

## НЕКАНОНИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ИНИЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ мРНК ВИРУСОВ ЭУКАРИОТ

### Обзор

© 2021 И.И. Сорокин<sup>1,2,3</sup>, К.С. Василенко<sup>2</sup>, И.М. Теренин<sup>1</sup>,  
Н.О. Калинина<sup>1,4</sup>, В.И. Агол<sup>1,5</sup>, С.Е. Дмитриев<sup>1,6,7\*</sup>

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

<sup>2</sup> Институт белка РАН, 142290 Пушкино, Московская обл., Россия

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

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

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

<sup>6</sup> Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991 Москва, Россия

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

Поступила в редакцию 14.06.2021

После доработки 04.08.2021

Принята к публикации 04.08.2021

Для производства своих белков вирусы используют трансляционный аппарат заражённой клетки. При этом их мРНК вынуждены вступать в конкуренцию за рибосомы и трансляционные факторы с многочисленными клеточными матрицами. Чтобы не проиграть в этой борьбе, вирусы применяют специальные стратегии. мРНК многих эукариотических вирусов, размножающихся в цитоплазме, не имеют m<sup>7</sup>G-кэпа на 5'-конце. Однако они могут содержать структуры, привлекающие факторы трансляции и рибосомы альтернативными способами – например, участки внутреннего связывания рибосом (IRES-элементы), которые делают их трансляцию не зависящей от 5'-конца и, как следствие, от m<sup>7</sup>G-кэпа. Другие вирусные мРНК содержат кэп-независимые трансляционные энхансеры (CITE-элементы), которые могут быть расположены, в том числе и в 3'-нетранслируемой области (3'-НТО). В тех случаях, когда посадка рибосомы на мРНК происходит по кэп-зависимому пути, особые структуры в 5'-НТО могут менять формат рибосомного сканирования и узнавания стартового кодона. Необходимость компактизировать геном зачастую приводит к наличию в вирусных мРНК внутренних рамок, для трансляции которых могут использоваться разнообразные механизмы – например, пропускающее сканирование, соскальзывание 43S-комплекса, шунтирование или сопряжённая терминативная-реинициация, требующие особых *cis*-действующих элементов в мРНК. Некоторые из перечисленных особенностей делают вирусные мРНК менее требовательными к набору факторов инициации трансляции, обеспечивая устойчивость к условиям клеточного стресса и антивирусным механизмам клетки. Более того, вирусы могут создавать конкурентные преимущества для трансляции своих мРНК, инактивируя отдельные трансляционные факторы, подменяя их своими или провоцируя развитие стрессового ответа. Многие вирусы реорганизуют мембранные структуры клетки, в том числе с целью создания вирусных трансляционных «фабрик», пространственно изолируя места синтеза своих белков от действия антивирусных систем и обогащая их трансляционными компонентами. Тем не менее зачастую именно трансляция является ахиллесовой пятой их жизненного цикла. Лучшее понимание неканонических механизмов инициации трансляции вирусных мРНК даёт дополнительные ключи к разработке новых подходов в антивирусной терапии.

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

DOI: 10.31857/S0320972521090049

### ПОСВЯЩЕНИЕ

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

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

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

## ВВЕДЕНИЕ

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

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

## КЛАССИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ мРНК

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

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

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

\* Адресат для корреспонденции.

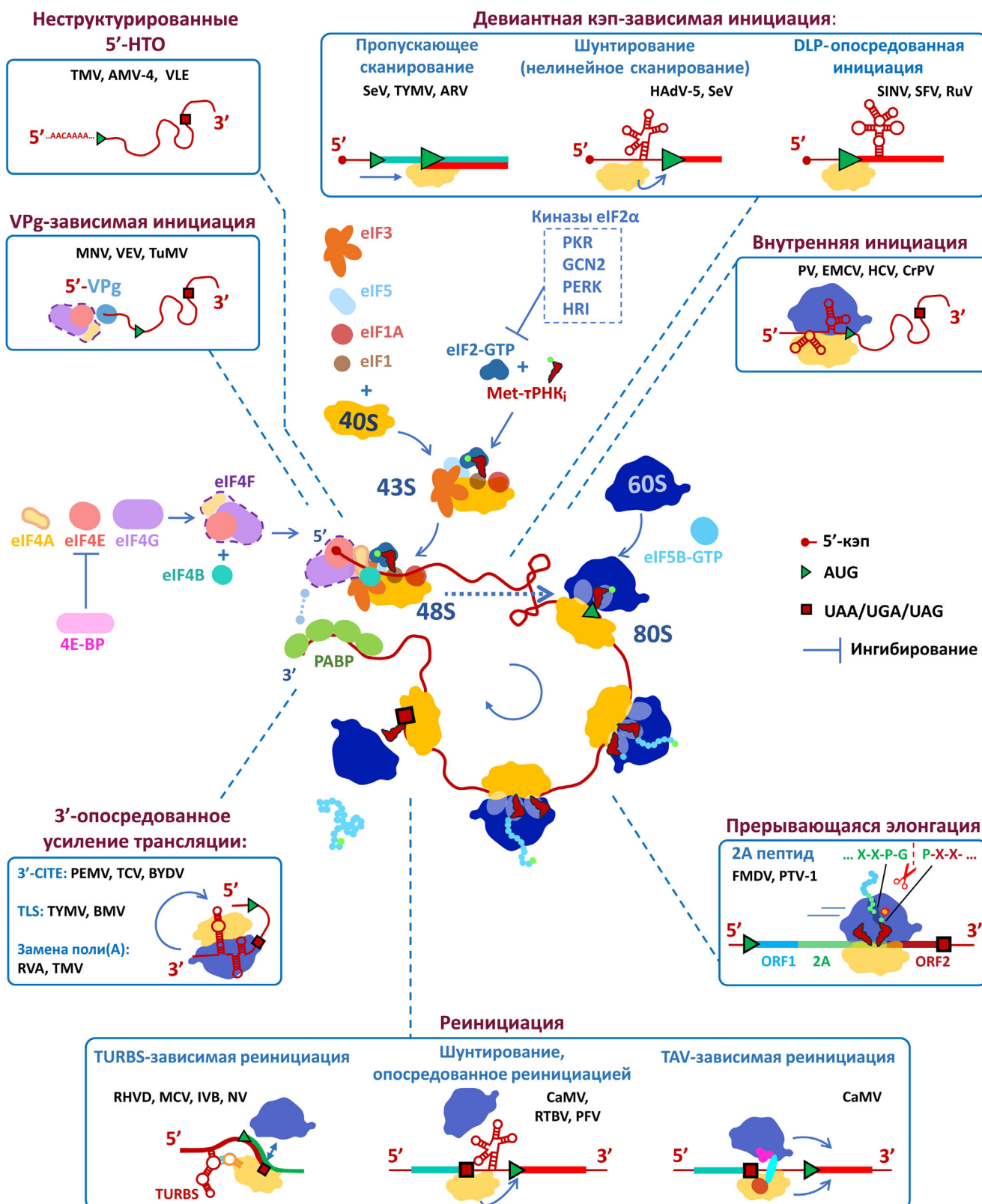


Рис. 1. Трансляционный цикл эукариотической мРНК и основные неканонические механизмы инициации трансляции, используемые вирусными мРНК. Полные названия вирусов приведены в тексте статьи

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

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

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

### **«ДЕВИАНТНЫЕ» ФОРМЫ КЭП-ЗАВИСИМОЙ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ ВИРУСНЫХ мРНК**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### VPg-ЗАВИСИМАЯ ИНИЦИАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ

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

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

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

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

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

## ВНУТРЕННЯЯ ИНИЦИАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

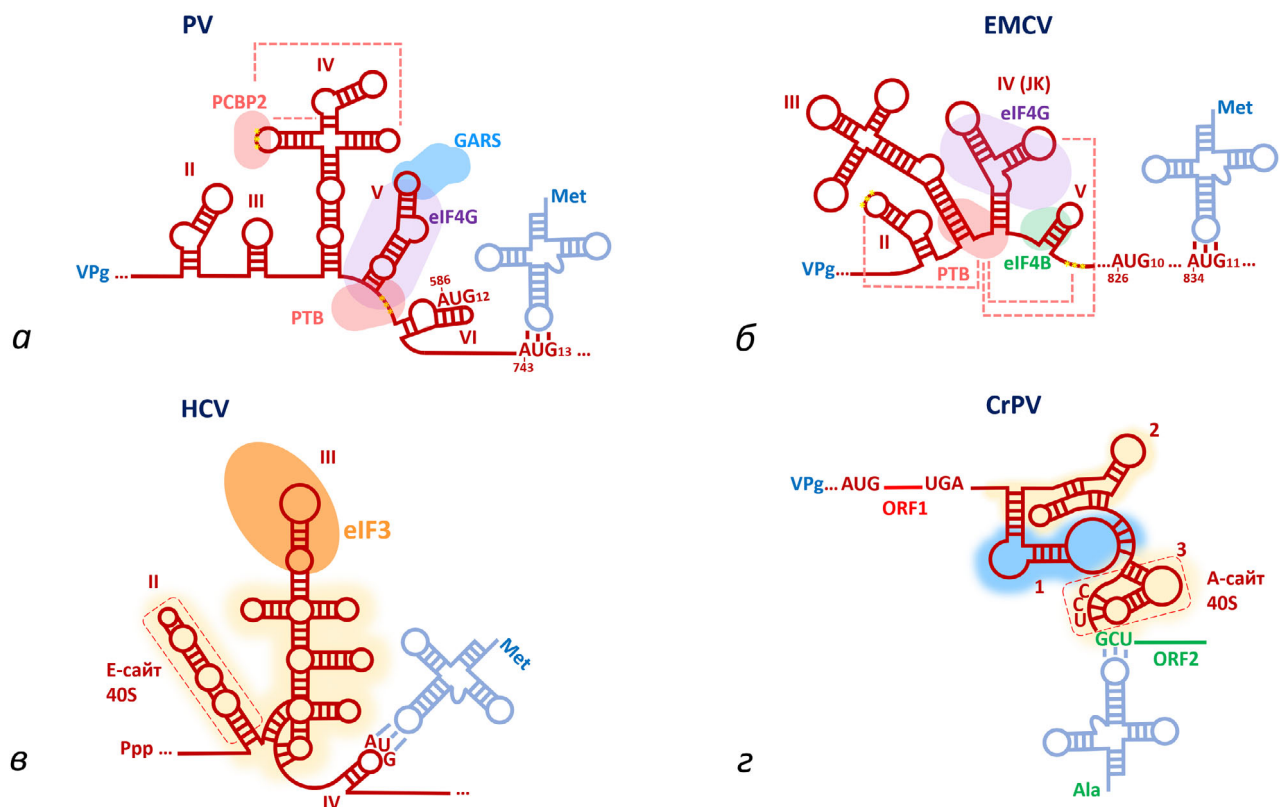
5'-концевыми фрагментами гидролизованых мРНК и высвобождается при добавлении ингибиторов кэп-зависимой инициации ( $m^7GTP$ , 4E-VP1 или специфичных протеаз, разрезающих eIF4G), что приводит к стимуляции трансляции некэпированных или малоэффективных кэпированных мРНК. Аберрантная внутренняя инициация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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

тивности IRES-элемента [78, 79], за которыми следует слабоструктурированная область длиной 160 нт и стартовый кодон AUG<sub>743</sub>, 13-й по счёту с 5'-конца (рис. 2, a). У основания домена VI расположен олигопиримидиновый тракт (Y<sub>n</sub>), включающий консервативную последовательность UUUC. Другие представители этого типа IRES-элементов – например, в гРНК энтеровируса A71 (enterovirus EV-A71), вируса Коксаки типа B (Coxsackievirus B3,

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

Особенностью этого типа IRES-элементов является наличие «криптического» AUG-кодона (в случае PV – это AUG<sub>586</sub>), расположенного внутри домена VI, на расстоянии 18–20 нт в 3'-сторону от Y<sub>n</sub>. Этот кодон важен для эффективной работы IRES-элемента [81]. Он может узна-

ваться инициаторным комплексом, однако из-за неоптимального нуклеотидного контекста этот AUG не является основным стартовым кодоном для синтеза вирусного полипротеина. Настоящий стартовый кодон, AUG<sub>743</sub>, находится гораздо дальше — на расстоянии более 100 нт от конца домена VI. В случае HRV аналогичную пару составляют AUG<sub>589</sub> и AUG<sub>626</sub>, расположенные друг напротив друга вблизи основания шпильки домена VI. У разных вирусов эти два AUG-кодона могут находиться как в одной, так и в разных рамках считывания.

Результаты экспериментов по мутагенезу показывают, что мотив Y<sub>n</sub>, криптоический AUG-кодон и разделяющий их спейсер фиксированной длины образуют единый функциональный модуль Y<sub>n</sub>-X<sub>m</sub>-AUG, который важен для эффективной работы IRES-элемента и, по всей видимости, является местом посадки рибосомы (см. статью Pilipenko et al. [81] и упомянутые в ней более ранние работы). Тандем Y<sub>n</sub>-AUG характерен также и для других типов пикорнавирусных IRES-элементов, однако там он может не быть строго необходимым (см. ниже). Особый интерес к этому элементу структуры связан с тем, что он обуславливает нейровирулентность вируса. Сконструированные мутанты высоконейровирулентного для мышей штамма полиовируса, у которых в состав тандема на место криптоического AUG был перемещён основной инициаторный AUG<sub>743</sub> в благоприятном контексте, проявляли высокую степень аттенуации (уменьшения патогенности) в опытах на мышах. При этом они в значительной степени сохраняли способность размножаться в культивируемых клетках (в том числе нейрональной природы), а их РНК проявляла высокую трансляционную активность в бесклеточной системе из клеток асцитной карциномы Кребс-2, тем самым указывая на наличие/отсутствие именно в клетках центральной нервной системы особого фактора или факторов, определяющих значимость модуля Y<sub>n</sub>-X<sub>m</sub>-AUG для биологии полиовируса [82]. Интересно, что в вышедшей недавно работе Lulla et al. [83] было обнаружено, что AUG<sub>589</sub> у ряда энтеровирусов не является «молчащим», а может направлять синтез 65-членного пептида, влияющего на ход инфекции в клетках кишечного эпителия. Возможно, некоторые из ранее описанных эффектов мутаций AUG<sub>586</sub> на патогенность вируса связаны с нарушением синтеза этого пептида.

Ещё одна интрига заключается в малопонятном механизме попадания рибосомы с участка Y<sub>n</sub>-X<sub>m</sub>-AUG на основной стартовый кодон AUG<sub>743</sub>. Данные по мутагенезу области между этими кодонами, введению стабильных шпи-

лек и дополнительных AUG позволяют предположить нелинейное сканирование этого региона, напоминающее шунтирование [84, 85]. В случае HRV, где два AUG находятся друг напротив друга в стабильной шпильке, часть рибосом также попадает с AUG<sub>589</sub> на AUG<sub>626</sub> путём её шунтирования [86].

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

стандартном сканировании: с одной стороны, нуклеотидный контекст играет здесь ту же роль, с другой — вероятность узнавания AUG от 5'-концевой границы к 3'-концевой сильно увеличивается, а затем выходит на плато [101]. Эта разница наглядно видна при сравнении распределения 48S-комплексов между AUG-кодонами в инициаторной области EMCV в двух случаях: когда трансляция направляется IRES-элементом и когда большая часть IRES-элемента удалена, а рибосомы садятся с 5'-конца [8, 102]. В первом из них комплексы в основном формируются на AUG<sub>834</sub> (11-м по счёту), который и является основным стартовым кодоном полипротеина EMCV, а расположенный перед ним AUG<sub>826</sub>, несмотря на хороший контекст, почти не узнаётся рибосомой, т.к. находится, по-видимому, на самой границе стартового окна. Если же рибосомы попадают на эту же область путём кэп-зависимой инициации, то наблюдается обратное распределение в полном соответствии с предсказанием сканирующей модели. Уместно отметить, что сходные правила характерны и для классической 5'-конец-зависимой инициации трансляции в случае AUG-кодонов, находящихся вблизи самого 5'-конца — это сходство, вероятно, обусловлено общими для этих двух случаев особенностями, возникающими при укладке мРНК в канал 40S-субчастицы. Аналогия усиливается тем, что 48S-комплексы на AUG<sub>826</sub> EMCV можно увидеть в реконструированной трансляционной системе при отсутствии фактора eIF1 — в тех же условиях, в которых удаётся увидеть комплексы на AUG, расположенных вблизи 5'-конца, на кэп-зависимых мРНК [103].

В инициаторной области мРНК EMCV есть ещё один AUG, 12-й по счёту (AUG<sub>846</sub>), который находится в одной рамке с AUG<sub>834</sub>. В некоторых условиях на него может происходить описанное выше соскальзывание 43S-комплекса [8], но в норме он не является инициаторным. А вот FMDV имеет два функциональных стартовых кодона (также находящихся в одной рамке), разделённых протяжённым спейсером длиной 84 нт и дающих начало двум изоформам лидерной (L) протеазы, при этом второй AUG используется чаще [80]. По всей видимости, преинициаторный комплекс собирается на IRES FMDV в окрестностях первого AUG, после чего либо происходит его узнавание, либо eIF1-зависимое сканирование и узнавание второго (см. статью Andreev et al. [104] и ссылки в ней).

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

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

Интересны случаи взаимосвязи мутаций в участках узнавания ITAF с потерей нейровирулентности без утраты вирусом способности размножаться и синтезировать белки в клетках других типов. Например, у TMEV разрушение тандема Y<sub>n</sub>—AUG путём изменения критического расстояния между его полипиримидиновым блоком (который, вероятно, служит одним из сайтов связывания PTB [107]) и AUG не оказывает существенного влияния на его репродукцию в культуре клеток ВНК-21 и бескеточную трансляцию [101], но резко снижает нейровирулентность для мышей [108]. Известны и другие подобные примеры (см. обсуждение в ранее опубликованных работах [105, 109]). Механизм такой взаимосвязи удалось установить при изучении зависимости нейровирулентности TMEV от взаимодействия IRES-элемента с разными формами PTB. Клетки центральной нервной системы (в частности, нейроны) содержат мало белка PTBP1, но зато продуцируют его нейрон-специфичный паралог — nPTB/PTBP2. Обе формы PTB связываются с одними и теми же участками IRES TMEV и проявляют сравнимую способность стимулировать трансляцию. Однако некоторые мутации в PTB-связывающих мотивах снижают сродство IRES к nPTB существенно сильнее, чем к «обычному» PTB. Эти мутации значительно понижают нейровирулентность вируса, не оказывая существенного влияния на трансляционную активность и его размножение в других клетках [109].

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

В то же время 5'-концевой IRES другого представителя Dicistroviridae, уже упоминавшегося вируса CrPV, имеет, по-видимому, отдалённое функциональное сходство с IRES HCV, несмотря на различие их структур. Он специфично связывает фактор eIF3, причём в данном случае это взаимодействие строго необходимо для посадки 40S-субчастицы [152, 153]. Как и IRES HCV, 5'-концевой IRES CrPV взаимодействует с «факультативным» рибосомным белком RACK1, что объясняет обнаруженную ранее зависимость трансляции первого, но не второго цистрона CrPV от этого белка [154]. Тем не менее детальный структурно-функциональный анализ реконструированного комплекса этого IRES-элемента с очищенными 40S и eIF3 выявил ряд уникальных черт [152]. Три его домена охватывают «голову» 40S-субчастицы, взаимодействуя с белками и рРНК, а одноцепочечная область, следующая за доменом III, оказывается уложенной в мРНК-канал. Добавление Met-тРНК<sub>i</sub> либо eIF2, либо eIF5B приводит к образованию преинициаторного комплекса, в котором в Р-сайте находится не стартовый кодон AUG<sub>709</sub>, а предшествующий ему uAUG<sub>701</sub>. Чтобы комплекс собрался именно на стартовом AUG<sub>709</sub>, необходимы дополнительные факторы — eIF1 и eIF1A, причём в этом случае eIF2 уже не может быть заменён на eIF5B [152]. Это подразумевает локальное сканирование инициаторной области, напоминающее таковое у вышеописанного IRES EMCV. Интересно, что uAUG<sub>701</sub> открывает микрорамку AUGUGA, поэтому при реальной трансляции нельзя исключить попадания рибосомы на стартовый кодон AUG<sub>709</sub> также и в результате реинициации.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

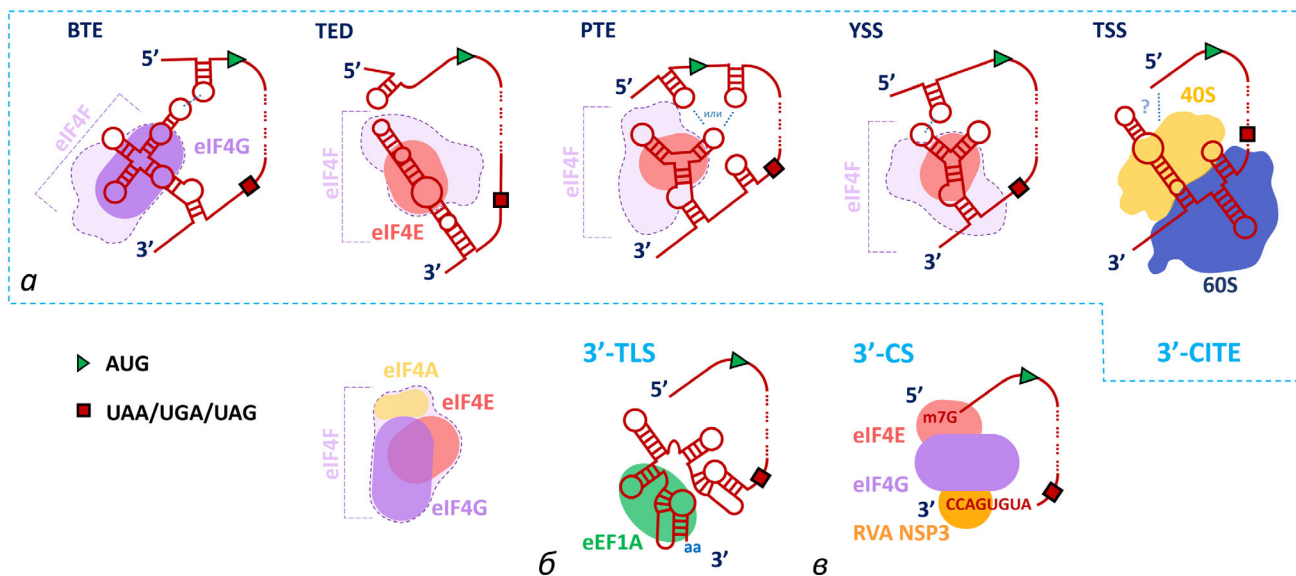
Основываясь на сходстве вторичной структуры, различают 6 основных типов 3'-CITE, а именно: BTE (BYDV-like translation enhancer), TED (translation enhancer domain), PTE (PMV-like translational enhancer), ISS (I-shaped structure), YSS (Y-shaped structure) и TSS (T-shaped structure) (рис. 3, а; табл. 2).

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

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

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

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



**Рис. 3.** Основные способы усиления трансляции вирусных мРНК с помощью элементов, размещённых в 3'-НТО. а – 5 основных типов 3'-CITE и связывающиеся с ними трансляционные компоненты. б – Аминоацелированный 3'-TLS в комплексе с eIF1A. в – 3'-CS ротавируса и компоненты, замыкающие мРНК в кольцо. Полные названия вирусов приведены в тексте статьи, названия элементов – в табл. 2. aa – аминокислотный остаток

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

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

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

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

\*\*\* Связывание белков показано неравновесным методом.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

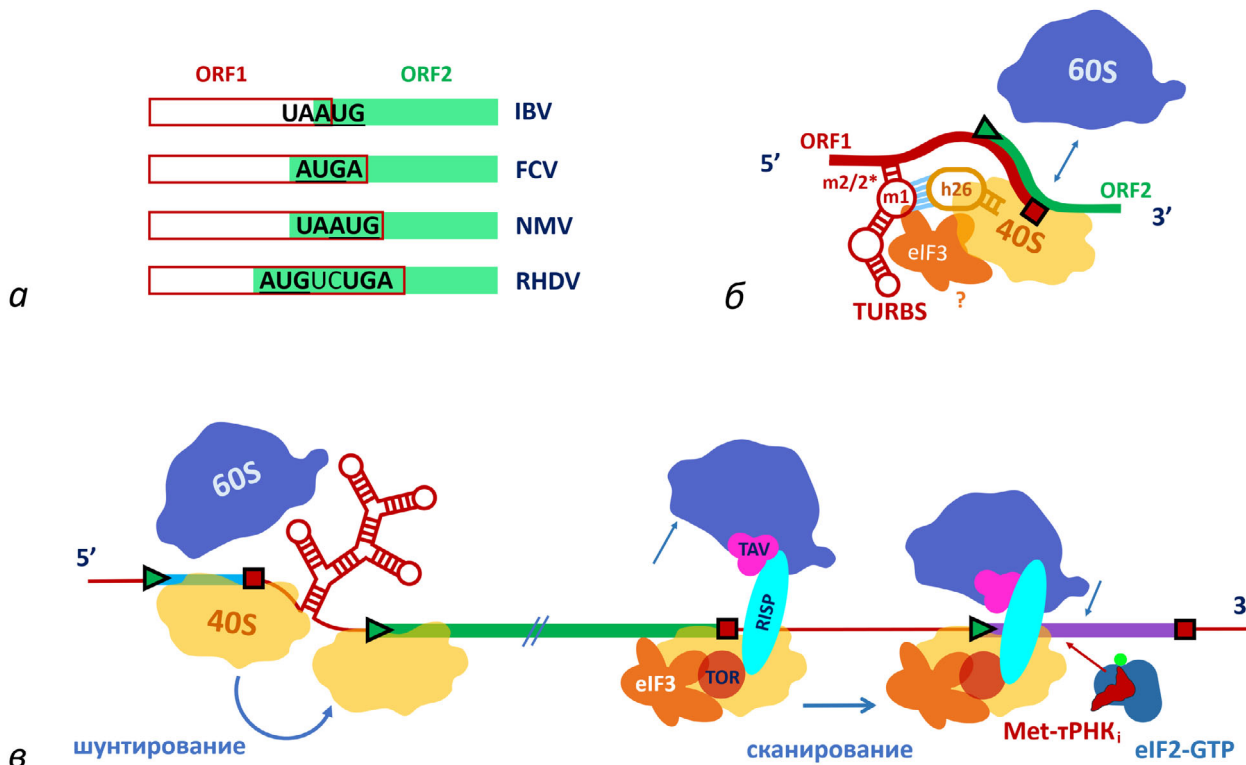


**РЕИНИЦИАЦИЯ ПРИ ТРАНСЛЯЦИИ ВИРУСНЫХ мРНК**

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

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

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



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

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

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

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

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

Помимо калицивирусов и IBV, описаны и другие случаи эффективной реинициации на перекрывающихся рамках: например, у мРНК вируса H<sub>v</sub>V190S паразитического грибка *Helminthosporium victoriae*, респираторно-синцитиального вируса человека (human respiratory syncytial virus, HRSV) и прототипического гиповируса (*Cryphonectria hypovirus 1*, CHV1-EP713) [223]. Мотив TURBS в РНК этих вирусов не обнаружен, однако выявлены другие слабо охарактеризованные участки неконсервативной вторичной структуры, имеющие комплементарность с 18S рРНК.

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

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

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

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

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

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

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

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

#### ПРЕРЫВАЮЩАЯСЯ ЭЛОНГАЦИЯ (МЕХАНИЗМ «StopGo»)

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

#### ТРАНСЛЯЦИЯ КОЛЬЦЕВЫХ ВИРУСНЫХ РНК

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

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

Одна из транслируемых кРНК кодирует онкобелок E7 вируса папилломы [244]. E7 вызывает опухолевую трансформацию клеток, контролируя транскрипцию протоонкогенов и генов-супрессоров опухолевого роста, структуру и модификации хроматина. Показано, что кРНК HPV, синтезируемая после трансфекции клеток цервикальной карциномы плазмидой с мини-геном E7, содержит модифицированные нуклеотиды m<sup>6</sup>A и транслируется в полисомах [244]. кРНК найдены в жизненном цикле и других вирусов – например, Эпштейна–Барр (Epstein–Barr virus, EBV), саркомы Капоши (Kaposi sarcoma herpes virus, KSHV), HBV и др. [245]. Однако достоверно неизвестно, выполняют ли они роль мРНК.

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

### МЕХАНИЗМЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ ВИРУСНЫМ мРНК ТРАНСЛЯЦИОННЫЙ ПРИОРИТЕТ

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

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

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

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

Известны примеры, когда вирусы осуществляют ограниченный протеолиз факторов ини-

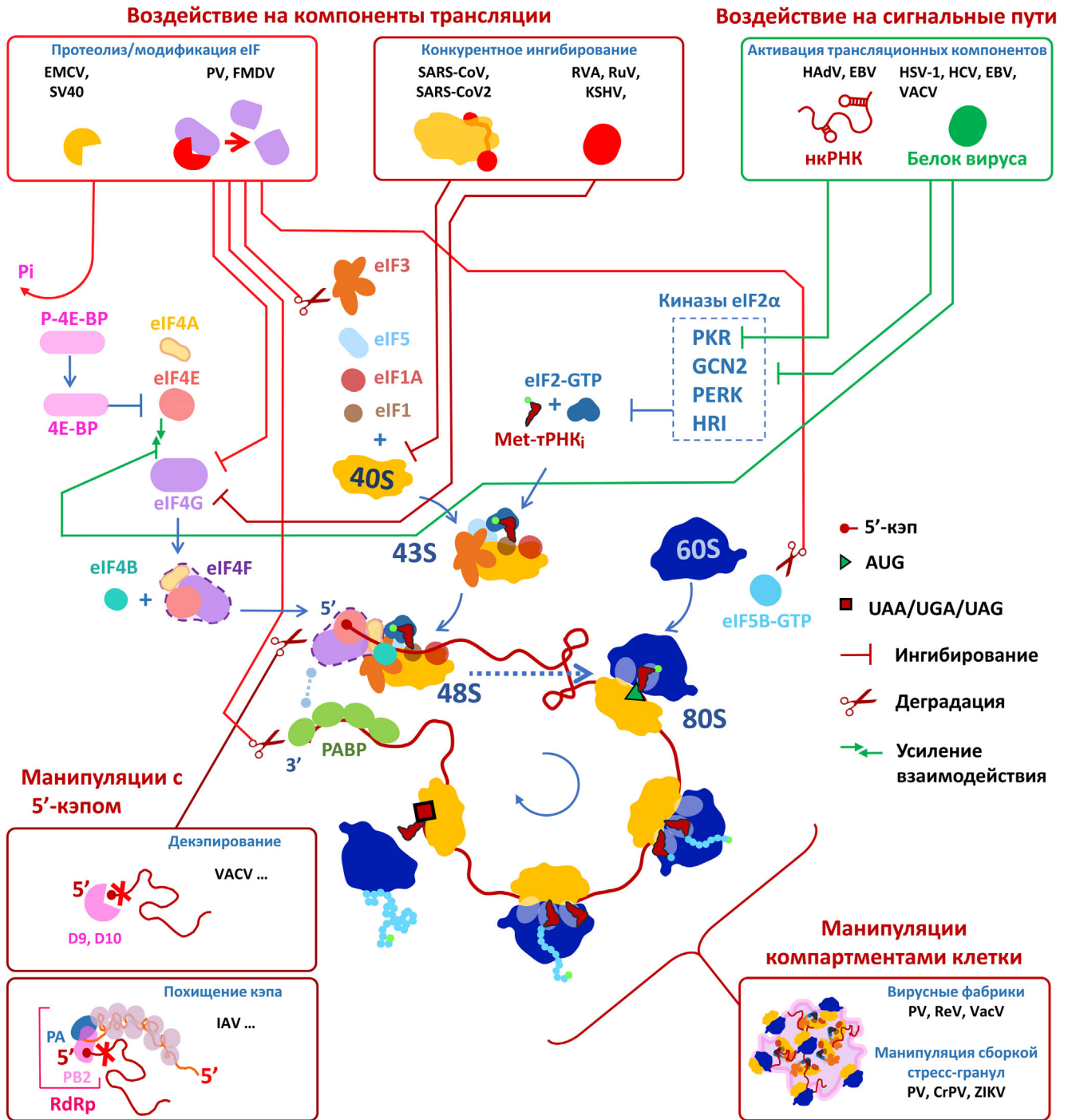


Рис. 5. Механизмы создания вирусами конкурентных преимуществ для трансляции собственных мРНК. Полные названия вирусов приведены в тексте статьи

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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

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

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

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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