

Полиаденилирование про-мРНК. 1. Образование 3'-концов мРНК позвоночных

М. И. Зарудная

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

В обзоре изложены современные представления о процессе образования 3'-концов мРНК позвоночных: охарактеризованы участвующие в реакции белки и сигнальные последовательности про-мРНК, направляющие реакцию, описан процесс сборки комплекса полиаденилирования, обсуждена связь между полиаденилированием и процессами транскрипции и сплайсинга, приведены примеры регуляции реакции образования 3'-концов мРНК.

Введение. Поли(А)-последовательности, ковалентно присоединенные к 3'-концам мРНК, участвуют в таких внутриклеточных процессах, как транспорт мРНК из ядра в цитоплазму [1], контроль их времени жизни [2, 3], инициация трансляции [4] и, возможно, внутриклеточная локализация мРНК [5]. Полиаденилированию подвергаются предшественники мРНК всех живых организмов от бактерий до человека [6]. Среди эукариотов не имеют 3'-концевых поли(А)-последовательностей только гистоновые мРНК репликативно зависимых генов высших эукариотов. Тем не менее, их 3'-концы также образуются в результате модификации транскрипта — специфического эндонуклеотического расщепления [7] и представляют собой консервативную последовательность, содержащую шпилькообразную структуру. Эта структура, как и специфически связанные с ней белки, существенна для функционирования гистоновых мРНК. Она подобно 3'-концевой поли(А)-последовательности участвует в процессах транспорта мРНК [8], дестабилизации [9] и инициации трансляции [10].

В представленной здесь первой части обзора обсуждается реакция полиаденилирования про-мРНК позвоночных, а во второй — будет рассмотрен процесс образования 3'-концов мРНК дрожжей, растений и вирусов, а также процесс полиаденилирования РНК прокариотов.

Белки, участвующие в реакции полиаденилирования про-мРНК. 3'-Концевые поли(А)-последовательности мРНК эукариотов образуются в ре-

зультате двухстадийной реакции: сначала происходит специфическое эндонуклеотическое расщепление мРНК-предшественника, а затем — синтез поли(А) на вновь образовавшемся 3'-конце [11]. Реакция осуществляется комплексом белков и зависит от наличия в 3'-нетранслируемой области (3' UTR) про-мРНК сигнальных последовательностей, определяющих место расщепления и эффективность реакции. Минимальный набор белков, требующихся для процесса расщепления/полиаденилирования, представлен в табл. 1. Для первой стадии реакции — расщепления — необходимы: фактор специфичности расщепления/полиаденилирования (CPSF), фактор стимулирования расщепления (CstF), факторы расщепления (CF I_m и CF II_m (m — mammalian)) и в большинстве случаев поли(А)-полимераза (РАР). Следует отметить, что до сих пор еще не установлено, какой из полипептидов, входящих в состав перечисленных факторов, обладает эндонуклеазной активностью и непосредственно осуществляет расщепление. На второй стадии — синтез поли(А) — участвуют РАР, CPSF и поли(А)-связывающий белок (РАВР2).

Поли(А)-полимераза относится к семейству нуклеотидилтрансфераз [18]. Каталитический домен этих ферментов характеризуется наличием трех консервативных остатков аспарагиновой кислоты и типичной организацией β-слоев и α-спиралей. Три карбоксилата РАР, вероятно, связывают два иона Mg²⁺, координирующих α-фосфат «входящего» АТФ и группу 3'-ОН праймера [18].

Из табл. 1 видно, что в последовательностях

Таблица 1
Белки высших эукариотов, участвующие в реакции полиаденилирования про-мРНК ([12], а также ссылки в таблице)

| Белок | Субъединица, кДа | Обнаруженные специфические мотивы | Полнуклеотиды, с которыми выявлены специфические взаимодействия | Белки, с которыми обнаружены контакты |
|------------------------|-----------------------|---|---|---------------------------------------|
| CPSF | CPSF-160 | Предполагаемый RBD типа RNP2/RNP1; предполагаемый NLS | PHK, содержащая сигнал AAUAAA; PHK, содержащая U-богатый элемент [13] | CstF-77; PAP |
| | CPSF-100 | — | — | — |
| | CPSF-73 | — | — | — |
| | CPSF-30 | Предполагаемые цинк-связывающие домены: пять повторов C-X ₇ -C-X ₅ -C-X ₃ -H (цинковый палец) и один мотив C-X ₂ -C-X ₄ -H-X ₄ -C (цинковый сустав) | поли(U) | PAB P2 [1] |
| CstF | CstF-77 | 11 полутетратрикопептидных повторов (HAT) [14]; NLS; P-богатая область | — | CstF-64; CstF-50; CPSF-160 |
| | CstF-64 | RBD типа RNP2/RNP1; P/G-богатый участок; 12 мотивов MEARA/G | PHK, содержащая U/GU-повторы | CstF-77 |
| | CstF-50 | Семь повторов WD-40 | — | CstF-77 |
| CF I _m [15] | CF I _m -72 | — | — | — |
| | CF I _m -68 | Предполагаемый RBD типа RNP2/RNP1; P-богатая область; домен с чередующимися зарядами | мРНК, содержащая сигналы полиаденилирования | — |
| | CF I _m -59 | — | — | — |
| | CF I _m -25 | — | — | — |
| CF II _m | — | — | — | — |
| PAP | PAP ≈ 80 [16] | Предполагаемый RBD типа RNP1 [17]; нуклеотидилтрансферазный домен; RBD [18]; два NLS; S/T-богатый домен | — | CPSF-160 |
| PABP2 | PABP 2-33 [19] | E-богатый домен; RBD типа RNP2/RNP1; R-богатый домен | поли(A), поли(G) [20] | CPSF-30 |

Примечание. RBD — PHK-связывающий домен; NLS — сигнал ядерной локализации.

аминокислот белков, осуществляющих полиаденилирование про-мРНК, выявлены и другие консервативные мотивы, кроме каталитического домена PAP. Одни из них важны для взаимодействия между белками и РНК (PHK-связывающий домен, содержащий мотивы RNP2 и RNP1, и цинк-связывающие домены [21]). Наличие других мотивов может свидетельствовать о белково-белковых взаимодействиях (WD-40 повторы [22], пролин-богатые домены и домены с чередующимися зарядами [15], HAT-повторы [14]). Через эти мотивы могут осуществляться взаимодействия (они указаны в четвертом и пятом столбцах табл. 1 соответственно) между данной субъединицей и РНК или другими белками.

Следует отметить, что некоторые белки аппарата полиаденилирования позвоночных, например

PAP, представлены различными формами [12]. Зао и Мэнли [23], детально изучившие структуру и экспрессию шести разных форм поли(A)-полимеразы мыши, выяснили, что три формы фермента (PAP I, II и IV) образуются в результате альтернативного сплайсинга 3'-концевых экзонов (высокомолекулярные формы), а остальные три — вследствие конкуренции между полиаденилированием и сплайсингом (низкомолекулярные формы). Они установили, что мРНК PAP II, V и VI присутствуют во всех исследованных тканях, а мРНК PAP I и/или IV и III — тканеспецифичны. Авторы не обнаружили в тканях мыши белков с молекулярной массой (м. м.) ≈ 43 кДа, которые могли бы быть образованы при трансляции коротких форм мРНК PAP (III, V и VI), и показали, что соответствующие низкомолекулярные рекомбинантные белки не

обладают ферментативной активностью при проверках в системе *in vitro*. Функции коротких форм мРНК PAP пока неизвестны.

Высокомолекулярные каталитически активные формы PAP содержат С-концевые серин/треонин-богатые домены (табл. 1), фосфорилирующиеся *in vivo*, по-видимому, под действием комплекса *cdc2/cyclin B*. Гиперфосфорилирование PAP, например, во время митоза приводит к репрессии ферментативной активности [12].

Разные формы имеет также CstF. Бейер и соавт. [24] обнаружили, что CstF, выделенный из тимуса телят, в отличие от аналогичного белка, выделенного из клеток человека (HeLa), содержит наряду с субъединицей CstF-64 ее новую форму CstF-70. Существование двух различных форм средней по размеру субчастицы фактора CstF обнаружено также и другими авторами [25]. Форма с м. м. 70 кДа тканеспецифична, в частности, только эта форма присутствует в мейотических сперматоцитах мыши [25].

Гетерогенным, по-видимому, является также белок CF I_m. Рюэгсеггер и соавт. [15] показали, что в реакции расщепления про-мРНК этот белок может быть заменен димером, состоящим из субъединиц с м. м. 25 и 68 кДа. Авторы предположили, что CF I_m существует в двух или трех различных формах: CF I_m^{25/59}, CF I_m^{25/68} и, возможно, CF I_m^{25/72}. В состав этих белков входят общая низкомолекулярная субъединица и разные высокомолекулярные полипептиды.

Сигнальные последовательности про-мРНК, направляющие процесс полиаденилирования. Необходимым условием осуществления реакции расщепления/полиаденилирования является наличие в про-мРНК как минимум двух сигнальных последовательностей — высококонсервативного гексамера AAUAAA и расположенного за ним U/GU-богатого элемента [11, 12, 16]. Расщепление происходит между этими сигналами. Гексамер узнается полипептидом CPSF-160, а дальний сигнал — белком CstF-64. Единичные замены в сигнале AAUAAA приводят к значительному уменьшению эффективности реакции полиаденилирования [26]. Единственным сравнительно эффективно используемым вариантом канонического гексамера AAUAAA является элемент AUUAAA. Он встречается наиболее часто среди сигналов с единичными заменами [11, 27].

Для описания U/GU-богатого сигнала обычно используют такие определения, как: «менее консервативный, чем AAUAAA», «вариабельный», «не описываемый адекватным консенсусом» и т. п. [16, 11—13, 16] и др.). В то же время детальный анализ

имеющихся в литературе данных позволяет охарактеризовать этот элемент более точно.

Рассмотрим эти данные. Виллоз и Шенк [28] показали, что олиго(U)-тракт из пяти нуклеотидов может успешно исполнять роль природных «нижних» (downstream) сигналов про-мРНК вирусов животных SV40 L (simian virus, Late), SV40 E (Early) и Ad L3 (adenovirus). Однако и элемент из четырех U-остатков достаточен для осуществления реакции полиаденилирования про-мРНК SV40 L [29]. Более того, функциональными сигналами являются также пентамеры, состоящие из четырех уридилловых остатков и одного А-, С- или G-остатка, занимающего любую позицию в пентамере — так называемый «four-out-of-five base URE» [30, 31]. Назовем его «четыре U из пяти». Чен и соавт. [31], выявив среди представленных в электронной базе данных (Gen Bank) нуклеотидных последовательностей генов животных те из них, которые содержат наряду с гексамером AAUAAA также и «нижний» сигнал полиаденилирования, показали, что в 102 из 131 такой последовательности имеется U-богатый элемент (URE) типа «четыре U из пяти», расположенный преимущественно на расстоянии 10—30 нуклеотидов от места расщепления. Они пришли к выводу, что такой элемент является основным «нижним» сигналом полиаденилирования про-мРНК. Элемент «четыре U из пяти» входит в состав многих сигналов полиаденилирования, выявленных экспериментальными методами, например [32—38]. С последовательностями, содержащими такие сигналы, непосредственно контактирует, как зарегистрировано методом УФ-сшивок, полипептид CstF-64 [29] (рис 1.).

«Нижний» сигнал полиаденилирования могут замещать не только U-богатые, но и GU-богатые элементы, например, последовательность GUUGUGGU [35], составляющая часть «нижнего» сигнала полиаденилирования про-мРНК SV40 E. Интересно отметить, что замена любого G в динуклеотиде GG этого элемента на U, то есть разрушение G-повтора, приводит к увеличению эффективности реакции полиаденилирования в системе *in vivo* приблизительно в три раза. Этот эффект находится в соответствии с результатами работы [42], авторы которой, используя метод SELEX (селекция высокоспецифических мест связывания), установили, что изолированный РНК-связывающий домен полипептида CstF-64 специфически взаимодействует с GU-богатыми элементами, состоящими из GU- и U-повторов, но без G-повторов. Они показали также, что такие элементы специфически узнаются фактором CstF и могут исполнять роль «нижних» сигналов в реакции расщепления про-мРНК.

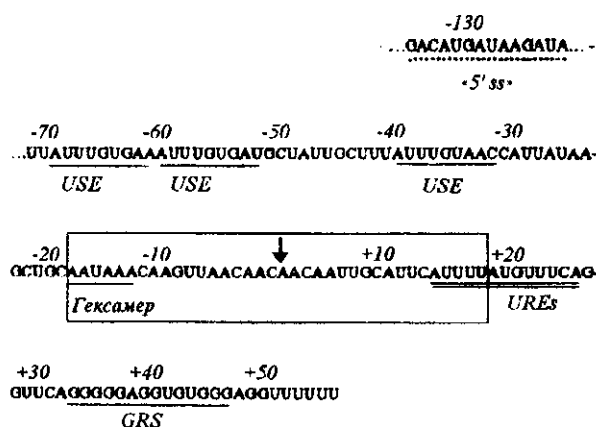


Рис. 1. Нуклеотидная последовательность про-мРНК SV40 L [32] в области места расщепления (показано стрелкой). Места взаимодействия с белками [39, 40] подчеркнуты прямой чертой, с U1-мРНК [41] — пунктирной линией. Двойной чертой подчеркнуто место связывания CstF-64 [29]. В прямоугольнике заключены сигнальные последовательности, минимально необходимые для осуществления реакции полиаденилирования. USE — upstream sequence element; «5' ss» — псевдо-5'-сайт сплайсинга, GRS — G-богатая последовательность; URE — U-богатый элемент

Согласно экспериментальным данным, такие последовательности, как GGGUGUU [36] и UGU-GU [34], составляют часть «нижнего» сигнала, поскольку замещение этих трактов в природных сигналах на неспецифические последовательности приводит к уменьшению эффективности реакции полиаденилирования. Последовательность GUUG-UGGU, как уже упоминалось выше, может играть роль «нижнего» сигнального элемента [35]. В этих G/U-богатых последовательностях участки, состоящие из чередующихся G- и U-остатков, составляют собой пентамеры. Можно предположить, что эти пентамеры (GUGUU, UGUGU и GUUGU), состоящие из расположенных в любом порядке двух GU и одного U, являются еще одной простой формой «нижнего» сигнала наряду с элементом «четыре U из пяти».

В работе [32] приведены 95 нуклеотидных последовательностей ДНК высших эукариотов и их вирусов в области места расщепления про-мРНК. Мы проанализировали, как часто среди этих последовательностей на соответствующем расстоянии от места расщепления (см. следующую главу) встречаются пентамеры «четыре U из пяти» и «два GU и один U» или более длинные последовательности,

включающие U/GU-пентамеры и содержащие дополнительные (GU)_n- и / или U_n-тракты. Результаты этого анализа представлены в табл. 2. Следует отметить, что примерно половина про-мРНК, включающих пентамеры «два GU и один U» (класс II), содержит их в составе более длинных трактов, состоящих из GU-димеров и U-остатков. Например, элемент UGUGU встречается, в основном, в составе тракта (U)GUGUGU. Элементы UGUGU и GUGUU встречаются среди элементов класса II наиболее часто.

Этот результат согласуется с данными Грабера и соавт. [27], которые с помощью компьютерных методов проанализировали нуклеотидные последовательности нескольких тысяч про-мРНК разных организмов в области места расщепления. Они показали, что в случае про-мРНК плодовой мушки в позиции «нижнего» сигнала чаще всего встречаются тракты UGUGUUU, UGUGUU и UUUUUU (анализировали «слова» из шести нуклеотидов). Заметим, что аппараты полиаденилирования насекомых и позвоночных, по-видимому, одинаковы в отличие от соответствующего аппарата дрожжей. Об этом, в частности, свидетельствует тот факт, что в состав комплекса полиаденилирования про-мРНК дрозофилы так же, как и в случае позвоночных, входит поли(A)-связывающий белок PABP2 [43], тогда как дрожжевые про-мРНК полиаденилируются при участии Pab 1p [16].

Из результатов, представленных в табл. 2, видно, что 80 % последовательностей мРНК, приведенных в работе [32], содержат пентамеры «четыре U из пяти» или «два GU и один U», расположенные дальше места расщепления. На самом деле количество таких последовательностей, по-видимому, занижено, поскольку не учтены более отдаленные U/GU-богатые элементы, которые могут быть приближены к гексамеру AAUAAA, если участки РНК между этими сигналами участвуют в образовании двойной спирали, как это имеет место в случае про-мРНК вируса HTLV 1 (human T cell leukemic virus) [44]. В литературе встречаются также данные о наличии «нижних» сигналов, не содержащих U- или GU-богатых элементов. Такой сигнал имеет, например, про-мРНК Ad L4 [45].

Как следует из данных табл. 2, U-богатые элементы встречаются в составе обследованных последовательностей значительно чаще, чем GU-богатые, но доля про-мРНК, содержащих GU-богатые элементы, возможно, занижена, поскольку последовательности типа GUUGUU мы учитывали как содержащие элемент «четыре U из пяти», а не «два GU и один U». Из этой таблицы также видно, что 33 % последовательностей содержат не один, а

Таблица 2
Состав «нижних» сигналов полиаденилирования про-мРНК
высших эукариотов

| Элемент | Вариант | Про-мРНК, содержащие данный элемент, % |
|--|---------|--|
| I, «четыре U из пяти» | XUUUU | 63 |
| | UXUUU | |
| | UUXUU | |
| | UUUXU | |
| | UUUUU | |
| II, «два GU и один U» | GUGUU | 28 |
| | UGUGU | |
| | GUUGU | |
| I или II | — | 80 |
| Не менее двух элементов типа I/II | — | 33 |
| Кластеры ($n \geq 3$) из G-повторов, расположенные дальше элементов I/II | — | 19 |

два и более U/GU-богатых элементов. И, наконец, любопытным является тот факт, что 19 % последовательностей содержат кластеры G-повторов, расположенные немного дальше U/GU-богатого элемента. Насколько нам известно, ранее в литературе о таком наблюдении не сообщалось. Один из таких кластеров имеется в про-мРНК SV40 L (см. рис. 1). В этом случае G-богатая последовательность (GRS) является местом связывания белка DSEF-1 (downstream element factor) из семейства белков гяРНП [40, 46]. Специфическое взаимодействие DSEF-1 с GRS приводит к стимулированию реакции образования 3'-конца мРНК. Подобную роль, возможно, играют также G-богатые участки, входящие в состав других транскриптов. Не исключено, что участки про-мРНК, состоящие из четырех G-кластеров (в некоторых случаях — из трех), сворачиваются с образованием четырехцепочечных структур, содержащих G-тетрады. Модели таких структур для теломерных олигонуклеотидов предложены в работе [47].

Авторы статьи [32], материалами которой мы воспользовались для построения табл. 2, пришли к выводу, что последовательность YGUGUUYU, где Y обозначает пиримидиновый остаток, является консенсусом для U/GU-богатого сигнала полиаденилирования, поскольку 67 % проанализирован-

ных генов содержат тракты, гомологичные этому элементу. Другие консенсусы, предложенные на основании анализа многих генов, представляют собой последовательности AGGUUUUUU [48] и UUG/ANNNUUUUUU [37]. Однако ни один из ранее предложенных консенсусов не признан в литературе удовлетворительным. В недавней работе Бейера и соавт. [24] представлен новый консенсус YGUGUYN₀₋₄UUYAYUGYGU. Авторы изучали связывание высокоочищенных факторов CstF из тимуса теленка и клеток человека HeLa с полинуклеотидами разного состава. Они отметили, в частности, что факторы из организмов разных видов преимущественно связывались с различными последовательностями. Консенсус, предложенный Бейером и соавт. [24], так же, как и последовательности, предложенные ранее [32, 37, 48], содержат простые элементы, приведенные в табл. 2. Мы полагаем, что единого консенсуса для описания «нижнего» сигнала полиаденилирования про-мРНК, возможно, и не существует, но определение этого сигнала как «U- и/или GU-богатого тракта» является в свете вышеизложенного вполне конкретным. По-видимому, «нижний» сигнал полиаденилирования про-мРНК представляет собой последовательность, содержащую один или более U- и/или GU-богатых элементов с минимальной длиной, равной пяти нуклеотидам. Пентамеры содержат расположенные в любом порядке четыре нуклеотида U или два GU и один U. Мы полагаем также, что узнавание U- и GU-богатых сигналов происходит, возможно, через узнавание и в том, и в другом случаях двух—трех специфически расположенных уридиловых остатков.

Процесс расщепления/полиаденилирования про-мРНК. В работе Чена и соавт. [31] представлена модель организации сайта полиаденилирования про-мРНК животных, т. е. области транскрипта, содержащей гексамер AAUAAA и U/GU-богатый элемент. Авторы изучали процесс расщепления сконструированных ими РНК (содержащих сайт полиаденилирования про-мРНК SV40 L), в которых менялось расстояние между гексамером и «нижним» U-богатым элементом. Кроме того, они проанализировали местоположение 131-го природного сайта полиаденилирования, используя базу данных нуклеотидных последовательностей Gen Bank.

Авторы показали, что расщепление происходит в месте, расположенном на расстоянии не ближе, чем 11, и не дальше, чем 23 нуклеотида, от гексамера AAUAAA. Оптимальное расстояние URE от места расщепления составляет 10—30 нуклеотидов, но этот элемент может располагаться и ближе.

Следует отметить, что эффективность реакции расщепления снижается несколько более медленно при увеличении расстояния между гексамером AAU-AAA и GU-богатым «нижним» элементом, чем при смещении URE [35]. Смещение URE в рамках его оптимальной локализации приводит к смещению в том же направлении места расщепления. Относительное расположение гексамера и URE определяет область длиной ≈ 6 нуклеотидов, в которой происходит выбор места расщепления. Выбор производится в следующем порядке: $A > U > C \gg G$. Авторы работы [31] предположили, что выявленная ими структура сайта полиаденилирования отражает пространственные ограничения при взаимодействии белковых факторов CPSF и CstF, связанных с сигнальными последовательностями, а образование комплекса этих белков служит «платформой» для сборки остальных факторов, участвующих в реакции расщепления.

Однако сборка комплекса белков аппарата полиаденилирования начинается, по-видимому, не с взаимодействия CPSF и CstF с соответствующими сигналами про-мРНК и друг с другом. Эксперименты по изучению кинетики реакции расщепления [15] свидетельствуют в пользу того, что одним из наиболее ранних событий в процессе полиаденилирования про-мРНК является взаимодействие фактора CF I_m (наряду с CPSF) с про-мРНК. Это взаимодействие ускоряет доставку остальных компонентов комплекса. Механизм участия CF I_m в сборке комплекса расщепления про-мРНК пока неизвестен.

Как уже упоминалось выше, кроме CPSF, CstF и CF I_m, в состав комплекса расщепления входят также CF II_m, функции которого в настоящее время неизвестны, и PAP. Поли(А)-полимераза не является необходимым компонентом комплекса расщепления, поскольку про-мРНК SV40 L может расщепляться и без ее участия [11], однако PAP стимулирует эту реакцию [11].

Необходимым компонентом процесса расщепления является кофактор. Как показали Хирозэ и Мэнли [49], в случае про-мРНК SV40 L эту роль может исполнять креатинфосфат (CP) и некоторые другие соединения, например аргининфосфат. АТФ не требуется для расщепления про-мРНК SV40 L, более того, при определенных условиях он является ингибитором. CP не используется в качестве источника энергии, поскольку он не гидролизует в процессе реакции расщепления и его фосфатная группа не переносится на белки. Однако в случае другого транскрипта (про-мРНК Ad L3), расщепление которого происходит с участием PAP, CP стимулирует реакцию расщепления незначительно,

а АТФ не только является эффективным кофактором, но и способен влиять на выбор места расщепления.

Учитывая, что CP стимулирует реакцию расщепления про-мРНК *in vitro* при высоких концентрациях (порядка 20—60 мМ), не являющихся физиологическими, авторы работы [49] предположили, что это соединение и ему подобные замещают в системе *in vitro* истинный физиологический кофактор, возможно, фосфопротеин, содержащий фосфоаргинин.

В работе [50] использована оригинальная методика исследования процесса расщепления/полиаденилирования про-мРНК *in vivo*. Авторы сконструировали ДНК-матрицы, в которые на разные расстояния дальше участка, соответствующего месту расщепления транскрипта, помещали инвертированную копию сегмента ДНК, содержащего сигнальные последовательности полиаденилирования. При транскрипции таких ДНК происходили два конкурентных процесса: сайт полиаденилирования либо участвовал в образовании двойной спирали с инвертированной копией, либо направлял сборку комплекса расщепления/полиаденилирования, которая происходила лишь в том случае, если инвертированный сегмент находился достаточно далеко и РНК-полимераза не успевала его транскрибировать. Авторы оценили время, которое занимает процесс расщепления/полиаденилирования про-мРНК SV40 E *in vivo*. Оно оказалось равным 10—20 с. Полученные в работе [50] зависимости эффективности реакции полиаденилирования от места расположения инвертированного повтора и его длины проще всего описываются моделью, согласно которой длина участка про-мРНК, вовлеченного в сборку комплекса, постепенно возрастает до ≈ 200 нуклеотидов. Этот факт может свидетельствовать, например, о последовательном добавлении разных факторов к комплексу расщепления или же о конформационных перестройках комплекса, образовавшегося в результате одновременного связывания всех факторов.

В работе [50] также показано, что сборка комплекса происходит в несколько раз быстрее на про-мРНК SV40 L, содержащей «сильный» сайт полиаденилирования, чем на про-мРНК SV40 E, которая содержит более «слабый» сайт. Этот результат свидетельствует о том, что эффективность сигналов полиаденилирования может коррелировать не со стабильностями собранных на них комплексов, как считали до сих пор [11, 16], а со скоростями сборки.

В реакции образования 3'-концов мРНК, кроме белков, представленных в табл. 1, участвуют

также РНК-полимераза II и белки, связанные с 5'-кэп структурой ($m^7G(5')ppp(5')N$) про-мРНК. Флагерти и соавт. [51] показали, что СВС (кэп-связывающий комплекс), связанный с кэп-структурой, взаимодействует с факторами полиаденилирования, связанными с сигнальными элементами, и стимулирует реакцию расщепления. Взаимодействие происходит с участием еще не идентифицированного фактора(ов).

Что касается РНК-полимеразы II, то существует мнение, что она выполняет в реакции образования 3'-концов мРНК две функции: доставляет белковые факторы полиаденилирования к сигнальным последовательностям про-мРНК и непосредственно участвует в реакции расщепления [16]. МакКркен и соавт. [52] показали, что для эффективного процесса полиаденилирования необходим С-концевой домен (CTD) наибольшей субъединицы РНК-полимеразы II. Он образует специфические комплексы с факторами CstF и CPSF. При исследовании связывания отдельных субъединиц CstF с CTD оказалось, что CstF-50 взаимодействует с CTD очень эффективно, CstF-77 — значительно менее эффективно, а CstF-64 не связывается совсем. Авторы другой работы [53] обнаружили, что фактор транскрипции TFIID доставляет CPSF к комплексу преинициации, сборка которого предшествует инициации транскрипции РНК-полимеразой II. После начала транскрипции CPSF оказывается связанным с элонгирующей РНК-полимеразой.

Хирозэ и Мэнли [54] показали, что РНК-полимераза II необходима для образования 3'-концов мРНК и вне связи с процессом транскрипции (в отсутствие фосфатных соединений). Причем один CTD необходим и достаточен для стимулирования реакции. Поскольку при добавлении высокоочищенной РНК-полимеразы к ядерным экстрактам, из которых этот фермент был предварительно удален осаждением антителами, более активной являлась форма РНК-полимеразы, содержащая гиперфосфорилированный CTD, авторы предположили, что именно она участвует в процессе полиаденилирования про-мРНК *in vivo*. В этой работе также сделан ряд предположений о механизме участия РНК-полимеразы II в реакции расщепления. В частности, авторы считают, что реакция может происходить сразу же, как только транскрибированы сигналы полиаденилирования, или же CTD при продолжении транскрипции может оставаться в контакте с доставленными им факторами и после их связывания с сайтом полиаденилирования.

В соответствии со вторым вариантом находятся результаты работы Баурена и соавт. [55], изучавших *in vivo* процессы терминации транскрипции

гена BR1 (Balbiani ring) *Chironomus tentans* и полиаденилирования синтезируемой про-мРНК. Авторы обнаружили, что небольшой процент про-мРНК с короткими олиго(А)-трактами (10—20 нуклеотидов) связан с активным геном. Они предположили, что такие события, как окончание транскрипции, расщепление транскрипта и начальная стадия полиаденилирования (образование короткого олигонуклеотида), происходят почти одновременно и в одном и том же месте.

В качестве иллюстрации к изложенным выше гипотезам об участии РНК-полимеразы II в реакции расщепления мы предложили схему, представленную на рис. 2. Возможно, в некоторых случаях она является и схемой терминации транскрипции. В ряде работ ([38, 56] и ссылки в этих работах) показано, что функциональные сигналы полиаденилирования на про-мРНК необходимы для эффективного окончания транскрипции, однако механизм взаимодействия процессов образования 3'-концов мРНК и терминации транскрипции неясен. Возможно, единый комплекс, включающий факторы расщепления, собранные на сайте полиаденилирования про-мРНК, и РНК-полимеразу, связанную с ДНК, осуществляет почти одновременно обе реакции: и специфическое расщепление про-мРНК, и окончание транскрипции. Поскольку для эффективной терминации транскрипции, зависящей от сигналов полиаденилирования, требуется наличие в ДНК сигнальных последовательностей (терминаторов или энхансеров) [56], они также, вероятно, вовлечены в сборку вышеуказанного суперкомплекса (не показано), как, возможно, и другие белки и сигналы.

Прежде чем перейти к обсуждению второй стадии реакции полиаденилирования — синтезу поли(А)-тракта мРНК, следует упомянуть о топологических особенностях процесса образования 3'-концов мРНК. Стумпф и соавт. [57] показали, что псевдокольцевые про-мРНК дрожжей и животных — субстраты со спаренными концами — не полиаденилируются, причем шпилькообразные концы не влияют на эффективность реакции. Авторы

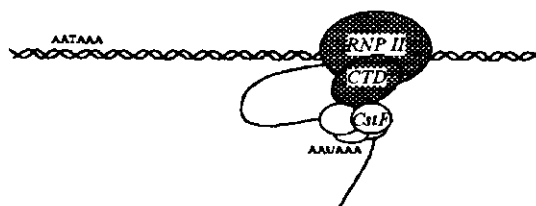


Рис. 2. Участие РНК-полимеразы II в реакции расщепления про-мРНК

предположили, что один из факторов полиаденилирования, возможно, CF I_m или CF II_m «нанизывается», как бублик, на конец транскрипта (одноцепочечный или в виде шпильки) и скользит по про-мРНК до места сборки комплекса.

Вторая стадия реакции полиаденилирования про-мРНК осуществляется PAP, CPSF и PABP2, но короткий олиго(A)-тракт синтезируется, как предполагают Вале и Кун [58], до высвобождения белковых факторов расщепления. Такое же мнение высказывают и Баурен и соавт. [55], которые считают, что олиго(A)-тракт образуется в то время, когда транскрипт еще связан с активным геном, а удлиняется во время диффузии про-мРНК в нуклеоплазме.

Механизм реакции удлинения поли(A)-трактов про-мРНК детально исследован Вале и соавт. в системе *in vitro* ([59] и ссылки в этой работе). Авторы использовали очищенные белки (PAP, CPSF и PABP2) и специфически расщепленные про-мРНК с короткими 3'-концевыми олиго(A)-последовательностями. Они показали, что поли(A)-тракт мРНК образуется в результате быстрой и процессивной реакции. PAP в комплексе с CPSF и PABP2 синтезирует длинную последовательность в результате однократного присоединения к про-мРНК, причем в системе *in vitro* синтезируется последовательность той же длины, что и в системе *in vivo*. Однако после добавления ≈250 адениловых остатков процессивная реакция прекращается. Поли(A) продолжает удлиняться дистрибутивно, то есть полимеразы в результате одного акта присоединения к субстрату добавляет лишь один адениловый остаток. Изменение характера реакции связано, очевидно, с разрушением белкового комплекса. Причина распада неясна. Интересен тот факт, что PAP процессивно синтезирует поли(A) длиной не более ≈250 нуклеотидных остатков даже в тех случаях, когда субстрат уже имеет достаточно длинную 3'-концевую поли(A)-последовательность, например, длиной 80 нуклеотидов.

Нами предложен [60, 61] механизм разрушения комплекса полиаденилирования при образовании поли(A)-тракта определенной длины на основании собственных исследований конформационных свойств полиадениловой кислоты [62—64]. Мы полагаем, что удлинение синтезирующейся поли(A)-последовательности до определенного размера (≈250 нуклеотидов в случае животных) позволяет ей свернуться таким образом, что некоторые ее сегменты, близкорасположенные к комплексу полиаденилирования, ориентируются параллельно. Под действием кислых аминокислотных остатков белка PABP2 адениновые остатки этих сегментов

протонируются, что приводит к образованию внутренней двойной спирали в поли(A)-последовательности. Образование такой спирали вызывает механическое напряжение в комплексе полиаденилирования и приводит к его распаду. Такой же механизм разрушения комплекса полиаденилирования предложен нами и для дрожжевых про-мРНК. Поскольку, как уже упоминалось, образование 3'-концов этих мРНК осуществляется другим аппаратом полиаденилирования [16], мы полагаем, что в этом случае синтезируемая поли(A)-последовательность сворачивается с образованием внутренней двойной спирали иным образом, приводя к образованию более коротких поли(A)-трактов (60—70 нуклеотидов).

В заключение этого раздела кратко опишем результаты работы Шула и соавт. [65], посвященной внутриядерной локализации белков аппарата полиаденилирования про-мРНК. На примере клеток T24 человека они показали, что гипер- и гипофосфорилированные формы PAP распределены в ядре различным образом, хотя обе формы распределены в виде пятнышек по всему ядру. Гипофосфорилированная форма сконцентрирована в местах синтеза РНК. В местах транскрипции найдены также и другие факторы полиаденилирования, локализация которых была исследована, в частности, это CPSF, CstF и PABP2. Авторы обнаружили, что места синтеза РНК на периферии доменов, называемых «speckles» (крапинки), которые содержат большие количества полиаденилированных РНК и факторов сплайсинга, особенно обогащены PAP и PABP2. Шула и соавт. [65] предположили, что вблизи «крапинок» локализуются наиболее активные гены, поскольку в этих местах их транскрипты могут быть процессированы наиболее эффективно.

Регуляция процесса полиаденилирования про-мРНК. В первых двух разделах описан минимальный набор белков и сигналов про-мРНК, необходимых для осуществления реакции образования 3'-концов мРНК. Следует подчеркнуть, что при наличии лишь такого аппарата полиаденилирования эффективность реакции полиаденилирования про-мРНК может быть различной. Она зависит, в частности, от степени каноничности гексамера, узнаваемого CPSF, а также от состава U/GU-богатого сигнала. Так, например, авторы работы [38] измеряли эффективность реакции расщепления синтетических про-мРНК, отличающихся друг от друга только составом «нижнего» элемента, и получили следующий ряд: $\mu m > SV_L > \mu s > mSV_L$, где μm и μs относятся к сигналам полиаденилирования про-мРНК тяжелой цепи иммуноглобулина, а SV_L и mSV_L — к сигналам про-мРНК SV40 E дикого

типа и с мутациями. Эффективность этих сигналов коррелирует с количеством простых элементов (описанных во втором разделе), входящих в их состав.

На эффективность реакции полиаденилирования может также влиять структура одноцепочечной РНК в области, включающей сигнал. Так, например, в работе [66] показано, что обмен короткими сегментами, содержащими гексамер AAUAAA и непосредственно прилегающие к нему последовательности, между про-мРНК Ad L1 и L3 приводит к уменьшению эффективности реакции полиаденилирования в случае про-мРНК Ad L3 и к увеличению эффективности — в случае про-мРНК Ad L1. В про-мРНК Ad L1 гексамер и примыкающие к нему участки представляют собой последовательность ...AAAAUAAAAA... [38]. Причина неэффективного использования этого сигнала может, по мнению автора, заключаться в том, что узнаваемая фактором CPSF-160 специфическая конформация гексамера AAUAAA нарушена вследствие его «погружения» в олиго(A)-последовательность. Конформация олиго(A)-участков по обе стороны от U-остатка может приближаться к конформации «свободной» одноцепочечной поли(A). Кроме того, связывание фактора CPSF с гексамером в данном случае может быть затруднено из-за конкуренции с белком PABP2. Неэффективность данного сигнала вряд ли связана с тем, что он может образовывать двойную спираль с U-богатыми «нижними» элементами про-мРНК Ad L1 и L3, поскольку такие спирали вследствие отсутствия G-C пар не будут высокостабильными.

Минимально необходимые сигналы полиаденилирования про-мРНК — гексамер AAUAAA и U/GU-богатый тракт — составляют так называемую кор(сore)-последовательность (рис. 1). Кроме нее, в реакции образования 3'-концов мРНК могут участвовать и другие элементы, образуя более сложный сайт полиаденилирования.

Обсудим механизмы вовлечения дополнительных элементов про-мРНК в процесс полиаденилирования на ряде конкретных примеров. На рис. 3 показаны схемы организации сайтов полиаденилирования тех про-мРНК, для которых в литературе имеется информация о нуклеотидной последовательности регуляторных элементов и о белках, участвующих в регуляции. Схема на рис. 3, а, относится к сайту полиаденилирования поздней про-мРНК вируса папилломы быка (BPV-1). Ранее было показано, что элемент, подобный 5'-сайту сплайсинга (псевдо 5' ss), расположенный до гексамера AAUAAA, ответствен за ингибирование реакции полиаденилирования поздних про-мРНК BPV-

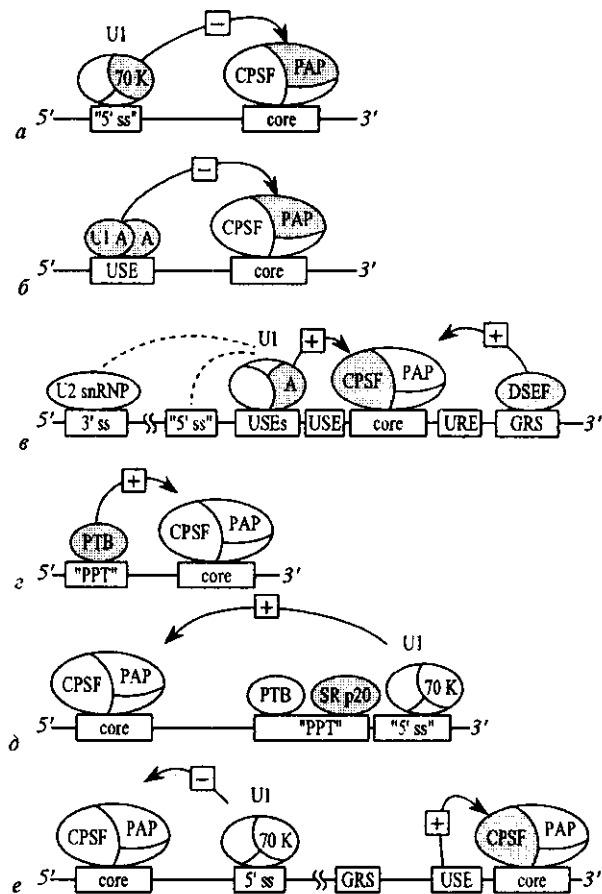


Рис. 3. Схемы организации сайтов полиаденилирования про-мРНК, содержащих регуляторные элементы. Про-мРНК: а — BPV-1; б — UI A; в — SV40; г — C2; д — CT/CGRP; е — HIV-1

1 на ранних стадиях инфекции или в неинфицированных клетках [67], причем он не участвует в реакции сплайсинга. Механизм ингибирования был недавно раскрыт Гундерсоном и соавт. [68]. Оказалось, что белок U1 70K в составе белково-нуклеинового комплекса U1-мяРНК (рис. 4), связанного с псевдо 5' ss-элементом, взаимодействует с PAP, и это взаимодействие приводит к подавлению реакции образования 3'-концов мРНК. Ингибируется вторая стадия реакции — синтез поли(A)-хвоста. Во взаимодействии между PAP и U1 70K участвуют С-концевая область полимеразы и одна из двух пар специфических мотивов (рис. 4), расположенных в доменах U1 70K, содержащих SR-повторы.

Эти четыре специфических мотива были най-

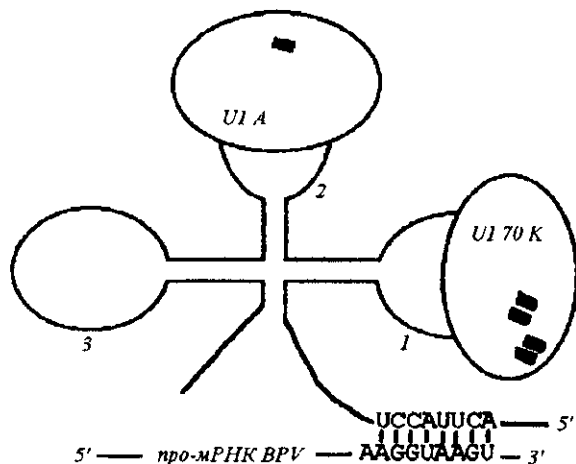


Рис. 4. Местоположение белков U1 A и U1 70K на РНК U1 [68]. Черный прямоугольник — пептид ERDRKREKRKPKS (U1 A) и гомологичные ему мотивы (U1 70K)

дены авторами в результате целенаправленного поиска, инициированного результатами более ранних работ. В них было показано, что белок U1 A регулирует свой синтез (ингибируя полиаденилирование своей про-мРНК) также посредством взаимодействия с С-концом РАР ([69] и ссылки в этой работе). Схема этого процесса показана на рис. 3, б. Регуляторный элемент (USE), расположенный до кор-последовательности про-мРНК U1 A, образует двухспиральную шпилькообразную структуру с двумя внутренними одноцепочечными участками, на каждом из которых имеется место связывания для белка U1 A, гомологичное месту его связывания на U1 РНК. Ингибирование реакции полиаденилирования про-мРНК U1 A происходит только в том случае, когда с регуляторным элементом связываются две макромолекулы белка U1 A, то есть при его избытке в нуклеоплазме. Более того, показано, что существенным моментом процесса ингибирования является близкая локализация двух макромолекул белка U1 A, а не структура основы, обеспечивающей их близость [68, 69].

Ингибиторный домен белка U1 A состоит из 13 аминокислотных остатков (рис. 4). Гундерсон и соавт. в упомянутой выше работе [68] не только нашли четыре аминокислотные последовательности, гомологичные этому элементу, в белке U1 70K, но и обнаружили подобные мотивы в других белках. Они предположили, что белки U1 A и U1 70K являются лишь первыми представителями целого семейства белков, регулирующих процессинг про-мРНК посредством ингибирования РАР.

Однако белок U1 A может оказывать не только ингибиторное действие, но и стимулирующее, если он не спарен. Латз и Элвайн [39] показали, что этот белок (по-видимому, в составе U1-мяРНП) стимулирует реакцию полиаденилирования про-мРНК SV40 L, связываясь с «верхними» регуляторными элементами (USE). Состав и расположение этих элементов показаны на рис. 1. Они описываются консенсусом AUUUGURA. Аналогичные USE найдены также в про-мРНК вируса гепатита земляной белки и вируса мозаики цветной капусты (ссылки в [39]). Авторы предположили, что если U1A стимулирует реакцию полиаденилирования, находясь в составе U1-мяРНП, то последний при этом может взаимодействовать либо с U2-мяРНП, связанным с 3'-сайтом сплайсинга (3' ss), либо с псевдо 5' ss, расположенным до USE (см. рис. 1 и 3, в). Специфическое взаимодействие между U1-мяРНП и псевдо 5' ss-элементами в 3' UTR про-мРНК SV40 L и Ad L3 обнаружено авторами работы [41].

В другой работе Латз и соавт. [70] показали, что белки U1 A и CPSF-160 специфически взаимодействуют между собой, стимулируя реакцию полиаденилирования, осуществляемую РАР и CPSF на специфически расщепленных про-мРНК SV40 L. Однако при высоких концентрациях U1 A ингибирует реакцию, как предполагают авторы, в результате взаимодействия с РАР, подобного взаимодействию с этим ферментом спаренного белка U1 A. В пользу этого предположения свидетельствует, в частности, тот факт, что хотя U1 A не стимулирует реакции неспецифического полиаденилирования, не зависящего от присутствия CPSF, он ингибирует ее при высоких концентрациях. Отметим, что специфическое и неспецифическое полиаденилирование про-мРНК осуществляется в присутствии ионов двухвалентных металлов Mg^{2+} и Mn^{2+} соответственно [72]. Белок U1 70K и спаренные белки U1 A также способны ингибировать неспецифическую реакцию [68, 69]. Следует отметить, что в недавно опубликованной работе [71] сообщается о способности белка U1 A к димеризации не только при связывании со своей про-мРНК, но и в свободном состоянии. Латз и соавт. [70] предположили, что *in vivo* взаимодействие между U1 A и CPSF-160 осуществляется при одновременном связывании U1 A с USE.

На рис. 3, в, где представлена схема организации сайта полиаденилирования про-мРНК SV40 L, показано также взаимодействие регуляторного белка DSEF-1 с G-богатым «нижним» элементом GRS, о котором упоминалось во втором разделе. Наличие нескольких регуляторных элементов на про-мРНК

SV40 L, по-видимому, неслучайно. Поздний сайт полиаденилирования этого вируса приблизительно в пять раз активнее раннего [73]. Высокая эффективность позднего сайта может быть обусловлена дефицитом основных белковых факторов полиаденилирования на поздней стадии вирусной инфекции [46].

Схема на рис. 3, з, относится к про-мРНК C2 человека. Наличие в этой про-мРНК USE, что нехарактерно для транскриптов животных в отличие от вирусов, может быть обусловлено, по предположению Моурейра и соавт. [74], близким расположением генов. Расстояние между 3'-концом гена C2 и 5'-концом следующего гена составляет лишь 412 нуклеотидов. Такая организация более типична для дрожжей, чем для высших эукариотов. Близкорасположенные гены дрожжей, как правило, не имеют нижних сигналов полиаденилирования и сигналы, функционально подобные U/GU-богатому элементу, размещены до места расщепления [16]. В другой работе [75] показано, что USE необходим для полиаденилирования про-мРНК Lamin B2 человека. Соответствующий ген также находится на близком расстоянии от следующего гена.

В случае про-мРНК C2 оказалось, что регуляторным элементом является псевдополипиримидиновый тракт (псевдо-РРТ) [74] (истинные РРТ расположены вблизи 3'-сайта сплайсинга). Авторы работы [74] показали, что псевдо-РРТ в сайте полиаденилирования про-мРНК C2 играет двойную роль. Белок, связывающийся с истинным полипиримидиновым трактом (РТВ, м. м. 55 кДа), повышает эффективность расщепления про-мРНК C2, взаимодействуя с псевдо-РРТ. Однако это взаимодействие не стимулирует второй стадии реакции полиаденилирования (синтез поли(А)-последовательности), хотя, согласно экспериментальным данным, последовательность псевдо-РРТ необходима для стимулирования обеих стадий. Оказалось, что к стимулированию второй стадии реакции приводит взаимодействие между псевдо-РРТ и одним из основных факторов полиаденилирования CstF. Таким образом, в работе [74] впервые продемонстрировано, что CstF может участвовать в реакции полиаденилирования, взаимодействуя не только с «нижним» сигналом, но и с USE, и что он может стимулировать вторую стадию реакции. Отметим, что ген C2 человека, в отличие от аналогичного гена кролика, не имеет «нижнего» U/GU-богатого сигнала полиаденилирования [74].

В случае про-мРНК CT/CGRP человека регуляторный элемент, представляющий собой псевдо-РРТ, расположен дальше кор-последовательности поли(А)-сайта (рис. 3, д). В этой про-мРНК чет-

вертый экзон (транскрипт содержит шесть экзонов) является в зависимости от вида ткани либо концевым экзоном (при этом кодируется белок кальцитонин), либо исключается при сплайсинге, что приводит к синтезу белка CGRP (calcitonin gene-related peptide). Появление транскриптов, кодирующих кальцитонин, связано с активацией кор-последовательности полиаденилирования, локализованной в экзоне 4. Полиаденилирование стимулируется интронным энхансером, в состав которого входят псевдо-РРТ и псевдо-5' ss (рис. 3, д), существенные для стимулирования [76, 77]. Кроме того, необходимы еще, по крайней мере, два взаимодействующих с ними фактора: РНК U1, связывающаяся с псевдо-5' ss, и белок SRp20, который преимущественно связывается с псевдо-РРТ.

В настоящее время механизм стимуляции неясен. В работе [77] предложены две модели. Согласно первой из них, белок SRp20, связанный с энхансером, взаимодействует с фактором CF I_m, входящим в состав комплекса расщепления/полиаденилирования. Возможность взаимодействия между этими двумя белками обусловлена тем, что оба они являются SR-белками и могут взаимодействовать между собой посредством SR-доменов [77]. Согласно второй модели, SRp20 не связывается непосредственно с факторами расщепления, но стимулирует взаимодействие с этими факторами белков комплекса U1-мяРНП. Белок РТВ также связывается с энхансером [76], но его роль в стимуляции пока неясна.

Последняя схема на рис. 3 показывает, как организованы сайты полиаденилирования про-мРНК вируса иммунодефицита человека (HIV-1), принадлежащего к группе ретровирусов. У таких вирусов дубликация сигналов контроля транскрипции обуславливает необходимость регулирования идентичных сайтов полиаденилирования, расположенных в 5'- и 3'-концевых областях транскрипта. При этом направлять процесс полиаденилирования должен только 3'-концевой поли(А)-сайт, но не 5'-концевой. Эта проблема решается в разных вирусах по-разному [44]. Про-мРНК вируса HIV-1 содержит два регуляторных элемента: один из них (в 5'-концевой области) ответствен за ингибирование процесса полиаденилирования, другой (в 3'-концевой области) — за стимулирование.

Ингибирование осуществляется комплексом U1-мяРНП [78], связанным с истинным 5'-сайтом сплайсинга, расположенным дальше кор-последовательности (левая часть рис. 3, е). Механизм ингибирования в настоящее время неизвестен. Авторы работы [79] показали, что механизм ингибирования комплексом U1-мяРНП зависит от относитель-

ного расположения кор-последовательности полиаденилирования и элемента 5' ss. Хотя локализация 5' ss до кор-последовательности (как в про-мРНК ВРV-1) (рис. 3, а) приводит к ингибированию второй стадии реакции полиаденилирования — синтеза поли(А)-последовательности, альтернативное расположение (как в про-мРНК HIV-1) приводит к ингибированию первой стадии реакции — расщепления, причем в этом случае ингибирование не обусловлено взаимодействием РАР с U1 70К. Однако, как показано в другой недавней работе [80], место связывания белка U1 70К с U1 РНК может быть вовлечено в процесс ингибирования.

Следует отметить, что кор-последовательность про-мРНК HIV-1 не является эффективным сайтом полиаденилирования, но в случае ее замены на эффективную последовательность комплекс U1-мРНК, связанный с 5' ss, не ингибирует реакции расщепления [78]. Низкая эффективность кор-последовательности про-мРНК вируса HIV-1 обусловлена тем, что часть гексамера AAUAAA и часть одного из GU-богатых элементов (рис. 5) входят в состав двухспирального участка шпилькообразной структуры [81, 83, 84]. Авторы работы [84] сравнили эффективность образования комплексов между факторами полиаденилирования и синтетическими РНК, содержащими сайты полиаденилирования про-мРНК HIV-1 дикого типа и с мутациями, влияющими на термодинамическую стабильность шпилькообразной структуры. Свободные энергии (ΔG) «шпильки» дикого типа, мутантной высокостабильной «шпильки» и одной из мутантных низкостабильных «шпилек» составляли -15,3; -25,7 и -6,8 ккал/моль соответственно при $t^{\circ} = 37^{\circ}\text{C}$. Оказалось, что очищенные CPSF и CstF связывались более эффективно с субстратами, содержащими низкостабильную шпилькообразную структуру, чем с субстратом дикого типа. В ядерных экстрактах комплексы образовывались одинаково эффективно с обоими субстратами. Высокостабильные субстраты практически не связывались ни с очищенными факторами полиаденилирования, ни с входящими в состав экстрактов.

Поли(А)-сайт про-мРНК HIV-1, расположенный в 3'-концевой области транскрипта, в отличие от расположенного в 5'-концевой области содержит USE (рис. 5) [82]. Джилмартин и соавт. [13] показали, что специфическое взаимодействие этого элемента с CPSF-160 увеличивает стабильность комплекса CPSF с про-мРНК, а также повышает эффективность реакции полиаденилирования расщепленной про-мРНК, осуществляемой РАР и CPSF. Аналогичный элемент имеется в про-мРНК

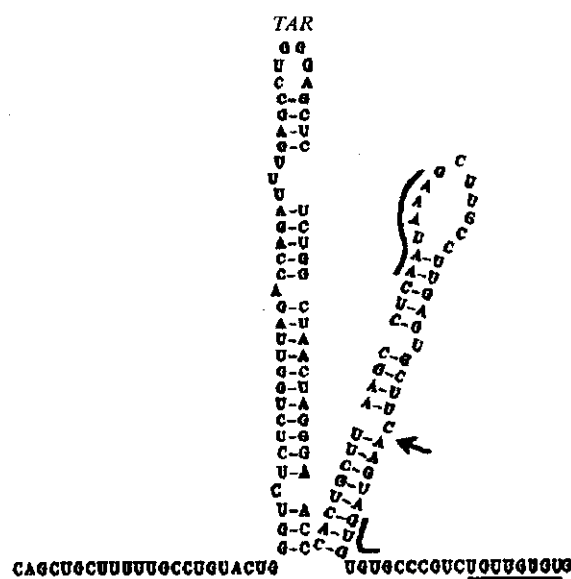


Рис. 5. Первичная и вторичная структуры про-мРНК вируса HIV-1 в области места расщепления (показано стрелкой). Выделены USE, гексамер AAUAAA и GU-богатые элементы [78, 81, 82]

Ad L3 [66]. Он может функционально заменять USE про-мРНК HIV-1 [13]. В описанной выше работе [84] стимулирующее действие USE проявлялось только в случае сайта полиаденилирования про-мРНК HIV-1 дикого типа, но не мутантных. Авторы этой работы предположили, что USE представляет собой первичное место связывания CPSF. При раскрытии в процессе дыхания двухспирального участка шпилькообразной структуры гексамер AAUAAA становится полностью доступным для CPSF, и этот белок связывается с гексамером, либо покидая USE, либо оставаясь связанным и с ним. Верно, скорее всего, последнее предположение, поскольку в работе [13] показано, что CPSF-160 сшивается с USE под действием ультрафиолета только в случае, если про-мРНК содержит гексамер AAUAAA.

Таким образом, термодинамическая стабильность шпилькообразной структуры про-мРНК HIV-1, включающей сигналы полиаденилирования, тщательно сбалансирована. Эффективность кор-сайта полиаденилирования подавлена как раз в такой степени, чтобы его можно было бы почти полностью репрессировать при участии 5'-концевого регуляторного элемента и стимулировать при участии 3'-концевого элемента [83]. Авторы работы [83] считают, что подобный тип регуляции

может быть распространен более широко, поскольку вовлечение части гексамера AAUAAA в двухспиральную структуру может иметь место, судя по первичным последовательностям про-мРНК, и для других вирусов этой же группы (лентивирусы), а также другой группы (спумавирусы).

Следует отметить, что, как считают авторы работы [83], непосредственное соседство в поли(А)-сайте про-мРНК HIV-1 (рис. 5) двух критических для развития вируса шпилькообразных структур — TAR (*trans*-activation region) и шпильки с поли(А)-сигналами — может быть неслучайным. Двухспиральные области этих структур могут взаимодействовать между собой, увеличивая стабильность всей охватывающей их структурированной области.

На рис. 3, е, показан еще один регуляторный элемент, входящий в состав поли(А)-сайта про-мРНК HIV-1, расположенного в 3'-концевой области — G-богатый элемент, подобный GRS про-мРНК SV40 L. Он ответственен за незначительное стимулирование реакции полиаденилирования [82]. Роль этого элемента неизвестна, но в работе [40] показано, что с ним может связываться белок DSEF-1.

Как следует из вышесказанного, в регуляции процесса полиаденилирования всех про-мРНК, сайты полиаденилирования которых схематически изображены на рис. 3, участвуют компоненты аппарата сплайсинга. По современным представлениям, две реакции — полиаденилирование и удаление 3'-концевого интрона — взаимосвязаны. Такая взаимозависимость наблюдается, с одной стороны, экспериментально (процессы сплайсинга и полиаденилирования, происходящие на одной и той же про-мРНК стимулируют друг друга), а с другой стороны, обоснована теоретически в рамках модели определения экзона (*exon definition model*) [11]. Согласно этой модели, на первой стадии процесса удаления интрона аппарат сплайсинга узнает «нижний» экзон, взаимодействуя с 3' ss удаляемого интрона и 5' ss следующего интрона, причем в случае 3'-концевого интрона поли(А)-сайт функционально заменяет донорный сайт сплайсинга. Механизм взаимосвязи процессов сплайсинга и полиаденилирования пока неизвестен.

Авторы работы [85] подробно исследовали роль отдельных специфических элементов про-мРНК в координации реакций полиаденилирования и сплайсинга, используя для экспериментов синтетические транскрипты, содержащие сайт полиаденилирования про-мРНК SV 40 L и участок, включающий интрон из про-мРНК аденовируса. В данной работе показано, что наиболее существенными для

координации двух реакций процессинга про-мРНК являются PPT, 3' ss, гексамер AAUAAA, U-богатый нижний сигнал полиаденилирования, G-богатый элемент и олиго(U)-участок, расположенный на ≈50 нуклеотидов ниже места расщепления (см. рис. 1). Причем отдаленный олиго(U)-тракт ответствен только для сопряженной, но не для изолированной реакции полиаденилирования (проводимой в условиях, неблагоприятных для сплайсинга). Мутации USE, с которыми связываются белки U1 A, приводили лишь к умеренному ингибированию сопряженной реакции сплайсинга (но к значительному ингибированию сопряженной реакции полиаденилирования), а мутации элемента псевдо 5' ss вызывали увеличение эффективности обеих взаимозависимых реакций.

Роль отдельных белковых факторов в координации двух реакций процессинга про-мРНК выяснена гораздо меньше, чем роль сигнальных элементов на про-мРНК. Установлено лишь, что карбоксильный конец PAP необходим для сопряженной реакции [69] и что он специфически взаимодействует с белковым фактором сплайсинга U2AF 65 [86]. Этот белок на ранней стадии сплайсинга связывается с полипиримидиновым трактом.

В заключение этого раздела следует упомянуть еще об одном типе регуляторных элементов. Недавно обнаружены элементы, ответственные за образование мРНК с короткими дискретными поли(А)-хвостами, так называемые PLE (*poly*(A)-limiting element) [87, 88]. В отличие от многих мРНК, изученных в настоящее время, мРНК (и про-мРНК) сывороточного альбумина лягушки имеют короткие поли(А)-хвосты длиной всего 17 нуклеотидов. Дас Гупта и соавт. [87] показали, что образование про-мРНК с короткими хвостами обусловлено присутствием верхнего элемента СААА-СUCACUGAGGAAACACCU или АААAGUUCUU-СAGCUGAAAAGAGCAU (гомологичные области выделены жирным шрифтом). Механизм действия этих регуляторных элементов пока неизвестен. PLE либо индуцируют быструю деградацию длинного поли(А)-хвоста про-мРНК до удаления 3'-концевого интрона, либо способствуют ингибированию второй стадии реакции полиаденилирования — процессивного синтеза поли(А)-хвоста, осуществляемого PAP, CPSF и PABP2 [87]. PLE найдены не только в про-мРНК альбумина, но и в про-мРНК других белков, имеющих поли(А)-хвосты длиной менее 20 нуклеотидов [88]. Короткий поли(А)-хвост про-мРНК сывороточного альбумина является своеобразной «меткой». Его узнавание эндонуклеазой, индуцируемой эстрогеном, приводит к деградации мРНК [87].

Таким образом, не только 3'-концевые поли(А)-последовательности мРНК, но и сам процесс полиаденилирования используется клетками и вирусами в самых разных целях [89].

В заключение выражаю благодарность Д. Н. Говоруну за ценные советы и замечания.

М. И. Зарудная

mRNA polyadenylation. 1. 3'-end formation of vertebrates' mRNAs

Summary

In this review the contemporary understanding of a process of the 3'-end formation of vertebrates' mRNAs is summarized. The protein factors taking part in the reaction, and the signal sequences in pre-mRNAs guiding the process are characterized. The process of polyadenylation complex formation is analyzed. The relation between polyadenylation, on one hand, and transcription and splicing, on the other hand, is considered. The examples of the regulation of the polyadenylation reaction are given. The author proposes more strict definition of downstream signal than that available in literature.

М. И. Зарудна

Полиаденилювання про-мРНК. 1. Утворення 3'-кінців мРНК хребетних

Резюме

В огляді докладно розглянуто процес утворення 3'-кінців мРНК хребетних: охарактеризовано білки, які беруть участь у реакції, та сигнальні елементи, що її направляють; описано процес складання комплексу поліаденилювання; обмірковано зв'язок між поліаденилюванням та процесами транскрипції і сплайсингу; наведено приклади регулювання реакції утворення 3'-кінців мРНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Wang Z., Day N., Trifillis P., Kiledjian M. An mRNA stability complex functions with poly(A)- binding protein to stabilize mRNA in vitro // *Mol. and Cell. Biol.*—1999.—19, N 7.—P. 4552—4560.
3. Decker C. J., Parker R. A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: evidence for a requirement for deadenylation // *Genes and Dev.*—1993.—7, N 8.—P. 1632—1643.
4. Craig A. W. B., Haghghat A., Yu A. T. K., Sonenberg N. Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation // *Nature.*—1998.—392, N 6675.—P. 520—523.
5. Taneja K. L., Lifshitz L. M., Fay F. S., Singer R. H. Poly(A) RNA codistribution with microfilaments: evaluation by in situ hybridization and quantitative digital imaging microscopy // *J. Cell. Biol.*—1992.—119, N 5.—P. 1245—1260.
6. Manley J. L. Messenger RNA polyadenylation: A universal modification // *Proc Nat. Acad. Sci. USA.*—1995.—92, N 6.—P. 1800—1801.
7. Dominski Z., Zheng L.-X., Sanchez R., Marzluff W. F. Stem-loop binding protein facilitates 3'-end formation by stabilizing U7 snRNP binding to histone pre-mRNA // *Mol. and Cell. Biol.*—1999.—19, N 5.—P. 3561—3570.

8. Williams A. S., Ingledue III T. C., Kay B. K., Marzluff W. F. Changes in the stem-loop at the 3'-terminus of histone mRNA affects its nucleocytoplasmic transport and cytoplasmic regulation // *Nucleic Acids Res.*—1994.—22, N 22.—P. 4660—4666.
9. Pandey N. B., Marzluff W. F. The stem-loop structure at the 3'-end of histone mRNA is necessary and sufficient for regulation of histone mRNA stability // *Mol. and Cell. Biol.*—1987.—7, N 12.—P. 4557—4559.
10. Sun J., Pilch D. R., Marzluff W. F. The histone mRNA 3' end is required for localization of histone mRNA to polyribosomes // *Nucl. Acids Res.*—1992.—20, N 22.—P. 6057—6066.
11. Wahle E. 3'-end cleavage and polyadenylation of mRNA precursors // *Biochim. et biophys. acta.*—1995.—1261, N 2.—P. 183—194.
12. Colgan D. F., Manley J. L. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation // *Genes and Dev.*—1997.—11, N 21.—P. 2755—2766.
13. Gilmartin G. M., Fleming E. S., Oetjen J., Graveley B. R. CPSF recognition of an HIV-1 mRNA 3'-processing enhancer: multiple sequence contacts involved in poly(A) site definition // *Genes and Dev.*—1995.—9, N 1.—P. 72—83.
14. 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.
15. Rügsegger U., Blank D., Keller W. Human pre-mRNA cleavage factor Im is related to spliceosomal SR proteins and can be reconstituted in vitro from recombinant subunits // *Mol. Cell.*—1998.—1, N 2.—P. 243—253.
16. Wahle E., Rügsegger U. 3'-End processing of pre-mRNA in eukaryotes // *FEMS Microbiol. Revs.*—1999.—23, N 3.—P. 277—295.
17. Raabe T., Murthy K. G. K., Manley J. L. Poly(A) polymerase contains multiple functional domains // *Mol. and Cell. Biol.*—1994.—14, N 5.—P. 2946—2957.
18. 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.
19. Nemeth A., Krause S., Blank D., Jenny A., Jenö P., Lustig A., Wahle E. Isolation of genomic and cDNA clones encoding bovine poly(A) binding protein II // *Nucl. Acids Res.*—1995.—23, N 20.—P. 4034—4041.
20. Wahle E., Lustig A., Jenö P., Maurer P. Mammalian poly(A)-binding protein II // *J. Biol. Chem.*—1993.—268, N 4.—P. 2937—2945.
21. Burd C. G., Dreyfuss G. Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins // *Science.*—1994.—265, N 5172.—P. 615—621.
22. Neer E. J., Schmidt C. J., Nambudripad R., Smith T. F. The ancient regulatory-protein family of WD-repeats protein // *Nature.*—1994.—371, N 6495.—P. 297—300.
23. Zhao W., Manley J. L. Complex alternative RNA processing generates an unexpected diversity of poly(A) polymerase isoforms // *Mol. and Cell. Biol.*—1996.—16, N 5.—P. 2378—2386.
24. Beyer K., Dandekar T., Keller W. RNA ligands selected by cleavage stimulation factor contain distinct sequence motifs that function as downstream elements in 3'-end processing of pre-mRNA // *J. Biol. Chem.*—1997.—272, N 42.—P. 26769—26779.
25. Wallace A. M., Dass B., Ravnik S. E., Tonk V., Jenkins N. A., Gilbert D. J., Copeland N. G., MacDonald C. C. Two distinct forms of the 64,000 M_r protein of the cleavage stimulation factor are expressed in mouse male germ cells //

- Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1999.—96, N 12.—P. 6763—6768.
26. Birnstiel M. L., Busslinger M., Strub K. Transcription termination and 3' processing: the end is in site! // *Cell*.—1985.—41, N 2.—P. 349—359.
 27. Graber J. II, 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.
 28. Wilusz J., Shenk T. A uridylyate tract mediates efficient heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C protein-RNA cross-linking and functionally substitutes for the downstream element of the polyadenylation signal // *Mol. and Cell. Biol.*—1990.—10, N 12.—P. 6397—6407.
 29. MacDonald C. C., Wilusz J., Shenk T. The 64-kilodalton subunit of the CstF polyadenylation factor binds to pre-mRNAs downstream of the cleavage site and influences cleavage site location // *Mol. and Cell. Biol.*—1994.—14, N 10.—P. 6647—6654.
 30. Chou Z.-F., Chen F., Wilusz J. Sequence and position requirements for uridylyate-rich downstream elements of polyadenylation signals // *Nucl. Acids Res.*—1994.—22, N 13.—P. 2525—2531.
 31. 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.
 32. McLaughlan J., Gaffney D., Whitton J. L., Clements J. B. The consensus sequence YGTGTTY located downstream from the AATAAA signal is required for efficient formation of mRNA 3'-termini // *Nucl. Acids Res.*—1985.—13, N 4.—P. 1347.
 33. Gil A., Proudfoot N. J. Position-dependent sequence elements downstream of AAUAAA are required for efficient rabbit β -globin mRNA 3' end formation // *Cell*.—1987.—49, N 3.—P. 399—406.
 34. Chen J. S., Nordstrom J. L. Bipartite structure of the downstream element of the mouse beta globin (major) poly(A) signal // *Nucl. Acids Res.*—1992.—20, N 10.—P. 2565—2572.
 35. McDevitt M. A., Hart R. P., Wong W. W., Nevins J. R. Sequences capable of restoring poly(A) site function define two distinct downstream elements // *EMBO J.*—1986.—5, N 11.—P. 2907—2913.
 36. Zhang F., Denome R. M., Cole C. N. Fine structure analysis of the processing and polyadenylation region of the herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene by using linker scanning, internal deletion, and insertion mutations // *Mol. and Cell. Biol.*—1986.—6, N 12.—P. 4611—4623.
 37. Renan M. J. Conserved 12-bp element downstream from mRNA polyadenylation sites // *Gene*.—1987.—60, N 2, 3.—P. 245—254.
 38. Edwalds-Gilbert G., Prescott J., Falck-Pedersen E. 3' RNA processing efficiency plays a primary role in generating termination-competent RNA polymerase II elongation complexes // *Mol. Cell. Biol.*—1993.—13, N 6.—P. 3472—3480.
 39. Lutz C. S., Alwine J. C. Direct interaction of the U1 snRNP-A protein with the upstream efficiency element of the SV40 late polyadenylation signal // *Genes and Dev.*—1994.—8, N 5.—P. 576—586.
 40. Bagga P. S., Ford L. P., Chen F., Wilusz J. The G-rich auxiliary downstream element has distinct sequence and position requirements and mediates efficient 3' end pre-mRNA processing through a trans-acting factor // *Nucl. Acids Res.*—1995.—23, N 9.—P. 1625—1631.
 41. Wassarman K. M., Steitz J. A. Association with terminal exons in pre-mRNAs: a new role for the U1 snRNP? // *Genes and Dev.*—1993.—7, N 4.—P. 647—659.
 42. Takagaki Y., Manley J. L. RNA recognition by the human polyadenylation factor CstF // *Mol. and Cell. Biol.*—1997.—17, N 7.—P. 3907—3914.
 43. Benoitte B., Nemeth A., Aulner N., Kühn U., Simonelig M., Wahle E., Bourbon H.-M. The *drosophila* poly(A)-binding protein II is ubiquitous throughout *drosophila* development and has the same function in mRNA polyadenylation as its bovine homolog *in vitro* // *Nucl. Acids Res.*—1999.—27, N 19.—P. 3771—3778.
 44. Proudfoot N. Poly(A) signals // *Cell*.—1991.—64, N 4.—P. 671—674.
 45. Sittler A., Gallinaro H., Jacob M. Upstream and downstream cis-acting elements for cleavage at the L4 polyadenylation site of adenovirus-2 // *Nucl. Acids Res.*—1994.—22, N 2.—P. 222—231.
 46. Bagga P. S., Arhin G. K., Wilusz J. DSEF-1 is a member of the hnRNP H family of RNA-binding proteins and stimulates pre-mRNA cleavage and polyadenylation *in vitro* // *Nucl. Acids Res.*—1998.—26, N 23.—P. 5343—5350.
 47. 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.
 48. Sadofsky M., Connelly S., Manley J. L., Alwine J. C. Identification of a sequence element on the 3' side of AAUAAA which is necessary for simian virus 40 late mRNA 3'-end processing // *Mol. and Cell. Biol.*—1985.—5, N 10.—P. 2713—2719.
 49. Hirose Y., Manley J. L. Creatine phosphate, not ATP, is required for 3' end cleavage of mammalian pre-mRNA *in vitro* // *J. Biol. Chem.*—1997.—272, N 47.—P. 29636—29642.
 50. Chao L. C., Jamil A., Kim S. J., Huang L., Martinson H. G. Assembly of the cleavage and polyadenylation apparatus requires about 10 seconds *in vivo* and is faster for strong than for weak poly(A) sites // *Mol. and Cell. Biol.*—1999.—19, N 8.—P. 5588—5600.
 51. Flaherty S. M., Forthes P., Izaurralde E., Mattaj J. W., Gilmartin G. M. Participation of the nuclear cap binding complex in pre-mRNA 3' processing // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1997.—94, N 22.—P. 11893—11898.
 52. McCracken S., Fong N., Yankulov K., Ballantyne S., Pan G., Greenblatt J., Patterson S. D., Wickens M., Bentley D. L. The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription // *Nature*.—1997.—385, N 6614.—P. 357—361.
 53. Dantonel J.-C., Murthy K. G. K., Manley J. L., Tora L. Transcription factor TFIID recruits factor CPSF for formation of 3' end of mRNA // *Nature*.—1997.—389, N 6649.—P. 399—402.
 54. Hirose Y., Manley J. L. RNA polymerase II is an essential mRNA polyadenylation factor // *Nature*.—1998.—395, N 6697.—P. 93—96.
 55. Baur'en G., Belikov S., Wieslander L. Transcriptional termination in the *Balbani ring I* gene is closely coupled to 3'-end formation and excision of the 3'-terminal intron // *Genes and Dev.*—1998.—12, N 17.—P. 2759—2769.
 56. Yeung G., Choi L. M., Chao L. C., Park N. J., Liu D., Jamil A., Martinson H. G. Poly(A)-driven and poly(A)-assisted termination; two different modes of poly(A)-dependent transcription termination // *Mol. and Cell. Biol.*—1998.—18, N 1.—P. 276—289.
 57. Stumpf G., Goppelt A., Domdey H. Pre-mRNA topology is important for 3'-end formation in *Saccharomyces cerevisiae* and mammals // *Mol. and Cell. Biol.*—1996.—16, N 5.—P. 2204—2213.
 58. Wahle E., Kühn U. The mechanism of 3' cleavage and

- polyadenylation of eukaryotic pre-mRNA // *Progr. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.*—1997.—57.—P. 41—71.
59. Wahle E. Poly(A) tail length control is caused by termination of processive synthesis // *J. Biol. Chem.*—1995.—270, N 6.—P. 2800—2808.
 60. Зарудна М. И., Говорун Д. М. Структурні переходи в поліаденілової кислоти. Можливі молекулярні механізми функціонування полі(А)-хвостів мРНК // *Доповіді НАН України.*—1998.—№ 12.—С. 155—160.
 61. Zrudnaya M. I., Hovorun D. M. Structural transitions in polyadenylic acid and hypothesis on biological role of its double-stranded forms // *Укр. біохім. журн.*—1999.—71, № 4.—P. 15—20.
 62. Зарудная М. И., Желтовский Н. В. Исследование взаимодействия гомополирибонуклеотидов с дикатионом эфира лизина методом аффинного электрофореза // *Молекуляр. биология.*—1992.—26, № 1.—С. 110—117.
 63. Зарудная М. И., Желтовский Н. В. Электрофоретическое исследование конформационных переходов в поли(А) при кислых рН // *Молекуляр. биология.*—1995.—29, № 5.—С. 1040—1047.
 64. Зарудная М. И. Исследование конформационных переходов в поли(А) методом буферной емкости // *Молекуляр. биология.*—1998.—32, № 3.—С. 508—514.
 65. Schul W., van Driel R., de Jong L. A subset of poly(A) polymerase is concentrated at sites of RNA synthesis and is associated with domains enriched in splicing factors and poly(A) RNA // *Exp. Cell. Res.*—1998.—238, N 1.—P. 1—12.
 66. Prescott J., Falck-Pedersen E. Sequence elements upstream of the 3' cleavage site confer substrate strength to the adenovirus L1 and L3 polyadenylation sites // *Mol. and Cell. Biol.*—1994.—14, N 7.—P. 4682—4693.
 67. Furth P. A., Choe W.-T., Rex J. H., Byrne J. C., Baker C. C. Sequences homologous to 5' splice sites are required for the inhibitory activity of papillomavirus late 3' untranslated regions // *Mol. and Cell. Biol.*—1994.—14, N 8.—P. 5278—5289.
 68. Gunderson S. I., Polycarpou-Schwarz M., Mattaj J. W. U1 snRNP inhibits pre-mRNA polyadenylation through a direct interaction between U1 70K and poly(A) polymerase // *Mol. Cell.*—1998.—1, N 2.—P. 255—264.
 69. 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 Dev.*—1997.—11, N 6.—P. 761—773.
 70. Lutz C. S., Murthy K. G. K., Schek N., O'Connor J. P., Manley J. L., Alwine J. C. Interaction between the U1 snRNP-A protein and the 160-kD subunit of cleavage-polyadenylation specificity factor increases polyadenylation efficiency in vitro // *Genes and Dev.*—1996.—10, N 3.—P. 325—337.
 71. Gunnewiek J. M. T. K., Hussein R. I., van Aarssen Y., Palacios D., de Jong R., van Venrooij W. J., Gunderson S. I. Fourteen residues of the U1 snRNP-specific U1 A protein are required for homodimerization, cooperative RNA binding, and inhibition of polyadenylation // *Mol. and Cell. Biol.*—2000.—20, N 6.—P. 2209—2217.
 72. Wahle E., Martin G., Schiltz E., Keller W. Isolation and expression of cDNA clones encoding mammalian poly(A) polymerase // *EMBO J.*—1991.—10, N 13.—P. 4251—4257.
 73. Carswell S., Alwine J. C. Efficiency of utilization of the Simian virus 40 Late polyadenylation site: effects of upstream sequences // *Mol. and Cell. Biol.*—1989.—9, N 10.—P. 4248—4258.
 74. Moreira A., Takagaki Y., Brackenridge S., Wollerton M., Manley J. L., Proudfoot N. J. The upstream sequence element of the C2 complement poly(A) signal activates mRNA 3' end formation by two distinct mechanisms // *Genes and Dev.*—1998.—12, N 16.—P. 2522—2534.
 75. Brackenridge S., Ashe H. L., Giacca M., Proudfoot N. J. Transcription and polyadenylation in a short human intergenic region // *Nucl. Acids Res.*—1997.—25, N 12.—P. 2326—2335.
 76. Lou H., Gagel R. F., Berget S. M. An intron enhancer recognized by splicing factors activates polyadenylation // *Genes and Dev.*—1996.—10, N 2.—P. 208—219.
 77. Lou H., Neugebauer K. M., Gagel R. F., Berget S. M. Regulation of alternative polyadenylation by U1 snRNPs and SRp20 // *Mol. and Cell. Biol.*—1998.—18, N 9.—P. 4977—4985.
 78. Ashe M. P., Pearson L. H., Proudfoot N. J. The HIV-1 5' LTR poly(A) site is inactivated by U1 snRNP interaction with the downstream major splice donor site // *EMBO J.*—1997.—16, N 18.—P. 5752—5763.
 79. Vagner S., Rueggsegger U., Gunderson S. I., Keller W., Mattaj J. W. Position-dependent inhibition of the cleavage step of pre-mRNA 3'-end processing by U1 snRNP // *RNA.*—2000.—6, N 2.—P. 178—188.
 80. Ashe M. P., Furger A., Proudfoot N. J. Stem-loop 1 of the U1 snRNP plays a critical role in the suppression of HIV-1 polyadenylation // *RNA.*—2000.—6, N 2.—P. 170—177.
 81. Das A. T., Klaver B., Klasens B. I. F., Wamel J. L. B., Berkhout B. A conserved hairpin motif in the R-U5 Region of the human immunodeficiency virus type 1 RNA genome is essential for replication // *J. Virol.*—1997.—71, N 3.—P. 2346—2356.
 82. Valsamakis A., Zeichner S., Carswell S., Alwine J. C. The human immunodeficiency virus type 1 polyadenylation signal: a 3' long terminal repeat element upstream of the AAUAAA necessary for efficient polyadenylation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1991.—88, N 6.—P. 2108—2112.
 83. Das A. T., Klaver B., Berkhout B. A hairpin structure in the R Region of the human immunodeficiency virus type 1 RNA genome is instrumental in polyadenylation site selection // *J. Virol.*—1999.—73, N 1.—P. 81—91.
 84. Klasens B. I. F., Thiesen M., Virtanen A., Berkhout B. The ability of the HIV-1 AAUAAA signal to bind polyadenylation factors is controlled by local RNA structure // *Nucl. Acids Res.*—1999.—27, N 2.—P. 446—454.
 85. Cooke C., Hans H., Alwine J. C. Utilization of splicing elements and polyadenylation signal elements in the coupling of polyadenylation and last-intron removal // *Mol. and Cell. Biol.*—1999.—19, N 7.—P. 4971—4979.
 86. Vagner S., Vagner C., Mattaj J. W. The carboxyl terminus of vertebrate poly(A) polymerase interacts with U2AF 65 to couple 3'-end processing and splicing // *Genes and Dev.*—2000.—14, N 4.—P. 403—413.
 87. Das Gupta J., Gu H., Chernokalskaya E., Gao X., Schoenberg D. R. Identification of two cis-acting elements that independently regulate the length of poly(A) on *Xenopus* albumin pre-mRNA // *RNA.*—1998.—4, N 7.—P. 766—776.
 88. Gu H., Das Gupta J., Schoenberg D. R. The poly(A)-limiting element is a conserved cis-acting sequence that regulates poly(A) tail length on nuclear pre-mRNAs // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1999.—96, N 16.—P. 8943—8948.
 89. Edwalds-Gilbert G., Veraldi K. L., Milcarek C. Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? // *Nucl. Acids Res.*—1997.—25, N 13.—P. 2547—2561.

УДК 577.21

Надійшла до редакції 04.04.2000