транскрипте сигнальных последовательностей), находится в N-концевой части полимеразы.

Функцию другого РНК-связывающего домена Рар 1p дрожжей Желковский и соавт. выяснили в результате анализа кинетики включения в синтезируемый рибополинуклеотид различных рибо- и дезоксирибомонофосфатов [20]. Оказалось, что второй RBD узнает три последних нуклеотида РНК-матрицы, и это взаимодействие наряду с процессами, происходящими в АТФ-связывающем сайте, обуславливает субстратную специфичность фермента. Желковский и соавт. [20] не исключают также существования и третьего РНК-связывающего домена в Рар 1p, однако экспериментальные результаты, на основании которых сделано такое предположение, могут быть объяснены и иным образом.

Авторы работы [20] и ряда других работ (см. ссылки в статье [20]) показали, что Рар 1p, а также поли(А)-полимераза вируса оспы могут при высоких концентрациях использовать в качестве субстрата GTP, однако они внезапно прекращают синтез после добавления 14 гуаниловых остатков. В случае использования UTP Рар 1p способна синтезировать и более длинные олигомеры. Желковский и соавт. [20] в качестве возможного объяснения этих результатов предположили, что в Рар 1p есть третий РНК-связывающий домен, взаимодействующий с РНК в области, расположенной на расстоянии примерно 14 нуклеотидов от ее 3'-конца, и это

взаимодействие специфически препятствует удлинению именно олиго(G)-сегмента размером более 14 нуклеотидов.

Мы же полагаем, что 12—14 нуклеотидов — это длина, необходимая для сворачивания олиго(G) в четырехспиральную структуру с образованием двух G-тетрад. Пространственные модели подобных структур предложены в работе [21] для сворачивания теломерных олигонуклеотидов. Именно образование четырехцепочечной структуры является, по мнению автора, препятствием для дальнейшей работы фермента.

Недавно обнаружена еще одна пара гомологов среди факторов полиаденилирования про-мРНК дрожжей и позвоночных. Такагаки и Мэнли [22] показали, что животный ядерный белок симплектин, функция которого была ранее неизвестна, может быть выделен в составе большого мультибелкового комплекса, включающего CPSF и CstF. Они предположили, что симплектин может участвовать в сборке аппарата полиаденилирования позвоночных. Оказалось [22], что этот белок в значительной степени подобен дрожжевому белку Pta 1p — субъединице фактора расщепления CF II.

Сигнальные последовательности про-мРНК, направляющие процесс полиаденилирования. Из вышеизложенного параграфа следует, что белковые факторы аппаратов полиаденилирования дрожжей и позвоночных не являются принципиально отлич-

ными друг от друга. То же самое можно сказать и о сигналах полиаденилирования про-мРНК этих двух категорий организмов. На рис. 1 изображены схемы организации наиболее простых сайтов полиаденилирования про-мРНК животных и дрожжей. Как видно, в про-мРНК животных и дрожжей имеется A-богатый элемент, расположенный примерно за 20 нуклеотидов до места расщепления. Этот сигнал называется PE (positioning element) [25]. В про-мРНК животных он, в основном, представляет собой последовательность AAUAAA, реже — AUUAAA: 65 % про-мРНК человека содержат такие последовательности [25]. PE про-мРНК дрожжей значительно более вариабельны. Гуо и Шерман [26] показали, что оптимальными вариантами PE дрожжевых про-мРНК являются последовательности AAUAAA и AAAAAA. Допустимы также различные замены в этих элементах.

Многочисленные экспериментальные исследования сигнальных элементов полиаденилирования дрожжевых про-мРНК позволили разделить их на три группы [18]: область, содержащую место добавления поли(A)-тракта, вышеупомянутый PE и так называемый «efficiency element», который на рис. 1 обозначен как «верхний» элемент (UE). Мэнли и Такагаки [27] предположили, что UE про-мРНК дрожжей является функциональным аналогом U/GU-богатого нижнего элемента (DE) про-мРНК животных (рис. 1), но находится не за

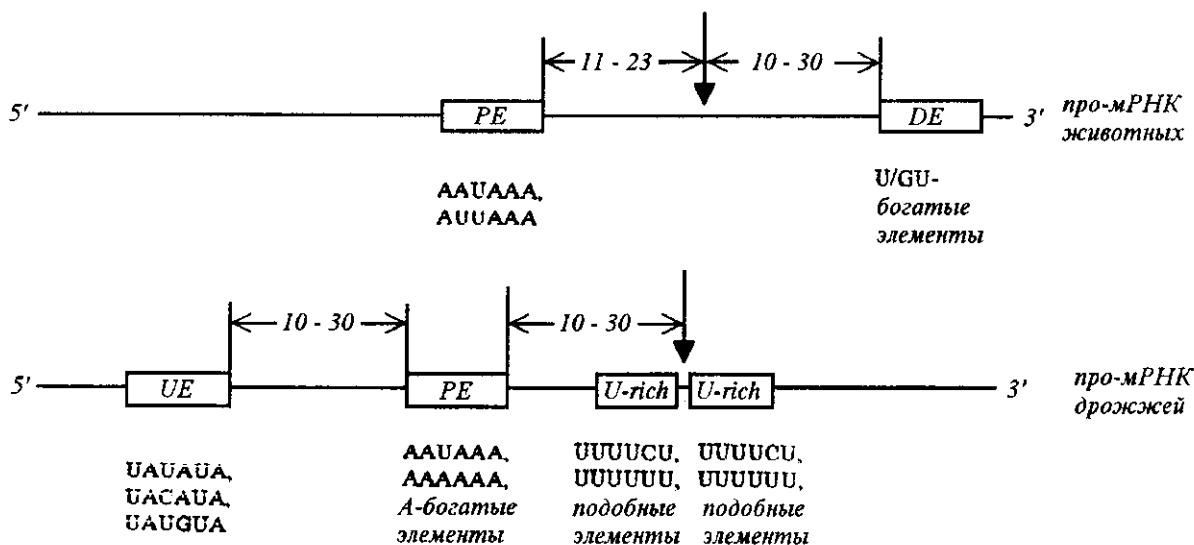


Рис. 1. Схемы организации сайтов полиаденилирования про-мРНК животных и дрожжей [23—25]. Обозначения: PE — positioning element; DE — downstream element; UE — upstream element; U-rich — U-богатый элемент. Вертикальными стрелками показаны места расщепления, цифрами обозначены расстояния в нуклеотидах

местом расщепления, а до него вследствие относительно близкого расположения генов в геноме дрожжей. Следует, однако, отметить, что в про-мРНК животных элемент, функционально подобный DE, может быть расположен и до места расщепления [1], а некоторые про-мРНК дрожжей, в свою очередь, могут содержать DE [18]. Наиболее эффективным и часто встречающимся «верхним» элементом про-мРНК дрожжей является последовательность UAUAUA [26].

Эксперименты показывают, что три вышеназванных элемента необходимы и достаточны для осуществления процесса полиаденилирования про-мРНК дрожжей. Синтетический сигнал UAUAU-AN<sub>10</sub>AAUAAAAN<sub>10</sub>UUUCAA, содержащий оптимальные UE и PE, а также короткую область, включающую место расщепления про-мРНК *CYC 1*, способен исполнять роль полного сайта полиаденилирования про-мРНК дрожжей [28].

Грэйба и соавт. в своих недавних работах [24, 25] подтвердили и состав, и местоположение найденных экспериментально сигнальных элементов полиаденилирования про-мРНК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, проанализировав методом статистического компьютерного анализа 1352 уникальных сайта полиаденилирования, относящихся к 861-му гену.

На рис. 1 приведены найденные ими наиболее часто встречающиеся сигналы. Кроме того, Грэйба и соавт. обнаружили, что участки РНК, непосредственно прилегающие с обеих сторон к месту расщепления, являются U-богатыми областями. То, что такая особенность не была ранее обнаружена экспериментально, объясняется, как полагают авторы, в рамках предложенной ими модели функционирования сайтов полиаденилирования дрожжевых про-мРНК.

Согласно этой модели, элементы, образующие сайт полиаденилирования, следует рассматривать в совокупности. При множественных и кооперативных белково-нуклеиновых взаимодействиях эффективный сайт полиаденилирования может содержать отдельные субоптимальные элементы или даже полностью состоять из таких элементов. В частности, при наличии оптимальных UE и PE, например UAUAUA и AAUAAA, элементы, прилегающие к месту расщепления, могут быть не обогащены уридиловыми остатками.

Следует отметить, что, согласно статистическим данным [24], ~ 40 % исследованных генов дрожжей содержат UE, представляющий собой последовательность TATATA, в большинстве случаев являющуюся единственным оптимальным элементом в сайте полиаденилирования.

В заключение этого раздела следует отметить, что сайты полиаденилирования про-мРНК дрожжей могут состоять более чем из четырех вышеупомянутых элементов, как это, например, имеет место в случае про-мРНК *GCN4* [29].

Процесс полиаденилирования про-мРНК. Процесс расщепления/полиаденилирования дрожжевых про-мРНК имеет ряд особенностей по сравнению с процессом образования 3'-концов мРНК позвоночных [2, 18]. В частности, при полиаденилировании про-мРНК дрожжей две стадии реакции не объединены в единый процесс в такой же степени, как в случае позвоночных, и расщепленные про-мРНК без 3'-концевых поли(А)-последовательностей легко обнаруживаются в экспериментах *in vitro* без применения специальных мер по блокированию второй стадии реакции полиаденилирования.

Особую роль в процессе полиаденилирования про-мРНК дрожжей играет фактор расщепления CF IB (Nab 4p/Hrp 1p), родственный A/B-группе гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов (гяРНП) позвоночных, регулирующих альтернативный сплайсинг [30]. Оказалось, что этот белок не является необходимым для осуществления реакции расщепления [30]. В его отсутствие CF IA и CF II<sub>γ</sub> (состав фактора CF II<sub>γ</sub> в данной работе непонятен, поскольку авторы, например, относят полипептид Ysh 1p/Vgt 5p к фактору PF I) расщепляют про-мРНК преимущественно на аутентичных местах, однако при наличии дополнительных сайтов полиаденилирования вышеназванные факторы, расщепив транскрипт на природном месте, далее расщепляют его на всех остальных сайтах. Механизм ингибирования утилизации альтернативных мест полиаденилирования фактором CF IB неизвестен.

Авторы предположили, что Nab 4p/Hrp 1p может блокировать продвижение белкового комплекса расщепления вдоль про-мРНК, создавая в РНК структуру высшего порядка, или же этот белок может связываться с про-мРНК на участке до нативного сайта полиаденилирования, экранируя другие менее эффективные сайты. Второе предположение основано, по-видимому, на том, что связывание CF IB с про-мРНК не является высокоспецифичным. Так, например, авторы показали, что этот белок, а также полипептид Rna 15p «сшиваются» достаточно эффективно под действием ультрафиолета с мутантной про-мРНК *CYC 1*, в которой отсутствуют, в частности, UE и PE. Кроме того, эта мутантная про-мРНК эффективно расщепляется *in vitro* очищенными факторами CF IA и CF II<sub>γ</sub>, но не полиаденилируется в присутст-

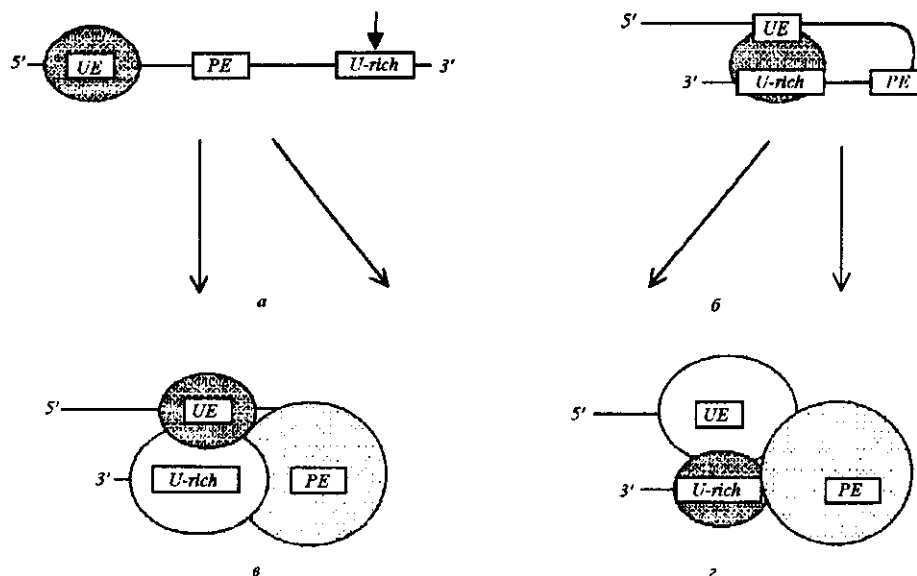


Рис. 2. Образование комплекса расщепления на сайте полиаденилирования про-мРНК дрожжей [30]. Факторы CF IA, CF IB и CF II<sub>y</sub> обозначены кружками: светлым, темным и «в крапинку» соответственно. Обозначения сигнальных элементов, как на рис. 1. На рисунке (а) короткой стрелкой показано место расщепления

вии соответствующих факторов, а реакция расщепления ингибируется при добавлении CF IB.

Из полученных результатов авторы делают вывод о том, что UE и PE не требуются для реакции расщепления и не являются необходимыми для связывания Nab 4p/Hgr 1p, но эти элементы существенны в реакции полиаденилирования.

Согласно нашему мнению, тот факт, что CF IB относительно эффективно связывается с про-мРНК, не содержащими консенсусных сигналов полиаденилирования, находится в соответствии с моделью функционирования сайтов полиаденилирования про-мРНК дрожжей, представленной выше. Этот белок имеет два РНК-связывающих домена [4] и специфически связывается с последовательностями AUAUAU разных про-мРНК [4, 31], однако он также может специфически связываться и с про-мРНК, нативный сайт полиаденилирования которой не содержит UA-повторов [31]. В последнем случае, согласно модели, ключевым сигнальным элементом в сайте полиаденилирования является, очевидно, не UE, а другой элемент или же сайт может полностью состоять из неконсенсусных элементов.

Наша интерпретация результатов работы [30] проиллюстрирована на рис. 2. Мы полагаем, что CF IB не экранирует почти весь участок РНК до

природного места расщепления, как это изображено на рис. 8, приведенном в работе [30], а связывается преимущественно с нативными и потенциальными сайтами полиаденилирования. При этом он может связываться либо только с элементом UE (рис. 2, а), либо одновременно с UE и U-богатыми элементами, прилегающими к месту расщепления (рис. 2, б). В настоящее время неизвестно, с какими сигнальными элементами связываются факторы расщепления CF II<sub>y</sub> и CF IA, хотя оба фактора — потенциальные РНК-связывающие белки (табл. 1). Можно предположить, что местом связывания CF II<sub>y</sub>, гомологичного фактору животных CPSF, является A-богатый участок (PE), а местом связывания CF IA (две субъединицы которого гомологичны субъединицам фактора животных CstF) — или «верхний» сигнальный элемент (UE), или U-богатая область, окружающая место расщепления. Связывание CF II<sub>y</sub> и CF IA с природным сайтом полиаденилирования и с CF IB, связанным с UE (или с UE и U-богатой областью), приведет к смещению CF IB с одного из сигналов (во всех вариантах, кроме варианта а→в, рис. 2) и к образованию эффективного комплекса расщепления. На альтернативных, менее эффективных сайтах, смещение будет затруднено и активный комплекс не образуется.

Если же CF IB связывается только с UE и этот сигнал не является местом связывания CF IA (вариант  $a \rightarrow v$ , рис. 2), связывание CF II, и CF IA с альтернативным сайтом полиаденилирования в присутствии CF IB приведет к образованию неактивного комплекса расщепления, тогда как в отсутствие CF IB эти факторы образуют активный комплекс.

Интересно отметить, что в дрожжах найден белок Ref 2p [32] с молекулярной массой 48 кДа, в составе которого много лизиновых (14,4 %) и сериновых (12,6 %) остатков. Ref 2p не существен для полиаденилирования про-мРНК, имеющих эффективные сигналы полиаденилирования, но значительно увеличивает скорость реакции расщепления транскриптов со «слабыми» сайтами.

Еще одно отличие между процессами полиаденилирования про-мРНК дрожжей и позвоночных состоит в том, что в них используются разные белки для контроля длины поли(А)-тракта. В случае высших эукариотов ключевым белком, ответственным за контроль, является PABP2 [33]. Дрожжевой аналог этого белка в настоящее время не найден. Однако, как показано в работах [6, 34], в состав комплекса полиаденилирования про-мРНК дрожжей входит главный цитоплазматический поли(А)-связывающий белок Pab 1p. Отсутствие его приводит к синтезу поли(А)-трактов мРНК, значительно более длинных, чем в природных мРНК, имеющих длину 60—70 нуклеотидов.

Следует отметить, что PABP1 высших эукариотов так же, как и его дрожжевой аналог, может аккумулироваться не только в цитоплазме, но и в клеточном ядре [35]. Он найден в так называемых спеклах (speckles) там же, где и фактор сплайсинга SC35. Функции PABP1 позвоночных в ядре неизвестны. В первой части обзора [1] сообщалось о том, что на периферии спеклов, возможно, осуществляется процессинг транскриптов наиболее активных генов. Можно предположить, что в случае этих транскриптов обмен PABP2 на PABP1 происходит не в цитоплазме во время обмена ядерных РНК-связывающих белков на цитоплазматические, а еще до экспорта их из ядра.

Pab 1p дрожжей, возможно, является не единственным белком, участвующем в контроле длины синтезируемых поли(А)-хвостов мРНК. Мэнгас и соавт. [36] идентифицировали белок Pbr 1p, специфически взаимодействующий с Pab 1p. Взаимодействие осуществляется через гомологичные пролин- и метионин-богатые домены, входящие в состав обоих белков. Отсутствие Pbr 1p в системе *in vitro* приводит к синтезу укороченных поли(А)-трактов. Авторы считают, что этот белок может

быть регулятором либо Pab 1p, либо нуклеазы, например, PAB-зависимой (PAN).

Следует отметить, что Pbr 1p дифференциально экспрессируется в разных фазах роста клеток: в логарифмической фазе наблюдается максимальная экспрессия, а в стационарной — белок практически отсутствует.

Вышеупомянутая нуклеаза PAN, как показано в работе [37], присутствует и активна в экстрактах, используемых для проведения реакции полиаденилирования про-мРНК. Оказалось, что этот фермент необходим для специфического укорачивания 3'-концевых поли(А)-последовательностей мРНК. Авторы предположили, что в результате реакции полиаденилирования дрожжевые про-мРНК приобретают 3'-концевые поли(А)-последовательности длиной 70—90 нуклеотидов, затем поли(А)-нуклеаза быстро укорачивает их до длины, зависящей от вида мРНК. Например, зрелые мРНК *RPL46*, *PGK1* и *MFA2* имеют поли(А)-тракты длиной примерно 55, 60 и 70 нуклеотидов соответственно. В настоящее время неизвестно, происходит ли PAN-зависимое деаденилирование в ядре, являясь одной из стадий реакции полиаденилирования, или же это цитоплазматическая реакция.

В заключение рассмотрим вопрос о связи между процессами образования 3'-концов мРНК дрожжей и терминации транскрипции. Так же, как и в случае позвоночных, сигналы полиаденилирования дрожжевых про-мРНК вовлечены в процесс окончания транскрипции [38—41]. Механизм сопряжения этих двух процессов неизвестен. Однако Бирс и соавт. [41] показали, что мутации белков Rna 14p, Rna 15p и Pcf 11p, участвующих как в первой, так и во второй стадиях процесса полиаденилирования, приводили к ингибированию терминации транскрипции, а мутации белков Pcp 1p, а также Fir 1p и Yth 1p, участвующих, как считалось ранее, лишь в синтезе поли(А)-тракта, не оказывали заметного влияния.

В работе [42], где модифицировали не белковые факторы, а сайт полиаденилирования про-мРНК *FBP1*, показано, что в отдельных случаях изменение этого сложного сайта по-разному влияет на эффективность процессов полиаденилирования и терминации транскрипции. Например, полная делеция (ТА)-богатого элемента вызывала значительное снижение эффективности процесса полиаденилирования, но почти не оказывала влияния на процесс терминации транскрипции. Авторы высказывают предположение, что в этих процессах участвуют либо разные перекрывающиеся сигналы, либо сборка неполноценных нефункциональных комплексов полиаденилирования про-мРНК на мо-

дифицированных сигналах может быть все же достаточной для стимулирования окончания транскрипции.

В недавней работе Родригез и соавт. [43] сообщается о том, что субъединица фактора CF II, — Pta 1p — специфически связывается в дрожжевых экстрактах с фосфорилированным С-концевым доменом РНК-полимеразы II. Таким образом, по крайней мере это взаимодействие может обуславливать сопряжение процессов полиаденилирования и терминации транскрипции.

Полиаденилирование про-мРНК растений. Не исключено, что процессы образования 3'-концов мРНК позвоночных и дрожжей, с одной стороны, и растений — с другой, существенно различаются; процесс полиаденилирования про-мРНК растений, возможно, более прямо связан с окончанием транскрипции. Такое предположение высказано в обзоре Ли и Ханга [44]. В его основе лежит, в частности, тот факт, что, хотя в базах данных последовательностей ДНК растений встречаются последовательности с высокой степенью гомологии к субъединицам факторов полиаденилирования про-мРНК позвоночных, тем не менее, существование факторов полиаденилирования про-мРНК растений пока еще гипотетично.

Лишь об одном из белков — поли(А)-полимеразе — имеется некоторая информация, но пока еще нет работ, в которых было бы продемонстрировано участие этого фермента в специфической (зависящей от наличия в про-мРНК сигнальных последовательностей) реакции полиаденилирования, локализованной в клеточном ядре [44].

Кроме того, хотя в растительных про-мРНК найдены последовательности, необходимые для осуществления реакции полиаденилирования, и их организацию можно считать аналогичной организации сайтов полиаденилирования про-мРНК дрожжей и позвоночных, тем не менее, сигнальные элементы в случае растений могут играть роль, отличную от таковой подобных элементов в других системах [44].

Сайты полиаденилирования растительных про-мРНК расположены, в основном, так же, как и в случае дрожжей, — до места расщепления. Они состоят из комбинаций трех типов элементов: FUE (far-upstream element), NUE (near-upstream element) и области, содержащей место присоединения поли(А)-тракта [44]. NUE представляет собой А-богатый элемент, состоящий из 6—10 нуклеотидов. Он расположен за 10—40 нуклеотидов до места расщепления. В одной про-мРНК может быть несколько таких элементов. В качестве NUE может использоваться и гексамер AAUAAA, являющийся

сигналом полиаденилирования про-мРНК вируса мозаики цветной капусты (CaMV), однако в этом случае эффективны также гексамеры с любыми единичными заменами нуклеотидов [45]. Интересно отметить, что субстраты, содержащие сайт полиаденилирования про-мРНК CaMV, могут быть «аккуратно» полиаденилированы в дрожжах [45].

Сигнал FUE определяет эффективность поли(А)-сайта. Он может состоять из нескольких элементов, охватывая область длиной в 100 нуклеотидов и располагаясь на расстоянии от 13 до 100 нуклеотидов до NUE [44]. Среди выявленных мотивов FUE встречаются, например, такие элементы, как UUUGUA, CUUGUAA, UCUGUA и UUUGAA ([45] и ссылки в этой работе). Единственный FUE может входить в состав нескольких сайтов, содержащих разные NUE и области, окружающие место расщепления [44]. Согласно уже упоминавшейся работе Грэйба и соавт. [25], изучавших сигналы полиаденилирования компьютерным методом, организация сайтов полиаденилирования и состав сигнальных элементов про-мРНК дрожжей и растений подобны, хотя наиболее часто встречающиеся UE (FUE) растительных про-мРНК — UUGUAU и UUGUAA — соответствуют менее значимым «верхним» элементам транскриптов дрожжей.

Отличительной особенностью растительных про-мРНК является наличие в них множественных мест полиаденилирования, расположенных в области ~ 100—400 нуклеотидов дальше стоп-кодона (ссылки в работе [46]). Причина такой множественности неизвестна. Одно из возможных объяснений существования многих мест расщепления основано на различии нуклеотидного состава растительных генов в области экзонов и 3'-нетранслируемой области.

Авторы работы [46], проанализировав состав 29 генов кукурузы в 3'-концевой области, показали, что участок транскрипта размером 100 нуклеотидов, расположенный непосредственно перед стоп-кодоном, является особенно GC-богатым (65 %) по сравнению с остальными участками экзонов. Содержание уридиловых остатков в нем составляет 17 %. Оно увеличивается до 33 % (а содержание AU — до 57 %) в области размером ~ 240 нуклеотидов, расположенной между стоп-кодоном и главным местом расщепления, и до 40 % — на участке размером ~ 50 нуклеотидов, расположенном сразу же за местом расщепления. Авторы этой работы вставляли AT-богатые фрагменты фактически со случайным распределением нуклеотидов в GC-богатые экзоны гена Vz 2 кукурузы и обнаружили, что в отсутствие сплайсинга эти фрагменты служи-



ли сигналами полиаденилирования транскрипта, а при наличии 5'-сайта сплайсинга они направляли сплайсинг. Авторы предположили, что места полиаденилирования про-мРНК кукурузы определяются наличием в ее 3' UTR A/U-богатых областей, а не консервативных сигнальных элементов. Принимая во внимание результаты этой работы, Ли и Хант [44] высказали мнение о том, что большая вероятность образования в A/U-богатых UTR транскриптов растений коротких A-богатых участков (NUE) и коротких U-богатых участков (FUE) может объяснить существование множественных мест полиаденилирования в про-мРНК растений.

Если близость механизмов процесса полиаденилирования про-мРНК дрожжей и позвоночных, с одной стороны, и растений — с другой, не является в настоящее время бесспорной, то о сходстве функций, выполняемых 3'-концевыми поли(А)-последовательностями их мРНК в комплексе с поли(А)-связывающими белками, говорить, по-видимому, можно.

Позитивное влияние PABP, а также 3'-концевых поли(А)-последовательностей мРНК на трансляцию в растениях отмечалось еще в ранних работах. Например, Гэли [47] показал, что как стабильность, так и эффективность трансляции синтезированной *in vitro* мРНК Lys, введенной в протопласты табака, увеличивается при наличии на 3'-конце транскрипта поли(А)-тракта, а на 5'-конце — кэп-структуры, причем при наличии одновременно и кэп-структуры, и поли(А)-тракта степень повышения эффективности процесса синтеза белка намного превышает суммарный эффект от индивидуальных вкладов этих структур. В этой работе синергическое стимулирование концевыми структурами мРНК наблюдали также и при трансляции в клетках дрожжей и животных.

В более поздних работах [48, 49] показано, что PABP из пшеницы специфически связывается с факторами инициации трансляции eIF-4F, eIF-iso4F (через субъединицу eIF-4G) и eIF-4B и что комплексы eIF-4F/PABP или eIF-iso4F/PABP значительно эффективнее связываются с аналогом кэп-структуры, чем отдельные факторы eIF-4F и eIF-iso4F. Эти результаты, как считают авторы работы [49], могут, по крайней мере, частично объяснить механизм стимулирования инициации трансляции поли(А)-связывающим белком. Кроме того, они показали, что комплекс eIF-4F/PABP может одновременно связывать кэп-структуру и поли(А). Сближение концов мРНК, облегчающее реинициацию трансляции, также может быть причиной стимуляции.

Еще до опубликования работы [48] появилось

сообщение о том, что дрожжевой белок Pab 1p специфически взаимодействует с фактором инициации трансляции eIF-4G [50]. Pab 1p необходим для жизнеспособности дрожжевых клеток [51]. Он участвует во многих внутриклеточных процессах. Во-первых, как уже упоминалось выше, поли(А)-связывающий белок входит в состав комплекса полиаденилирования, обеспечивая контроль длины 3'-концевых поли(А)-последовательностей мРНК [6, 34]; во-вторых, он является необходимым для функционирования поли(А)-нуклеазы (PAN) [37]; в-третьих, этот белок, вероятно, способствует реорганизации мРНК-белкового комплекса при переходе мРНК из ядра в цитоплазму [52]. Наконец, он вовлечен во взаимодействие между 5'- и 3'-концами мРНК, которое, с одной стороны, обуславливает стимуляцию инициации трансляции [53], а с другой, — защиту мРНК от декэпирования (удаления кэп-структуры) и последующей деградации (5'→3')-экзонуклеазой (этим двум процессам предшествует деградация поли(А)-тракта до длины ~ 10 нуклеотидов) [54].

Оказалось, что поли(А)-связывающий белок растений способен функционально заменять Pab 1p дрожжей [55]. Из растений выделен ряд орган-специфичных PABP [56]. Один из них — PAB5 из *Arabidopsis thaliana*, экспрессирующийся только в цветах, может, как показано в работе [55], обеспечить жизнеспособность дрожжевых клеток в отсутствие эндогенного поли(А)-связывающего белка. Экспрессирующийся в дрожжах PAB5 выполняет, хотя и менее эффективно, некоторые функции Pab 1p, а именно — он участвует в процессе укорачивания поли(А)-трактов мРНК и стимулирует инициацию трансляции. В то же время этот белок не способен восстанавливать связь между деаденилированием и декэпированием мРНК дрожжей. Однако, как показано в недавней работе [57], другой поли(А)-связывающий белок из этого растения — PAB2, экспрессирующийся в различных органах, может частично восстанавливать и эту функцию дрожжевого белка. Авторы предположили, что в растениях поли(А)-связывающие белки вовлечены во многие из тех процессов, в которых участвует дрожжевой Pab 1p.

Подтверждением этого предположения могут, например, служить результаты работы [58], в которой показано, что мРНК  $\alpha 1$ -tubulin *Chlamydomonas reinhardtii* разрушается в обычных условиях, следуя основному пути деградации мРНК дрожжей, — сначала деаденилируется, а затем подвергается действию (5'→3')-экзорибонуклеазы.

Более того, как полагают авторы работы [55], учитывая локализацию PAB5 из *A. thaliana* и

динамику его экспрессии, этот белок может участвовать также и в процессах, специфичных для высших эукариот, а именно — в гаметогенезе и раннем развитии. Это предположение сделано исходя из того факта, что при развитии ооцитов и ранних эмбрионов многих видов животных контроль трансляции матерински наследуемых мРНК осуществляется посредством изменения длины их 3'-концевых поли(А)-последовательностей.

Интересно отметить, что кодируемый в ядре растительный поли(А)-связывающий белок RB47 из *C. reinhardtii* используется для стимулирования трансляции одной из мРНК в хлоропластах [59, 60], хотя трансляция в этой органелле подобна таковой в прокариотах. RB47 специфически связывается с 5' UTR мРНК *PsbA* хлоропластов и необходим для ее трансляции. Связывание, возможно, происходит в области мРНК, содержащей три коротких олиго(А)-тракта. Механизм стимуляции до сих пор неизвестен. Следует подчеркнуть, что в данном случае существенным является взаимодействие поли(А)-связывающего белка с 5'-концом мРНК, а не с 3'-концевым поли(А)-трактом. мРНК, кодируемые геномом хлоропластов, в основном не имеют 3'-концевых поли(А)-трактов; более того, полиаденилирование этих мРНК играет важную роль в процессе их деградации, хотя механизм этого процесса отличен от процесса деградации мРНК дрожжей и позвоночных.

Схема процесса деградации одной из мРНК хлоропластов — *pet D* — изображена на рис. 3. Результаты работы [61] свидетельствуют в пользу того, что деградация этой мРНК начинается с

эндонуклеолитического расщепления, осуществляемого сайт-специфической эндорибонуклеазой р67 (подобной бактериальной РНКазе E) на двух АУ-богатых участках, расположенных до 3'-концевой шпилькообразной структуры, устойчивой к действию нуклеаз. Расщепление на этих участках происходит с разной эффективностью (рис. 3). К вновь образовавшимся 3'-концам добавляются поли(А)-тракты; кроме того, может полиаденилироваться и 3'-конец нерасщепленной макромолекулы. Во всех случаях полиаденилированные продукты эффективно разрушаются под действием (3' → 5')-экзорибонуклеазы — полинуклеотидфосфорилазы (ПНФазы) р100/PNPase с молекулярной массой 100 кДа. Реакция эндонуклеолитического расщепления ингибируется, когда с АУ-богатым участком связывается белок с молекулярной массой 55 кДа.

Связь между полиаденилированием и быстрой деградацией РНК пластид объяснили Лисицки и соавт. [62], показавшие, что экзорибонуклеаза 100RNP/PNPase (р100/PNPase) связывается с поли(А)-трактами гораздо более эффективно, чем с другими полирибонуклеотидами. Поскольку этот фермент осуществляет процессивную реакцию, т. е. деградирует РНК в результате одного акта присоединения, отщепляя нуклеотид за нуклеотидом, то его преимущественными субстратами является РНК с 3'-концевыми поли(А)-последовательностями. Как будет видно из следующего раздела, механизм деградации мРНК пластид близок к таковому бактериальных РНК.

Полиаденилирование бактериальных РНК. Процессы образования мРНК прокариотов и эука-

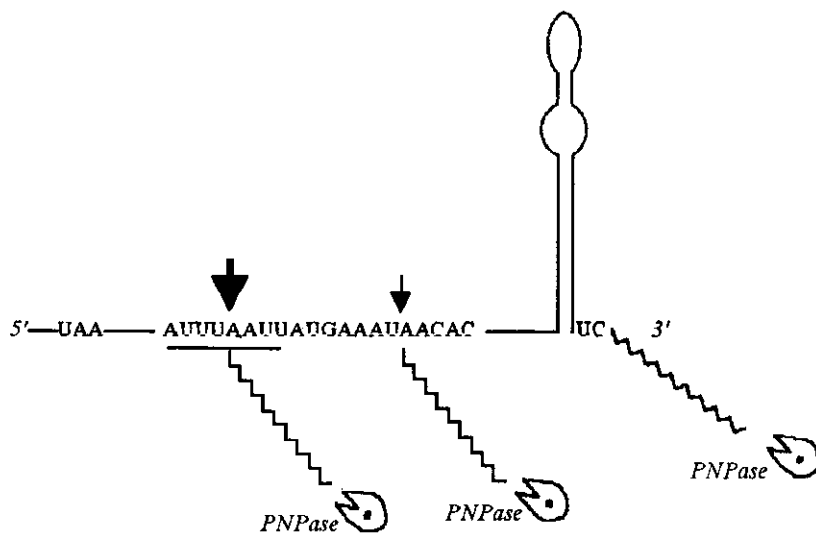


Рис. 3. Схема деградации мРНК *Pet D* хлоропластов шпината [61]. Стрелками обозначены места эндонуклеолитического расщепления (тонкой стрелкой указано минорное место). Волнистыми линиями изображены 3'-концевые поли(А)-последовательности. Место связывания белка с молекулярной массой 55 кДа подчеркнуто

Таблица 2  
Классификация мест полиаденилирования мРНК *Escherichia coli* [67]

Место полиаденилирования	мРНК	Кодируемый белок
I — конец первичного транскрипта с $\rho$ -независимым терминатором транскрипции	<i>lpp, rps O</i>	Липопротеин, рибосомный белок S 15
II — в области, расположенной непосредственно перед 3'-концевой шпилькообразной структурой транскрипта с $\rho$ -независимым терминатором транскрипции	<i>lpp, rps O, trx A</i>	Липопротеин, рибосомный белок S 15, тиоредоксин
III — в области $\rho$ -зависимого терминатора транскрипции	<i>crp</i>	Рецептор циклической АМР
IV — в интерцистронной области	<i>lac Z</i>	$\beta$ -Галактозидаза
V — внутри кодирующей последовательности	<i>rps O</i>	Рибосомный белок S 15
VI — в области $\rho$ -зависимых мест аттенюации транскрипции	<i>rho</i>	Фактор терминации транскрипции

риотов, как известно, существенно различаются. В частности, эукариотические мРНК должны экспортироваться из ядра в цитоплазму до того, как они смогут быть использованы для трансляции, а мРНК прокариотов доступны для синтеза белка сразу же после транскрипции. Кроме того, большинство бактериальных мРНК очень быстро разрушается [63]. Исходя из этих фактов долгое время считали, что полиаденилирование является отличительной чертой мРНК эукариотов, несмотря на то, что поли(А)-полимеразная активность была обнаружена в бактериях еще в 1962 г. [64], а начиная с 1975 г. начали появляться работы, свидетельствующие о наличии в бактериальных РНК 3'-концевых поли(А)-последовательностей. Эти факты приобрели значение, по-видимому, только в 1993 г., когда стало известно [65], что процесс полиаденилирования существен для деградации регуляторной РНК I, ингибирующей репликацию бактериальных плазмид типа ColE1. Следует отметить, что 3'-концевые поли(А)-тракты эукариотических мРНК были обнаружены еще в 1971 г. [17], а их функции были установлены в 90-е годы [66].

По сравнению с мРНК эукариотов бактериальные РНК имеют более короткие 3'-концевые поли(А)-тракты и полиаденилированию подвергается меньшая их часть [63]. Процесс полиаденилирования в бактериях не является специфичным лишь для некоторых транскриптов, играющих определенную физиологическую роль, например, в *Escherichia coli* полиаденилированы как одна из наиболее стабильных мРНК — мРНК *lpp*, кодирующая структурный белок липопротеин, так и короткоживущая мРНК *trpA*, кодирующая  $\alpha$ -субъединицу триптофан синтетазы [67]. Обе мРНК имеют 3'-концевые поли(А)-тракты длиной 10—20 нукле-

отидов, причем в обоих случаях полиаденилировано 40—50 % молекул.

3'-Концевые поли(А)-тракты мРНК *E. coli* синтезируются двумя различными поли(А)-полимеразами: PAP I (основной фермент) и PAP II с молекулярными массами 52 и 35 кДа соответственно [67]. Значительной гомологии между двумя бактериальными полимеразми, а также между этими белками и ферментами эукариотов не обнаружено. Однако следует отметить, что все известные PAP из разных категорий организмов, а также тРНК нуклеотидилтрансферазы (ссaT) и некоторые другие ферменты принадлежат к одному суперсемейству нуклеотидилтрансфераз [68]. Внутри него они подразделяются на две или три группы в зависимости от типа структурной организации каталитического домена [10]. К первой группе относятся, в частности, сsaT дрожжей и PAP<sup>1</sup>ы эукариотов, а ко второй — PAP *E. coli* и сsaT *E. coli*.

Как показано в работе [69], бактериальная PAP I в отличие от P<sub>ap</sub> 1<sub>r</sub> дрожжей может использоваться в качестве субстрата для присоединения к РНК длинных рибогомополимеров не только АТР, но и другие нуклеотидтрифосфаты. Авторы этой работы также показали, что *in vitro* шпилькообразная структура, присутствующая на 3'-концах большинства бактериальных мРНК, ингибирует поли(А)-полимеразную активность, однако тракт из двух—шести нуклеотидов, расположенный сразу же за «шпилькой», достаточен для подавления ингибиторного эффекта.

В бактериях поли(А)-последовательности добавляются не только к 3'-концам мРНК. Саркар [67], суммировав результаты, полученные в разных работах, в том числе и ее собственных, сгруппировала различные места полиаденилирования

бактериальных РНК в шесть классов. Мы приводим ее классификацию в виде табл. 2. Следует отметить, что вследствие быстрой деградации бактериальных РНК для определения мест полиаденилирования использовали штаммы *E. coli* с дефектами в генах эндонуклеазы РНКазы E и двух основных 3'-экзонуклеаз — полинуклеотидфосфорилазы и РНКазы II.

Из табл. 2 видно, что полиаденилирование может происходить, в частности, на местах эндонуклеолитического расщепления как в транскрибуемых, так и нетранскрибуемых областях мРНК.

3'-Концевые поли(A)-тракты участвуют в процессе деградации бактериальных РНК и, возможно, в инициации трансляции. Последнее предположение основано на том, что белок S1 малой рибосомной субъединицы *E. coli* является поли(A)-связывающим белком [70]. Результаты работы [70] свидетельствуют в пользу того, что в процессе трансляции *in vivo* S1 связан с поли(A)-трактами мРНК *E. coli*.

Функции 3'-концевых поли(A)-трактов в процессе деградации бактериальных РНК были впервые установлены Ксу и соавт. [65] при исследовании деградации вышеупомянутой РНК I — антисмыслового репрессора репликации плазмид. В процессе разрушения этой РНК участвуют, по крайней мере, три фермента: эндонуклеаза E, расщепляющая РНК I на 5'-конце; PAP, синтезирующая поли(A)-хвост на 3'-конце; и полинуклеотидфосфорилаза, которая эффективно деградирует полиаденилированную расщепленную РНК [65, 71].

Нуклеазы, по-видимому, функционально взаимосвязаны — одна из них стимулирует действие другой и наоборот. Рибонуклеаза E, возможно, участвует не только в эндонуклеолитическом расщеплении РНК I, но и в укорачивании 3'-концевого поли(A)-тракта [72], причем обе реакции зависят от его длины. РНК с относительно длинными поли(A)-трактами (~ 40 нуклеотидов) не подвергается эндонуклеолитическому расщеплению.

Полиаденилирование играет определенную роль не только в деградации бактериальных регуляторных РНК, но и мРНК. Об этом свидетельствуют результаты работ (см., например, [73]), в которых показано, что время жизни ряда мРНК значительно возрастает в отсутствие PAP.

Пути деградации некоторых мРНК *E. coli*, в частности, *rpsT* и *rpsO* были изучены детально [74, 75]. В обоих случаях деградация инициируется эндонуклеолитическим расщеплением транскрипта, катализируемым РНКазой E. Образовавшиеся фрагменты разрушаются различными нуклеазами. Их эффективность может стимулироваться поли-

аденилированием фрагментов; более того, в некоторых случаях этот процесс играет особенно важную роль. Так, например, он необходим для деградации 3'-концевого фрагмента мРНК *rpsT* длиной 147 нуклеотидов [74]. При этом реакция полиаденилирования должна происходить в условиях, гарантирующих ее неоднократное возобновление.

Авторы этой работы постулировали следующую модель деградации разных полирибонуклеотидов под действием таких экзонуклеаз, как РНКазы II и полинуклеотидфосфорилаза: 1) для деградации РНК с неспаренным 3'-концом, которому предшествует область с неустойчивой вторичной структурой, не требуется модификации 3'-конца; РНК непосредственно разрушается под действием обеих нуклеаз; 2) полинуклеотид, содержащий на 3'-конце стабильную шпилькообразную структуру, такую, например, как в РНК I, может быть разрушен после однократного полиаденилирования РНК; 3) для деградации высокостабильной «шпильки», такой как в  $\rho$ -независимом терминаторе мРНК *rpsT*, необходимы повторные циклы полиаденилирования и процессивного фосфоролиза. Постепенное «внедрение» ПНФазы в шпилькообразную структуру происходит при локальном расплетании двойной спирали в основании «шпильки» в процессе «дыхания» РНК. РНКазы II не способна разрушать подобные структуры.

Более того, она ингибирует зависящую от полиаденилирования активность ПНФазы, так как удаляет 3'-концевые поли(A)-тракты; 4) деградация наиболее стабильных полирибонуклеотидов, таких как структурированный фрагмент в мРНК *malE-malF*, происходит с использованием энергии АТФ под действием деградосомы, в состав которой входят РНКазы E, ПНФаза, енолаза (гликолитический фермент с неизвестной функцией в деградации РНК), геликаза RhlB и, возможно, шаперон Dna K.

В недавней работе [76] показано, что в *E. coli* имеется функциональный аналог поли(A)-связывающего белка позвоночных PABP2. Напомним, что этот белок совместно с фактором CPSF обеспечивает процессивность второй стадии реакции полиаденилирования про-мРНК позвоночных и, кроме того, ответствен за контроль длины синтезируемых поли(A)-трактов [1]. Оказалось, что в присутствии многофункционального фактора Hfq *E. coli*, специфически связанного с олигоаденилированными мРНК, реакция полиаденилирования становится процессивной. Функциональное значение стимулируемого фактором Hfq процесса полиаденилирования неизвестно. Авторы предположили, в частности, что длинные 3'-концевые поли(A)-тракты мо-

гут облегчать взаимодействие связанного с поли(А) активатора трансляции с 5'-оператором. Кроме того, не исключено, что фактор Hfq защищает поли(А)-тракты от действия рибонуклеаз.

**Полиаденилирование вирусных мРНК.** Наличие в эукариотических мРНК специфических концевых структур — кэп-структуры на 5'-конце и поли(А)-тракта на 3'-конце — является, как известно, отличительной чертой эукариотических мРНК. Хотя эти концевые структуры не являются необходимыми для трансляции, они в значительной степени стимулируют белковый синтез [53], поэтому вирусы либо обеспечивают ими свои мРНК, либо используют иные подходы для предотвращения преимущественной трансляции кэпированных и полиаденилированных хозяйских мРНК. В этом разделе мы рассмотрим несколько примеров подобных стратегий.

мРНК многих ДНК-содержащих вирусов «кэпируются» и полиаденилируются соответствующими хозяйскими аппаратами. Они имеют в 3' UTR сигнальные последовательности полиаденилирования, аналогичные последовательностям хозяйских мРНК. К таким транскриптам относится, например, мРНК вируса SV 40, процесс полиаденилирования которой детально описан в предыдущем обзоре [1].

3'-Концевые поли(А)-тракты мРНК ряда вирусов, например пикорнавирусов, кодируются геномом [77]. мРНК пикорнавирусов не имеют на 5'-конце кэп-структуры, но они используют для инициации трансляции элементы IRES (internal ribosome entry site) [53]. В процессе IRES-стимулируемой инициации трансляции участвует почти тот же набор канонических белковых факторов, что и при трансляции, стимулируемой кэп-структурой, в том числе и фактор eIF4G.

В инфицированных пикорнавирусами клетках некоторые вирусные протеазы расщепляют eIF4G на два фрагмента: меньший N-концевой фрагмент содержит место связывания eIF4E, а больший — места связывания eIF3 и eIF4A. Расщепление eIF4G приводит к ингибированию кэп-зависимой трансляции хозяйских мРНК и к активации трансляции вирусных мРНК, для которой достаточен С-концевой фрагмент этого фактора.

Следует также отметить, что 3'-концевые поли(А)-тракты мРНК могут стимулировать инициацию трансляции независимо от кэп-структуры, способствуя доставке рибосом к внутренним местам инициации трансляции [78].

Существуют вирусные мРНК, приобретающие 3'-концевые поли(А)-тракты путем повторного копирования вирусной полимеразой олиго(U)-участ-

ков матричной РНК. Этим способом образуется, например, поли(А)-тракт мРНК вируса гриппа А. Результаты работы Пуна и соавт. [79] свидетельствуют о том, что началу транскрипции предшествует связывание вирусной полимеразы с 5'-концом матричной РНК (vРНК) и образование двойной спирали между комплементарными участками, расположенными в 5'- и 3'-концевых областях матрицы. После инициации транскрипции двойная спираль распадается, а полимеразы во время всего процесса синтеза мРНК остается связанной с 5'-концом матрицы. Поскольку полимеразы не способны транскрибировать место своего связывания, она повторно копирует прилегающий к нему олиго(U)-участок длиной 5—7 нуклеотидов.

В другой работе [80] Пун и соавт. подтвердили существование процесса повторного копирования, показав, что искусственная замена копируемого олиго(U)-участка в vРНК на олиго(А)-тракт приводит *in vitro* и *in vivo* к синтезу 3'-концевого поли(U)-тракта, а вставки в олиго(U)-тракт других нуклеотидных остатков — к ингибированию синтеза 3'-концевых поли(А)-последовательностей мРНК вируса гриппа. Следует отметить, что большая часть мРНК с поли(U)-хвостами рекомбинантного вируса гриппа не транспортируется из ядра в цитоплазму [81]. Эти данные свидетельствуют о существенной роли 3'-концевых поли(А)-трактов для экспорта вирусных мРНК.

мРНК вируса гриппа кэпированы. Эндонуклеаза, входящая в состав комплекса вирусных белков, включающего РНК-полимеразу, отщепляет кэпированный фрагмент хозяйской мРНК, который затем используется для инициации транскрипции [82]. При вирусной инфекции не только разрушаются 5'-концы хозяйских мРНК, но и нарушается процесс образования их 3'-концов. Как показано в работе [83], вирусный белок NS 1 специфически связывается с факторами полиаденилирования CPSF-30 и PABP2. Связывание с CPSF-30 приводит к ингибированию процесса расщепления хозяйских про-мРНК, но не полному, некоторые транскрипты расщепляются и имеют короткие 3'-концевые поли(А)-тракты. Связывание NS 1 с PABP2 блокирует вторую стадию полиаденилирования — процессивный синтез длинного поли(А)-тракта, осуществляемый, как уже упоминалось, комплексом из трех белков (PAP, CPSF и PABP2). Кроме того, это взаимодействие подавляет экспорт PABP2 из ядра. Нерасщепленные хозяйские про-мРНК, а также расщепленные, но имеющие лишь короткие 3'-концевые поли(А)-тракты, не экспортируются из ядра, в частности, как полагают авторы [83], из-за отсутствия взаимодействия между PABP2 и

удлиняющимися 3'-концевыми поли(А)-последовательностями мРНК. В то же время экспорт вирусных мРНК не блокируется, поскольку их 3'-концевые поли(А)-тракты не синтезируются хозяйским аппаратом полиаденилирования.

Процесс повторного копирования олиго(U)-тракта используется, видимо, и для полиаденилирования мРНК вируса везикулярного стоматита (VSV) [84]. Комплекс, состоящий из двух белков (L и P), осуществляет экпирование и полиаденилирование транскриптов вируса VSV, средняя длина 3'-концевых поли(А)-последовательностей которых составляет 100—200 нуклеотидов. Сигналом для полиаденилирования служит последовательность AUACU<sub>7</sub>. Механизм повторного копирования не установлен. Интересно отметить, что, как и в случае эукариотов, сигнал полиаденилирования мРНК вируса VSV необходим для терминации транскрипции [84].

Иная стратегия в отношении процесса полиаденилирования выработана вирусом оспы (VV). Этот вирус кодирует PАР, состоящую из двух полипептидов с молекулярными массами 55 и 39 кДа, первый из них обладает каталитической активностью, а второй является фактором процессивности, стимулируя образование длинных 3'-концевых поли(А)-трактов [85]. Гетеродимерный белок, по-видимому, связывается с РНК на участке, содержащем мотив U<sub>2</sub>-N<sub>25</sub>-U [86].

В работе [87] показано, что заражение клеток VV сопровождается появлением небольших нетранслируемых полиаденилированных РНК, в число которых входят тРНК, мРНК, а также фрагменты вирусных и хозяйских мРНК. Авторы полагают, что полиаденилирование осуществляется вирусной PАР, не обладающей, как следует из работы [86], особой специфичностью. Полиаденилированные продукты, связывая хозяйский PABP1, значительно уменьшают его концентрацию в цитоплазме, что приводит к селективному подавлению трансляции хозяйских мРНК, поскольку инициация трансляции вирусных мРНК еще возможна при низких концентрациях PABP1.

Вирусные мРНК могут не иметь ни кэп-структуры, ни 3'-концевых поли(А)-трактов, как, например, мРНК M<sub>1</sub> сателлита дрожжевого вируса L-A [88]. Экспрессию сателлита обеспечивает главный белок оболочки вируса L-A, отщепляющий кэп-структуру от некоторых хозяйских мРНК, что приводит к увеличению общей концентрации неэкпированных мРНК в цитоплазме и соответственно к уменьшению вероятности деградации мРНК M<sub>1</sub> под действием (5'→3')-экзорибонуклеазы Xrn 1p.

Некоторые растительные вирусные мРНК име-

ют в 3' UTR структуру, функционально заменяющую 3'-концевой поли(А)-тракт, которая является псевдоузлы. В эту группу входит вирус табачной мозаики (ВТМ). Результаты работы [89] свидетельствуют в пользу того, что псевдоузлы в 3'-концевой части мРНК ВТМ совместно с кэп-структурой и 5'-лидерной последовательностью ответственны за стимуляцию инициации трансляции.

Следует упомянуть также о том, что «плюс» РНК-вирусы могут использовать 3'-концевые поли(А)-тракты в процессе репликации. Интересный пример представляет вирус мозаики бамбука [90]. Геномная РНК этого вируса содержит на 3'-конце псевдоузел, включающий часть поли(А)-тракта длиной по крайней мере 13 нуклеотидов. Наличие поли(А)-последовательности и организация его части в псевдоузел существенны для репликации этого вируса.

**Заключение.** В двух частях обзора ([1] и настоящая работа) рассмотрен процесс полиаденилирования мРНК разных категорий организмов — от бактерии до человека. Хотя в данной работе функции 3'-концевых поли(А)-трактов мРНК не рассматривались подробно (этой теме будет посвящен отдельный обзор), тем не менее, даже из кратких упоминаний вытекает, что, по-видимому, все организмы используют поли(А)-последовательности в таких жизненно важных процессах, как регулирование времени жизни мРНК и инициация трансляции. Однако, несмотря на консервативность функций, процесс образования 3'-концевых поли(А)-трактов мРНК заметно усложняется по мере продвижения по эволюционной лестнице.

У прокариотов полиаденилируются 3'-концы как полных транскриптов, так и их фрагментов, образовавшихся в результате действия эндонуклеаз; у растений имеется множество мест полиаденилирования, расположенных в 3' UTR про-мРНК, и только у позвоночных процесс полиаденилирования происходит в основном на единичных специфических местах. Причем у позвоночных две стадии этого процесса более тесно связаны между собой, чем у дрожжей.

Работы, относящиеся к изучению процесса полиаденилирования бактериальных РНК, в основном посвящены механизмам действия различных эндонуклеаз и экзонуклеаз, поскольку полиаденилируется практически любой 3'-конец РНК со свободной ОН-группой. С другой стороны, в обширной литературе, посвященной полиаденилированию про-мРНК позвоночных и дрожжей, насчитывающей в настоящее время сотни работ, главным образом обсуждается вопрос о том, каким образом

поли(А)-полимераза привлекается к «нужному» месту на транскрипте в «нужный» момент времени и такие белково-нуклеиновые и белково-белковые взаимодействия обеспечивают эту избирательность. Ответы на эти вопросы еще далеко неполные.

Как ни удивительно, но до сих пор еще не найден полипептид, обладающий эндонуклеолитической активностью, непосредственно осуществляющий расщепление эукариотических про-мРНК. Недавно был частично очищен единственный неохарактеризованный ранее фактор полиаденилирования животных CF I<sub>m</sub> [91]. Препарат содержит более 15 полипептидов, в том числе гомологи двух факторов дрожжей (C1p 1p и Pcf 1p), CF I<sub>m</sub> и ряд факторов транскрипции и сплайсинга. Но эндонуклеазы среди этих белков не оказалось. Белками, расщепляющими транскрипты в процессе полиаденилирования про-мРНК эукариотов, являются, скорее всего, CPSF-30 (животные) и Yth 1p (дрожжи) [8, 13], гомологичные белку CLP дрозофилы, обладающему эндорибонуклеолитической активностью [92].

Как следует из первой части обзора [1], в реакции образования 3'-концов эукариотов участвуют, кроме аппарата полиаденилирования, также аппараты транскрипции, кэпирования и сплайсинга. В свою очередь аппарат полиаденилирования существен для терминации транскрипции и сплайсинга.

Таким образом, процесс полиаденилирования эукариотов осуществляется с помощью множества белков и сигнальных последовательностей в про-мРНК и взаимосвязан с другими процессами. С другой стороны, процесс полиаденилирования РНК прокариотов представляется, на первый взгляд, довольно простым. Однако, очевидно, что эта простота лишь кажущаяся. Например, недавно в бактериальной РАР идентифицированы места взаимодействия с РНКазой E и РНК-геликсами [93]. Результаты этой, а также других работ, свидетельствующие о взаимодействии РАР I *E. coli* с фактором Hfq [76] и РАР хлоропластов с ПНФазой [94], показывают, что РАР прокариотов так же, как и эукариотические ферменты, функционирует в комплексе с другими белками.

Выражаю искреннюю благодарность Д. Н. Говоруну за ценные советы и замечания.

*M. I. Zarudnaya*

mRNA polyadenylation. 2. Formation of poly(A) tails in yeast, plant, prokaryote and virus mRNAs

Summary

*The present work is the last part of the review devoted to polyadenylation of pre mRNAs from different categories of orga-*

*nisms. The mechanisms of poly(A) tails formation in yeast, plant, prokaryote and virus mRNAs are under consideration. A model of formation of cleavage complex, assembled on the polyadenylation site of yeast pre mRNA, is proposed.*

*M. I. Zarudna*

Полиаденилювання про-мРНК. 2. Утворення 3'-кінцевих полі(А)-последовностей мРНК дріжджів, рослин, прокариотів та вірусів

Резюме

*Представлена робота є другою заключною частиною огляду, присвяченого поліаденилюванню про-мРНК різних категорій організмів. У ній розглянуто процеси утворення полі(А)-хвостів мРНК дріжджів, рослин, прокариотів та вірусів. Запропоновано модель утворення комплексу розщеплення на сайті поліаденилювання про-мРНК дріжджів.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Zarudnaya M. I.* Полиаденилирование про-мРНК. 1. Образование 3'-концов мРНК позвоночных // Биополимеры и клетка.—2001.—17, № 2.—С. 93—108.
2. *Keller W., Minvielle-Sebastia L.* A comparison of mammalian and yeast pre-mRNA 3'-end processing // *Curr. Opin. Cell Biol.*—1997.—9, N 3.—P. 329—336.
3. *Preker P. J., Keller W.* The HAT helix, a repetitive motif implicated in RNA processing // *Trends Biochem. Sci.*—1998.—23, N 1.—P. 15—16.
4. *Kessler M. M., Henry M. F., Shen E., Zhao J., Gross S., Silver P. A., Moore C. L.* Hrp 1, a sequence-specific RNA-binding protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm, is required for mRNA 3'-end formation in yeast // *Genes and Devel.*—1997.—11, N 19.—P. 2545—2556.
5. *Minvielle-Sebastia L., Preker P. J., Keller W.* RNA 14 and RNA 15 proteins as components of a yeast pre-mRNA 3'-end processing factor // *Science.*—1994.—266, N 5191.—P. 1702—1705.
6. *Amrani N., Minet M., Le Gouar M., Lacroute F., Wyers F.* Yeast Pab 1 interacts with Rna 15 and participates in the control of the poly(A) tail length in vitro // *Mol. and Cell Biol.*—1997.—17, N 7.—P. 3694—3701.
7. *Zhao J., Kessler M. M., Moore C. L.* Cleavage factor II of *Saccharomyces cerevisiae* contains homologues to subunits of the mammalian cleavage/polyadenylation specificity factor and exhibits sequence-specific, ATP-dependent interaction with precursor RNA // *J. Biol. Chem.*—1997.—272, N 16.—P. 10831—10838.
8. *Barabino S. M. L., Hübner W., Jenny A., Minvielle-Sebastia L., Keller W.* The 30-kD subunit of mammalian cleavage and polyadenylation specificity factor and its yeast homolog are RNA-binding zinc finger proteins // *Genes and Devel.*—1997.—11, N 13.—P. 1703—1716.
9. *Zhelkovsky A. M., Kessler M. M., Moore C. L.* Structure-function relationships in the *Saccharomyces cerevisiae* poly(A) polymerase. Identification of a novel RNA binding site and a domain that interacts with specificity factor(s) // *J. Biol. Chem.*—1995.—270, N 44.—P. 26715—26720.
10. *Martin G., Keller W.* Mutational analysis of mammalian poly(A) polymerase identifies a region for primer binding and a catalytic domain, homologous to the family X polymerases, and to other nucleotidyltransferases // *EMBO J.*—1996.—15, N 10.—P. 2593—2603.
11. *Sachs A. B., Bond M. W., Kornberg R. D.* A single gene from yeast for both nuclear and cytoplasmic polyadenylate-binding

- proteins: domain structure and expression // *Cell*.—1986.—45, N 6.—P. 827—835.
12. *Burd C. G., Matunis E. L., Dreyfuss G.* The multiple RNA-binding domains of the mRNA polyA-binding protein have different RNA-binding activities // *Mol. and Cell. Biol.*—1991.—11, N 7.—P. 3419—3424.
  13. *Barabino S. M. L., Ohnacker M., Keller W.* Distinct roles of two Yth 1p domains in 3'-end cleavage and polyadenylation of yeast pre-mRNAs // *EMBO J.*—2000.—19, N 14.—P. 3778—3787.
  14. *Zhao J., Kessler M., Helmling S., O'Connor J. P., Moore C.* Pta1, a component of yeast CF II, is required for both cleavage and poly(A) addition of mRNA precursor // *Mol. and Cell. Biol.*—1999.—19, N 11.—P. 7733—7740.
  15. *Jenny A., Minvielle-Sebastia L., Preker P. J., Keller W.* Sequence similarity between the 73-kilodalton protein of mammalian CPSF and a subunit of yeast polyadenylation factor I // *Science*.—1996.—274, N 5292.—P. 1514—1517.
  16. *Preker P. J., Ohnacker M., Minvielle-Sebastia L., Keller W.* A multisubunit 3' end processing factor from yeast containing poly(A) polymerase and homologues of the subunits of mammalian cleavage and polyadenylation specificity factor // *EMBO J.*—1997.—16, N 15.—P. 4727—4737.
  17. *Colgan D. F., Manley J. L.* Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation // *Genes and Devel.*—1997.—11, N 21.—P. 2755—2766.
  18. *Wahle E., Rügsegger U.* 3'-end processing of pre-mRNA in eukaryotes // *FEMS Microbiol. Revs.*—1999.—23, N 3.—P. 277—295.
  19. *Gunderson S. I., Vagner S., Polycarpou-Schwarz M., Mattaj J. W.* Involvement of the carboxyl terminus of vertebrate poly(A) polymerase in U1 A autoregulation and in the coupling of splicing and polyadenylation // *Genes and Devel.*—1997.—11, N 6.—P. 761—773.
  20. *Zhelkovsky A., Helmling S., Moore C.* Processivity of the *Saccharomyces cerevisiae* poly(A) polymerase requires interactions at the carboxylic-terminal RNA binding domain // *Mol. and Cell. Biol.*—1998.—18, N 10.—P. 5942—5951.
  21. *Williamson J. R., Raghuraman M. K., Cech T. R.* Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: the G-quartet model // *Cell*.—1989.—59, N 5.—P. 871—880.
  22. *Takagaki Y., Manley J. L.* Complex protein interactions within the human polyadenylation machinery identify a novel component // *Mol. and Cell. Biol.*—2000.—20, N 5.—P. 1515—1525.
  23. *Chen F., MacDonald C. C., Wilusz J.* Cleavage site determinants in the mammalian polyadenylation signal // *Nucl. Acids Res.*—1995.—23, N 14.—P. 2614—2620.
  24. *Graber J. H., Cantor C. R., Mohr S. C., Smith T. F.* Genomic detection of new yeast pre-mRNA 3'-end-processing signals // *Nucl. Acids Res.*—1999.—27, N 3.—P. 888—894.
  25. *Graber J. H., Cantor C. R., Mohr S. C., Smith T. F.* *In silico* detection of control signals: mRNA 3'-end-processing sequences in diverse species // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1999.—96, N 24.—P. 14055—14060.
  26. *Guo Z., Sherman F.* 3'-end-forming signals of yeast mRNA // *Mol. and Cell. Biol.*—1995.—15, N 11.—P. 5983—5990.
  27. *Manley J. L., Takagaki Y.* The end of the message — another link between yeast and mammals // *Science*.—1996.—274, N 5292.—P. 1481—1482.
  28. *Guo Z., Sherman F.* Signals sufficient for 3'-end formation of yeast mRNA // *Mol. and Cell. Biol.*—1996.—16, N 6.—P. 2772—2776.
  29. *Egli C. M., Springer C., Braus G. H.* A complex unidirectional signal element mediates GCN4 mRNA 3' end formation in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. and Cell. Biol.*—1995.—15, N 5.—P. 2466—2473.
  30. *Minvielle-Sebastia L., Beyer K., Krecic A. M., Hector R. E., Swanson M. S., Keller W.* Control of cleavage site selection during mRNA 3' end formation by a yeast hnRNP // *EMBO J.*—1998.—17, N 24.—P. 7454—7468.
  31. *Chen S., Hyman L. E.* A specific RNA-protein interaction at yeast polyadenylation efficiency elements // *Nucl. Acids Res.*—1998.—26, N 21.—P. 4965—4974.
  32. *Russnak R., Nehrke K. W., Platt T.* REF2 encodes an RNA-binding protein directly involved in yeast mRNA 3'-end formation // *Mol. and Cell. Biol.*—1995.—15, N 3.—P. 1689—1697.
  33. *Wahle E.* Poly(A) tail length control is caused by termination of processive synthesis // *J. Biol. Chem.*—1995.—270, N 6.—P. 2800—2808.
  34. *Minvielle-Sebastia L., Preker P. J., Wiederkehr T., Strahm Y., Keller W.* The major yeast poly(A)-binding protein is associated with cleavage factor IA and functions in premessenger RNA 3'-end formation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1997.—94, N 15.—P. 7897—7902.
  35. *Afonina E., Stauber R., Pavlakis G. N.* The human poly(A)-shuttling protein I shuttles between the nucleus and the cytoplasm // *J. Biol. Chem.*—1998.—273, N 21.—P. 13015—13021.
  36. *Mangus D. A., Amrani N., Jacobson A.* Pbp 1p, a factor interacting with *Saccharomyces cerevisiae* poly(A)-binding protein, regulates polyadenylation // *Mol. and Cell. Biol.*—1998.—18, N 12.—P. 7383—7396.
  37. *Brown C. E., Sachs A. B.* Poly(A) tail length control in *Saccharomyces cerevisiae* occurs by message-specific deadenylation // *Mol. and Cell. Biol.*—1998.—18, N 11.—P. 6548—6559.
  38. *Russo P.* *Saccharomyces cerevisiae* mRNA 3'-end forming signals are also involved in transcription termination // *Yeast*.—1995.—11, N 5.—P. 447—453.
  39. *Birse C. E., Lee B. A., Hansen K., Proudfoot N. J.* Transcriptional termination signals for RNA polymerase II in fission yeast // *EMBO J.*—1997.—16, N 12.—P. 3633—3643.
  40. *Greger I. H., Proudfoot N. J.* Poly(A) signals control both transcriptional termination and initiation between the tandem GAL10 and GAL7 genes of *Saccharomyces cerevisiae* // *EMBO J.*—1998.—17, N 16.—P. 4771—4779.
  41. *Birse C. E., Minvielle-Sebastia L., Lee B. A., Keller W., Proudfoot N. J.* Coupling termination of transcription to messenger RNA maturation in yeast // *Science*.—1998.—280, N 5361.—P. 298—301.
  42. *Aranda A., Perez-Ortin J. E., Moore C., Del Olmo M. L.* Transcription termination downstream of the *Saccharomyces cerevisiae* FPB1 poly(A) site does not depend on efficient 3' end processing // *RNA*.—1998.—4, N 3.—P. 303—318.
  43. *Rodriguez C. R., Cho E.-J., Keogh M.-C., Moore C. L., Greenleaf A. L., Buratowski S.* Kin28, the TFIIF-associated carboxy-terminal domain kinase, facilitates the recruitment of mRNA processing machinery to RNA polymerase II // *Mol. and Cell. Biol.*—2000.—20, N 1.—P. 104—112.
  44. *Li Q., Hunt A. G.* The polyadenylation of RNA in plants // *Plant Physiol.*—1997.—115, N 2.—P. 321—325.
  45. *Rothnie H. M., Reid J., Hohn T.* The contribution of AAUAAA and the upstream element UUUGUA to the efficiency of mRNA 3'-end formation in plants // *EMBO J.*—1994.—13, N 9.—P. 2200—2210.
  46. *Luehrsen K. R., Walbot V.* Intron creation and polyadenylation in maize are directed by AU-rich RNA // *Genes and Devel.*—1994.—8, N 9.—P. 1117—1130.
  47. *Gallie D. R.* The cap and poly(A) tail function synergistically



- to regulate mRNA translational efficiency // *Genes and Devel.*—1991.—5, N 11.—P. 2108—2116.
48. Le H., Tanguay R. L., Balasta M. L., Wei C.-C., Browning K. S., Metz A. M., Goss D. J., Gallie D. R. Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity // *J. Biol. Chem.*—1997.—272, N 26.—P. 16247—16255.
  49. Wei C.-C., Balasta M. L., Ren J., Goss D. J. Wheat germ poly(A) binding protein enhances the binding affinity of eukaryotic initiation factor 4F and (iso)4F for cap analogues // *Biochemistry.*—1998.—37, N 7.—P. 1910—1916.
  50. Tarun S. Z., Sachs A. B. Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G // *EMBO J.*—1996.—15, N 24.—P. 7168—7177.
  51. Sachs A. B., Davis R. W., Kornberg R. D. A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability // *Mol. and Cell. Biol.*—1987.—7, N 9.—P. 3268—3276.
  52. Caponigro G., Parker R. Multiple functions for the poly(A)-binding protein in mRNA decapping and deadenylation in yeast // *Genes and Devel.*—1995.—9, N 19.—P. 2421—2432.
  53. Sachs A. B., Sarnow P., Hentze M. W. Starting at the beginning, middle and end: translation initiation in eukaryotes // *Cell.*—1997.—89, N 6.—P. 831—838.
  54. Muhrad D., Decker C. J., Parker R. Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5'→3' digestion of the transcript // *Genes and Devel.*—1994.—8, N 7.—P. 855—866.
  55. Belostotsky D. A., Meagher R. B. A pollen-, ovule-, and early embryo-specific poly(A) binding protein from *Arabidopsis* complements essential functions in yeast // *Plant Cell.*—1996.—8, N 8.—P. 1261—1275.
  56. Belostotsky D. A., Meagher R. B. Differential organ-specific expression of three poly(A)-binding-protein genes from *Arabidopsis thaliana* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1993.—90, N 14.—P. 6686—6690.
  57. Palanivelu R., Belostotsky D. A., Meagher R. B. *Arabidopsis thaliana* poly(A) binding protein 2 (PAB2) functions in yeast translational and mRNA decay processes // *Plant J.*—2000.—22, N 3.—P. 187—198.
  58. Gera J. F., Baker E. J. Deadenylation-dependent and -independent decay pathways for  $\alpha$ -tubulin mRNA in *Chlamydomonas reinhardtii* // *Mol. and Cell. Biol.*—1998.—18, N 3.—P. 1498—1505.
  59. Yohn C. B., Cohen A., Danon A., Mayfield S. P. A poly(A) binding protein functions in the chloroplast as a message-specific translation factor // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1998.—95, N 5.—P. 2238—2243.
  60. Yohn C. B., Cohen A., Rosch C., Kuchka M. R., Mayfield S. P. Translation of the chloroplast *psb A* mRNA requires the nuclear encoded poly(A)-binding protein, RB47 // *J. Cell Biol.*—1998.—142, N 2.—P. 435—442.
  61. Kudla J., Hayes R., Gruissem W. Polyadenylation accelerates degradation of chloroplast mRNA // *EMBO J.*—1996.—15, N 24.—P. 7137—7146.
  62. Lisitsky I., Kotler A., Schuster G. The mechanism of preferential degradation of polyadenylated RNA in the chloroplast. The exoribonuclease 100RNP/polynucleotide phosphorylase displays high binding affinity for poly(A) sequence // *J. Biol. Chem.*—1997.—272, N 28.—P. 17648—17653.
  63. Manley J. L. Messenger RNA polyadenylation: A universal modification // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1995.—92, N 6.—P. 1800—1801.
  64. Cohen S. N. Surprises at the 3' end of prokaryotic RNA // *Cell.*—1995.—80, N 6.—P. 829—832.
  65. Xu F., Lin-Chao S., Cohen S. N. The *Escherichia coli* *pcn B* gene promotes adenylation of antisense RNA I of Col E1-type plasmids *in vivo* and degradation of RNA I decay intermediates // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1993.—90, N 14.—P. 6756—6760.
  66. Sachs A., Wahle E. Poly(A) tail metabolism and function in eukaryotes // *J. Biol. Chem.*—1993.—268, N 31.—P. 22955—22958.
  67. Sarkar N. Polyadenylation of mRNA in prokaryotes // *Annu. Rev. Biochem.*—1997.—66.—P. 173—197.
  68. Yue D., Maizels N., Weiner A. M. CCA-adding enzymes and poly(A) polymerases are all members of the same nucleotidyltransferase superfamily: characterization of the CCA-adding enzyme from the archaeal hyperthermophile *Sulfolobus shibatae* // *RNA.*—1996.—2, N 9.—P. 895—908.
  69. Yehudai-Resheff S., Schuster G. Characterization of the *E. coli* poly(A) polymerase: nucleotide specificity, RNA-binding affinities and RNA structure dependence // *Nucl. Acids Res.*—2000.—28, N 5.—P. 1139—1144.
  70. Kalapos M. P., Paulus H., Sarkar N. Identification of ribosomal protein S1 as a poly(A) binding protein in *Escherichia coli* // *Biochimie.*—1997.—79, N 8.—P. 493—502.
  71. Xu F., Cohen S. N. RNA degradation in *Escherichia coli* regulated by 3' adenylation and 5' phosphorylation // *Nature.*—1995.—374, N 6518.—P. 180—183.
  72. Huang H., Liao J., Cohen S. N. Poly(A)- and poly(U)-specific RNA 3' tail shortening by *E. coli* ribonuclease E // *Nature.*—1998.—391, N 6662.—P. 99—102.
  73. O'Hara E. B., Chekanova J. A., Ingle C. A., Kushner Z. R., Peters E., Kushner S. R. Polyadenylation helps regulate mRNA decay in *Escherichia coli* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1995.—92, N 6.—P. 1807—1811.
  74. Coburn G. A., Mackie G. A. Reconstitution of the degradation of the mRNA for ribosomal protein S20 with purified enzymes // *J. Mol. Biol.*—1998.—279, N 5.—P. 1061—1074.
  75. Hajnsdorf E., Regnier P. *E. coli* *rps O* mRNA decay: RNase E processing at the beginning of the coding sequence stimulates poly(A)-dependent degradation of the mRNA // *J. Mol. Biol.*—1999.—286, N 4.—P. 1033—1043.
  76. Hajnsdorf E., Regnier P. Host factor Hfq of *Escherichia coli* stimulates elongation of poly(A) tails by poly(A) polymerase I // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2000.—97, N 4.—P. 1501—1505.
  77. *Вирусология* / Под ред. Б. Филдса, Д. Найпа.—М.: Мир, 1989.—Т. 2.—С. 190—256.
  78. Preiss T., Hentze M. W. Dual function of the messenger RNA cap structure in poly(A)-tail-promoted translation in yeast // *Nature.*—1998.—392, N 6675.—P. 516—520.
  79. Poon L. L. M., Pritlove D. C., Sharps J., Brownlee G. G. The RNA polymerase of influenza virus, bound to the 5' end of virion RNA, acts *in cis* to polyadenylate mRNA // *J. Virol.*—1998.—72, N 10.—P. 8214—8219.
  80. Poon L. L. M., Pritlove D. C., Fodor E., Brownlee G. G. Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template // *J. Virol.*—1999.—73, N 4.—P. 3473—3476.
  81. Poon L. L. M., Fodor E., Brownlee G. G. Polyuridylylated mRNA synthesized by a recombinant influenza virus is defective in nuclear export // *J. Virol.*—2000.—74, N 1.—P. 418—427.
  82. Plotch S. J., Bouloy M., Ulmanen I., Krug R. M. A unique cap(m<sup>7</sup>GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription // *Cell.*—1981.—23, N 3.—P. 847—858.
  83. Chen Z., Li Y., Krug R. M. Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end

- processing machinery // *EMBO J.*—1999.—18, N 8.—P. 2273—2283.
84. *Hwang L. N., Englund N., Pattnaik A. K.* Polyadenylation of vesicular stomatitis virus mRNA dictates efficient transcription termination at the intercistronic gene junctions // *J. Virol.*—1998.—72, N 3.—P. 1805—1813.
85. *Gershon P. D., Ahn B.-Y., Garfield M., Moss B.* Poly(A) polymerase and a dissociable polyadenylation stimulatory factor encoded by vaccinia virus // *Cell.*—1991.—66, N 6.—P. 1269—1278.
86. *Deng L., Johnson L., Neveu J. M., Hardin S., Wang S.-M., Lane W. S., Gershon P. D.* A polyadenylation-specific RNA-contact site on the surface of the bifunctional vaccinia virus RNA modifying protein VP39 that is distinct from the mRNA 5' end-binding «cleft» // *J. Mol. Biol.*—1999.—285, N 4.—P. 1417—1427.
87. *Lu C., Bablanian R.* Characterization of small nontranslated polyadenylated RNAs in vaccinia virus-infected cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1996.—93, N 5.—P. 2037—2042
88. *Masison D. C., Blanc A., Ribas J. C., Carroll K., Sonenberg N., Wickner R. B.* Decoying the cap<sup>-</sup> mRNA degradation system by a double-stranded RNA virus and poly(A)<sup>-</sup> mRNA surveillance by a yeast antiviral system // *Mol. and Cell. Biol.*—1995.—15, N 5.—P. 2763—2771.
89. *Leathers V., Tanguay R., Kobayashi M., Gallie D. R.* A phylogenetically conserved sequence within viral 3' untranslated RNA pseudoknots regulates translation // *Mol. and Cell. Biol.*—1993.—13, N 9.—P. 5331—5347.
90. *Tsai C.-H., Cheng C.-P., Peng C.-W., Lin B.-Y., Lin N.-S., Hsu Y.-H.* Sufficient length of a poly(A) tail for the formation of a potential pseudoknot is required for efficient replication of bamboo mosaic potexvirus RNA // *J. Virol.*—1999.—73, N 4.—P. 2703—2709.
91. *de Vries H., Rügsegger U., Hübner W., Friedlein A., Langen H., Keller W.* Human pre-mRNA cleavage factor II<sub>m</sub> contains homologs of yeast proteins and bridges two other cleavage factors // *EMBO J.*—2000.—19, N 21.—P. 5895—5904.
92. *Bai C., Tolias P. P.* *Drosophila* clipper/CPSF 30 K is a post-transcriptionally regulated nuclear protein that binds RNA containing GC clusters // *Nucl. Acids Res.*—1998.—26, N 7.—P. 1597—1604.
93. *Raynal L. C., Carpousis A. J.* Poly(A) polymerase I of *Escherichia coli*: characterization of the catalytic domain, an RNA binding site and regions for the interaction with proteins involved in mRNA degradation // *Mol. Microbiol.*—1999.—32, N 4.—P. 765—775.
94. *Li Q.-S., Das Gupta J., Hunt A. G.* Polynucleotide phosphorylase is a component of a novel plant poly(A) polymerase // *J. Biol. Chem.*—1998.—273, N 28.—P. 17539—17543.

УДК 577.21

Надійшла до редакції 25.04.2000