



УДК 577.218

ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ 5'-КОНЦЕВОГО СЕГМЕНТА ГЕНОМНОЙ РНК САТЕЛЛИТНОГО ВИРУСА НЕКРОЗА ТАБАКА ПОВЫШАТЬ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТРАНСЛЯЦИИ В БЕСКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЕ СИНТЕЗА БЕЛКА

А.В. Жигайлов, Н.С. Полимбетова, Е.А. Збродько, И.С. Тазабеков, Б.К. Искаков

andrzhjglov@mail.ru

РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина», КН МОН РК,
Алматы, Казахстан

В настоящей работе установлено, что 5'-концевой сегмент (нуклеотиды 1-60) геномной РНК сателлитного вируса некроза табака обладает способностью повышать уровень трансляции в бесклеточной системе синтеза белка из зародышей пшеницы. Показано, что исследуемый сегмент РНК способен поддерживать биосинтез белка при стрессовой для растений температуре (37°C), находясь перед репортерным геном моноцистронных мРНК-конструкций, а также обеспечивать экспрессию второго цистрона, находясь в межцистронном участке бицистронных мРНК-конструкций. Установлена прямая корреляция между степенью комплементарности исследуемого сегмента РНК к участку 1099-1113 центрального домена 18S рРНК растений и его способностью к повышению уровня трансляции репортерных мРНК. Полученные результаты свидетельствуют, что формирование комплементарных взаимодействий между сегментами мРНК и экспонированными в составе 40S рибосомных субчастиц участками 18S рРНК может являться одним из механизмов повышения уровня трансляции у растений.

Введение

Известно, что во время вирусной инфекции мРНК вирусов транслируются эффективнее клеточных мРНК, и основными продуктами клеточного синтеза являются вирусные белки [1, 2]. Причиной высокой эффективности и конкурентной способности вирусных мРНК является использование ими различных альтернативных путей инициации трансляции, для запуска которых необходимы так называемые энхансерные последовательности, которые могут находиться в составе мРНК и многократно повышать уровень их трансляции.

Согласно канонической схеме инициации трансляции эукариотических цитоплазматических мРНК, малая рибосомная субчастица связывается с мРНК только после того, как комплекс белковых факторов инициации узнает кэп-структуру на 5'-конце мРНК. Присоединившись к мРНК, 40S субчастица сканирует ее 5'-нетранслируемую последовательность (НТП) до тех пор, пока не узнает инициаторный кодон AUG [3]. Один из альтернативных механизмов, так называемая

внутренняя инициация трансляции, реализуется у эукариот при трансляции неэкспонированных вирусных РНК, содержащих в своем составе варианты энхансерных последовательностей – так называемые IRES-элементы (от англ. *Internal Ribosome Entry Site*), способные связываться с 40S субчастицами рибосом без участия одного или нескольких факторов инициации [4, 5]. Считают, что с помощью этого механизма осуществляется регуляция селективной трансляции определенных мРНК при росте и дифференциации клеток и в условиях стресса [6].

В настоящее время механизмы, лежащие в основе функционирования IRES-элементов и иных энхансерных последовательностей в клетках растений, остаются недостаточно изученными. Одним из таких механизмов может являться формирование комплементарных взаимодействий между энхансерными последовательностями и участками 18S рРНК, экспонированными в составе 40S рибосомных субчастиц [5, 7]. В этом случае энхансерные последовательности участвуют в привлечении к мРНК дополнительных 40S рибосомных



субчастиц, что позволяет многократно повысить уровень трансляции. Хорошо известно, что подобный механизм реализуется в прокариотических организмах (так называемое взаимодействие Шайн-Далгарно, ответственное за правильное распознавание стартового кодона у прокариот) [3].

В настоящей работе нами проведены эксперименты, доказывающие, что свойства, по крайней мере, некоторых природных энхансерных последовательностей, опосредованы наличием в их составе сегментов, комплементарных к участкам центрального домена 18S рРНК. В качестве природной энхансерной последовательности был выбран 5'-концевой сегмент (нуклеотиды 1-60) геномной РНК (гРНК) сателлитного вируса некроза табака (STNV), включающий

тридцатинуклеотидную 5'-НТП и первые тридцать AUG-приближенных нуклеотидов кодирующей области этой РНК. Проведено исследование роли комплементарности данного сегмента РНК к 18S рРНК в проявлении им энхансерных свойств.

Материалы и методы

В работе использовали зародыши яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта «Казахстанская 4». Для работы использовались [³⁵S]-L-метионин (37,0 МБк/нмоль) и реагенты фирм «Sigma», «Serva», «Merck», «Fermentas», «Roche», «Promega» и «BioLabs». Олигодезоксирибонуклеотиды (олиго-ДНК) синтезированы в Институте Фридриха Мишера (Базель, Швейцария):

«N+» (5' AGCTTAGTAAAGACAGGAACTTTACTGACTAACATGGCAAAACA 3'),
«N-» (5'-CATGTTAGTCAGTAAAGTTTCCTGTCTTTACTA-3'),
«H+» (5'-AGCTTAGTAAAGACAGGAACTTTACTGACTAACCTGGCAAAACA-3'),
«H-» (5'-CAGGTTAGTCAGTAAAGTTTCCTGTCTTTACTA-3'),
«TN+» (5'-AGAGACCAAAGGCCGAAAATAGTCGAC-3'),
«TN-» (5'-CATGGTCGACTATTTTCGGCCTTTGGTCTCTTGTTTTGC-3'),
«TH+» (5'-GGAACCCAAAGACCGAAAATAGTCGAC-3'),
«TH-» (5'-CATGGTCGACTATTTTCGGTCTTTGGGTCCTGTTTTGC-3'),
«TL+» (5'-AGTGAACAACCGCCGAAAATAGTCGAC-3'),
«TL-» (5'-CGTTTTGTCTTGGGTTTGTCTGCTTTTATCAGCTGGTAC-3') и «GUS-» (5'-CAGCAATTGCCCCGGCTT-3')

Создание рекомбинантных ДНК-конструкций. Для создания моноцистронных ДНК-конструкций использовали плазмиду «*pl-GUS*», сконструированную на основе вектора pBluescript KS II(+) и содержащую репортерный ген β-глюкуронидазы (*uidA*) [8]. Для создания бицистронных ДНК-конструкций использовали плазмиду «*GUS-pl-CAT*», содержащую репортерный ген *uidA*, кодирующий β-глюкуронидазу, и ген *CAT*, кодирующий хлорамфениколацетилтрансферазу. Исходные плазмиды были любезно предоставлены Д.Р. Галли (Отдел Биохимии, Университет Калифорнии, США).

Фрагменты ДНК, фланкированные сайтами рестрикции *Hind*III и *Nco*I и содержащие в своем составе различные вариан-

ты 5'-концевого сегмента гРНК STNV, собирались из двух видов ДНК-фрагментов: 5'-приближенного (содержащего липкие концы сайта рестрикции *Hind*III) и AUG-приближенного (содержащего липкие концы сайта рестрикции *Nco*I). Было создано два типа 5'-приближенных ДНК-фрагментов: «N», образуемый при отжиге олигоДНК «N+» и «N-», и «H», образуемый при отжиге олигоДНК «H+» и «H-». Первый соответствовал по последовательности нативному варианту исследуемого сегмента РНК, а второй отличался от нативного фрагмента лишь одной нуклеотидной заменой, заменяющей стартовый ATG-кодон на CTG. В первом случае стартовым кодоном являлся природный ATG, при этом



30-нуклеотидная кодирующая область гРНК STNV находилась в кодирующей области рекомбинантных ДНК-конструкций. Во втором случае стартовым кодоном являлся первый ATG-триплет репортерного гена, при этом 30-нуклеотидная кодирующая область гРНК STNV перемещалась в 5'-НТП рекомбинантной ДНК-конструкции. Также было создано три варианта AUG-приближенных ДНК-фрагментов («TN», «TH»

и «TL»). Первый из них («TN») соответствовал по нуклеотидной последовательности нативному варианту 5'-концевого сегмента гРНК STNV, второй вариант («TH») содержал нуклеотидные замены, повышающие степень его комплементарности к участку 1099-1113 центрального домена 18S рРНК растений, а третий вариант («TL») содержал нуклеотидные замены, ослабляющие такую комплементарность (рис. 1).

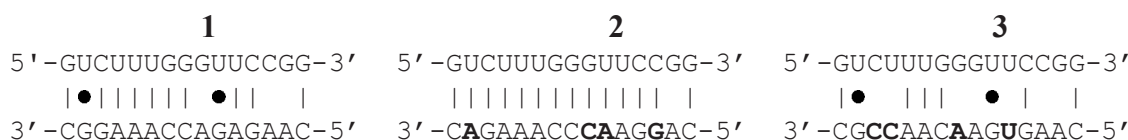


Рис. 1. Комплементарные взаимодействия различных вариантов 5'-концевого сегмента гРНК STNV с участком 1099-1113 центрального домена 18S рРНК растений

В приведенных РНК-дуплексах сверху расположен участок 1099-1113 центрального домена 18S рРНК пшеницы, а снизу - участок 39-53 того или иного варианта 5'-концевого сегмента гРНК STNV. Нуклеотидные замены выделены полужирным шрифтом; знаком «|» указаны совершенные пары нуклеотидов, а знаком «•» – несовершенные пары «G-U». 1 – нативный вариант 5'-концевого сегмента гРНК STNV; 2 – вариант с усиленной комплементарностью к 18S рРНК; 3 – вариант с ослабленной комплементарностью к 18S рРНК.

После лигирования соответствующих 5'- и 3'-приближенных фрагментов ДНК, были получены вставки ДНК «NTN», «NTH», «NTL», «HTN», «HTH» и «HTL», которые были лигированы в векторные ДНК, обработанные предварительно рестриктазами *Hind*III и *Nco*I. Таким образом, были получены моноцистронные ДНК-конструкции «NTN-GUS», «NTH-GUS», «NTL-GUS», «HTN-GUS», «HTH-GUS»

и «HTL-GUS» и бицистронные ДНК-конструкции «GUS-HTN-CAT», «GUS-HTH-CAT» и «GUS-HTL-CAT». Схемы строения данных ДНК-конструкций, а также нуклеотидные последовательности всех вариантов 5'-концевого сегмента гРНК показаны на рис. 2. Правильность построения ДНК-конструкций проверялась рестрикционным анализом и ПЦР.

А

«NTN»

5'-AGUAAAGACAGGAAACUUUACCGACUAACAUGGCAAAAACAAGAGACCAAAGGCCGAAAAU-3'

«NTH»

5'-AGUAAAGACAGGAAACUUUACCGACUAACAUGGCAAAAACAGGA**ACCC**AAAGACCGAAAAU-3'

«NTL»

5'-AGUAAAGACAGGAAACUUUACCGACUAACAUGGCAAAAACAAGUGA**ACAAC**CGCCGAAAAU-3'

«HTN»

5'-AGUAAAGACAGGAAACUUUACCGACUAAC**C**UGGCAAAAACAAGAGACCAAAGGCCGAAAAU-3'

«HTH»

5'-AGUAAAGACAGGAAACUUUACCGACUAAC**C**UGGCAAAAACAGGA**ACCC**AAAGACCGAAAAU-3'

«HTL»

5'-AGUAAAGACAGGAAACUUUACCGACUAAC**C**UGGCAAAAACAAGUGA**ACAAC**CGCCGAAAAU-3'



А – использующиеся в работе варианты 5'-концевого сегмента гРНК STNV. Нуклеотидные замены выделены полужирным шрифтом, а прямоугольником обозначен природный AUG-кодон, который в вариантах «HTN», «HTH» и «HTL» замещен на CUG-кодон; Б – схематическое представление полученных рекомбинантных ДНК-конструкций; 1 – ДНК-конструкции «NTN-GUS», «NTH-GUS» и «NTL-GUS»; 2 – ДНК-конструкции «HTN-GUS», «HTH-GUS» и «HTL-GUS»; 3 – ДНК-конструкции «GUS-HTN-CAT», «GUS-HTH-CAT» и «GUS-HTL-CAT». Стрелкой указано наличие стартовых кодонов; T3 и T7 – промоторы фара T3 и фара T7 соответственно, 5'-STNV – фрагмент ДНК, соответствующий 5'-концевому сегменту гРНК STNV, GUS – uidA, кодирующий β-глокуронидазу, CAT – ген, кодирующий хлорамфениколацетилтрансферазу, 3'-TMV – 3'-HTT11 гРНК вируса табачной мозаики.

было получить радиоактивно меченые продукты трансляции, к реакционной смеси дополнительно прибавляли 0,075 мМ [³⁵S]-L-метионина (37,0 МБк). Инкубировали при 26°C в течение 1 часа или при 37°C в течение 2 часов.

Эффективность трансляции определяли по активности β -глюкуронидазы (GUS), которая являлась продуктом трансляции (измерение GUS-активности осуществлялось флуорометрически и выражалось в условных единицах).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) использовалась для подтверждения наличия в составе ДНК-конструкций той или иной вставки и правильности её ориентации. В качестве одного из праймеров выступал олигоДНК «Н+», а в качестве второго праймера - олигоДНК «GUS-». Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 50 mM KCl, 10 mM трис-HCl (pH 9,0), 2,5 mM MgCl₂, 10 mM ДТТ, 200 мкМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов, 2,5 ед. Taq-полимеразы фирмы «Promega», 0,1 мкг



плазмидной ДНК и по 1 мкМ каждого из двух праймеров. Синтез проводили в амплификаторе 9700 фирмы «Applied Biosystems» при использовании следующего температурного режима: стадия 1 - 5 мин. при 94°C - 1 цикл; стадия 2 - 30 сек. при 94°C, 30 сек. при 58°C, 1 мин. при 72°C - 30 циклов; стадия 3 - 5 мин. при 72°C - 1 цикл. Продукты ПЦР анализировали в 1,5% агарозном геле.

Секвенирование ДНК-конструкций для выверки нуклеотидных последовательностей, встроенных в них сегментов ДНК, проводилось в Институте Фридриха Мишера (Базель, Швейцария). В качестве праймера использовался олигоДНК «GUS-».

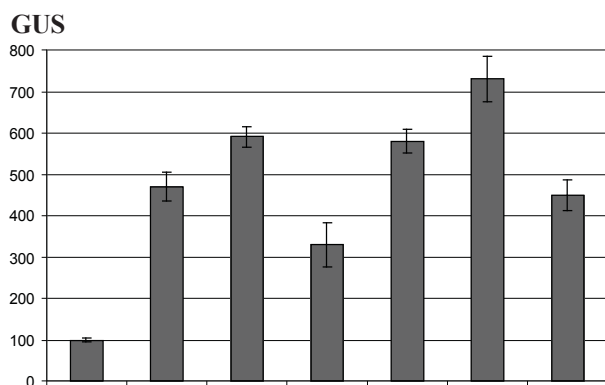
Результаты и обсуждение

Единого механизма действия энхансерных последовательностей, по-видимому, не существует. Одним из возможных механизмов функционирования таких регуляторных последовательностей может являться прямое их взаимодействие с определенными участками 18S рРНК в составе рибосомных субчастиц [10].

С использованием компьютерной программы «RNA-structure v.3.1» в нашей лаборатории было показано, что в составе 5'-концевого сегмента (нуклеотиды 1-60) гРНК сателлитного вируса некроза табака (STNV) находятся последовательности, комплементарные к участку 1099-1113 центрального домена 18S рРНК растений.

Основываясь на результатах данного компьютерного анализа, было сделано предположение, что благодаря такой комплементарности данный сегмент РНК способен напрямую взаимодействовать с 40S рибосомными субчастицами растений, что способствует привлечению к мРНК дополнительных рибосом, а соответственно – к повышению эффективности ее трансляции. Чтобы проверить эту гипотезу, было решено исследовать энхансерные свойства 5'-концевого сегмента гРНК STNV, а также двух его вариантов, отличающихся от первого степенью комплементарности к участку 1099-1113 центрального домена 18S рРНК растений. Комплементарность к 18S рРНК первого варианта была усилена, а второго – наоборот, ослаблена (рис. 1).

Было получено три типа ДНК-конструкций, содержащих в своем составе эти три варианта 5'-концевого сегмента гРНК STNV. В 5'-НТП первой группы ДНК-конструкций («NTN-GUS», «NTH-GUS» и «NTL-GUS») помещался ДНК-фрагмент, соответствующий тридцатинуклеотидой 5'-НТП гРНК STNV, а последовательность, соответствующая тридцатинуклеотидному AUG-приближенному участку кодирующей области этой РНК располагался в кодирующей области ДНК-конструкций (схема 1 на рис. 2Б). Во второй группе ДНК-конструкций («HTN-GUS», «HTH-GUS» и «HTL-GUS») весь 5'-концевой сегмент гРНК STNV помещался перед репортерным



Активность β -глюкуронидазы в относительных единицах флуоресценции. Результаты в таблице под диаграммой приведены в виде $X_{\text{ср}} \pm \text{md}$, где $X_{\text{ср}}$ – среднее значение, а md – ошибка среднего арифметического [11].

«pl-GUS»	«NTN-GUS»	«NTH-GUS»	«NTL-GUS»	«HTN-GUS»	«HTH-GUS»	«HTL-GUS»
100 ± 5	470 ± 34	590 ± 25	330 ± 54	580 ± 30	730 ± 55	450 ± 38

Рис. 3. Эффективность трансляции мРНК-конструкций «*pl-GUS*», «*NTN-GUS*», «*NTH-GUS*», «*NTL-GUS*», «*HTN-GUS*», «*HTH-GUS*» и «*HTL-GUS*»



геном, т.е. в 5'-НТП ДНК-конструкций. Это достигалось внесением в него нуклеотидной замены, замещающей AUG-кодон на CUG-кодон (схема 2 на рис. 2Б). В третьей группе ДНК-конструкций («GUS-NTN-CAT», «GUS-NTH-CAT» и «GUS-NTL-CAT») вставки помещались в межцистронное пространство между репортерным геном *uidA*, кодирующим β-глюкуронидазу, и геном CAT, кодирующим хлорамфениколацетилтрансферазу (схема 3 на рис. 2Б).

На основе всех полученных ДНК-конструкций методом транскрипции *in vitro* были синтезированы соответствующие им РНК-конструкции, которые использовались в качестве мРНК в бесклеточной системе синтеза белка из зародышей пшеницы. Результаты трансляции моноцистронных РНК-конструкций при температуре 26°C в течение 1 часа представлены на рис. 3. В качестве контрольной использовали мРНК-конструкцию «*pl-GUS*», содержащую в своей 5'-НТП линкерную последовательность (5'-GCCUAAGCUUGUCGACC-3'), не обладающую энхансерными свойствами.

Как видно из данного рисунка, все варианты 5'-концевого сегмента гРНК STNV проявляют свойства энхансерных последовательностей: содержащие их моноцистронные РНК-конструкции по эффективности трансляции в несколько раз превосходят контрольную мРНК-конструкцию «*pl-GUS*». Причем усиление комплементарности последовательности STNV к центральному домену 18S рРНК приводит к достоверному повышению уровня экспрессии мРНК: по эффективности трансляции конструкция «*NTH-GUS*»

достоверно превосходит конструкцию «*NTN-GUS*» (критерий Стьюдента [11] составил $P(t \geq T) = 0,011$), а конструкция «*HTH-GUS*» достоверно превосходит конструкцию «*HTN-GUS*» ($P(t \geq T) = 0,029$). В то же время, ухудшение комплементарности к центральному домену 18S рРНК негативно сказывается на проявлении исследуемой последовательностью энхансерных свойств: по эффективности экспрессии мРНК-конструкция «*NTL-GUS*» достоверно уступает мРНК-конструкции «*NTN-GUS*» ($P(t \geq T) = 0,022$), а эффективность экспрессии мРНК-конструкции «*HTL-GUS*» достоверно ниже, чем у мРНК-конструкции «*HTN-GUS*» ($P(t \geq T) = 0,014$). Следует отметить, что прямая зависимость эффективности проявления энхансерных свойств от степени комплементарности к участку 1099-1113 18S рРНК проявляется как при нахождении последовательности, комплементарной к этому участку 18S рРНК, в 5'-НТП (конструкции «*HTN-GUS*», «*HTH-GUS*» и «*HTL-GUS*»), так и в кодирующей области мРНК-конструкций (конструкции «*NTN-GUS*», «*NTH-GUS*» и «*NTL-GUS*»).

Чтобы проверить, способны ли РНК-конструкции, содержащие в своем составе различные варианты 5'-концевого сегмента гРНК STNV в стрессовых условиях, они были транслированы при температуре 37°C (которая для растений является температурой теплового шока). Результаты трансляции моноцистронных РНК при температуре 37°C в течение 2 часов представлены в таблице 1.

Таблица 1

Эффективность трансляции моноцистронных РНК-конструкций при температуре 37°C

мРНК-конструкция	GUS-активность при 26°C, Ед. флуоресценции	GUS-активность при 37°C, Ед. флуоресценции	(Эффективность трансляции при 26°C) / (Эффективность трансляции при 37°C)
« <i>pl-GUS</i> »	1560 ± 89	63 ± 5	24,76
« <i>NTN-GUS</i> »	7290 ± 320	785 ± 40	9,29
« <i>NTH-GUS</i> »	9120 ± 365	1285 ± 75	7,1
« <i>NTL-GUS</i> »	5030 ± 250	480 ± 55	10,45
« <i>HTN-GUS</i> »	8940 ± 365	995 ± 62	8,98
« <i>HTH-GUS</i> »	11320 ± 510	1620 ± 85	6,99
« <i>HTL-GUS</i> »	6750 ± 240	615 ± 27	10,98



Как видно из таблицы 1, РНК-конструкции, содержащие перед репортерным геном 5'-концевой сегмент гРНК STNV, способны поддерживать свою экспрессию даже при температуре температурного шока (37°C), в то время как в данных условиях большинство клеточных мРНК растений, использующих для своей экспрессии канонический путь инициации трансляции, прекращают транслироваться. Так, если эффективность трансляции мРНК-конструкции «*pl-GUS*» в условиях теплового шока (37°C) снижается почти в 25 раз по сравнению с нормой (26°C), то эффективность экспрессии мРНК-конструкций «*NTN-GUS*» и «*HTN-GUS*» снижается в 9 раз, а эффективность экспрессии конструкций «*HTN-GUS*» и «*HTN-GUS*» - лишь в 7 раз (таблица 1). Эти данные указывают на то, что мРНК-конструкции, содержащие перед репортерным геном 5'-концевой сегмент гРНК STNV, могут использовать для своей экспрессии альтернативные пути инициации трансляции.

Чтобы проверить, обладает ли тот или иной сегмент РНК способностью к внутренней посадке рибосом (т.е. является ли он IRES-элементом), его обычно помещают в межцистронное пространство бицистронных мРНК-конструкций. Если данный РНК-сегмент не обладает IRES-активностью, с таких мРНК-конструкций транслируются только первый цистрон, если же она обладает такой активностью - помимо первого цистрона с таких РНК-конструкций начинает транслироваться и второй цистрон [5, 10].

Чтобы проверить, обладает ли 5'-концевой сегмент гРНК STNV IRES-активностью, ДНК-фрагменты «HTN», «HTH» и «HTL» были встроены в межцистронный участок бицистронной ДНК-плазмиды, содержащей ген *uidA*, кодирующий β -глюкуронидазу, и ген *CAT*, кодирующий хлорамфениколацетилтрансферазу. Таким образом, были получены бицистронные ДНК-конструкции «*GUS-HTN-CAT*», «*GUS-HTH-CAT*» и «*GUS-HTL-CAT*» (схема 3 на рис.

2Б). С этих ДНК-конструкций с использованием РНК-полимеразы фага Т3 были транскрибированы соответствующие им бицистронные мРНК-конструкции. В качестве контрольной использовалась мРНК-конструкция «*GUS-pl-CAT*», в которой между генами *uidA* и *CAT* находилась линкерная последовательность (5'-AAGCUUGUCGACC-3'), не обладающая IRES-активностью.

Все бицистронные РНК-конструкции использовались в качестве мРНК для синтеза белка в бесклеточной системе из зародышей пшеницы, содержащей радиоактивный [35 S]-L-метионин. После окончания инкубации проводился электрофорез в ПАА-геле продуктов трансляции этих мРНК-конструкций. Гель сушили и проводили его радиоавтографию. Результаты эксперимента приведены на рис. 4.

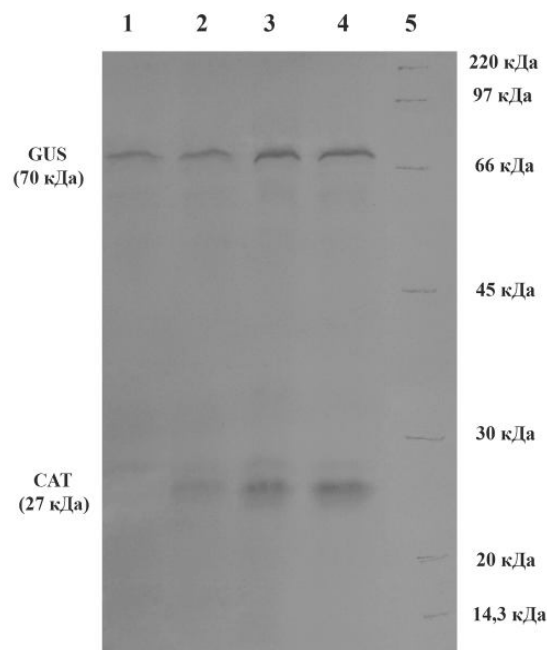


Рис. 4. Радиоавтографический и денситометрический анализ продуктов трансляции бицистронных РНК-конструкций, разделенных в 12,5% ПАА-геле

GUS – β -глюкуронидаза (продукт трансляции первого цистрона), *CAT* – хлорамфениколацетилтрансфераза (продукт трансляции второго цистрона). На дорожках 1-5 проанализированы продукты трансляции следующих РНК-конструкций: 1 - «*GUS-pl-CAT*»; 2 - «*GUS-HTL-CAT*»; 3 - «*GUS-HTN-CAT*»; 4 - «*GUS-HTH-CAT*»; 5 - белковый маркер RPN756 (полосы перед радиоавтографией обводились радиоактивными [14 C] - чернилами).



**Данные денситометрического анализа,
полученные с использованием
компьютерной программы «ImageJ
1.42q»:**

РНК-конструкция	«GUS» ¹	«CAT» ²	«CAT»/«GUS»
«GUS-pl-CAT»	4132,96	48,36	0,012
«GUS-HTL-CAT»	3172,61	3069,32	0,967
«GUS-HTN-CAT»	6411,0	9088,73	1,418
«GUS-HTH-CAT»	7066,01	14153,56	2,003

В данном случае «GUS» - уровень экспрессии первого цистрона согласно данным денситометрического анализа в условных единицах; «CAT» - уровень экспрессии второго цистрона согласно данным денситометрического анализа, в условных единицах

Исходя из данных, представленных на рис. 4, можно сделать вывод, что одним из возможных механизмов функционирования 5'-концевого сегмента геномной РНК STNV в качестве энхансерной последовательности может являться обеспечение внутренней посадки рибосом, то есть функционирование его в качестве IRES-элемента. Так как относительный уровень экспрессии второго цистрона в случае конструкции «GUS-HTN-CAT» ниже, чем в случае конструкции «GUS-HTH-CAT», но выше, чем в случае конструкции «GUS-HTL-CAT», можно предположить, что возможным механизмом рекрутирования рибосом исследуемым сегментом РНК может служить формирование комплементарных взаимодействий между ним и экспонированными в составе 40S рибосомных субчастиц участками 18S рРНК пшеницы.

Таким образом, в данной работе показано, что 5'-концевой сегмент геномной РНК сателлитного вируса некроза табака (нуклеотиды 1-60) способен по-

вышать эффективность трансляции, располагаясь в 5'-НТП и в кодирующей области мРНК-конструкций. При его помещении в межцистронное пространство бицистронных мРНК-конструкций, он опосредует эффективную экспрессию второго цистрона, что указывает на его способность обеспечивать внутреннюю посадку рибосом в растительных системах. Установлена прямая корреляция между степенью комплементарности исследуемого сегмента РНК к участку 1099-1113 центрального домена 18S рРНК растений и способностью к повышению уровня трансляции репортерных мРНК.

Вариант «HTN» 5'-концевого сегмента гРНК STNV, показавший наилучший результат в повышении уровня трансляции репортерных мРНК, может быть использован в качестве регуляторной последовательности при создании рекомбинантных ДНК- и РНК-конструкций, предназначенных для экспрессии в растительных системах, для повышения синтеза рекомбинантных генов. Используя данные о роли комплементарности мРНК к 18S рРНК в процессе синтеза белка у растений, можно создавать искусственные энхансерные последовательности с заданными свойствами.

Работа выполнена в рамках научно-исследовательского проекта Программы фундаментальных исследований: «Исследование молекулярных механизмов в регуляции биосинтеза белка у растений для разработки новой технологии повышения синтеза целевых белков в растительных системах *in vitro* и *in vivo*» (номер гос. регистрации 0109PK00144).

Литература

1. Gallie D.R., Le H, Caldwell Ch., Tanguay R.L., Hoang N.X., Browning K.S. The phosphorylation state of translation initiation factors is regulated developmentally and following heat shock in wheat. // *J. Biol. Chem.* – 1997. - Vol. 272. - P. 1046-1053.
2. Bailey-Serres J. Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants. // *Trends in Plant Science.* – 1999. - Vol. 4. - No. 4. - P. 142-148.



3. Kozak M. Rethinking some mechanisms invoked to explain translational regulation in eukaryotes // *Gene*. – 2006. – Vol. 382. – P. 1–11.
4. Pestova T.V., Shatsky I.N., Fletcher S.P., Jackson R.J., Hellen, C.U.T. 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.* – 1998. – Vol. 12. – P. 67-83.
5. Mauro V.P., Edelman G.M. The ribosome filter hypothesis. // *Proc.Nat'l.Acad. Sci. USA*. – 2002. – Vol. 99, No.19. – P. 12031–12036.
6. Скулачев М.В. Внутренняя инициация трансляции – разнообразие механизмов и возможная роль в жизнедеятельности клетки // *Успехи биологической химии*. – 2005. – Т.45. – С. 123-172.
7. Akbergenov R.Zh., Zhanybekova S.Sh., Kryldakov R.V., Zhigailov A.V., Polimbetova N.S., Hohn T., Iskakov B.K. ARC-1, a sequence element complementary to an internal 18S rRNA segment, enhances translation efficiency in plants when present in the leader or intercistronic region of mRNAs // *Nucleic Acids Research*. – 2004. – Vol.32. – №1. – P. 239-247.
8. Gallie D.R., Feder J.N., Schimke R.T., Walbot W. Post-transcriptional regulation in higher eukariotes: the role of reporter gene in controlling expression // *Mol. Gen. Genet.* – 1991. – Vol. 228. – P. 258-264.
9. Gurevich V., Obukhova T.A. Preparative in vitro mRNA synthesis using SP6 and T7 RNA polymerases // *Anal. Biochem.* – 1991. – Vol. 195. – P. 207-213.
10. Chappell S.A., Edelman G.M., Mauro V.P. A 9-nt segment of a cellular mRNA can function as an internal ribosome entry site (IRES) and when present in linked multiple copies greatly enhances IRES activity // *PNAS*. – 2000. – Vol. 97. – P. 1536-1541.
11. Удольская Н.Л. Введение в биометрию. - Алматы: Наука КазССР, 1976. - 84 с.

Түйін

Бұл жұмыста темекі некрозының сателлитті вирусы геномдық РНҚ-сының 5'-ұшындағы (1-60 нуклеотидтер) бидай ұрықтарынан жасалған жасушадан тыс трансляциялық жүйесінде трансляциялану деңгейін жоғарылату қабілеті көрсетілген. Вирустың бұл РНҚ-сегменті рекомбинантты моноцистронды РНҚ-конструкцияларының құрамындағы репортерлік геннің алдында болғанда өзінің энхансерлік қасиетін көрсететіні анықталды, ал, бицистронды РНҚ-конструкциялардың цистронаралық кеңістігіне орналастырылғанда, екінші цистронның экспрессиясына себеп бола алатыны да байқалды, сонымен қатар өсімдіктер үшін қолайлы емес температура (37°C) жағдайында мРНҚ трансляциясын қолдайды. Өсімдіктердің 18S рРНҚ орталық доменінің 1099-1113 сегментіне нуклеотидтердің комплементарлық деңгейін көтерген сайын вирус РНҚ-ның бұл сегментінің энхансерлік қасиеттері күшейетіні, ал комплементарлықты азайтқанда оның энхансерлік қасиеттері төмендейтіні анықталды. Осы нәтижелер рибосоманың 40S-суббөлігі құрамындағы 18S рРНҚ-ның ашық тізбектері мен мРНҚ-ның сегменттері арасында комплементарлы байланыс пайда болуы өсімдіктердегі трансляция деңгейін күшейту тетіктерінің бірі болуы мүмкін.

Summary

In present work it has been established that 5'-end segment of Satellite Tobacco Necrosis Virus genomic RNA (1-60 nucleotides) is able to increase the translation level in cell-free protein-synthesizing system from wheat germ. We have shown, that these RNA segment is able to support high translation level even at stress temperature conditions (37°C) in plants, when present before reporter gene in recombinant monocistronic mRNAs, and to provide second cistron expression when present in intercistronic region of bicistronic mRNA-constructions. The direct correlation between the complementarity to 1099-1113 region of 18S rRNA certain domain and translation enhancement efficiency was established for investigated RNA segment. The data suggest that formation of complementary interactions between the translation enhancer sequences of some mRNAs and certain exposed regions of 18S rRNA could be one of the potential mechanisms of translation level increasing in plants.