

*А.В. ЖИГАЙЛОВ<sup>1</sup>, Н.С. ПОЛИМБЕТОВА<sup>1</sup>,  
Р.Ж. АКБЕРГЕНОВ<sup>2</sup>, С.Ш. ЖАНЫБЕКОВА<sup>2</sup>, Б.К. ИСКАКОВ<sup>1</sup>*

## **ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ 3'-КОНЦЕВОГО УЧАСТКА 18S рРНК РАСТЕНИЙ, НАХОДЯЩЕЙСЯ В СОСТАВЕ 40S РИБОСОМНЫХ СУБЧАСТИЦ, В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ мРНК**

*(ДГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина»,  
РГП «Центр биологических исследований» МОН РК, Алматы, Казахстан)<sup>1</sup>  
(Институт ботаники, Университет г. Базель, Швейцария)<sup>2</sup>*

Изучена функциональная роль 3'-концевого и центрального доменов 18S рРНК растений в регуляции эффективности трансляции мРНК. Нами показано, что добавление в белок-синтезирующую бесклеточную систему коротких (20 нт) олигоРНК, обладающих значительной комплементарностью к исследуемым районам 18S рРНК, приводит к существенному ингибированию трансляции репортерных мРНК. Напротив, те олигоРНК, у которых степень комплементарности была искусственно уменьшена, не ингибировали трансляцию при тех же концентрациях. Полученные данные свидетельствуют о том, что 3'-концевой домен и центральный домен 18S рРНК в составе 40S рибосомной субчастицы растений достаточно экспонированы, чтобы участвовать в комплементарных взаимодействиях с другими РНК.

Исследования последних лет показали, что первичная структура мРНК заключает в себя не только информацию о кодируемом белке, но и полный набор сведений о самой мРНК как о фун-

кционирующей молекуле. Основным участником процесса трансляции являются собственно рибосомы, которые, наряду с белковыми факторами инициации трансляции, также принимают учас-

тие в осуществлении и регуляции биосинтеза белка, поэтому изучение механизмов функционирования рибосом и регуляции их активности продолжает оставаться весьма актуальным.

Известно, что во время вирусной инфекции мРНК вирусов транслируются эффективнее клеточных мРНК, и основными продуктами клеточного синтеза являются вирусные белки [1]. Причину высокой эффективности и конкурентной способности вирусных мРНК обычно связывают с наличием в составе РНК этих вирусов так называемых энхансерных последовательностей (ЭП) – последовательностей, способных повышать эффективность трансляции содержащих их мРНК. Так, установлено, что геномные РНК многих растительных вирусов, а также мРНК некоторых стресс-индуцируемых белков растений действительно содержат ЭП [1]. Хотя к настоящему времени накоплено большое количество информации о структуре этих ЭП, детальные механизмы их функционирования в растении остаются неизвестными.

Одним из таких механизмов может являться прямое (без участия белковых факторов инициации трансляции) связывание 40S субчастицы рибосомы с мРНК посредством комплементарного взаимодействия какого-либо экспонированного участка 18S рРНК с участком в пределах 5'-НТП мРНК [2, 3]. Для эукариот установлено несколько районов в составе 18S рРНК, способных комплементарно взаимодействовать с мРНК. Наличие в составе некоторых мРНК последовательностей комплементарных к этим районам стимулирует внутреннюю (кэп-независимую) инициацию трансляции таких мРНК [2, 4].

В статье приведены результаты исследований, посвященных изучению функциональной роли различных доменов 18S рРНК и их доступности для комплементарного взаимодействия с другими РНК (например, олигоРНК и мРНК). С применением компьютерного анализа и экспериментальных исследований налажен подход для изучения этих свойств 18S рРНК.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали зародыши яровой пшеницы *Triticum aestivum* L., сорта “Казахстанская 4”, полученные по методу Ф. Джонстона и Х. Стерн [5].

*Компьютерный анализ* комплементарного взаимодействия между олигоРНК и районами 18 рРНК растений проводили с использованием программ по построению и анализу вторичных структур РНК, задавая параметры анализа по межмолекулярному взаимодействию [6]. Визуализацию внутримолекулярных и межмолекулярных комплементарных взаимодействий проводили с помощью программы RNA-Vis [7].

*Создание конструкций.* Все конструкции были созданы на основе плазмиды «pI-GUS», любезно предоставленной доктором Д. Галли и описанной ранее [8]. При создании конструкций, кодирующих олигоРНК с различной степенью комплементарности к центральному и 3'-концевому участкам 18S рРНК, использовали синтетические олиго-ДНК, фланкированные липкими концами рестрикционных сайтов *Hind*III и *Nco*I. Для получения 5'-лидерных фрагментов РНК, перед реакцией транскрипции *in vitro*, проводили линеаризацию плазмиды по сайту рестриктазы *Nco*I.

*Транскрипцию in vitro* с использованием T7 РНК-полимеразы проводили по модифицированной методике Гуревича [9]. Реакционная смесь содержала 250 мМ Нерес-КОН (рН 7,5), 30 мМ Mg(Ас)<sub>2</sub>, 40 мМ ДТТ, 2 мМ спермина, по 7 мМ каждого из рибонуклеозидтрифосфатов, 2 ед/мкл ингибитора рибонуклеаз (RNAsin), 1 ед./мкл T7 РНК-полимеразы и 0,4 мкг ДНК-матрицы, предварительно линеаризованной рестриктазой *Nco*I. Реакционную смесь инкубировали 2 ч при 37 °С. По окончании инкубации смесь депротенинизировали, добавляли LiCl до конечной концентрации 3М и инкубировали во льду 15 мин. После центрифугирования при 10000 g в течение 15 мин, осадок промывали 70% этанолом, высушивали и растворяли в воде. Качество продукта транскрипции проверяли электрофорезом в 5% ПААГ с 7М мочевиной. Концентрацию определяли спектрофотометрически.

*Трансляция in vitro* проводилась в бесклеточной системе из зародышей пшеницы сорта “Казахстанская 4”, выделенной по методике, описанной ранее [3, 5]. Реакционная смесь объемом 25 мкл имела следующий состав: 20 мМ Трис-Ас (рН 7,6), 90 мМ КАс, 2,0 мМ MgAc<sub>2</sub>, 1 мМ АТР, 0,1 мМ GTP, 10 мМ креатинфосфата, 0,12 мг/мл креатинфосфокиназы, 0,1 мМ спермидина, по 0,1 мМ всех аминокислот, 1мкг

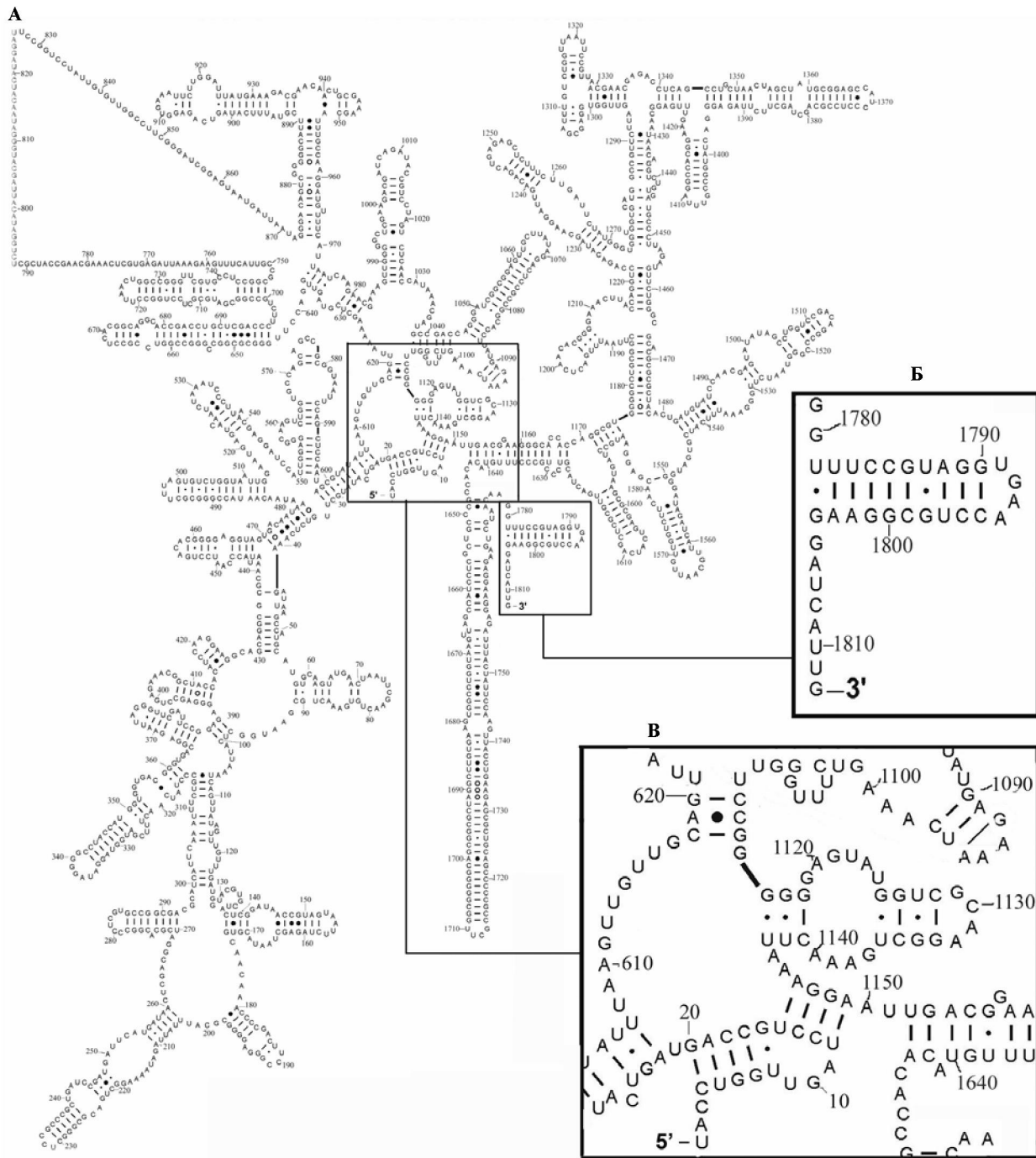


Рис. 1 Модель вторичной структуры 18S рРНК растений

Обозначения: А – Общий вид 18S рРНК (согласно структуре X00755 на сайте <http://www.ma.icmb.utexas.edu>); Б – увеличенный 3'-концевой домен 18S рРНК; В – увеличенный центральный домен 18S рРНК.

мРНК, 7 мкл экстракта из зародышей пшеницы. Реакционную смесь инкубировали в течение часа при 26°C.

Эффективность трансляции определяли по активности β-глюкуронидазы (GUS), которая являлась продуктом трансляции (измерение GUS-

активности осуществлялось флюорометрический и выражалось в условных единицах).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что у бактериальной 16S рРНК первые (5'-концевые) 25 нуклеотидов образуют

шпильку и петля ее участвует в формировании «центрального псевдоузла» («ЦПУ»), который весьма важен для инициации трансляции. В частности, было установлено, что формирование корректного «ЦПУ» является строго необходимым для того, чтобы инициация могла завершиться присоединением большой рибосомной субчастицы. Экспериментальное нарушение комплементарности хотя бы одной из пар оснований, формирующих «ЦПУ» 16S рРНК, приводило к блокировке инициации, но не элонгации трансляции мРНК [10].

У 18S рРНК клеток эукариот также существует «ЦПУ» и его важность для процесса инициации трансляции также признается, хотя строго не доказана [11].

Мы обратили внимание, что петля –  ${}^9\text{UGAUCCU}_{15}$  – первой шпильки 18S рРНК зародышей пшеницы может формировать не только «ЦПУ» с центральной областью (позиции 1146-1149), но также и так называемый «5'-3'-псевдоузел» («5'-3'-ПУ») с 3'-концевым доменом 18S рРНК (позиции 1803-1809, см. рис. 1). Таким образом, 18S рРНК (и, следовательно, сама малая рибосомная субчастица) может существовать, по крайней мере, в двух альтернативных конформациях.

Для того чтобы проверить предполагаемую важность этих конформаций, мы подготовили синтетическую олигоРНК (длиной 20 нуклеотидов), которая имитировала нативную структуру первой шпильки 18S рРНК («20-нат»), а также несколько мутированных олигоРНК, которые отличались от «20-нат» только заменами оснований в петле.

В табл. 1 представлены первичные структуры, а на рис. 2 – вторичные структуры нативного и мутированных вариантов олигоРНК.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности различных олигоРНК

Наименование олигоРНК	Первичная структура олигоРНК *
«20-нат» (5')	UACCUGGUUGA <u>UCCU</u> GCCAG (3')
«20-мут1» (5')	UACCUGGUUGA <u>UCC</u> GCCAG (3')
«20-мут2» (5')	UACCUGGUUGA <u>G</u> GCCAG (3')
«20-мут2+» (5')	UACCUGGUUGA <u>UCC</u> GCCAG (3')
«20-мут3» (5')	UACCUGGU <u>GCU</u> UCCUGCCAG (3')
«20-мут5» (5')	UACCUGGU <u>ACUGG</u> CUGCCAG (3')

\* Серым цветом обозначен участок олигоРНК, формирующий петлю при их сворачивании во вторичную структуру; мутированные остатки выделены полужирным шрифтом и подчеркнуты.

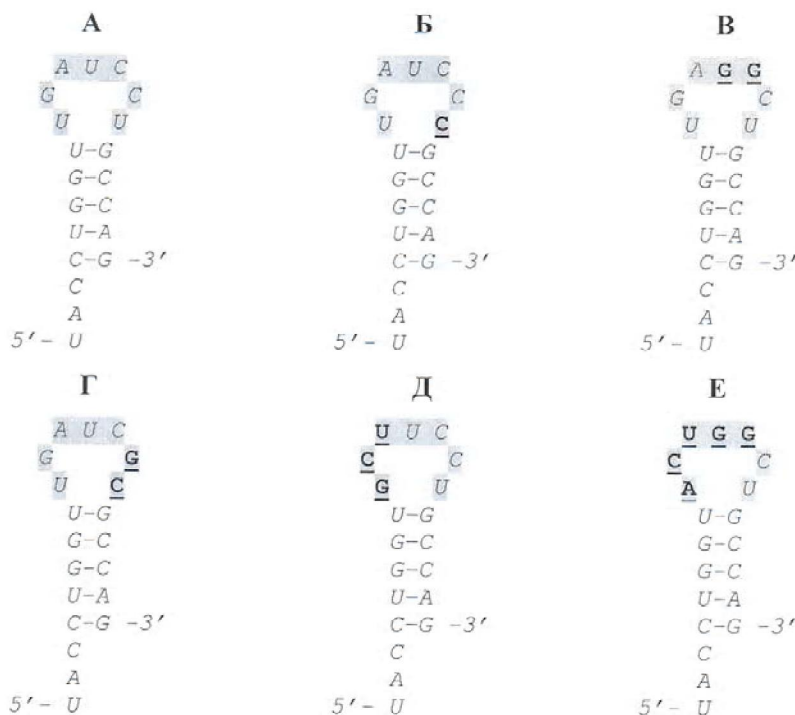


Рис. 2. Вторичные структуры различных олиго-РНК.

Обозначения: А – олигоРНК «20-нат», Б – олигоРНК «20-мут1», В – «20-мут2», Г – «20-мут2+», Д – «20-мут3», Е – «20-мут5». Нуклеотиды, формирующие петлю, выделены серым цветом; замененные нуклеотиды в петле выделены полужирным шрифтом и подчеркиванием.

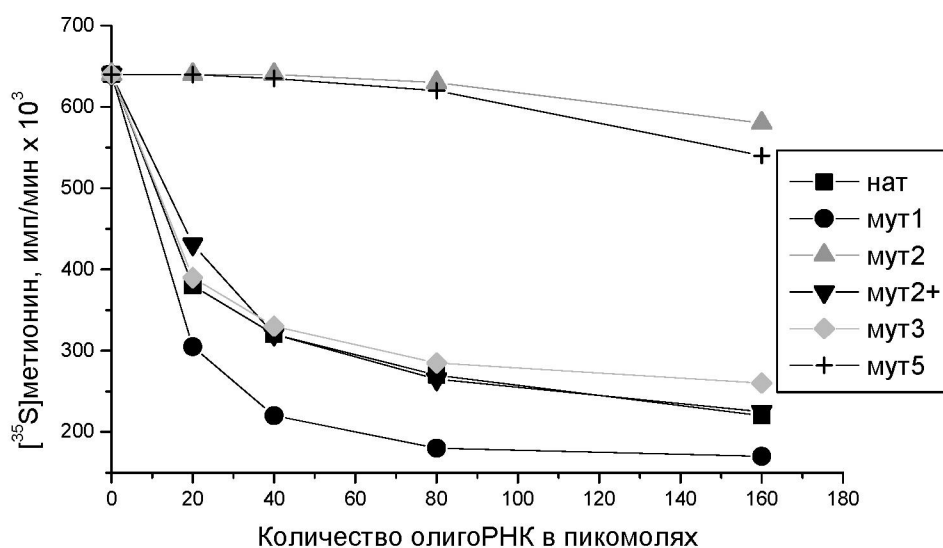


Рис. 3. Влияние различных олигоРНК на трансляцию мРНК «Y-GUS» в бесклеточной системе из зародышей пшеницы

ОлигоРНК «20-мут1» содержал одну мутацию, олигоРНК «20-мут2» и «20-мут2+» – по две мутации в различных позициях, олигоРНК «20-мут3» несли три замены, а олигоРНК «20-мут5» – пять замен, практически полностью изменяющих исходную последовательность.

Далее мы исследовали действие различных олиго РНК (в повышающихся количествах) на ход синтеза репортерного белка в–глюкуронидазы (GUS) в бесклеточной системе трансляции из зародышей пшеницы. В качестве матрицы в бесклеточную систему добавляли равные количества (по 1 мкг) транскрибированной *in vitro* неэкспонированной мРНК, в которой перед репортерным геном содержалась 5'-НТП геномной РНК Y-ВК («Y-GUS»). Результаты экспериментов приведены на рис. 3.

Полученные данные свидетельствуют, что добавление в бесклеточную систему олигоРНК, обладающих значительной комплементарностью к 18S рРНК, как в 3'-концевом, так и в центральном домене, приводит к существенному ингибированию трансляции репортерных мРНК.

Напротив, те олигоРНК, у которых степень комплементарности была искусственно уменьшена, теряли способность ингибировать трансляцию (варианты олигоРНК «20-мут5» и «20-мут2»).

Обращает на себя внимание то обстоятельство, что олигоРНК «20-мут2» почти не ингибирует трансляцию, хотя, в отличие от «20-мут5», сохраняет 5 немутированных нуклеотидов в пет-

ле из 7-ми. Вместе с тем, олигоРНК «20-мут2+» с таким же числом немутированных нуклеотидов сильно ингибирует трансляцию.

Возможным объяснением неспособности олигоРНК «20-мут2» ингибировать трансляцию может являться то, что 2 мутированных нуклеотида в «20-мут2» находятся в середине последовательности петли ( ${}_{9}\text{UGAGGCU}_{15}$ ) и разделяют ее на два коротких участка в 3 ( ${}_{9}\text{UGA}_{11}$ ) и 2 ( ${}_{14}\text{CU}_{15}$ ) нуклеотида, которые не могут обеспечить достаточно прочного комплементарного взаимодействия с 3'-концевым доменом 18S рРНК.

У олигоРНК «20-мут2+», которая существенно ингибирует трансляцию, мутированные нуклеотиды находятся на 3'-конце последовательности петли ( ${}_{9}\text{UGAUCGC}_{15}$ ), оставляя непрерывными 5 нуклеотидов подряд ( ${}_{9}\text{UGAUC}_{13}$ ), которых, по-видимому, достаточно для обеспечения комплементарного взаимодействия с 3'-концевым доменом 18S рРНК.

Таким образом, для минимального комплементарного взаимодействия между 3'-концевым доменом 18S рРНК и экзогенными олигоРНК, по-видимому, необходимо наличие, по крайней мере, четырех нуклеотидов подряд. В таком случае экзогенные олигоРНК могут проявлять ингибирующее действие на процесс трансляции, что и имеет место в случае вариантов «20-нат», «20-мут1», «20-мут2+», и «20-мут3» (см. рис. 3).

Полученные данные свидетельствуют, что 3'-концевой домен (и, весьма вероятно, централь-

ный домен) 18S рРНК в составе 40S рибосомной субчастицы растений достаточно экспонированы, чтобы участвовать в комплементарных взаимодействиях с другими РНК.

По-видимому, при вовлечении в комплементарные взаимодействия с экзогенными олигоРНК 3'-концевого домена (и, возможно, центрального домена) 18S рРНК происходит блокирование работы рибосомы, что указывает на важные функции этих доменов. Кроме того, эти данные свидетельствуют о динамичных конформационных изменениях, происходящих в 18S рРНК, а также в 40S рибосомной субчастице в ходе трансляции мРНК. Для выяснения механизма таких конформационных перестроек необходимы дальнейшие исследования.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Bailey-Serres J.* Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants // *Trends in Plant Science*. 1999. Vol.4. No.4. P. 142-148.
2. *Mauro V.P., Edelman G.M.* The ribosome filter hypothesis // *Proc.Natl.Acad.Sci.* 2002. V.99. No.19. P. 12031–12036.
3. *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. V.32. No.1. P. 239-247.
4. *Owens G.C., Chappel S.A., Mauro V.P., Edelman G.M.* Identification of two short internal ribosome entry sites selected from libraries of random oligonucleotides // *Proc.Natl.Acad.Sci.* 2001. V. 98. No.4. P. 1471-1476.
5. *Johnston F.B., Stern H.* Mass isolation of viable wheat embryo // *Nature*.1957. No.179. P. 160-161.
6. *Mathews DH, Sabina J, Zuker M, Turner DH.* Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure // *Journal of Molecular Biology*. 1999. V.288. P. 911-940.
7. *De Rijk P, De Wachter R.* RnaViz, a program for the visualisation of RNA secondary structure // *Nucleic Acids Research*. 1997. V.25. P. 4679-4684.
8. *Gallie D.R., Feder J.N., Schimke R.T., Walbot V.* Post-transcriptional regulation in higher eukaryotes: The role of the reporter gene in controlling expression // *Mol.Gen.Genet.* 1991. V.228. P. 258-264.
9. *Gurevich V., Pokrovskaya I.D., Obukhova T.A.* Preparative *in vitro* mRNA synthesis using SP6 and T7 RNA polymerases // *Anal.Biochem.* 1991. V.195, P. 207-213.
10. *Brink M.F., Verbeet M.Ph., de Boer H.A.* Formation of the central pseudoknot in 16S rRNA is essential for initiation of translation // *EMBO J.* 1993. V.12. P. 3987-2996.
11. *Melander Y., Holmgren L., Nygard O.* Structure of 18S ribosomal RNA in native 40S ribosomal subunits // *Journal of Molecular Biology*. 1997. V. 272. P. 3254-3258.

#### Резюме

Бұл жұмыс өсімдіктің 18S рРНК-ның 3'-соңындағы және орталық ауданда орналасқан домендерінің мРНК-ның трансляциясының қарқындылығын реттеудегі функциональды рөлін зерттеуге арналған.

18S рРНК-ның зерттеліп жатқан аудандарына комплементарлығы жоғары РНК олигонуклеотидтерін (20 нуклеотид) клеткадан тыс белок синтездеуші жүйесіне енгізу репортерлі мРНК трансляциясын едәуір тежейтіндігі анықталды. Керісінше, комплементарлығы төмен РНК олигонуклеотидтерді клеткадан тыс белок синтездеуші жүйесіне енгізу, трансляцияның қарқындылығына еш әсер етпейтіндігін көрсетті. Алынған тәжірибелер, 40S рибосоманың құрамындағы 18S рРНК-ның 3'-соңындағы және орталық ауданда орналасқан домендерінің басқа РНК-лармен комплементарлық қарым-қатынасқа түсуге қажет деңгейде ашық болады деп есептеуге болады.

#### Summary

The functional role of 3'-terminal and central domains of plant 18S rRNA in mRNA translational control was studied. It was shown that addition into the wheat germ cell free system of short (20 nt) oligoRNAs with significant complementarity to investigated regions of 18S rRNA results in considerable inhibition of different mRNAs translation. On the contrary, the oligoRNAs with decreased complementarity to these regions didn't show translation inhibition at the same concentrations. These data suggest that 3'-terminal and central domains of 18S rRNA are sufficiently exposed in the composition of plant 40S ribosomal subunit to participate in complementary interactions with other RNAs.