

УДК: 577.218

А.С. НИЗКОРОДОВА, Б.К. ИСКАКОВ

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СОЧЕТАНИЙ НЕТРАНСЛИРУЕМЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА β -ГЛЮКУРОНИДАЗЫ В *E.COLI*

(Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина,
РГП «Центр биологических исследований» МОН РК, Алматы, Казахстан)

Ряд энхансеров, ранее исследованных в эукариотических системах экспрессии *in vitro*, был проверен в системе экспрессии *E.coli* *in vivo*. Нами было показано, что сочетание 3'НТП вируса табачной мозаики как с естественным 5'НТП Y-вируса картофеля, так и с синтетическим 5'НТП 5×115, усиливает уровень экспрессии белка в ~44–50 раз по сравнению с контролем.

Введение

Эффективность трансляции в прокариотических системах зависит от специфичного связывания мРНК с рибосомой и узнавания стартового кодона, что обеспечивается в этих системах наличием последовательности Шайн-Дальгарно (S/D от Shine-Dalgarno) [1]. Эта последовательность располагается в 5-8 нуклеотидах перед стартовым кодоном и в большинстве случаев представляет собой 5'-AGGAGG-3' последовательность, комплементарную последовательности 5'-CCUCCU-3' на 3'-конце 16S рРНК [2].

В то же время эффективность трансляции эукариотических мРНК зависит от целого ряда различных факторов, таких как наличие 5'-кэпа, вторичных шпилечных структур, вышележащих регуляторных элементов, контекста окружения стартового кодона и так далее [3,4,5]. Не последнее место среди этих факторов занимают 5'-нетранслируемые последовательности (5'-НТП), лежащие перед стартовым кодоном и зачастую выполняющие, согласно сканирующей модели инициации трансляции, функциональную роль S/D для эукариотических мРНК [3,6].

Некоторые из 5'-НТП являются трансляционными энхансерами, что впервые было показано для 5'-НТП растительных и животных вирусов, таких как вирус табачной мозаики (ВТМ), вирус саркомы Роуса и вирус мозаики костра [7,8].

В случае 5'-НТП ВТМ (обозначаемую, как Ω) было выяснено, что она является не только эукариотическим, но и прокариотическим энхансером трансляции как *in vitro* [9], так и *in vivo* [10]. Механизм усиления трансляции 5' Ω для эукари-

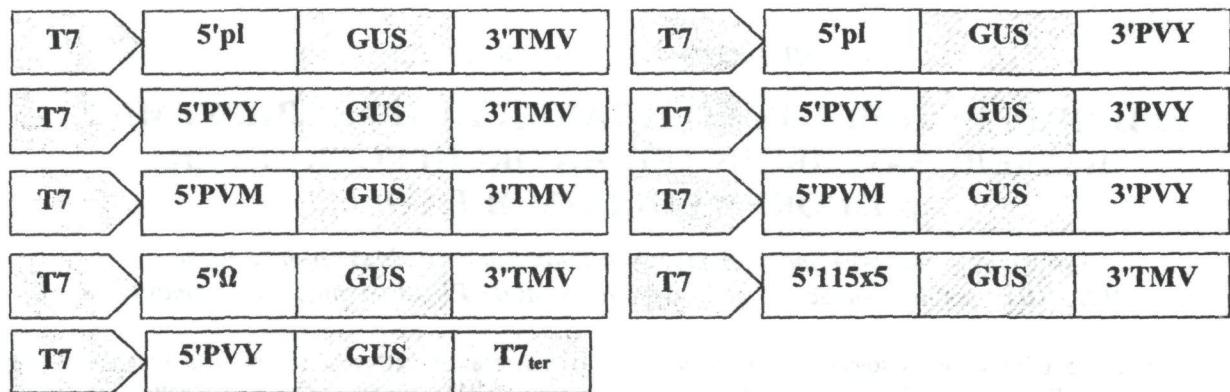
отических и прокариотических систем различен. В эукариотических системах 5' Ω служит для привлечения eIF4F, а поли(САА)-область этой последовательности служит сайтом связывания эукариотического белка теплового шока 101 (HSP101), что и обеспечивает усиление трансляции [11].

В то же время механизм усиления трансляции в прокариотических системах до конца неясен; высказаны предположения, что 5' Ω увеличивает стабильность мРНК через привлечение поли(САА)-областью нескольких рибосомальных 30S-субъединиц [2], а также что аденин-богатые области мРНК, возможно, являются прокариотическими энхансерами общего плана [12].

В данной работе мы исследовали влияние нескольких эукариотических трансляционных энхансеров, в том числе 5' Ω , на эффективность трансляции *in vivo* в *E.coli*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клонирование плазидных конструкций. В плазмиду pBluescript KSII+, содержащую ген *uidA*, кодирующий фермент β -глюкуронидазу (GUS), находящийся под контролем промотора T7 РНК-полимеразы, по сайтам рестриктаз *Hind*III и *Nco*I были клонированы следующие 5'НТП: p1 – 15-ти нуклеотидный участок плазмиды pUC19, 5'PVY – 5'НТП Y-вируса картофеля (Y-BK), 5'PVM – 5'НТП M-вируса картофеля (M-BK), 5"115×5 – искусственный энхансер, полученный в нашей лаборатории [13], 5' Ω – 5'НТП вируса табачной мозаики (ВТМ). По сайтам рестриктаз *Kpn*I и *Eco*RI были клонированы следующие 3'НТП: 3"PVY – 3'НТП Y-BK, 3"TMV – 3'НТП ВТМ. Полученные варианты плазмиды



Обозначения: T7 – промотор T7 РНК-полимеразы;
 $T7_{ter}$ – терминатор T7 РНК-полимеразы. Остальные сокращения расшифрованы в тексте.

Рис. 1. Варианты плазмид pBluescript KSII+ и pET23c, используемые для экспрессии β-глюкуронидазы.

pBluescript KSII+ представлены на рисунке 1. Данные генно-инженерные кассеты были клонированы под контроль промотора T7 РНК-полимеразы, но лишены терминатора T7 РНК-полимеразы. В плазмиду pET23c под контроль промотора и терминатора T7 РНК-полимеразы по сайтам рестриктаз *Bam*HI и *Sal*I была клонирована конструкция 5'PVY-GUS, лишенная 3'HTP (рисунок 1).

Оба использованных вектора, и pBluescript KSII+, и pET23c содержат ген *bla*, кодирующий β-лактамазу и обеспечивающий устойчивость к ампициллину, что позволяло вести скрининг клонов по устойчивости к этому антибиотику. Полученными конструкциями были трансформированы клетки штамма BL21(DE3) *E.coli*, лизогенные по λ-профагу, содержащему IPTG-индукцию T7 РНК-полимеразу. Все полученные клоны проверялись на наличие конструкций рестрикционным и ПЦР-анализом.

Экспрессия гена *uidA* в *E.coli*. Клоны, содержащие полученные модифицированные плазмиды, высевались с чашек не старше 4-х недель в ночную культуру в 2 мл обедненной LB (среда Luria-Bertani), содержащей 100 мг/мл ампициллина, на +25°C с частотой шейкера 120 об/мин. По достижении клетками оптической плотности OD₆₀₀=1,9, по 100 мклочной культуры центрифугировались в стерильных эпендорфах в течение 5 мин на 5000 об/мин. Питательная среда тщательно удалялась, а осадок ресуспенсировался в 1 мл свежей среды, содержащей 100 мг/мл

ампициллина и 1,5 mM IPTG (изопропил-тио-β-D-галактозид). Клетки выращивались в течение 4-х часов при +37°C с частотой шейкера 120 об/мин. Далее клетки центрифугировались в течение 5 мин на 5000 об/мин. Последующее выделение тотального клеточного белка осуществлялось по методу, прописанному у Brennan [14]. Концентрация тотального клеточного белка измерялась по методу Bradford [15].

Измерение активности β-глюкуронидазы. К 20 мкл водного раствора, содержащего 30 мкг тотального клеточного белка добавлялось по 40 мкл экстракционного буфера (50 mM NaHPO₄, pH 7.0, 10 mM 2-меркаптоэтанол, 10 mM Na₂EDTA, 0,1% SDS, 0,1% тритон X-100), смесь инкубировалась 30 мин на +37°C. По окончании инкубации к пробам добавлялось 6 мкл 2 mM MUG (4-метилумбеллиферил-β-D-глюкуронид), с последующей инкубацией в течение 5 мин на +37°C. По 40 мкл смеси добавлялось к 2 мл стоп-буфера (0,2 M Na₂CO₃), измерение количества образовавшегося 4MU (4-метилумбеллиферон) проводилось против стоп-буфера на мини-флюорометре фирмы Hoefer при поглощении с длиной волны 365 нм и эмиссии с длиной волны 460 нм. Единица активности фермента определялась стандартно, как 1 нМ субстрата, переведенного в продукт за 1 мин на 1 мг белка. Перед каждым измерением на флюорометре проводилась его калибровка по 1 мкМ раствору 4MU.

Статистическая обработка данных. Все эксперименты для каждого варианта конструк-

ций проводились в 5-ти кратной повторности. Статистическая обработка данных проводилась в программе Microsoft Excel 2003, с использованием функции пакета Статистического анализа «Описательная статистика». При этом учитывались среднее арифметическое значение, стандартная ошибка и стандартное отклонение. Приведенные в работе результаты являются средними арифметическими значениями, с приведенной для них стандартной ошибкой.

SDS-электрофорез. Белковый SDS-электрофорез проводился в 12% акриламидном геле с 1% содержанием SDS. Подготовка образцов к электрофорезу осуществлялась сразу после выделения белка: к 21 мкл образца добавлялось 7 мкл 4-х кратного препартивного буфера (250 mM трипс, 8% SDS, 40% глицерин, 320 mM DTT, 0,004% бромфеноловый синий), смесь тщательно перемешивалась и прогревалась на водяной бане 3 мин на +86°C. На SDS-электрофорез наносилось количество образца, содержащего 30 мкг общего клеточного белка. Окраска геля осуществлялась по методу, описанному у Reisner [16] с некоторыми модификациями: гель предварительно не фиксировался и состав коллоидного Кумасси был следующим: 0,05% Кумасси G-250, 2% трихлоруксусная кислота, 20% этанол.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбранные для исследования 5'- и 3'-нетранслируемые последовательности, были ранее испытаны нами в системе биосинтеза белка из зародышей пшеницы *in vitro* [13,17]. В этих работах нами было показано, что нет существенной разницы между 3'-НТП ВТМ и 3'-НТП Y-BK для усиления трансляции в эукариотической системе *in vitro*. Также ранее было показано, что исследуемые 5'-НТП имеют разный по силе энхансерный эффект на биосинтез белка как *in vitro* [13,17], так и *in vivo* в системе экспрессии растительных протопластов из *O. violaceus* [13]. Наибольший энхансерный эффект на биосинтез белка оказывала синтетическая конструкция 115×5.

Контрольными конструкциями в данной работе являлись 5"pl-GUS-3"TMV и 5"pl-GUS-3"PVY: на место 5'-НТП в них была поставлена 15-ти нуклеотидная последовательность из mcs (multiple cloning site) плазмиды pUC19, не оказывающая никакого эффекта на трансляцию.

3'-НТП ВТМ, входящий в состав пяти из исследуемых конструкций, представляет собой полнодлинную последовательность трейлера вируса (с 6150 по 6396 н. генома ВТМ) длиной 247 н. [18].

3'-НТП Y-BK, представленный в трех исследуемых конструкциях, также является полнодлинной последовательностью трейлера вируса (с 9375 по 9703 н. генома Y-BK) длиной 328 н. [19].

5'-Ω является полнодлинной последовательностью лидера вируса (с 1 по 68 н. генома ВТМ) длиной 68 н. [2]. Данная 5'-НТП является признанным энхансером, работающим как в эукариотических [5,11], так и в прокариотических системах [2].

5'-НТП Y-BK является полнодлинной последовательностью лидера вируса (с 1 по 185 н. генома Y-BK) длиной 185 н. [19]. В системе биосинтеза белка из зародышей пшеницы *in vitro*, данная 5'-НТП показала энхансерный эффект, сопоставимый и даже превышающий таковой у 5'-Ω [13].

5'-НТП M-BK является полнодлинной последовательностью лидера вируса (с 1 по 75 н. генома M-BK) длиной 75 н. [20]. В системе биосинтеза белка из зародышей пшеницы *in vitro*, данная 5'-НТП показала энхансерный эффект в размере 75% от такового у Y-BK [17].

5'-НТП 115×5 представляет собой искусственный энхансер длиной 136 н., состоящий из 5-ти повторяющихся районов, несущих 10-ти нуклеотидные участки, комплементарные к району 1115-1124 18S rPHK растений [13].

Исходя из предыдущих работ по схожей тематике [2,13,17] ожидаемый эффект различных НТП на трансляцию предполагался зависимым только от смены 5'-НТП. Предполагалось, что конструкции, несущие один и тот же 5'-НТП и разные 3'-НТП будут оказывать одинаковое по силе воздействие на трансляцию.

Однако это предположение подтвердилось не для всех типов сочетаний 5' и 3'-НТП. Полученные результаты отображены на рисунке 2, представляющем собой сводную диаграмму уровней энзиматической активности β-глюкуронидазы для различных конструкций.

Контрольные конструкции показали 2-х кратную разницу в уровне трансляции – находящийся на 3'-конце конструкции трейлер Y-BK делал трансляцию в два раза эффективнее, чем 3'НТП ВТМ.

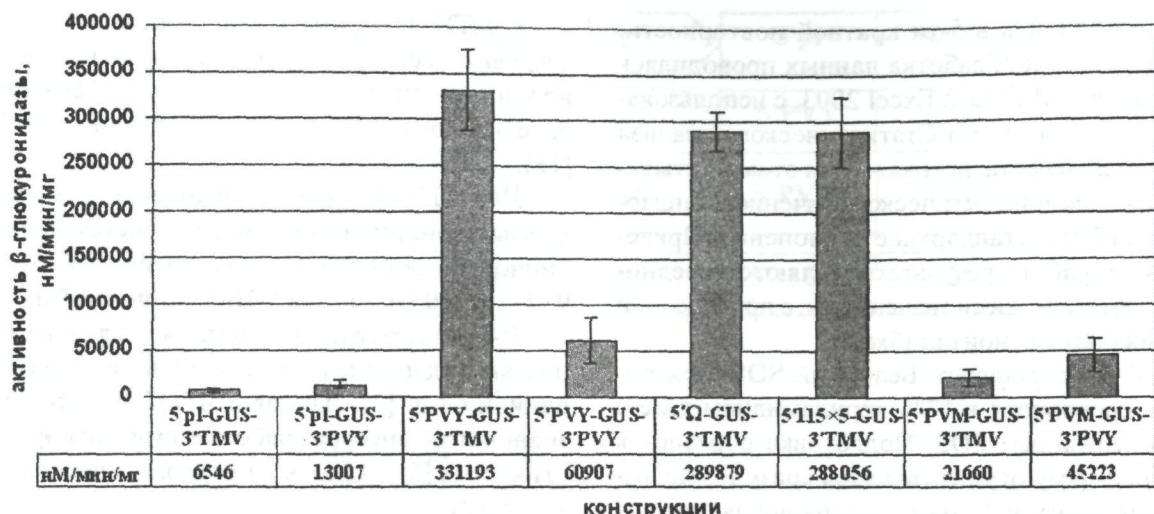


Рис. 2. Графическое изображение уровня трансляционной активности для различных сочетаний 5' и 3'-НТП.

Идентичная картина наблюдалась для конструкций, несущих на 5'-конце лидер M-BK – также 2-х кратное усиление трансляции конструкции, несущей на 3'-конце трейлер Y-BK по сравнению с трейлером BTM.

Противоположная картина наблюдалась для конструкций с лидером Y-BK – пятикратное усиление трансляции было отмечено для конструкции, несущей трейлер BTM по сравнению с трейлером Y-BK. Сводные результаты по усиливающему трансляцию эффекту 3'-НТП представлены в таблице 1.

Таблица 1. Эффект, оказываемый 3'-НТП на уровень трансляции

3'-НТП	5'-НТП		
	5'-pl	5'-PVY	5'-PVM
3'-TMV	1	×5	1
3'-PVY	×2	1	×2

Измерение активности GUS в экстрактах *E.coli* показало, что наибольший энхансерный эффект на трансляцию оказывает сочетание 5'PVY и 3'TMV, дающее усиление трансляции в 50 раз по сравнению с контрольной конструкцией 5'pl-GUS-3'TMV. В то же время сочетание 5'PVY и 3'PVY дает усиление трансляции только в 4-4,5 раза по сравнению с контролем 5'pl-GUS-3'PVY.

Усиление трансляции в 44 раза по сравнению с контролем показали конструкции, несущие на 5'-конце лидеры Ω и 115×5. Причем 5' Ω является признанным прокариотическим энхансером.

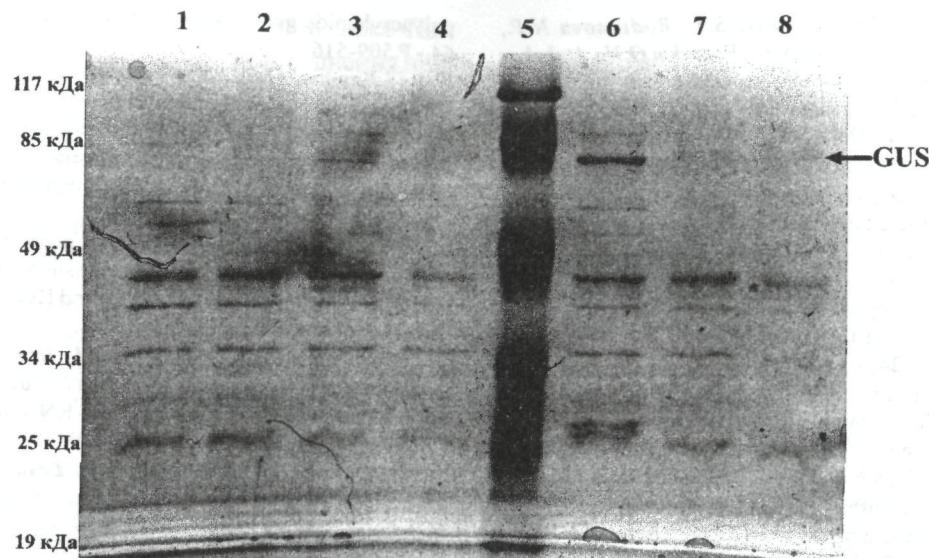
Лидер M-BK давал усиление трансляции в 3-3,5 раза по сравнению с контролем, как для конструкции, несущей в качестве трейлера 3'TMV, так и для конструкции с 3'PVY. Сводные результаты по усиливающему трансляцию эффекту 5'-НТП представлены в таблице 2.

Таблица 2. Эффект, оказываемый 5'-НТП на уровень трансляции

5'-НТП	3'-НТП	
	3'-TMV	3'-PVY
5'-pl	1	1
5'-PVY	×50	×4,5
5'- Ω	×44	-
5'-115×5	×44	-
5'-PVM	×3	×3,5

Для визуализации результатов был проведен электрофорез тотального клеточного белка *E.coli* (рисунок 3). Как отрицательный контроль использовался клон, трансформированный исходной плазмидой pBluescript KSII+ без гена *uidA*; как положительный контроль – клон, трансформированный плазмидой pET23c, несущий конструкцию 5'PVY-GUS.

Предполагалось, что наличие терминатора транскрипции само по себе повысит уровень экспрессии белка в несколько раз за счет увеличения количества копий целевой мРНК. Для увеличения уровня экспрессии еще и на уровне трансляции в конструкцию был клонирован лидер Y-BK. Уровень активности β-глюкуронидазы в полученном клоне показал увеличение активности в 3 раза по сравнению с уровнем экспрессии



Обозначения: 1 – клон, трансформированный 5'Ω-GUS-3'TMV; 2 – клон, трансформированный 5"115×5-GUS-3'TMV; 3 – клон, трансформированный 5'pl-GUS-3'PVY; 4 – клон, трансформированный исходной плазмидой pBluescript KSII+; 5 – белковый маркер Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas); 6 – клон, трансформированный 5'PVY-GUS в плазмиде pET23c; 7 – клон, трансформированный 5'PVY-GUS-3'TMV; 8 – клон, трансформированный 5'PVM-GUS-3'PVY.

Рис. 3. Электрофорез тотального клеточного белка, экспрессируемого в *E.coli*.

5'PVY-GUS-3'TMV, показавшей наилучший результат для конструкций, лишенных T7-термина тора.

Таким образом, данной работе нами показано, что сочетание 5'НТП Y-BK и 3'НТП ВТМ усиливает трансляцию в *E.coli* в 50 раз по сравнению с контролем. Энхансерный эффект найденного сочетания нетранслируемых последовательностей превышает подобный эффект у сочетания 5'? и 3'НТП ВТМ, усиливающего трансляцию в 44 раза и являющегося эталонным прокариотическим энхансером. Также показано, что 3'НТП Y-BK фактически не оказывает усиливающего действия на трансляцию в *E.coli* и не может считаться прокариотическим энхансером. В то же время, данные указывают, что 3'НТП ВТМ сам по себе также не обладает энхансерным действием в *E.coli*, но в сочетании с 5'НТП Y-BK дает энхансерный эффект.

Сам механизм усиления трансляции за счет эукариотических вирусных лидеров и трейлеров остается не ясным. Однако результаты работы показывают перспективность исследования механизмов усиления прокариотической трансляции с помощью вирусных НТП. Также результаты могут использоваться в микробиологической про-

мышленности для увеличения выхода целевого белка.

ЛИТЕРАТУРА

- Shine J., Dalgarno L. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. // Proc Natl Acad Sci USA.- 1974.- Vol. 71.- P.1342-1346.
- Gallie D.R., Kado C.I. A translational enhancer derived from tobacco mosaic virus is functionally equivalent to a Shine-Dalgarno sequence. // Proc. Natl. Acad. Sci.- 1989.- Vol. 86.- P.129-132.
- Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. // Cell.- 1986.- Vol. 44.- P.283-292.
- Gallie D.R. Posttranscriptional Regulation of Gene Expression in Plants. // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Biol.- 1993.- Vol. 44.- P.77-105.
- Schmitz J., Prüfer D., Rohde W., Tacke E. Non-canonical translation mechanisms in plants: efficient *in vitro* and *in planta* initiation at AUU codons of the tobacco mosaic virus enhancer sequence. // Nucleic Acids Research.- 1996.- Vol. 24.- P.257-263.
- Kozak M. Evaluation of the “scanning model” for initiation of protein synthesis in eukaryotes. // Cell.- 1980.- Vol. 22.- P.7-8.
- Gallie D.R., Sleath D.E., Watts J.W., Turner P.C., Wilson T.M. A comparison of eukaryotic viral 5'-leader sequences as enhancers of mRNA expression *in vivo*. // Nucleic Acids Research.- 1987.- Vol. 15.- P.8693-8711.

8. Smirnyagina E.V., Morozov S.Y., Rodionova N.P., Miroshnichenko N.A., Soloyev A.G., Fedorkin O.N., Atabekov J.G. Translational efficiency and competitive ability of mRNAs with 5'-untranslated $\alpha\beta$ -leader of potato virus X RNA. // Biochimie.- 1991.- Vol. 73.- P.587-598.
9. Gallie D.R., Sleat D.E., Watts J.W., Turner P.C., Wilson T.M. The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts *in vitro* and *in vivo*. // Nucleic Acids Research.- 1987.- Vol. 15.- P.3257-3273.
10. Gallie D.R., Sleat D.E., Watts J.W., Turner P.C., Wilson, T.M. In vivo uncoating and efficient expression of foreign mRNAs packaged in TMV-like particles. // Science.- 1987.- Vol. 236.- P.1122-1124.
11. Gallie D.R. The 5'-leader of tobacco mosaic virus promotes translation through enhanced recruitment of eIF4F. // Nucleic Acids Research.- 2002.- Vol. 30.- P.3401-3411.
12. Brock J.E., Paz R.L., Cottle P., Janssen G.R. Naturally Occurring Adenines within mRNA Coding Sequences Affect Ribosome Binding and Expression in *Escherichia coli*. // Journal of Bacteriology.- 2007.- Vol. 189.- P.501-510.
13. Akbergenov R.Zh., Zhanybekova S.Sh., Kryldakov R.V., Zhigailov A., 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.- P.239-247.
14. Brennan W.A., Lin S.H. Strategies for Protein Purification and Characterization. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996, 327 P.
15. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. // Analytical Biochemistry.- 1976.- Vol. 72.- P.248-254.
16. Reisner A. H., Nemes P., Bucholtz C. The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. // Analytical Biochemistry.- 1975.- Vol. 64.- P.509-516.
17. Карпова О.В., Станбекова Г.Э., Низкородова А.С., Назарова Л.М., Лигай Г.Л., Исаков Б.К. Создание трансгенных растений картофеля, трансформированных фрагментами 5'-нетранслируемого района геномной РНК М-вируса картофеля. // Известия научно-технического общества «КАХАК». - 2005.- № 2.- С.103-106.
18. Gallie D.R., Walbot V. RNA pseudoknot domain of tobacco mosaic virus can functionally substitute for a poly(A) tail in plant and animal cells. // Genes and Development.- 1990.- Vol. 4.- P.1149-1157.
19. Robaglia Ch., Durand-Tardif M., Tronchet M., Boudazin G., Astier-Manificier S., Casse-Belbart F. Nucleotide sequences of potato virus Y (N-strain) genomic RNA. // J. Gen. Virol.- 1989.- Vol. 70.- P.935-947.
20. Zavriev S.K., Kanyuka K.I., Levai K.E. Complete nucleotide sequence of potato virus M genomic RNA. // Molecular Biology (Moscow).- 1991.- Vol. 25.- P.761-769.

Резюме

Кейір әнхансерлік элементтер *in vivo* *E.coli* трансляциялық жүйеде зерттелді. Осы элементтерді бұрынғы *in vitro* эукариотикалық жүйелерде зерттелді. Біз темекі мозаик вирусының 3'НТР картоп вирусының 5'НТРмен және 5×115 5'НТРмен комбинацияларды 44-50 рет белок экспрессияның көбеюін көрсетіп бердік.

Summary

The number of enhancer elements previously studied in eukaryotic systems of expression *in vitro* was examined in *E.coli* expression system *in vivo*. We have shown that combination of Tobacco Mosaic Virus 3'UTR both with natural Potato Virus 5'UTR and synthetic 5×115 5'UTR increases the level of protein expression up to 44-50-fold.