



УДК 577.217.3

ИЗБИРАТЕЛЬНОСТЬ ТРАНСЛЯЦИИ МАТРИЧНЫХ РНК ЭУКАРИОТ*

Н. Ф. Стародуб, А. Э. Рачков

Синтез белка в клетке регулируется не только на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях, определяющих содержание мРНК в цитоплазме, но и существенно зависит от механизмов, обеспечивающих трансляционные и посттрансляционные процессы. Многостадийность этапа трансляции является основой для проявления целого ряда регуляторных механизмов. Экспериментальные данные о регуляции синтеза белка на этапе трансляции суммированы в ряде обзоров [1—4]. Ниже приведен анализ сведений об избирательности трансляции отдельных мРНК, при этом уделено внимание таким стадиям, лимитирующим скорость синтеза белка, как инициация и элонгация.

Известно, что в цитоплазме клеток эукариот мРНК локализована в полисомах и во внеполисомных мРНК-частицах. В большинстве клеток 10—80 % мРНК находится вне полисом, причем важно, что количественное распределение мРНК, кодирующих отдельные белки, между полисомами и внеполисомными РНК-частицами существенно различается и это различие не является случайным [5, 6]. Первые наблюдения о дискриминации отдельных мРНК на этапе трансляции были сделаны Лодишем [7] в экспериментах с использованием α - и β -мРНК глобина. Транскрипция и последующие посттранскрипционные события в эритроидных клетках обеспечивают преимущественный уровень α -мРНК, а вместе с тем α - и β -цепи синтезируются в эквимолярных количествах. Позже было показано [8], что мРНК, кодирующие β -цепи как взрослого, так и эмбрионального типа глобина, транслируются более эффективно, чем мРНК, обеспечивающие синтез α -цепей соответствующих периодов развития организма. Кроме того, оказалось, что мРНК α - и β -цепей взрослого глобина предпочтительнее транслируются в бесклеточной системе из ретикулоцитов, чем мРНК таких же цепей эмбрионального глобина. Два α -глобиновых локуса в эритроидных клетках человека транскрибируются с разной скоростью, а α_1 - и α_2 -цепи синтезируются в одинаковых количествах, так как 3-кратное превышение содержания мРНК α_2 -цепей в ретикулоцитах компенсируется в такой же степени большей трансляционной активностью мРНК α_1 -цепей [9]. В печени цыплят более чем в два раза интенсивнее синтезируется липопротеин II в расчете на молекулу мРНК по сравнению с вителлогенином [10].

Непосредственно после оплодотворения ооцитов моллюска *Spisula solidissima* скорость синтеза белка в них возрастает в несколько раз. Одновременно с этими изменениями происходит резкое снижение интенсивности синтеза некоторых белков, специфичных для ооцита, при существенной активации накопления трех полипептидов, являющихся доминирующими в клетках раннего эмбриона. Тотальный набор мРНК на указанных стадиях развития эмбриона остается тем же, но значительно изменяется состав полисомной мРНК. При трансляции тоталь-

* Представлена членом редколлегии д. б. н. А. В. Ельской.

ной мРНК в бесклеточной системе из ретикулоцитов синтез трех белков, характерных для эмбриона, наблюдается только в присутствии низкоскоростного супернатанта из клеток соответствующей стадии развития организма [11].

Воздействие теплового шока на многие организмы (грибы, дрожжи, высшие растения, дрозофила, клетки морского ежа, млекопитающие и т. д.) приводит к практически полному выключению трансляции мРНК интактных клеток и одновременно стимулирует синтез белков, характерных для шокового состояния. Обычно такая перестройка набора синтезируемых белков контролируется как на уровне транскрипции, так и на этапе трансляции. Однако их вклад в общий эффект разный в зависимости от стадии развития теплового шока и видовых особенностей организма [12—18]. Так, в ооцитах морского ежа изменения синтеза белка в таких условиях целиком определяются на этапе трансляции, что убедительно продемонстрировано в экспериментах с использованием α -аманитина, а также клеток, лишенных ядра [12]. С помощью блот-гибридизации и трансляции мРНК в различных бесклеточных системах было установлено, что при тепловом шоке в клетках содержатся мРНК, кодирующие белки, присущие интактному и шоковому состояниям организма. Вместе с тем обнаружено, что трансляция мРНК, характерных для интактного состояния, дискриминируется в лизатах клеток, подвергнутых тепловому шоку. Оба вида мРНК удается успешно транслировать в лизатах интактных клеток, что согласуется с данными многих авторов о возобновлении синтеза прежнего набора белков наряду с продолжающимся образованием полипептидов теплового шока после снижения температуры среды до обычного уровня.

Многочисленные примеры избирательной трансляции отдельных мРНК получены и при изучении молекулярных процессов развития вирусной инфекции. Уже на ранних стадиях заражения полиовирусом в клетках *HeLa* почти полностью выключается трансляция эндогенных мРНК. Причем лизаты таких клеток эффективно транслируют РНК пикорнавирусов и не способны транслировать не только клеточные мРНК, но и РНК некоторых других вирусов, в частности вируса везикулярного стоматита [19]. В свою очередь, инфицирование клеток животных вирусом везикулярного стоматита сопровождается избирательным ингибированием синтеза именно хозяйских белков, зависящим целиком от трансляции мРНК в новых сложившихся условиях [20]. Резкое снижение интенсивности трансляции хозяйских мРНК происходит на поздних стадиях заражения клеток нейробластомы вирусом леса Семлики. Аналогичная ситуация наблюдается и при реовирусной инфекции [20, 21].

Таким образом, дискриминация трансляции одних мРНК по сравнению с другими продемонстрирована как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*. Она имеет место при физиологических состояниях клеток, а также при воздействии на них экстремальных факторов (тепловой шок, вирусная инфекция). Различия в эффективности трансляции обнаружены не только при сравнении мРНК эукариот и прокариот, они также присущи отдельным видам мРНК эукариот.

Анализ имеющихся данных позволяет выделить три различных механизма, обуславливающих дискриминацию трансляции отдельных мРНК: а) изменение в структуре рибосом вследствие фосфорилирования белков или дополнительного комплексования с другими полипептидами; б) сдвиг ионного состава среды в клетке; в) модификация факторов, участвующих в трансляции, или изменение структур, связывающих эти факторы [3].

Выключение трансляции хозяйских мРНК при заражении клеток *HeLa* вирусом вакцины происходит синхронно с фосфорилированием S2- и S12-белков малой субъединицы рибосомы [22]. Возрастание уровня синтеза белков в ооцитах морских ежей после оплодотворения коррелирует с фосфорилированием белка S6 малой субъединицы рибо-

сом [23]. Обратимый переход клеток от интактного к шоковому состоянию (вследствие воздействия высокой температуры) сопровождается изменением интенсивности синтеза некоторых белков и фосфорилированием — дефосфорилированием белков *S6*, *L14*, а также ассоциированного с рибосомами полипептида с молекулярной массой 27 000 [18]. Следует отметить, что *S6* наряду с другими (*S1*, *S3/3a* и *S11*) белками малой субчастицы рибосом, возможно, имеет прямой контакт с мРНК в составе преинициаторного комплекса [24]. Показано также [2] наличие в неоплодотворенных ооцитах белка, связанного с рибосомами и ингибирующего образование инициаторного комплекса. Все же пока отсутствуют прямые доказательства участия указанных выше изменений структуры рибосом в дискриминации трансляции отдельных мРНК. Более того, существует мнение [25], что роль фосфорилирования — дефосфорилирования белка *S6* в регуляции синтеза полипептидов несущественна, так как при тонических сдвигах в клетках миеломы мыши наблюдается разрыв скорости данного процесса относительно изменения уровня инициации мРНК.

В настоящее время не вызывает сомнений зависимость эффективности трансляции мРНК от ионной силы и состава среды. В этом отношении особый интерес представляют данные [26] о том, что оптимумы интенсивности трансляции вирусных и клеточных мРНК достигаются при различных концентрациях моновалентных катионов. Коху и др. [27] даже удалось выявить более ранний синтез вирусспецифических полипептидов, если зараженные клетки выдерживали в среде, ионная сила которой несколько превышала физиологический уровень. Накоплен большой экспериментальный материал о существенном значении рН, температуры, концентрации ионов NH_4 , Na, Ca, Fe для активации замаскированных мРНК [2, 28]. Обращает внимание также и тот факт, что максимумы интенсивности трансляции отдельных мРНК глобина находятся в пределах одних и тех же концентраций солей калия, но при повышении их уровня по сравнению с оптимальным отмечается существенное снижение величины, характеризующей соотношение синтезируемых α - и β -цепей [29].

Более привлекательным из-за разнообразия своего проявления представляется третий механизм, учитывающий как факторы трансляции, так и особенности структурной организации матричных РНК. В процессе трансляции имеется ряд стадий, лимитирующих скорость, из которых наиболее чувствительной к регуляции является инициация.

Для идентификации факторов, определяющих избирательность трансляции мРНК на одном из этапов (инициация, элонгация или терминация), возникает необходимость в использовании четких экспериментальных подходов регистрации их дискриминирующего действия. Лодиш [30] вывел математическое уравнение процесса трансляции, которое позволяет в любой системе количественно оценить взаимозависимость скоростей инициации и элонгации, а тем самым исключить вероятность артефактов при решении вопроса о дискриминации мРНК тем или иным фактором. Степень «ограничения элонгацией» биосинтеза белка в уравнении Лодиша характеризуется полисомностью транслируемой мРНК и экспериментально определяется с помощью седиментационного анализа. Дискриминирующее влияние факторов инициации на трансляцию мРНК можно выявить, исходя из количественного учета дипептидов, образующихся в условиях блока элонгации циклогексимидом [31], по интенсивности накопления метионил-пуруоцина [32] либо определением с помощью электрофореза доли предварительно меченой мРНК, находящейся в инициаторном комплексе [33].

Несколько особый случай представляет конкуренция двух или более мРНК за участок связывания на лимитирующем компоненте аппарата трансляции. Для обнаружения такой конкуренции выявляют степень эффективности трансляции одного вида мРНК в присутствии увеличивающейся концентрации другого вида или наоборот.

Ассельберг и др. [34, 35] подробно изучили изменение интенсивности синтеза отдельных глобинов и кристаллинов при одновременной трансляции их мРНК в ооцитах *Xenopus laevis* и бесклеточной системе их ретикулоцитов. В случае роста содержания в клетках мРНК одного вида белка интенсивность его синтеза повышается на фоне снижения уровня образования другого. Причем лишь 20 % вновь синтезированного тотального глобина составляют α -цепи. При таком же варьировании концентраций указанных мРНК в бесклеточной системе снижается лишь интенсивность синтеза белков хрусталика. Все же в этих условиях и под влиянием m^7GMP более эффективно транслируется мРНК γ -, чем αA - и β -кристаллинов. Установлено также [36], что конкурентная способность снижается в ряду мРНК глобина > мРНК альбумина > мРНК ферритина > мРНК гемопексина.

Трансляция мРНК проинсулина снижается при повышении в бесклеточной системе концентрации тотальной мРНК поджелудочной железы [37]. Предполагается, что мРНК проинсулина конкурирует за факторы инициации с другими мРНК, а повышение общей скорости синтеза белка *in vivo* под влиянием глюкозы [38] приводит к преимущественному росту эффективности трансляции именно той мРНК, инициация которой первоначально была ограничена. Аналогичная ситуация наблюдается в случае стимуляции синтеза ряда белков под влиянием инсулина [39, 40]. Согласно модели трансляции, предложенной Лодишем [30], ингибируя элонгацию, можно повысить конкурентоспособность мРНК, проявляющей низкую активность в инициации. Такие примеры получены при изучении скорости синтеза рибосомальных белков под влиянием различных ингибиторов [39], а также в случае трансляции клеточных и реовирусных мРНК [41]. Все же высокая активность инициации позволяет одним мРНК по сравнению с другими более эффективно транслироваться даже в условиях, неблагоприятных для данного процесса [42].

Высказано два альтернативных предположения о механизме избирательной трансляции отдельных мРНК с участием факторов инициации. Лодиш [43] исходит из того, что в его основе лежит различное сродство мРНК к факторам вследствие особенностей самих матриц. Ревел и Гронер [44] полагают, что этот механизм определяется соотношением факторов, вовлеченных в процесс инициации.

Роль первичной и вторичной структур мРНК в процессе инициации широко обсуждается в литературе [45, 46]. Несомненна роль этих структур и для избирательной трансляции мРНК эукариот, хотя в настоящее время в этом отношении имеются лишь отдельные сведения.

Пейвар и Шимке [47] нашли, что в условиях *in vitro* мРНК кональбумина менее эффективна в инициации, чем мРНК овальбумина, и что эти различия довольно значительно уменьшаются после предварительной денатурации матриц с помощью метилмеркурийгидроксида. Либхабер и Кан [9] пришли к заключению, что разная интенсивность трансляции в бесклеточной системе из ретикулоцитов кролика двух мРНК, имеющих одну и ту же последовательность от сайта экспонирования до терминирующего кодона и обеспечивающих синтез идентичных α -цепей глобина человека, обусловлена структурными особенностями 3'-нетранслируемой области. Предпринята попытка оценить роль возможных вторичных структур инициаторных участков мРНК α - и β -глобинов кролика в их неодинаковой трансляционной активности [33], а также выявлена корреляция между эффективностью использования отдельных мРНК и длиной поли(A)-последовательностей [48].

Избирательная трансляция полиовирусных и поздних реовирусных РНК, лишенных кэпа, по сравнению с мРНК клеток *HeLa* и линии *L*, а также с РНК вируса везикулярного стоматита и ранних РНК реовирусов обусловлена, вероятно, модификацией фактора eIF-4A или изменением других компонентов, образующих при физиологических условиях комплекс с фактором eIF-4A. Не исключена также возможность гиперметилирования кэпа, в результате чего его рекогниция ста-

новится затруднительной при низкой концентрации оставшегося немодифицированного фактора eIF-4A [49, 50]. Однако наличие кэпа не является обязательным для связывания РНК вируса везикулярного стоматита с рибосомой. При инфицировании клеток этим вирусом ингибирование трансляции хозяйских мРНК связано с транскрипцией его генома. Причем транскрипты, выключающие трансляцию и угнетающие синтез хозяйских мРНК, обладают разной устойчивостью к ультрафиолетовому облучению, а повреждение трансляционного аппарата клетки коррелирует с изменениями белковой фракции, в состав которой входят факторы инициации eIF-3 и eIF-4A [20].

Показано [51], что посредством модуляции фактора eIF-4B контролируется уровень синтеза белков в клетках нейробластомы при переходе к выращиванию их в бессывороточной среде. Данный фактор необходим для эффективной трансляции мРНК эукариот и экариотных РНК вирусов. Более того, имеются указания [29] о конкуренции за eIF-4B мРНК α -цепей глобина и РНК вируса энцефаломиокардита, не имеющей кэпа и обладающей в восемь раз большим сродством к этому фактору.

В бесклеточной системе из ретикулоцитов одна молекула РНК вируса Менго обуславливает 50 %-ное ингибирование трансляции 35 молекул мРНК глобина, причем общий уровень синтезируемого белка остается неизменным. Внесение в эту систему экзогенного фактора инициации eIF-2 снижает степень дискриминации мРНК глобина, сохраняя постоянной интенсивность синтеза тотального белка. Сродство фактора eIF-2 к вирусной РНК и мРНК глобина различается более чем в 30 раз [52]. Предполагается, что вирусные РНК и мРНК эукариот могут прямо конкурировать за данный фактор инициации. Имеются доказательства [29] того, что с количественным содержанием этого фактора связана и дискриминация трансляции мРНК α - и β -цепей глобина. Другие авторы указывают [53], что eIF-4B и в меньшей мере eIF-4A способствуют избирательной трансляции α -цепей без уменьшения общего уровня синтезируемого белка.

Гобинда и др. [54] показали, что из всех используемых ими факторов инициации (eIF-2, eIF-3, eIF-4A, eIF-4B, eIF-4C и eIF-5) и элонгации (EF-1) на соотношение интенсивностей трансляции эндогенных мРНК α - и β -цепей глобина в бесклеточной системе из ретикулоцитов оказывал влияние только комплекс кэпсвязывающих белков, который включал три полипептида с молекулярными массами 24 000, 50 000 и 220 000. При насыщающих концентрациях этого комплекса в бесклеточной системе α - и β -цепи синтезируются в соотношении, типичном для мРНК, кодирующих указанные полипептиды, в тотальном препарате. В случае лимитирующих количеств кэпсвязывающего комплекса имеет место дискриминация трансляции отдельных мРНК с преимущественным синтезом того белка, мРНК которого более конкурентоспособная при связывании с данным комплексом. Рей и др. [21] также пришли к заключению, что только комплекс кэпсвязывающих белков, в том числе и фактор eIF-4A, оказывает дискриминирующее влияние на трансляцию ряда вирусных РНК. Остальные исследованные факторы (eIF-2, eIF-3 и eIF-4B) лишь усиливают в равной мере интенсивность синтеза вирусных белков. Под влиянием комплекса кэпсвязывающих белков преимущественно увеличивается интенсивность трансляции РНК вирусов Синдбис и мозаики (AMV-4) по сравнению с РНК вирусов некроза табака и энцефаломиокардита [29].

Обнаружено [55], что кэпсвязывающий белок 50 000 реагирует с моноклональными антителами к eIF-4A. Учитывая эти данные, а также на основании идентичности триптических гидролизатов указанных выше белков, предполагается, что eIF-4A модифицируется в составе кэпсвязывающего комплекса. Этот комплекс включает пять белков (24 000, 28 000, 50 000, 56 000 и 210 000), содержащих гомологичные пептиды. Связывание всех пяти белков ингибируется моноклональными антителами к белку 24 000. Причем в составе полисом, рибосом и мРНК только

белок 50 000 взаимодействует с моноклональными антителами к белку 24 000. На основании совокупности этих данных полагают, что путем специфического расщепления белка 210 000 образуются более низкомолекулярные полипептиды, один из которых имеет молекулярную массу 50 000 и является активной формой, узнающей кэп [56]. Для связывания eIF-4A, eIF-4B, а также белков 24 000, 50 000, 80 000 и 210 000 с участком кэп реовирусной РНК необходимо присутствие АТР, гидролиз которой, видимо, направлен на образование инициаторного комплекса и денатурацию вторичной структуры на 5'-конце матрицы [56, 57].

Хейвуд и др. [58, 59] установили, что в состав фактора инициации eIF-3, выделенного из эмбриональных мышечных клеток, входит белок, способствующий избирательной трансляции мРНК миозина в бесклеточной системе. Преинкубация матриц с этим белком приводила к повышению интенсивности трансляции миозиновой мРНК по сравнению с другими видами мРНК, которые вводили в мышечные клетки с помощью липосом.

Согласно современной схеме процесса инициации, фактор eIF-2 необходим для образования тройного комплекса (eIF-2-GTP-мет-тРНК). Факторы eIF-3 и eIF-4С обеспечивают присоединение к этому комплексу 40S субчастицы, и только функционирование факторов eIF-4A, eIF-4B и eIF-1 связано с формированием еще более сложного комплекса, в состав которого входит и мРНК [60]. В этой связи представляется вполне возможным участие фактора eIF-4A в дискриминации трансляции отдельных мРНК. Что касается роли в этом плане таких факторов, как eIF-2 и eIF-3, следует полагать, что они в составе 40S инициаторного комплекса непосредственно взаимодействуют с мРНК либо каким-то образом оказывают влияние на связывание с ней других белков, участвующих в инициации трансляции. Имеются данные [24], указывающие на возможность прямого контакта мРНК в составе преинициаторного комплекса не только с кэпсвязывающим белком 24 000, но и с тремя субъединицами (110 000, 95 000 и 64 000—66 000) фактора eIF-3. Не исключено также, что избыток eIF-2 и eIF-3 факторов обеспечивает такое количество тройных комплексов и комплексов их с 40S субчастицей (что равносильно стимуляции процесса инициации), когда преимущественно повышается интенсивность трансляции слабоконкурирующих мРНК за лимитирующие компоненты.

Резюмируя вышеизложенное, следует подчеркнуть, что дискриминация трансляции отдельных мРНК с помощью факторов инициации может осуществляться вследствие изменения соотношения этих факторов, сдвига качественного состава их отдельных видов, структурных особенностей самих мРНК, обеспечивающих конкуренцию за лимитирующий компонент аппарата трансляции, а также вероятными модификациями в структуре белка и нуклеиновой кислоты, которые могут усиливать или ослаблять сродство между мРНК и факторами. Вряд ли есть основания полагать, что каждый из этих процессов может быть альтернативным. Скорее их вклад в общий регуляторный механизм может варьировать в зависимости от состояния клетки и целого ряда других условий. Вопросы, касающиеся участия конкретных факторов инициации в избирательной трансляции тех или иных мРНК эукариот, а также идентификации в мРНК и факторах структурных особенностей, определяющих сродство между ними и имеющих столь важное значение для проявления эффекта дискриминации мРНК на этапе трансляции, остаются до сих пор нерешенными. В этом отношении имеются лишь отдельные сведения.

Сродство матриц к факторам может быть неодинаковым из-за различий в 5'-нетранслируемом участке. Так, геномная РНК вируса желтой мозаики турнепса и мРНК β-глобина имеют высокоомологичные 5'-участки в области иницирующего кодона, и в бесклеточной системе интенсивность трансляции одной из матриц ингибируется вы-

сокими концентрациями другой [29]. 5'-нетранслируемый участок РНК сателитного вируса некроза табака, к которому фактор eIF-2 проявляет повышенную специфичность, включает область связывания рибосомальной РНК и иницирующей кодон. Возможно, что именно наличие экспонированного иницирующего кодона является одним из условий эффективной конкуренции за фактор eIF-2. Косвенным подтверждением такого предположения служат данные, согласно которым область иницирующего кодона в мРНК β -цепей, но не в мРНК α -цепей, глобина кролика и мышцы доступна для рибонуклеазы T [29].

Рей и др. [21] на основании изучения конкурентной способности экпированных и неэкпированных реовирусных РНК при различных концентрациях K^+ и Mg^{++} пришли к выводу, что ее определяет не наличие экп-группы, а проявление каких-то других особенностей структуры мРНК. Экп же играет важную роль в процессе инициации до или после того этапа, на котором происходит дискриминация отдельных мРНК. В этой связи особое внимание обращают данные работ [56, 61] о том, что степень угнетения образования инициаторного комплекса моноклональными антителами к белку 24 000 коррелирует с изменением выраженности вторичной структуры РНК вследствие замены уридина на бромурин и гуанина на инозин на 5'-конце реовирусных матриц. Такая же ситуация сохраняется и в случае ингибирования аналогами экпа связывания этих РНК с 40S субчастицами рибосом. Причем интенсивность трансляции реовирусных РНК в экстрактах из зараженных полиовирусом клеток *HeLa* увеличивается после замены в них гуанина на инозин и достигает уровня, обычно присущего для неэкпированных природных матриц (РНК вируса энцефаломиокардита и сателитного вируса некроза табака).

Возможно, экпсвязывающие белки необходимы, прежде всего, для трансляции мРНК с выраженной вторичной структурой [56, 57]. Поскольку при удалении экпа скорость трансляции мРНК глобина становится относительно нечувствительной к изменению рН, а также учитывая усиление с повышением рН ингибирующего эффекта аналога экпа, предполагается [62], что только энольная форма m^7GTP узнается экпсвязывающим комплексом белков. По-видимому, они денатурируют вторичную структуру 5'-конца мРНК, облегчая прикрепление рибосом на иницирующем кодоне [56, 57]. По мере продвижения вдоль мРНК рибосомальный комплекс способен уже сам дестабилизировать ее вторичную структуру [63].

В настоящее время убедительно продемонстрировано, что при определенных состояниях клетки происходит фосфорилирование факторов, участвующих в трансляции, но наиболее подробно оно изучено в отношении eIF-2. Фосфорилирование α -субъединицы этого фактора может осуществляться с помощью двух известных киназ. Одна из них является гемконтролируемым ингибитором синтеза белка, а вторая — активируется при наличии низких концентраций двуспиральной РНК [4]. Фактор eIF-2 высвобождается из рибосом в виде комплекса с GDP. Повторное функционирование eIF-2 возможно лишь после замещения в комплексе GDP на GTP, что катализируется специальным фактором (GEF). Причем его концентрация в клетках значительно ниже, чем eIF-2 [64]. Фактор GEF прочно связывается (в соотношении 1:1) с фосфорилированным eIF-2, в результате чего исключается возможность его участия в образовании тройного комплекса, а также снижается уровень обмена GDP на GTP в комплексе GDP с оставшимся немодифицированным eIF-2 или полностью блокируется этот процесс [64, 65]. При определенных условиях образование активной eIF-2 киназы, а также реакция фосфорилирования могут блокироваться либо повышается активность фосфатазы, что восстанавливает функцию eIF-2 фактора в инициации белкового синтеза [66].

Роль фосфорилирования отдельных факторов в дискриминации трансляции мРНК остается пока недоказанной. То же касается и значимости низкомолекулярных РНК или так называемых РНК контроля

трансляции, рассматриваемых в качестве негативного регулятора синтеза белка [67].

Анализ процесса трансляции мРНК позволяет вычленить еще одну стадию, которая может оказывать влияние на избирательное считывание матриц, особенно в узкоспециализированных клетках. Такой стадией является элонгация, оптимальное протекание которой обеспечивается функционированием ряда факторов, в том числе и соответствующего набора тРНК.

Синтез специфических белков в узкоспециализированных тканях сопровождается изменениями количественного соотношения индивидуальных тРНК в клеточном пуле в направлении установления их соотношения аминокислотному составу белков. Причем происходит перераспределение как количественного соотношения, так и изоакцепторного набора тРНК с увеличением содержания именно тех молекул, антикодон которых соответствует кодонам, встречающимся в большом количестве в мРНК специфических белков. Это явление получило название функциональной адаптации тРНК и, как оказалось, носит универсальный характер, поскольку наблюдается при синтезе целого ряда белков: казеина, фиброина, кристаллина, зеина, коллагена, овальбумина, глобина и др. [68—71]. Последующими исследованиями было установлено [72], что функциональная адаптация набора тРНК является частью механизма, регулирующего синтез белка на уровне трансляции. Обоснование регуляторной роли тРНК предложено [73], исходя из модели стохастического процесса, суть которого заключается в том, что продолжительность паузы элонгации определяется не только фактором обеспеченности кодонов необходимым количеством тРНК, но и сбалансированностью пула тРНК с частотой соответствующих кодонов в транслируемой мРНК. При таких условиях время поиска необходимой тРНК будет минимальным, скорость элонгации — максимальной.

На моделях синтеза ряда специфических белков в условиях *in vivo* и *in vitro* экспериментально подтверждается справедливость предложенной модели. При несбалансированном пуле тРНК синтезируются завершенные полипептиды, но скорость трансляции мРНК резко снижена и, возможно, деградирует либо на определенном этапе считывания мРНК наступает блок элонгации, сопровождающийся накоплением незавершенных полипептидов или полным отсутствием синтеза специфического белка [71—75]. Показано [76] также, что в присутствии гетерологичного набора тРНК возможен синтез аномального белка. Видимо, функцию отсутствующей изоакцепторной тРНК выполняет другая, вследствие чего накапливаются ошибки трансляции [77].

Дальнейшие исследования должны быть направлены на выяснение вопросов о том, насколько существенна для клеток система регуляции с помощью тРНК и может ли она определять дискриминацию синтеза специфических белков при одновременной трансляции соответствующих мРНК. В этом отношении имеются пока лишь единичные сведения. Так, Робинсон и др. [78] заменяли в гене хлорамфениколацетилтрансферазы *E. coli* участок ДНК, кодирующий четыре остатка аргинина и по одному — фенилаланина и лизина. Оказалось, что только в случае введения уникального кодона AGG (вместо CGT) для всех четырех остатков аргинина в условиях индукции высокого уровня экспрессии гена снижается синтез указанного белка. Ассельберг и др. [34, 35], изучая одновременную трансляцию мРНК глобина и РНК вируса желтой мозаики турнепса в бесклеточной системе из ретикулоцитов, предварительно обработанной микрококковой нуклеазой, не обнаружили влияния дополнительного внесения тотальной тРНК печени крысы на избирательный синтез глобина и вирусных белков. Вместе с тем другие авторы [79] показали, что при недостатке тРНК в бесклеточной системе из ретикулоцитов либо в случае использования насыщающих ее количеств, но при отсутствии некоторых изоакцепторных

форм синтез α -цепей составляет всего лишь 50 % уровня, характерного для β -цепей.

Еще очень мало известно и о том, как достигается адаптация набора тРНК к синтезу белков. В пользу транскрипционного контроля качественного состава тРНК свидетельствуют данные Гарелла и др. [80] о сравнимости скорости деградации многих видов тРНК и корреляции содержания определенных тРНК в цитоплазме с концентрацией их предшественников в клетке. Все же пока нельзя исключить возможную роль посттранскрипционных процессов в обеспечении адаптации набора тРНК к кодовому составу мРНК. Остается нерешенным также и вопрос о молекулярных основах регуляторной роли функциональной адаптации тРНК.

COMPETITION IN THE TRANSLATION OF EUKARYOTIC MESSENGER RNAs

N. F. Starodub, A. E. Rachkov

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

С у м м а р у

Discrimination of certain messenger RNAs in translation is demonstrated both *in vitro* and *in vivo* at the physiological state of cells and under the effect of extremal situations. The role of ribosomal proteins, ion concentration, translational factors, set of tRNA in providing of more efficient translation of some mRNAs as compared with others is discussed.

1. *Kramer G., Hardesty B.* Regulation of eucaryotic protein synthesis // *Cell Biol.*—1980.—4, N 1.—P. 69—105.
2. *Woodland H.* The translational control phase of early development // *Biosci. Repts.*—1982.—2, N 2.—P. 471—491.
3. *Austin S. A., Kay J. E.* Translational regulation of protein synthesis in eucaryotes // *Essays Biochem.*—1982.—18.—P. 79—120.
4. *Ochoa S.* Regulation of protein synthesis initiation in eucaryotes // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1983.—223, N 2.—P. 325—349.
5. *Croall D. E., Morrison M. R.* Polysomal and non-polysomal mRNA in neuroblastoma cells // *J. Mol. Biol.*—1980.—140, N 4.—P. 549—564.
6. *Walden W. E., Thach R. E.* The role of mRNA competition in regulation translation in normal fibroblasts // *Interaction translational and transcriptional control regulation gene expression.*—New York: Acad. press, 1982.—P. 399—413.
7. *Lodish H. F.* Alpha and beta globin messenger ribonucleic acid // *J. Biol. Chem.*—1971.—246, N 23.—P. 7131—7138.
8. *Translational discrimination between embryonic and adult mouse globin mRNAs in the rabbit reticulocyte lysate system* / M. G. Farace, A. Fantoni, G. Raschella et al. // *Acta biol. et med. ger.*—1981.—40, N 4/5.—P. 527—533.
9. *Liebhaber S. A., Kan Y. W.* Different rates of mRNA translation balance the expression of the two human α -globin loci // *J. Biol. Chem.*—1982.—257, N 20.—P. 11852—11855.
10. *Translation in vivo and in vitro of mRNAs coding for vitellogenin, serum albumin and very-low-density lipoprotein II from chick liver* / B. Wieringa, J. van der Zwaag-Gerritsen, J. Mulder et al. // *Eur. J. Biochem.*—1981.—114, N 3.—P. 635—641.
11. *Rosenthal E. T., Hunt T., Ruderman J. V.* Selective translation of mRNA controls the pattern of protein synthesis during early development of the surf clam *Spisula solidissima* // *Cell.*—1980.—20, N 2.—P. 487—494.
12. *Bierni M., Gurdon J. B.* The heat-shock response in *Xenopus* oocytes in controlled at the translational level // *Ibid.*—1982.—29, N 23.—P. 811—819.
13. *Лозовская Е. Р., Евгеньева М. Б.* Тепловой шок у дрозофилы и регуляция активности генома // *Молекулярная биология.*—М.: ВИНТИ, 1984.—С. 142—185.—(Итоги науки и техники; Т. 20).
14. *Banerji S. S., Theodorakis N. G., Morimoto R. I.* Heat shock-induced translational control of HSP 70 and globin synthesis in chicken reticulocytes // *Mol. and Cell. Biol.*—1984.—4, N 11.—P. 2437—2448.
15. *Key J. L., Lin C. V., Chen Y. M.* Heat shock proteins of higher plants // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1981.—78, N 6.—P. 3526—3550.
16. *Bag J.* Regulation of heat-shock protein synthesis in chicken muscle culture during recovery from heat shock // *Eur. J. Biochem.*—1983.—135, N 3.—P. 373—378.
17. *Panniers R., Henshaw E.* Mechanism of inhibition of polypeptide chain initiation in heat-shocked Ehrlich ascites tumor cells // *Ibid.*—1984.—140, N 1.—P. 209—214.

18. Kennedy J. M., Burdon R. H., Leader D. P. Heat shock causes diverse changes in the phosphorylation of the ribosomal proteins of mammalian cells // FEBS Letters.—1984.—169, N 2.—P. 267—273.
19. Purification of a factor that restores translation of VSV mRNA in extracts from polio-virus-infected HeLa cells / H. Trachsel, N. Sonenberg, A. J. Rose et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1980.—77, N 4.—P. 770—774.
20. Thomas J. R., Wagner R. R. Inhibition of translation in lysates of mouse L-cells infected with vesicular stomatitis virus: presence of a defective ribosome-associated factor // Biochemistry.—1983.—22, N 7.—P. 1540—1546.
21. Role of mRNA competition in regulating translation: further characterization of mRNA discriminatory initiation factors / B. K. Ray, Th. G. Brendler, S. Adya et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1983.—80, N 3.—P. 663—667.
22. Kaerlein M., Horak I. Identification and characterization of ribosomal proteins phosphorylated in vaccinia-virus-infected HeLa cells // Eur. J. Biochem.—1978.—90, N 3.—P. 463—469.
23. Ballinger D. T., Hunt T. Fertilization of sea urchin eggs is accompanied by 40S ribosomal subunit phosphorylation // Develop. Biol.—1981.—87, N 2.—P. 277—285.
24. Westermann P., Nygard O. Crosslinking of mRNA to initiation factor eIF-3, 24 kDa cap binding protein and ribosomal proteins S1, S3/3a, S6 and S11 within the 48S preinitiation complex // Nucl. Acids Res.—1984.—12, N 23.—P. 8887—8897.
25. Kruppa J., Clemens M. J. Differential kinetics of changes in the state of phosphorylation of ribosomal protein S6 and in the rate of protein synthesis in MPC II cells during tonicity shifts // EMBO Journal.—1984.—3, N 1.—P. 95—100.
26. Carrasco L., Smith A. E. Sodium ions and the shut-off of host cell protein synthesis by picornaviruses // Nature.—1976.—264, N 5588.—P. 807—809.
27. Control of peptide chain initiation in uninfected and virus infected cells by membrane mediated events / G. Koch, H. Oppermann, P. Bilello et al. // Modern trends in human leukemia.—Munich: Lehmanns Verlag, 1976.—P. 541—555.
28. Shull G. E., Thell E. C. Translational control of ferritin synthesis by iron in embryonic reticulocytes of the bullfrog // J. Biol. Chem.—1982.—257, N 23.—P. 14187—14191.
29. Kaempfer R. Messenger RNA competition: Protein biosynthesis in the eucaryotes // Proc. NATO. A.—1982.—41.—P. 441—457.
30. Lodish H. F. Model for the regulation of mRNA translation applied to hemoglobin synthesis // Nature.—1974.—251, N 5472.—P. 385—388.
31. Birge C. H., Colini F., Thach R. E. Methods for analyzing messenger discrimination in eucaryotic initiation factors // Meth. Enzymol.—1979.—60.—P. 375—380.
32. Leder Ph., Bursztyn H. Initiation of protein synthesis. A convenient assay for the ribosome-dependent synthesis of N-formyl-¹⁴C-methionylpuromycin // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1966.—25, N 2.—P. 233—238.
33. Vournakis J. N., Vary C. P. H. The role of mRNA structure in the regulation of protein synthesis: implications for studies of development // Develop. Genet.—1984.—4, N 4.—P. 313—332.
34. Asselbergs A. M., van Venrooij W. J., Bloemendal H. Messenger RNA competition in living Xenopus oocytes // Eur. J. Biochem.—1979.—94, N 2.—P. 249—254.
35. Preferential translation of mRNAs in an mRNA-dependent reticulocyte lysate / A. M. Asselbergs, E. Meulenberg, W. J. van Venrooij, H. Bloemendal // Ibid.—1980.—109, N 1.—P. 159—165.
36. Konijn A., Kaempfer R. Translational competition by mRNA species encoding ferritin, haemopexin, albumin and globin // Structure and function iron storage and transport proteins.—Amsterdam: Elsevier, 1983.—P. 97—103.
37. Lomedico P. T., Saunders G. F. Cell-free modulation of proinsulin synthesis // Science.—1977.—198, N 4317.—P. 620—622.
38. Pernuti M. A., Kipnis D. M. Insulin biosynthesis: on the mechanism of glucose metabolism // J. Biol. Chem.—1972.—247, N 4.—P. 1194—1199.
39. Lodish model and regulation of ribosomal protein synthesis by insulin-deficient chick embryo fibroblasts / G. G. Igotz, S. Hokari, R. M. de Philip et al. // Biochemistry.—1981.—20, N 12.—P. 2550—2558.
40. Monier S., Le Marchand-Brustel Y. Effects of insulin and IGFJ on RNA synthesis in isolated solens muscle // Mol. and Cell. Endocrinol.—1984.—37, N 1.—P. 109—114.
41. Walden W. E., Godefroy-Colburn Th., Thach R. E. The role of mRNA competition in regulating translation. I. Demonstration of competition in vivo // J. Biol. Chem.—1981.—256, N 22.—P. 11734—11746.
42. Sonenshein G. E., Brawermann G. Differential translation of rat liver albumin messenger RNA in a wheat germ cell free-system // Biochemistry.—1977.—16, N 25.—P. 5445—5448.
43. Lodish H. F. Translational control of protein synthesis // Ann. Rev. Biochem.—1976.—45.—P. 39—72.
44. Revel M., Groner Y. Post-transcriptional and translational controls of gene expression in eucaryotes // Ibid.—1978.—47.—P. 1079—1126.
45. Gren E. J. Recognition of messenger RNA during translational initiation in Escherichia coli // Biochimie.—1984.—66, N 1.—P. 1—29.
46. Худяков Ю. Е. Последовательность Шайна-Дальгарно и эффективность инициации трансляции // Молекуляр. биология.—1985.—19, № 3.—С. 702—716.
47. Payvar F., Schimke R. T. Methylmercury hydroxide enhancement of translation and transcription of ovalbumin and conalbumin mRNAs // J. Biol. Chem.—1979.—254, N 16.—P. 7636—7642.

48. *Falainik C. M., Wilkins C., Jacobson A.* Translational control during early dictyostelium development: possible involvement of poly(A) sequences // *Cell.*—1984.—36, N 4.— P. 1017—1025.
49. *Skup D., Zarbl H., Millward S.* Regulation of translation in L-cells infected with reovirus // *J. Mol. Biol.*—1981.—151, N 1.— P. 35—55.
50. *Tahara S. M., Morgan M. A., Shatkin A. J.* Two forms of purified m⁷G-cap binding protein with different effects on capped mRNA translation in extracts of uninfected and poliovirus-infected HeLa cells // *J. Biol. Chem.*—1981.—256, N 16.— P. 7691—7694.
51. *The effect of serum derivation on the initiation of protein synthesis in mouse neuroblastoma cells / M. M. M. Salimans, A. A. H. van Heugten, H. van Steeg, O. H. Voorma // Biochim. et biophys. acta.*—1985.—824, N 1.— P. 16—26.
52. *Rosen H., de Segni G., Kaempfer R.* Translational control by messenger RNA competition for eucaryotic initiation factor 2. // *J. Biol. Chem.*—1982.—257, N 2.— P. 946—952.
53. *Kabat D., Chappell M.* Competition between globin messenger ribonucleic acids for a discriminating initiation factor // *Ibid.*—1977.—252, N 8.— P. 2684—2690.
54. *Preferential stimulation of rabbit α -globin mRNA translation by a cap-binding protein complex / S. Gobinda, E. Isaac, G. Richard, N. Sonenberg // Biochim. et biophys. acta.*—1984.—783, N 2.— P. 122—129.
55. *Involvement of eucaryotic initiation factor 4A in the cap recognition process / I. Edey, M. Humbelin, A. Darveau et al. // J. Biol. Chem.*—1983.—258, N 18.— P. 11398—11403.
56. *Sonenberg N., Trachsel H.* Probing the function of the eucaryotic 5'-cap structure using monoclonal antibodies to cap-binding proteins // *Curr. Top. Cell. Regul.*—1982.—21.— P. 65—88.
57. *Tahara S. M., Morgan M. A., Shatkin A. J.* Binding of inosine-substituted mRNA to reticulocyte ribosomes and eucaryotic initiation factors 4A and 4B requires ATP // *J. Biol. Chem.*—1983.—258, N 18.— P. 11350—11353.
58. *Heywood S. M., Kennedy D. S.* Messenger RNA affinity column fractionation of eIF-3 and associated proteins and the translation of myosin mRNA // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1979.—192, N 2.— P. 270—281.
59. *Encapsulation of core eIF-3, regulatory components of eIF-3 and mRNA into liposomes, and their subsequent uptake into myogenic cells in culture / J. O. Loughlin, L. Lehr, A. Havaranis, S. M. Heywood // J. Cell Biol.*—1981.—90, N 2.— P. 160—168.
60. *Hunt T.* The initiation of protein synthesis // *Trends Biochem. Sci.*—1980.—5, N 7.— P. 178—181.
61. *Sonenberg N., Guertin D., Lee K. A. W.* Capped mRNAs with reduced secondary structure can function in extracts from poliovirus-infected cells // *Mol. and Cell. Biol.*—1982.—2, N 12.— P. 1633—1638.
62. *Translational recognition of messenger ribonucleic acid caps as a function of pH / R. E. Rhoads, G. M. Hellmann, P. Remy, J.-P. Ebel // Biochemistry.*—1983.—22, N 26.— P. 6084—6088.
63. *Liebhaver S. A., Cash F. E., Shakin S. H.* Translationally associated helix-destabilizing activity in rabbit reticulocyte lysate // *J. Biol. Chem.*—1984.—259, N 24.— P. 15597—15602.
64. *Matts R. L., London I. M.* The regulation of initiation of protein synthesis by phosphorylation of eIF-2(α) and the role of reversing factor in the recycling of eIF-2 // *Ibid.*—N 11.— P. 4708—4711.
65. *Studies on the role of eucaryotic nucleotide exchange factor in polypeptide chain initiation / D. J. Gross, L. J. Parkhurst, H. B. Mehta et al. // Ibid.*—N 12.— P. 7374—7377.
66. *Translational control by adenovirus: Lack of virus-associated RNA_i during adenovirus infection results in phosphorylation of initiation factor eIF-2 and inhibition of protein synthesis / J. Siekierka, Th. M. Mariano, P. A. Reichel, M. B. Mathews // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1985.—82, N 7.— P. 1959—1963.
67. *Smith J. H., Subbatao M. N., Eliceiri G. L.* Small nuclear RNAs and translation // *J. Cell. Physiol.*—1983.—114, N 1.— P. 1—6.
68. *Ельська А. В., Мацука Г. Х.* Деякі особливості тРНК тканини молочної залози за різних функціональних станів // *Укр. біохім. журн.*—1968.—40, № 1.— С. 27—32.
69. *Остерман А. А.* Об участии тРНК в регулировании биосинтеза белка на уровне трансляции у эукариотов // *Успехи биол. химии.*—1980.—21, № 6.— С. 54—78.
70. *Pickett M. H., White B. N., Davies P. L.* Evidence that translational control mechanisms operate to optimize antifreeze protein production in the winter flounder // *J. Biol. Chem.*—1983.—258, N 24.— P. 14762—14765.
71. *Effect of transfer RNA from various sources on placental messenger RNA translation / S. J. Kelly, J. Loris, M. T. Gyves, J. Ilan // Mol. and Cell. Endocrinol.*—1983.—29, N 2.— P. 181—185.
72. *Роль функциональной адаптации тРНК в регуляции биосинтеза специфических белков / А. В. Ельская, Г. В. Турковская, Н. Ф. Стародуб, О. Т. Рожко // Биохимия.*—1983.—48, № 4.— С. 611—616.
73. *Chavancy G., Garel J.-P.* Does quantitative tRNA adaptation to codon content in mRNA optimize the ribosomal translation efficiency. Proposal for a translation system model // *Biochimie.*—1981.—61, N 1.— P. 187—195.
74. *Турковская Г. В., Стародуб Н. Ф.* Влияние экзогенных тРНК различного происхож-

- дения на биосинтез белков молока // Молекуляр. биология.—1984.—18, № 5.— С. 1380—1384.
75. *Beier H., Barciszewska M., Sickinger H.-D.* The molecular basis for the differential translation of TMV RNA in tobacco protoplasts and wheat germ extracts // EMBO J.—1984.—3, N 5.— P. 1091—1096.
76. *Sharma O. K., Livingston L. M., Borek E.* Functional differences in protein synthesis between rat liver tRNA and tRNA from novikoff hepatoma // Biochemistry.—1975.—14, N 3.— P. 500—513.
77. *Ельская А. В., Солдаткин А. П.* Основы высокой точности трансляции // Молекуляр. биология.—1984.—18, № 5.— С. 1163—1180.
78. *Codon usage can effect efficiency of translation of genes in Escherichia coli / M. Robinson, R. Lilley, S. Little et al.* // Nucl. Acids Res.—1984.—12, N 17.— P. 6663—6671.
79. *Gilbert J. M., Anderson W. E.*, Cell free hemoglobin synthesis. II. Characteristics of the transfer ribonucleic acid-dependent assay system // J. Biol. Chem.—1970.—245, N 9.— P. 2342—2349.
80. *Adaptation of iso-tRNA concentration to mRNA codon frequency in the eucaryote cell / G. Chavancy, A. Chevallier, A. Fournier, J.-P. Garel* // Biochimie.—1979.—61, N 1.— P. 71—78.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 24.12.85

Вниманию подписчиков!

С 1985 г. ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКОВА ДУМКА» ВЫПУСКАЕТ ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ ОТДЕЛЕНИЯ БИОХИМИИ, ФИЗИОЛОГИИ И ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ АН УССР

БИОПОЛИМЕРЫ И КЛЕТКА

Журнал публикует результаты фундаментальных и прикладных исследований взаимосвязи структуры и функции биополимеров, их взаимодействия при образовании и функционировании надмолекулярных структур, участия биополимеров в таких процессах, как регуляция экспрессии генетической информации, дифференцировка, онкогенез, взаимодействие клетка—вирус и т. д., а также направленного изменения генотипа и фенотипа клетки.

В журнале представлены постоянные рубрики: «Структура и функция биополимеров», «Клеточная биология» и переменные: «Геном и его регуляция», «Молекулярные механизмы дифференцировки», «Вирусы и клетка», «Генноинженерная биотехнология». Оперативная публикация приоритетных материалов осуществляется в рубрике «Краткие сообщения».

Кроме оригинальных статей, в каждом номере публикуются обзорные статьи, хроника, информация о съездах и конференциях, рецензии.

Журнал рассчитан на научных работников, преподавателей вузов, специалистов в области биологии, медицины и сельского хозяйства, ведущих исследования по проблемам молекулярной и клеточной биологии и генетической инженерии.

Периодичность — 6 номеров в год. Подписная цена: на 12 мес.— 3 руб. 90 коп. Цена одного экземпляра — 65 коп.

Индекс 70200.

Подписка принимается в агентствах и отделениях «Союзпечать», отделениях связи и общественными распространителями печати.
