

Е. А. ЗБРОДЬКО, А. В. ЖИГАЙЛОВ, Е. В. КОЖАНОВ, Н. С. ПОЛИМБЕТОВА, Б. К. ИСКАКОВ

НУКЛЕОТИДНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ В СОСТАВЕ мРНК, КОМПЛЕМЕНТАРНЫЕ УЧАСТКУ 1630-1650 18S рРНК ПШЕНИЦЫ, ПРОЯВЛЯЮТ СВОЙСТВА ТРАНСЛЯЦИОННЫХ УСИЛИТЕЛЕЙ

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

Работа посвящена исследованию функциональной роли «шарнирного района» 18S рРНК растений (для пшеницы – нуклеотиды 1630–1650). Установлено, что этот район 18S рРНК чрезвычайно консервативен у растений, что может свидетельствовать о его важной функциональной значимости для процесса трансляции мРНК у растений. В энхансерных участках геномных РНК многих растительных вирусов были выявлены сегменты, комплементарные «шарнирному району» 18S рРНК, на основе чего было сделано предположение, что комплементарность мРНК к этому району 18S рРНК может способствовать повышению уровня ее трансляции. Показано, что нуклеотидные последовательности, комплементарные участкам 1638–1650 и 1632–1646 «шарнирного района» 18S рРНК, обладают способностью усиливать эффективность трансляции репортерных мРНК при нахождении в 5'-нетранслируемой и в кодирующей области этих мРНК. Сегменты геномных РНК вирусов, комплементарные «шарнирному району» 18S рРНК растений, могут быть использованы в качестве мишеней для РНК-интерференции при создании растений, устойчивых к этим вирусам.

Введение. Цитоплазматические мРНК клеток растений содержат кэп-структуру на 5'-конце и поли(А)-последовательность на 3'-конце. Инициация трансляции большинства клеточных мРНК происходит по кэп-зависимому механизму [1]. Вместе с тем многие вирусные РНК лишены кэп-структуры и/или поли(А)-последовательности, что не мешает им по эффективности трансляции превосходить большинство клеточных мРНК [2]. Высокую эффективность и конкурентную способность вирусных мРНК обычно связывают с нахождением в их составе так называемых трансляционных энхансеров, которые повышают эффективность трансляции мРНК в несколько раз [3].

Одним из возможных механизмов функционирования трансляционных энхансеров может являться их связывание с 40S рибосомными субчастицами посредством комплементарных взаимодействий с экспонированными участками 18S рРНК [4]. С помощью компьютерного анализа нами было выявлено, что трансляционные энхансеры геномных РНК (гРНК) многих растительных вирусов содержат сегменты, комплементарные «шарнирному району» 18S рРНК растений (для пшеницы – нуклеотиды 1630–1650), который представлен на рис. 1.

При анализе нуклеотидных последовательностей генов 18S рРНК растений было установлено, что «шарнирный район» 18S рРНК является чрезвычайно консервативным у растений, что может свидетельствовать о его функциональной значимости для растений.

В настоящей работе также показано, что нуклеотидные последовательности, комплементарные различным участкам «шарнирного района» 18S рРНК пшеницы, обладают способностью усиливать эффективность трансляции репортерных мРНК в бесклеточной системе из зародышей пшеницы, если их поместить в кодирующую область непосредственно после стартового кодона, либо в 5'-нетранслируемые области (5'-НТП) этих мРНК.

Материалы и методы исследования

Нуклеотидные последовательности всех олигоДНК, использованных в настоящей работе, приведены ниже:

«N2+» – (5')CATGGGCGGTGTGTA;

«N2-» – (5')CATGTACACACCGCC;

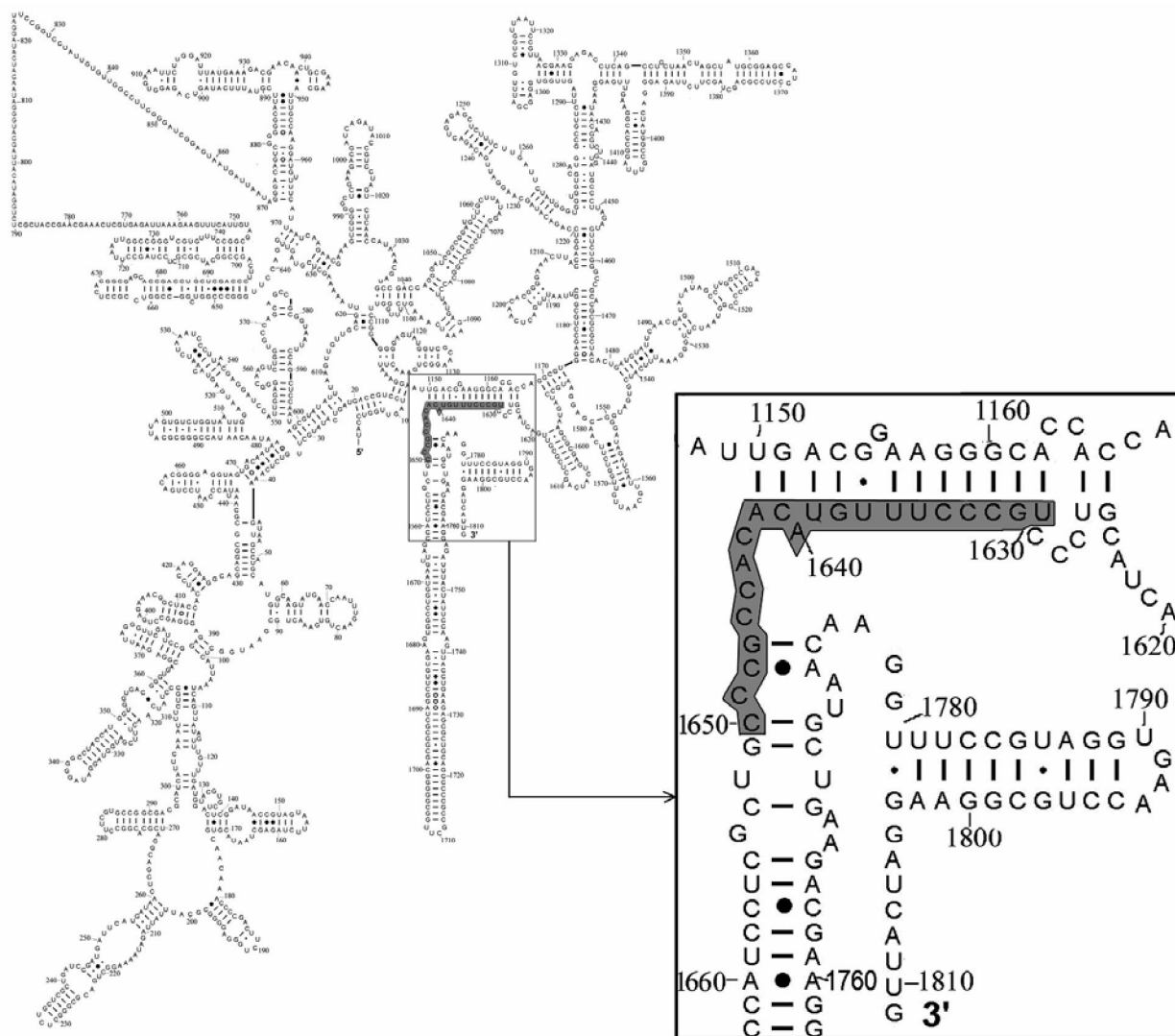
«N2mut+» – (5')TCGACCATGGGCGGTGTGTAC TGGTCCGTCCTG;

«N2mut-» – (5')TCGACCATGGACACACCGCCCTGGTCCGTCCTG;

«linker-» – (5')GGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTTC;

«N+» – (5')AGCTTACAAGGTGTGTATAAAGGGACAAC;

«N-» – (5')AGCTGTTGTCCSTTTATACACACCTTGTA.



Обозначения: «шарнирный район» увеличен и вынесен справа, как указано стрелкой.
Нуклеотиды 1630–1650 выделены серым фоном.

Рис. 1. Модель вторичной структуры 18S рРНК пшеницы (структура X00755 на сайте <http://www.rna.icmb.utexas.edu>)

В работе использовали зародыши яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта «Казахстанская 10». Зародыши пшеницы получали по методу Ф. Джонстона и Х. Стерн [5] и компетентные клетки *Escherichia coli* штамма DH5.

В целях исследования консервативности 3'-концевого района 18S рРНК у растений были проанализированы нуклеотидные последовательности 18S рРНК следующих видов растений (база данных «ssu rRNA database» на сайте <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/rRNA/ssu/>): *Oryza sativa* (AF069218), *Triticum aestivum* (AJ272181), *Glycine max* (X02623), *Begonia boisiana* (AF008948), *Solanum tuberosum* (X67238), *Arabidopsis thaliana* (AC006837), *Brachytecium rutabulum* (X94256), *Trillium erectum* (AF207048), *Umbellula sp.* (AF052904), *Limonium arborescens* (AF206953), *Gnetum leyboldii* (L24045), *Chlamydomonas reinhardtii* (M32703), *Rhodomonas mariana* (X81374), *Euglena viridis* (AF112872), *Bombax ceiba* (U42507), *Andreaea nivalis* (AJ243169), *Abatia parviflora* (AF206836), *Abelia triflora* (AJ236004), *Marchantia polymorpha* (AB021684), *Fragaria ananassa* (X15590), *Zea mays* (K02202), *Babesiidae Babesia* (X59604), *Caenomorpha sp.* (U97108), *Trebouxia arboricola* (Z68705), *Houttuynia cordata* (AF206929), *Paeonia brownii* (AF274602), *Ulothrix zonata* (Z47999), *Neochloris aquatica* (M62861), *Lambertia inermis* (AF274597), *Grewia occidentalis*

(AF206921), *Isacina mannii* (AF206935), *Napoleonaea vogelii* (AF206969), *Quiina pteridophylla* (AF207003), *Crassula Fishbei* (AF274604), *Coriaria arborea* (AF008954), *Characium hindakii* (M63000), *Xeronema callistemon* (AF207056), *Corallocarpus bainesii* (AF008955), *Hedyosmum arborescens* (AF206925), *Symplocos paniculata* (U43297), *Abobra tenuifolia* (U41501), *Friedmannia israeliensis* (M62995), *Tapiscia sinensis* (AF207034), *Manilkara zapota* (U43080), *Saruma henryi* (AF207013), *Ochroma pyramidale* (AF206975), *Plagiopteron suaveolens* (AF206993), *Schoepfia schreberi* (AF207017), *Choristylis rhamnoides* (AF274601), *Austrobaileya scandens* (AF206858), *Blandfordia punicea* (AF206869), *Xanthoceras sorbifolium* (AF207055), *Hedycarya arborea* (AF206924), *Lonicera maackii* (U66701).

Компьютерный анализ последовательностей геномных РНК вирусов растений, взятых из базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), с целью поиска фрагментов, комплементарных 18S рРНК, и расчет вторичных структур фрагментов мРНК проводили с помощью программы «RNAstructure v.5.3» [6]. Для оценки консервативности тех или иных нуклеотидов в составе 3'-концевого района 18S рРНК растений использовали компьютерную программу «Blast».

Создание рекомбинантных ДНК. Для создания ДНК-конструкций использовали любезно предоставленную Д.Р. Галли (Gallie D., Отдел Биохимии, Университет Калифорнии) плазмиду *T7-pl-GUS*, сконструированную на основе вектора pBluescript KS II(+) и содержащую репортерный ген, кодирующий β-глюкуронидазу [7].

Рекомбинантные ДНК *T7-(N2+)-GUS* и *T7-(N2-)-GUS* созданы путем встраивания в плазмиду *pl-GUS* по *NcoI*-сайту (рис. 2а) фрагмента ДНК, полученного с помощью гибридизации олигоДНК N2+ и олигоДНК N2- таким образом, чтобы ДНК *T7-(N2+)-GUS* содержала в смысловой цепи последовательность N2+, а ДНК *T7-(N2-)-GUS* – комплементарную ей последовательность «N2-».

Чтобы заменить в ДНК-конструкциях триплет ATG, с которого начинается нуклеотидная последовательность гена *uidA*, кодирующего β-глюкуронидазу, на CTG, проводили ПЦР с использованием праймеров N2mut+ и linker- в случае ДНК *T7-(N2+)-GUS* и праймеров N2mut- и linker- в случае *T7-(N2-)-GUS*. При этом использовали полимеразу PwoII, отличающуюся от Taq-полимеразы более высокой точностью синтеза. Продукты ПЦР элюировали из агарозного геля, обрабатывали рестриктазами *NcoI* и *BamHI*, а затем встраивали по этим же сайтам в векторную ДНК *T7-pl-GUS*. Таким образом получили конструкции *T7-(N2mut+)-GUS* и *T7-(N2mut-)-GUS*.

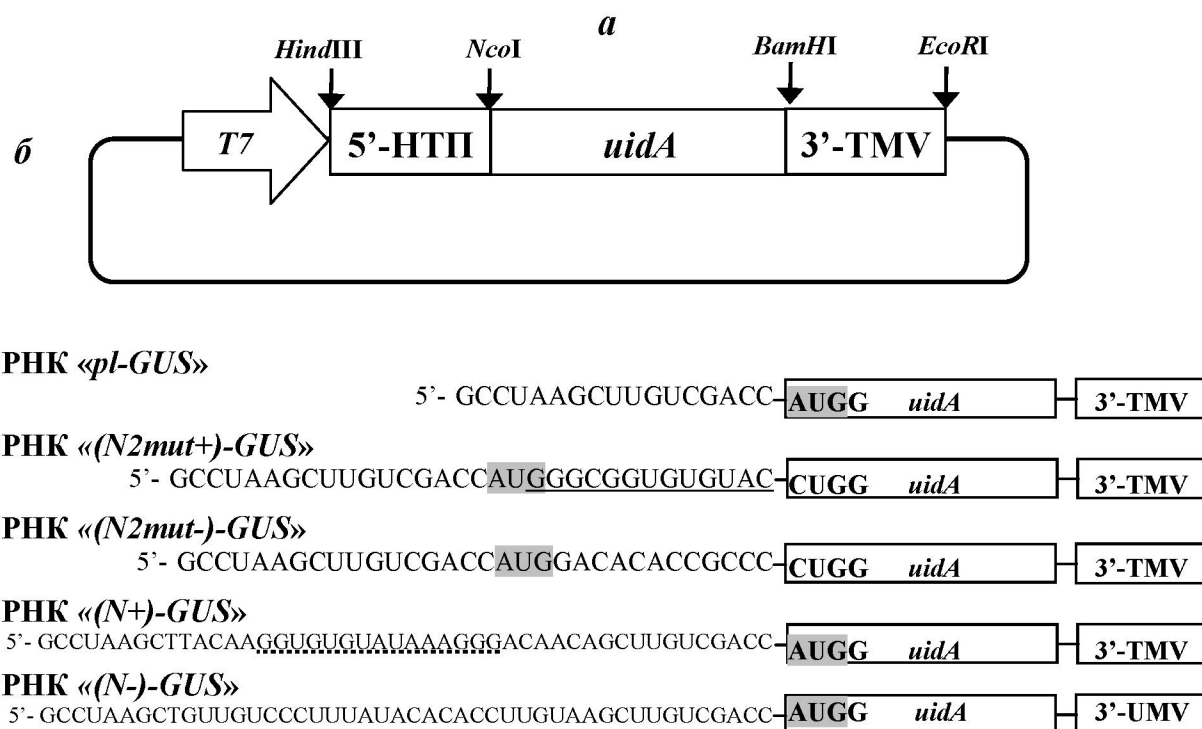
Рекомбинантные ДНК *T7-(N+)-GUS* и *T7-(N-)-GUS* созданы путем встраивания в плазмиду *T7-pl-GUS* по *NcoI*-сайту (рис. 2а) фрагмента ДНК, полученного с помощью гибридизации олигоДНК N+ и олигоДНК N- таким образом, чтобы ДНК *T7-(N+)-GUS* содержала в смысловой цепи последовательность «N+», а ДНК *T7-(N-)-GUS* – комплементарную ей последовательность «N-».

Корректность созданных ДНК-конструкций проверялась с использованием рестрикционного анализа и ПЦР. Нуклеотидные последовательности встроенных фрагментов ДНК выверялись секвенированием.

Рекомбинантные мРНК (рис. 1б) получали транскрипцией *in vitro* с помощью РНК-полимеразы бактериофага Т7 согласно [8]. В качестве матрицы использовали описанные выше ДНК-конструкции, линейаризованные по *EcoRI*-сайту.

Трансляцию *in vitro* проводили в бесклеточной системе из зародышей пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта «Казахстанская 10», полученной согласно [9]. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 20 мМ Трис-ОАс (рН 7.6), 90 мМ КОАс, 2.0 мМ Mg(OAc)₂, 1 мМ АТР, 0.1 мМ GTP, 10 мМ креатинфосфат («Fluka»), 0.12 мг/мл креатинфосфокиназы («Sigma»), 0.1 мМ спермидин, по 0.1 мМ каждой из 20 аминокислот, 1 мкг мРНК и 11 мкл экстракта из зародышей пшеницы, приготовленного согласно [5]. Реакционную смесь инкубировали в течение 1 ч при 26°C. Эффективность трансляции рекомбинантных мРНК определяли по активности β-глюкуронидазы (GUS), которую измеряли флуориметрически и выражали в условных единицах.

Общие методы. Выделение ДНК, приготовление компетентных клеток *Escherichia coli*, электрофорез ДНК и РНК в агарозном и полиакриламидном геле и трансформацию клеток *E. coli* проводили по стандартным методикам [10].



Обозначения: T7 – промотор бактериофага T7; 5'-НТП – 5'- НТП в рекомбинантной мРНК; *uidA* – ген, кодирующий β-глобулиноидазу (GUS); 3'-TMV – 3'-НТП геномной РНК вируса табачной мозаики; стрелками показаны сайты рестрикции. Серым выделены нуклеотиды стартового кодона рекомбинантных мРНК. Сплошной линией подчеркнута последовательность «N2+», комплементарная участку 1638–1650 в 18S рРНК пшеницы; пунктирной линией подчеркнута последовательность «N+», комплементарная участку 1632–1646 в 18S рРНК пшеницы.

Рис. 2. Карта плазмиды для получения рекомбинантных мРНК (а) и схематическое представление использующихся в работе рекомбинантных мРНК (б)

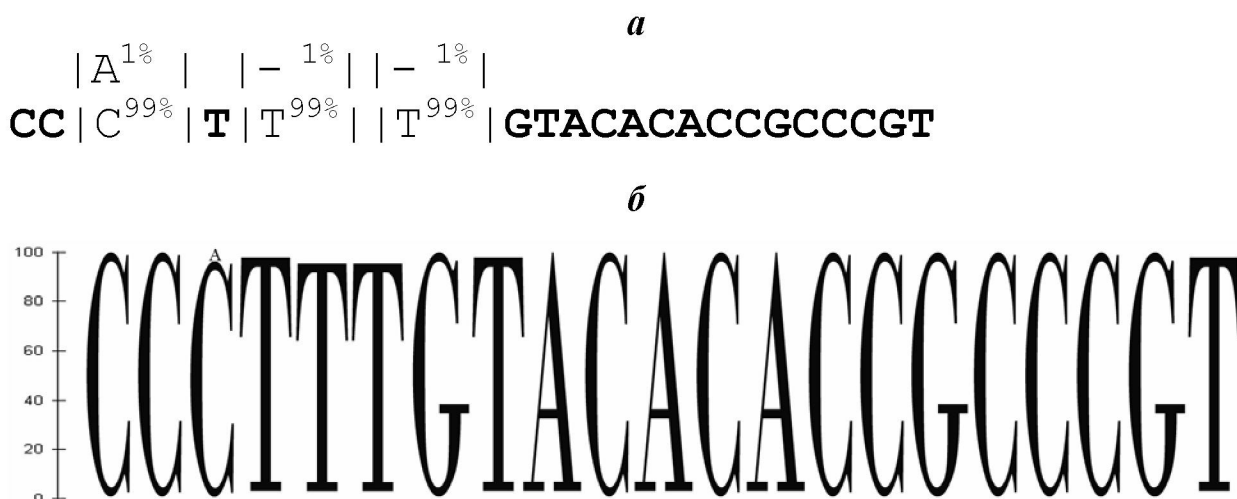
Результаты и их обсуждение

Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей гРНК вирусов растений, у которых отсутствует кэп-структура и/или поли(А), показал, что многие из них содержат в своих нетранслируемых областях сегменты длиной 5–8 нуклеотидов, комплементарные «шарнирному району» 18S рРНК пшеницы (участку 1630–1650). В частности, такие сегменты были обнаружены в энхансерных участках в 5'-НТП гРНК вируса гравировки табака (TEV), вируса мозаики турнепса (TuMV), вируса желтой мозаики цуккини (ZuMV), вируса морщинистости турнепса (TYMV) и почвенного вируса мозаики пшеницы (SbWMV); в 5'-и 3'-НТП гРНК вируса кустистой карликовости томатов (TBSV) и в 3'-НТП гРНК вируса желтой карликовости ячменя (BYDV).

С целью исследования консервативности «шарнирного района» у растений (для пшеницы – нуклеотиды 1630–1650), были проанализированы нуклеотидные последовательности более шестидесяти видов растений, относящихся к различным таксономическим группам. Результаты анализа представлены на рис. 3.

Как видно из данных, представленных на рисунке 3, «шарнирный» район 18S рРНК является чрезвычайно консервативным у растений, что может свидетельствовать о его важной функциональной роли для структуры самой рибосомы, а также для регуляции эффективности трансляции мРНК.

На настоящий момент есть данные, что «шарнирный район» 18S рРНК вовлечен в формирование декодирующего центра эукариотических рибосом [11, 12]. Ранее с использованием методов кросс-линкинга комплементарно адресованного подхода мы показали, что участок 1638–1650 этого района 18S рРНК способен формировать комплементарные взаимодействия с сегментами мРНК [13].



Обозначения: полужирным шрифтом выделены нуклеотиды с консервативностью 100%.

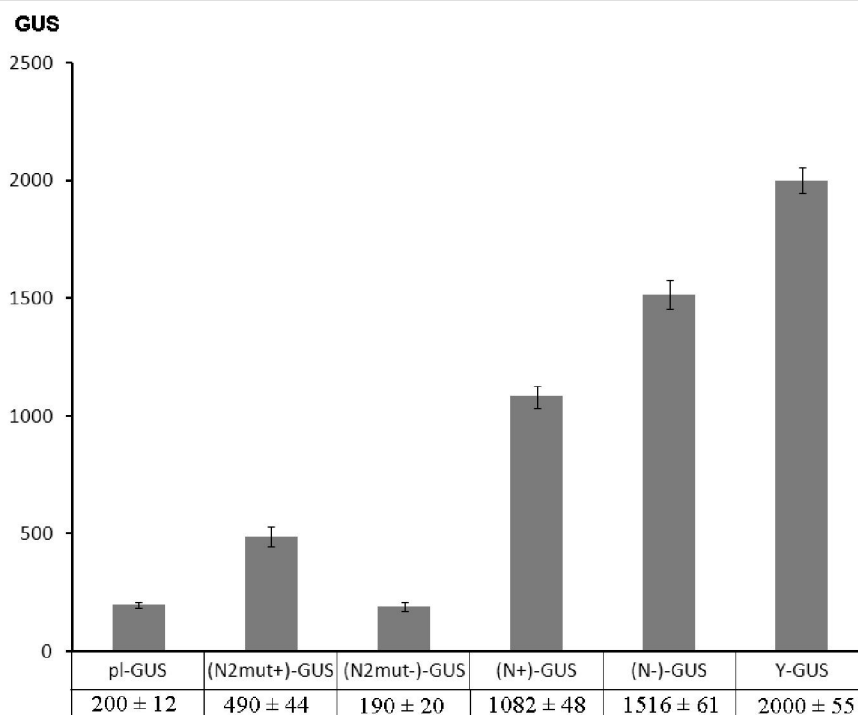
Рис. 3. Результаты исследования консервативности «шарнирного района» 18S рРНК растений (для пшеницы – нуклеотиды 1630–1650) в текстовом (а) и графическом виде (б)

Чтобы проверить, будут ли нуклеотидные последовательности, комплементарные различным участкам «шарнирного района» 18S рРНК растений, проявлять свойства трансляционных усилителей при их помещении в 5'-НТП и в кодирующую область рекомбинантных мРНК, были созданы четыре конструкции, кодирующие β-глобулину, и отличающиеся лишь нуклеотидными последовательностями, предшествующими репортерному гену.

Одна из конструкций, *T7-(N2mut+)-GUS*, соответствовала мРНК, в которой последовательность «N2+» (комплементарная участку 1638–1650 в 18S рРНК пшеницы) располагалась после AUG-кодона перед фрагментом, кодирующим β-глобулину. Стартовый кодон, с которого начинается этот фрагмент, был заменен смысловым кодоном (рис. 2б). Вторая конструкция (*T7-(N2mut-)-GUS*) соответствовала мРНК, в которой после стартового AUG-кодона находилась последовательность, комплементарная «N2+» (рис. 2б). Третья конструкция (*T7-(N+)-GUS*) соответствовала мРНК, в 5'-НТП которой помещалась последовательность «N+», комплементарная участку 1632–1646 в 18S рРНК пшеницы. Конструкция *T7-(N-)-GUS* соответствовала мРНК, в 5'-НТП которой помещалась последовательность, комплементарная «N+».

Описанные выше ДНК-конструкции были использованы нами для синтеза РНК-транскриптов, названных *(N2mut-)-GUS* и *(N-)-GUS*, *(N2mut+)-GUS* и *(N+)-GUS* (рис. 2б). Транскрипты *(N2mut-)-GUS* и *(N-)-GUS* предполагалось использовать в качестве контрольных по отношению к транскриптам *(N2mut+)-GUS* и *(N+)-GUS*. В качестве дополнительного контроля использовался транскрипт *pl-GUS*. Эта мРНК несла репортерную последовательность и не содержала трансляционных энхансеров в своей 5'-НТП [9]. В качестве положительного контроля использовался транскрипт *Y-GUS*. Перед репортерной последовательностью этой мРНК содержалась 5'-НТП гРНК Y-вируса картофеля (нуклеотиды 1–186), которая является одним из самых сильных из известных трансляционных энхансеров растений [9].

Все описанные выше транскрипты транслировали в качестве мРНК в бесклеточной системе биосинтеза белка из зародышей пшеницы. Результаты эксперимента представлены на рис. 4. Как видно из данных, представленных на этом рисунке, вставка в начало кодирующей области мРНК последовательности «N2+» приводила к незначительному (примерно в 2,5 раза) повышению уровня трансляции (уровень трансляции транскрипта *(N2mut+)-GUS* по сравнению с уровнем трансляции контрольной мРНК *pl-GUS*). В то же время, контрольная последовательность такой же длины («N2-») не влияла существенно на уровень трансляции (см. уровень трансляции мРНК *(N2mut-)-GUS* на рис. 4).



Обозначения: GUS – активность β -глокуронидазы в относительных единицах флуоресценции. Y-GUS – рекомбинантная мРНК, содержащая перед репортерным геном *uidA* 5'-НТП гРНК вируса Y картофеля, один из самых сильных из известных растительных трансляционных энхансеров [9].

Рис. 4. Уровень трансляции РНК-транскриптов в бесклеточной системе биосинтеза белка из зародышей пшеницы

При помещении нуклеотидной последовательности «N+», комплементарной участку 1632-1646 «шарнирного района» 18S рРНК пшеницы, в 5'-НТП рекомбинантной мРНК, приводит к повышению уровня ее трансляции (уровень трансляции мРНК (N+)-GUS в сравнении с уровнем трансляции контрольной мРНК *pl-GUS* на рис. 4). Интересно, что последовательность «N-», комплементарная последовательности «N+», также проявляет выраженные энхансерные свойства (см. уровень трансляции мРНК (N-)-GUS на рис. 4), хотя она планировалась именно как контрольная последовательность, которая не должна была проявлять таких свойств. Есть несколько объяснений этого феномена. Во-первых, эта последовательность комплементарна участку 1150–1160 18S рРНК пшеницы, который формирует с «шарнирным районом» 18S рРНК двухспиральный участок (спираль h44) (см. рис. 1). Возможно, для проявления у нуклеотидной последовательности энхансерных свойств важны не сами комплементарные взаимодействия, а конформационные взаимодействия, связанные с нарушением спирали h44 вследствие комплементарности одной из ее цепей сегменту мРНК. Во-вторых, последовательность «N-» содержит в себе сегменты, потенциально комплементарные 3'-концевому району 18S рРНК (нуклеотиды 1770-1811), что также может являться причиной проявления ей таких выраженных энхансерных свойств [14]. Следует отметить, что по способности повышать уровень трансляции последовательность «N-» лишь в 1,3 раза уступает одному из самых сильных из известных растительных трансляционных энхансеров – 5'-НТП гРНК вируса Y-картофеля [9, 15] (см. уровень трансляции мРНК (N-)-GUS по сравнению с уровнем трансляции мРНК Y-GUS).

Таким образом, из приведенных выше результатов можно сделать вывод, что участок мРНК, комплементарный фрагменту 18S рРНК в районе декодирующего центра, может проявлять свойства трансляционного энхансера, если его поместить в 5'-некодирующую область, либо в кодирующую область мРНК сразу после стартового AUG кодона.

В нашей лаборатории было показано, что 5'-НТП гРНК М-вируса картофеля (PVM), проявляющая свойства трансляционного энхансера, может успешно использоваться в качестве мишени для РНК-интерференции при создании трансгенных растений картофеля, устойчивых к этому вирусу [16]. Поэтому можно предположить, что сегменты трансляционных энхансеров вирусных гРНК,

комплементарные «шарнирному району» 18S рРНК растений, также могут быть использованы в качестве мишеней для создания растений, устойчивых к другим растительным вирусам.

Работа выполнена в рамках проекта «Исследование молекулярных механизмов взаимодействия вируса и растения: выявление белков М вируса картофеля, подавляющих процесс РНК-интерференции клеток хозяина» (Тема 0226 ГФ; Госрегистр. № 0112РК00463).

ЛИТЕРАТУРА

1. Kozak M. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes // *Gene*. – 2005. – V. 361. – P. 13-37.
2. Bailey-Serres J. Selective translation of cytoplasmic mRNAs in plants // *Trends in Plant Science*. – 1999. – V. 4, N 4. – P. 142-148.
3. Hellen Ch.U.T., Sarnow P. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules // *Genes Dev*. – 2001. – V. 15. – P. 1593-1612.
4. Mauro V., Edelman G. The ribosome filter hypothesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2002. – V. 99. – P. 12031-12036.
5. Johnston F.B., Stern H. Mass isolation of viable wheat embryo // *Nature*. – 1957. – N 179. – P. 160-161.
6. Reuter J.S., Mathews D.H. RNA structure: software for RNA secondary structure prediction and analysis // *BMC Bioinformatics*. – 2010. – V. 11. – P. 129.
7. 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.
8. 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.
9. Akbergenov R.Zh., Zhanybekova S.Sh., Kryldakov R.V., Zhigailov A.V., Polimbetova N.S., Hohn T., Isakov 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, N 1. – P. 239-247.
10. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning (a laboratory manual). – New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. – 3 vol.
11. Yusupova G.Zh., Yusupov M.M., Cate J.H.D., Noller H.F. The path of messenger RNA through the ribosome // *Cell*. – 2001. – V. 106. – P. 233-241.
12. Demeshkina N., Repkova M., Ven'yaminova A., Graifer D., Karpova G. Nucleotides of 18S rRNA surrounding mRNA codons at the human ribosomal A, P and E sites, respectively: a cross-linking study with mRNA analogues carrying aryl azide group at either the uracil or the guanine residue // *RNA*. – 2000. – V. 6. – P. 1727-1736.
13. Zhigailov A.V., Babaylova E.S., Polimbetova N.S., Graifer D.M., Karpova G.G., Isakov B.K. Fragment of mRNA Coding Part Complementary to Region 1638–1650 of Wheat 18S RNA That Functions as a Translational Enhancer // *Molecular Biolog.* – 2012. – V. 46, N 5. – P. 670-678.
14. Полимбетова Н.С., Жигайлов А.В., Тазабеков И.С., Збродько Е.А., Исаков Б.К. Комплементарные взаимодействия между мРНК и 3'-концевым районом 18S рРНК в составе 40S субчастиц рибосом растений влияют на эффективность трансляции // *Биотехнология. Теория и практика*. – 2011. – № 1. – С. 41-49.
15. Yang L.J., Hidaka M., Sonoda J., Masaki H., Uozumi T. Mutational analysis of the potato virus Y 5' untranslated region for alteration in translational enhancement in tobacco protoplasts // *Biosci. Biotech. Biochem.* – 1997. – V. 61. – P. 2131-2133.
16. 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 "КАХАХ"*. – 2006. – Т. 14, № 1. – С. 103-106.

REFERENCES

1. Kozak M. *Gene*, **2005**, 361, 13-37 (in Engl.).
2. Bailey-Serres J. *Trends in Plant Science*, **1999**, 4 (4), 142-148 (in Engl.).
3. Hellen Ch.U.T., Sarnow P. *Genes Dev.*, **2001**, 15, 1593-1612 (in Engl.).
4. Mauro V., Edelman G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, 99, 12031-12036 (in Engl.).
5. Johnston F.B., Stern H. *Nature*, **1957**, 179, 160-161 (in Engl.).
6. Reuter J.S., Mathews D.H. *BMC Bioinformatics*, **2010**, 11, 129 (in Engl.).
7. Gallie D.R., Feder J.N., Schimke R.T., Walbot V. *Mol. Gen. Genet.*, **1991**, 228, 258-264 (in Engl.).
8. Gurevich V., Pokrovskaya I.D., Obukhova T.A. *Anal. Biochem.*, **1991**, 195, 207-213 (in Engl.).
9. Akbergenov R.Zh., Zhanybekova S.Sh., Kryldakov R.V., Zhigailov A.V., Polimbetova N.S., Hohn T., Isakov B.K. *Nucleic Acids Research*, **2004**, 32 (1), 239-247 (in Engl.).
10. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Cold Spring Harbor Lab. Press*, **1989**, 3 vol. (in Engl.).
11. Yusupova G.Zh., Yusupov M.M., Cate J.H.D., Noller H.F. *Cell*, **2001**, 106, 233-241 (in Engl.).
12. Demeshkina N., Repkova M., Ven'yaminova A., Graifer D., Karpova G. *RNA*, **2000**, 6, 1727-1736 (in Engl.).
13. Zhigailov A.V., Babaylova E.S., Polimbetova N.S., Graifer D.M., Karpova G.G., Isakov B.K. *Molecular Biolog.*, **2012**, 46 (5), 670-678 (in Engl.).
14. Polimbetova N.S., Zhigajlov A.V., Tazabekov I.S., Zbrod'ko E.A., Isakov B.K. *Biotechnologiya. Teoriya i praktika*, **2011**, 1, 41-49 (in Russ.).
15. Yang L.J., Hidaka M., Sonoda J., Masaki H., Uozumi T. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1997**, 61, 2131-2133 (in Engl.).
16. Karpova O.V., Stanbekova G.E., Nizkorodova A.S., Nazarova L.M., Ligaj G.L., Isakov B.K. *Izvestiya nauchno-tehnicheskogo obshchestva "KAHAX"*, **2006**, 14(1), 103-106 (in Russ.).

Е. А. Збродько, А. В. Жигайлов, Е. В. Қожанов, Н. С. Польшбетова, Б. Қ. Ысқақов

**мРНҚ ҚҰРАМЫНДАҒЫ 18 рРНҚ 1630–1650 САЙТЫНА КОМПЛЕМЕНТАРЛЫ НУКЛЕОТИДТІК
ТІЗБЕКТЕР ТРАНСЛЯЦИЯЛЫҚ КҮШЕЙТКІШТЕР ҚАСИЕТІН КӨРСЕТЕДІ**

Өсімдіктер 18 рРНҚ-ның «топсалы аймағының» (бидай үшін 1630–1650 нуклеотидтер) қызметіне арналған. 18S рРНҚ-ның бұл аймағының өсімдіктерде мүлде тұрақтылығы анықталғандығы, трансляция үшін оның маңызды қызметін көрсетеді. Көптеген өсімдік вирустарының геномдық РНҚ-дарының күшейткіш сайттарында өсімдіктер 18 рРНҚ-ның «топсалы аймағына» комплементарлы сегменттер табылғанда, 18 рРНҚ-ның осы аймағы олардың трансляция деңгейін көтеруіне әсер етеді деген болжам айтылды. 18 рРНҚ-ның 1638–1650 және 1632–1646 «топсалы аймағына» комплементарлы нуклеотидтік тізбектер репортерлік мРНҚ-дарының 5'-трансляцияланбайтын және кодтайтын аймақтарында орналасқанда осы мРНҚ-дары трансляциясының тиімділігін арттыру қабілетіне ие. 18 рРНҚ-ның «топсалы аймағына» комплементарлы сегменттерді осы вирустарға төзімді өсімдіктер шығарғанда РНҚ-интерференция үшін нысана ретінде пайдалануға болады.

E. A. Zbrod'ko, A. V. Zhigailo, E. V. Kozhanov, N. S. Polymbetova, B. K. Iskakov

**NUCLEOTIDE SEQUENCES OF mRNA COMPLEMENTARY TO REGION 1630–1650
OF WHEAT 18S rRNA FUNCTIONS AS A TRANSLATIONAL ENHANCERS**

In the present work the possibility was investigated of participation of 3'-terminal region (for wheat 18S rRNA – nucleotides 1630 – 1650) of wheat 18S rRNA, being in composition of 40S ribosomal subunit, in cap-independent initiation of mRNA translation. It is found that this region of 18S rRNA is extremely conservative among plants; this fact may be indicating of its functional relevance in the process of mRNA translation in plants. We had revealed segments complementary to «swivel region» of plant 18S rRNA in translation enhancers of many plant viral genomic RNAs. On the basis of this fact we make assumption that complementarity of mRNA to this region of plant 18S rRNA may promote to enhance its translation level. It was shown that nucleotide sequences complementary to regions 1638–1650 and 1632–1646 of «swivel region» of wheat 18S rRNA are able to enhance translation efficiency of the reporter mRNAs when placed in coding and 5'-noncoding regions of these mRNAs. Segments of viral genomic RNAs complementary to «swivel region» of plant 18S rRNA could be used as targets for RNA-interference to produce plants, resistant to viral infection.