

УДК 577.217.34

## ФРАГМЕНТ КОДИРУЮЩЕЙ ЧАСТИ мРНК, КОМПЛЕМЕНТАРНЫЙ УЧАСТКУ 1638–1650 18S рРНК ПШЕНИЦЫ, ПРОЯВЛЯЕТ СВОЙСТВА ТРАНСЛЯЦИОННОГО УСИЛИТЕЛЯ

© 2012 г. А. В. Жигайлов<sup>1</sup>, Е. С. Бабайлова<sup>2</sup>, Н. С. Полимбетова<sup>1</sup>, Д. М. Грайфер<sup>2</sup>,  
Г. Г. Карпова<sup>2\*</sup>, Б. К. Исаков<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина Комитета Науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, Алматы, 050012, Республика Казахстан

<sup>2</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

Поступила в редакцию 22.09.2011 г.

Принята к печати 26.12.2011 г.

Изучена возможность участия фрагмента 1638–1650 18S рРНК в процессе кеп-независимой инициации трансляции на рибосомах растений. Этот фрагмент охватывает основания спиралей h44 и h28 и включает нуклеотиды, формирующие декодирующий центр рибосомы. Показано, что этот участок доступен для комплементарных взаимодействий в составе 40S субчастицы. Обнаружено, что нуклеотидная последовательность, комплементарная фрагменту 1638–1650 18S рРНК, обладает способностью усиливать эффективность трансляции репортерных мРНК, если ее поместить в эти мРНК сразу после инициаторного кодона. Полученные результаты указывают на возможность комплементарных взаимодействий между кодирующей областью мРНК и фрагментом 18S рРНК, вовлеченным в формирование декодирующего центра рибосомы, при кеп-независимой инициации трансляции.

**Ключевые слова:** рибосомы растений, кеп-независимая инициация трансляции, мРНК, трансляционные энхансеры, 18S рРНК, комплементарные взаимодействия, олигонуклеотиды и их реакционноспособные производные, комплементарно-адресованная модификация.

FRAGMENT OF mRNA CODING PART THAT IS COMPLEMENTARY TO REGION 1638–1650 OF WHEAT 18S rRNA FUNCTIONS AS A TRANSLATIONAL ENHANCER, by A. V. Zhigailov<sup>1</sup>, E. S. Babaylova<sup>2</sup>, N. S. Polimbetova<sup>1</sup>, D. M. Graifer<sup>2</sup>, G. G. Karpova<sup>2\*</sup>, B. K. Isakov<sup>1\*\*</sup> (<sup>1</sup>Ajtkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Committee of Science, Ministry of Education and Sciences of the Republic of Kazakhstan, Almaty, 050012 Kazakhstan; \*\*e-mail: bulat.isakov@mail.ru; <sup>2</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, 630090 Russia; \*e-mail: karpova@niboch.nsc.ru). Possible involvement of 18S rRNA fragment 1638–1650 including basements of the helices h44 и h28 and nucleotides of the ribosomal decoding site in the cap-independent translation initiation on plant ribosomes is studied. This rRNA fragment is shown to be accessible for complementary interactions within the 40S ribosomal subunit. It is found that the sequence complementary to the 18S rRNA fragment 1638–1650 is able to enhance efficiency of a reporter mRNA translation when placed just after the initiation codon. The results obtained indicate that in the course of the cap-independent translation initiation, complementary interactions can occur between mRNA coding sequence and 18S rRNA fragment in the region of the ribosomal decoding site.

**Keywords:** plant ribosomes, cap-independent initiation of translation, mRNA, translational enhancers, 18S rRNA; complementary interactions, oligonucleotides and their reactive derivatives, complementary addressed modification.

Одной из ключевых стадий, на которой осуществляется регуляция экспрессии генов, является инициация трансляции [1–3]. Канониче-

ская схема инициации трансляции кепированных мРНК в клетках эукариот основана на зависимом от факторов инициации семейства

Принятые сокращения: 5'- и 3'-НТО – 5'- и 3'-нетранслируемые области мРНК; GUS – β-глюкуронидаза; RN2 – 4-[N-(2-хлорэтил)-N-метиламино]бензилметил-5'-фосфамидное производное пентадекадезоксирибонуклеотида рCATGGGCG-GTGTGTA; SDS – додецилсульфат натрия.

\* Эл. почта: karpova@niboch.nsc.ru; \*\* bulat.isakov@mail.ru

eIF4 связывании 40S субчастицы рибосомы с 5'-концевым фрагментом мРНК с последующим сканированием мРНК до старт-кодона [4, 5]. Принципиальное отличие канонической инициации трансляции у эукариот и прокариот заключается в том, что у эукариот для связывания мРНК с малой рибосомной субчастицей не требуются комплементарные взаимодействия между мРНК и рРНК, подобные Шайн–Далгарновским [5]. Однако к настоящему времени накоплено много данных, согласно которым в ряде случаев комплементарные взаимодействия между мРНК и 18S рРНК возможны и при инициации трансляции у эукариот [6–8]. Еще в 2002 г. была выдвинута гипотеза “рибосомного фильтра” [9], в которой, в частности, постулировалось, что комплементарные взаимодействия между мРНК и определенными участками 18S рРНК могут играть важную роль в обеспечении предпочтительной трансляции определенной группы мРНК, кодирующих продукты, необходимые клетке в данный момент.

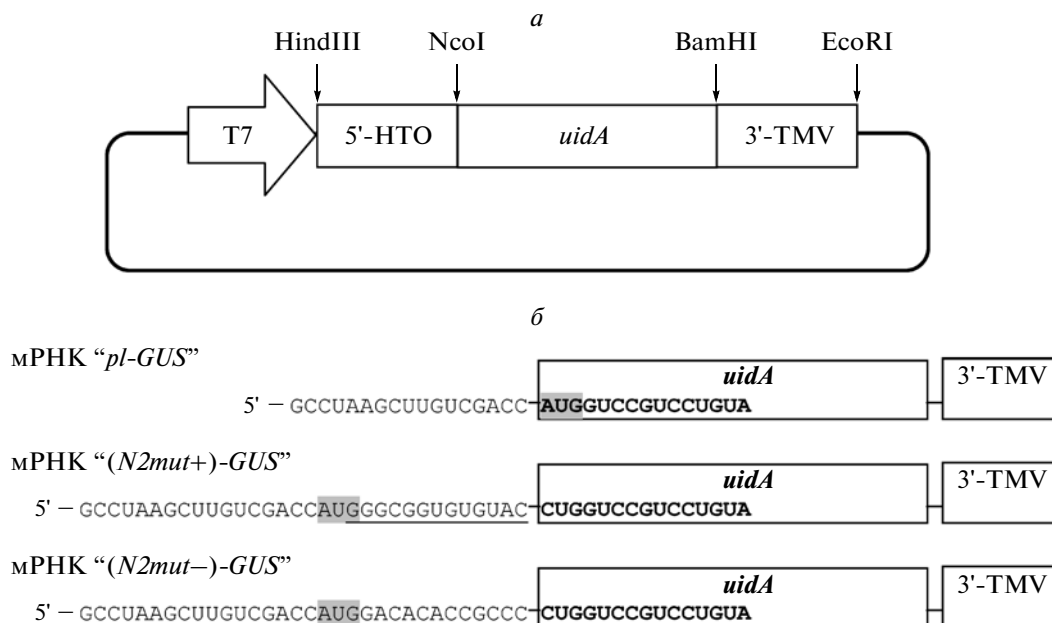
Прямых данных в пользу комплементарных взаимодействий между мРНК и 18S рРНК при инициации трансляции у эукариот пока не получено. Однако есть достаточно убедительные доказательства того, что в определенных случаях участки центрального и 3'-концевого доменов 18S рРНК могут взаимодействовать с комплементарными последовательностями в 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) мРНК. Так, целая серия работ посвящена доказательству того, что 9-нуклеотидный фрагмент в 5'-НТО мРНК гомеодомена фактора транскрипции Gtx взаимодействует в процессе трансляции с участком спирали h26 в центральном домене 18S рРНК млекопитающих [10–12]. Другой фрагмент (10 н.), комплементарный началу спирали h27 в этом же домене 18S рРНК, если его поместить в 5'-НТО модельных репортерных мРНК, проявлял свойства сильного трансляционного усилителя (энхансера), значительно повышая эффективность трансляции мРНК в бесклеточной белоксинтезирующей системе из зародышей пшеницы [13]. В дальнейшем было показано, что участок 1113–1124 спирали h27 18S рРНК в составе 40S субчастицы растений доступен для комплементарных взаимодействий. Так, олигонуклеотид, комплементарный этому участку, специфически подавлял трансляцию рекомбинантной мРНК, несущей в своей 5'-НТО последовательность, антисмысловую по отношению к сегменту 1113–1124 [14]. Аналогичные результаты получены недавно и для сегмента спирали h45 в 3'-концевом минидомене 18S рРНК [15]. В этой же работе продемонстрированы энхансерные свойства помещенного в 5'-НТО модельных

мРНК участка, комплементарного фрагменту 3'-концевого минидомена. Кроме того, с помощью компьютерного анализа комплементарная 18S рРНК последовательность найдена в начале кодирующей области геномной РНК вируса *Y* картофеля [15]. Оказалось, что эта последовательность может участвовать в комплементарных взаимодействиях с 3'-концевым сегментом 18S рРНК и проявлять свойства трансляционного энхансера, если ее поместить в 5'-НТО мРНК [15]. Однако оставалось неизвестным, могут ли последовательности, комплементарные 18S рРНК, проявлять такие свойства в составе кодирующей части мРНК.

В настоящей работе изучены энхансерные свойства участка с комплементарностью к фрагменту 1638–1650 18S рРНК пшеницы у основания спиралей h44 и h28 в районе декодирующего центра, встроенного в кодирующую часть некепированной репортерной мРНК сразу после инициаторного кодона. Доступность района 1638–1650 18S рРНК для комплементарных взаимодействий проверяли, анализируя связывание олигодезоксирибонуклеотида, комплементарного этому району, с 40S субчастицами рибосом из зародышей пшеницы. С помощью комплементарно-адресованной модификации 18S рРНК в составе 40S субчастиц алкилирующим производным упомянутого дезоксиолигомера показана специфичность его связывания с данным фрагментом рРНК.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, мочевины (“AppliChem”), РНКазин из плаценты человека (“Promega”), РНКазу H (“BioLabs”). Олигодезоксирибонуклеотид (олиго-ДНК) GGGCGGTGTGTAC (N2) синтезирован в лаборатории биотехнологической химии ИХБФМ СО РАН, олиго-ДНК CATGGT-CATGACGGACATG (K) любезно предоставлена Т. Хоном (Th. Hohn, Friedrich Miescher Institut, Basel, Switzerland, Институт Фридриха Мишера, Базель, Швейцария). Остальные олиго-ДНК (N2+, N2-, N2mut+, N2mut- и linker-), последовательности которых приведены ниже, синтезированы фирмой “ATG:biosynthetics” (Германия). В олиго-ДНК N2+ и N2mut+ подчеркнут участок N2, комплементарный фрагменту 1638–1650 18S рРНК пшеницы; серым выделена нуклеотидная замена, сделанная для превращения стартового AUG-кодона, с которого начинается последовательность, кодирующая β-глюкуро니다зу, в смысловой кодон.



**Рис. 1.** ДНК-конструкции и рекомбинантные мРНК, полученные на их основе. Карта плазмиды для получения рекомбинантных мРНК (а) и схематическое представление мРНК-конструкций *pI-GUS*, *(N2mut+)-GUS* и *(N2mut-)-GUS* (б). Обозначения: T7 – промотор бактериофага T7; 5'-НТО – 5'- НТО в рекомбинантной мРНК; *uidA* – κДНК β-глокуронидазы (GUS); 3'-TMV – 3'-НТО геномной РНК вируса табачной мозаики; стрелками показаны сайты рестрикции. Серым выделены нуклеотиды стартового кодона рекомбинантных мРНК. В мРНК *(N2mut+)-GUS* подчеркнута последовательность N2, комплементарная участку 1638–1650 в 18S рРНК пшеницы. В рекомбинантных мРНК показаны первые 15 н. последовательности *uidA*.

N2+ – CATGGGCGGTGTGTA;

N2– – CATGTACACACCGCC;

N2mut+ – TCGACCATGGGCGGTGTGTACCTGGTCCGTCCTG

N2mut– – TCGACCATGGACACACCGCCCCTGGTCCGTCCTG

linker– – GGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTTC

Полинуклеотидкиназа фага T4 получена в лаборатории биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН. [ $\gamma$ - $^{32}P$ ]АТР (40 МБк/нмоль) синтезирована в лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН.

Для создания ДНК-конструкций использовали любезно предоставленную Д.Р. Галли (Gallie D., Department of Biochemistry, University of California) плазмиду *pI-GUS*, сконструированную на основе вектора *pBluescript KS II(+)* и содержащую κДНК репортерного белка β-глокуронидазы [16].

**Рекомбинантные ДНК** *(N2+)-GUS* и *(N2-)-GUS* созданы путем встраивания в плазмиду *pI-GUS* по *NcoI*-сайту (рис. 1а) фрагмента ДНК, полученного с помощью гибридизации олиго-ДНК N2+ и олиго-ДНК N2 таким образом, чтобы ДНК *(N2+)-GUS* содержала в смысловой цепи последовательность N2+, а ДНК *(N2-)-GUS* – комплементарную ей N2– [13]. Чтобы заменить в ДНК-конструкциях триплет ATG, с которого начинается нуклеотидная последовательность

κДНК β-глокуронидазы, на СТG, проводили ПЦР с использованием праймеров N2mut+ и linker– в случае ДНК *(N2+)-GUS* и праймеров N2mut– и linker– в случае *(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 *pI-GUS*. Таким образом получили конструкции *(N2mut+)-GUS* и *(N2mut-)-GUS*. Эти конструкции содержали промотор бактериофага T7, фрагмент, соответствующий 5'-НТО модельных мРНК, κДНК β-глокуронидазы (*uidA*) с заменой первой пары нуклеотидов и фрагмент, соответствующий 3'-НТО геномной РНК вируса табачной мозаики, и отличались друг от друга только вставкой из 12 н. перед *uidA*. Нуклеотидные последовательности конструкций проверяли с помощью рестрикционного анализа и секвенирования.

**Рекомбинантные мРНК** (рис. 1б) получали транскрипцией *in vitro* с помощью РНК-полимеразы бактериофага Т7 согласно [17]. В качестве матрицы использовали описанные выше ДНК-конструкции, линейаризованные по EcoRI-сайту.

**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 “RNAs-structure v.5.3” [18, 19].

**Трансляцию *in vitro*** проводили в бесклеточной системе из зародышей пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта “Казахстанская 4”, полученной согласно [13]. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 20 мМ Трис-ОАс (рН 7.6), 90 мМ КОАс, 2.0 мМ Mg(ОАс)<sub>2</sub>, 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 [20]. Реакционную смесь инкубировали в течение 1 ч при 26°C.

Эффективность трансляции рекомбинантных мРНК определяли по активности β-глюкуронидазы (GUS), которую измеряли флуориметрически [16] и выражали в условных единицах.

**40S субчастицы рибосом** пшеницы сорта “Казахстанская 4” выделяли из зародышей, очищенных от эндосперма, как описано ранее [15]. Субчастицы перед использованием реактивировали инкубацией в течение 10 мин при 37°C в буфере А (20 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 120 мМ КСl, 13 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.5 мМ EDTA). При расчетах принимали, что 1 *OE*<sub>260</sub> соответствует 50 пмоль 40S субчастиц по аналогии с субчастицами рибосом человека [21].

**Фосфорилирование дезоксиолигомеров и синтез алкилирующего производного олигомера N2.** Олиго-ДНК фосфорилировали по 5'-концу Т4-поли-нуклеотидкиназой в присутствии [γ-<sup>32</sup>P]АТР. Затем фосфорилированный олигомер очищали с помощью обращенно-фазовой хроматографии на микроколоночном хроматографе Милихром (НПО “Научприбор”, г. Орел). Меченый олигомер N2 использовали в синтезе его (4-[N-(2-хлорэтил)-N-метиламино]бензилметил-5'-фосфамидного производного (RN2) с помощью конденсации олигомера с 4-[N-(2-хлорэтил)-N-метиламино]бензилметиламином в присутствии трифенилфосфина и дипиридилдисульфида. Синтез проводили как описано ранее [22], с небольшими изменениями, в частности, в качестве катализатора вместо метилимидазола использовали диметиламинопиридин.

**Связывание олиго-ДНК с 40S рибосомными субчастицами** проводили, инкубируя 4–100 пмоль меченой <sup>32</sup>P олиго-ДНК и 2 пмоль субчастиц в

10 мкл буфера А в течение 1 ч при 25°C. Степень связывания олиго-ДНК с субчастицами определяли по сорбции комплексов на нитроцеллюлозных фильтрах [23].

**Аффинную модификацию 40S субчастиц** осуществляли, инкубируя субчастицы (конечная концентрация 0.2 мкМ) с RN2 (конечная концентрация 2 мкМ) в буфере А в течение 20 ч при 25°C. Количество 40S субчастиц в реакционной смеси составляло 30–40 пмоль. Модифицированные субчастицы использовали для выделения из них 18S рРНК с помощью фенольной депротенинизации и последующего осаждения этанолом.

Анализ распределения радиоактивной метки между рРНК и белками в составе модифицированных 40S субчастиц и выделение 18S рРНК из модифицированных субчастиц проводили как описано [14].

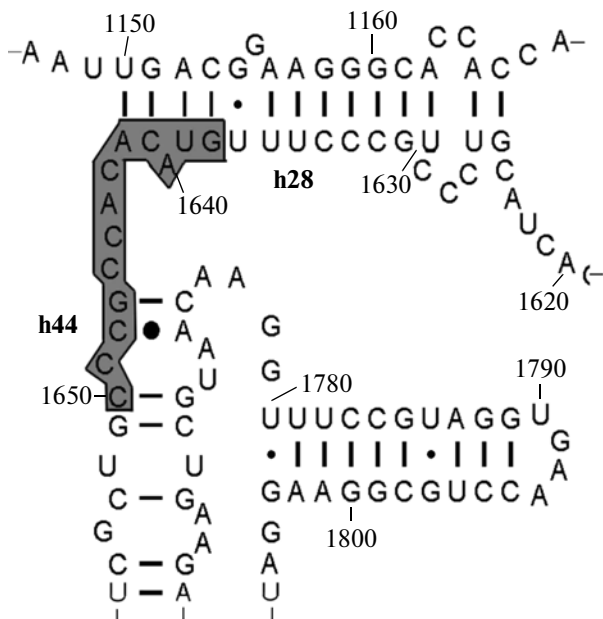
**Участки 18S рРНК, содержащие остатки ковалентно присоединенного меченого RN2**, определяли с помощью гидролиза модифицированной рРНК РНКазой Н с последующим разделением фрагментов рРНК электрофорезом в денатурирующем 6%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) [23]. Гели окрашивали “Stains all”, сушили и радиоавтографировали.

**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 [24].

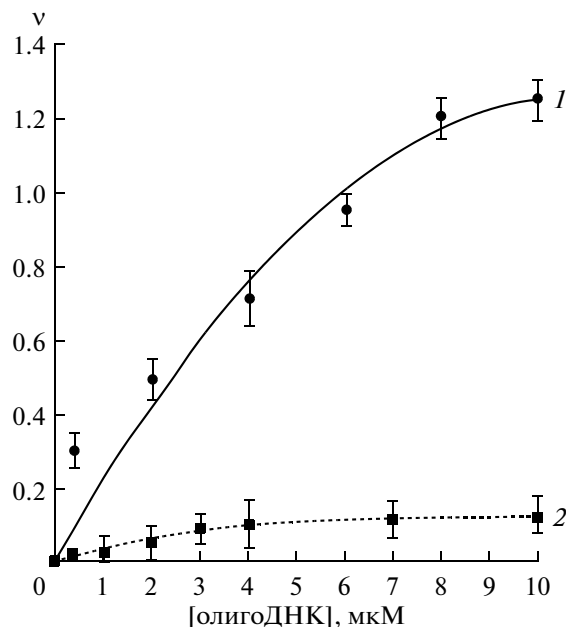
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей геномных РНК (гРНК) вирусов растений, у которых нет кеп-структуры и/или поли(А), показал, что многие из них содержат в своих НТО сегменты длиной 5–8 н., комплементарные участку 1634–1650 18S рРНК пшеницы. В частности, такие сегменты обнаружены в энхансерных участках в 5'-НТО гРНК вирусов гравировки табака [25], мозаики турнепса [26], желтой мозаики цуккини [27], морщинистости турнепса [28] и гРНК почвенного вируса пшеницы [29]; в 5'- и 3'-НТО гРНК вируса кустистой карликовости томатов [30] и в 3'-НТО гРНК вируса желтой карликовости ячменя [31].

Нуклеотиды 1638–1650 находятся в районе основания спирали h44 и примыкающей к ней части h28 18S рРНК пшеницы (рис. 2). Этот район, как известно, вовлечен в формирование декодирующего центра рибосомы [32–37]. Чтобы оценить степень доступности для комплементарных взаимодействий этого района 18S рРНК в составе 40S субчастиц рибосом пшеницы, изучали связывание 40S субчастиц с меченым олигомером N2, комплементарным фрагменту 1638–1650. В каче-



**Рис. 2.** Вторичная структура 3'-концевого района 18S рРНК пшеницы, на которой указаны спирали h28 и h44. За основу взята структура X00755 на сайте <http://www.rna.cccb.utexas.edu>. Выделена последовательность, комплементарная N2.

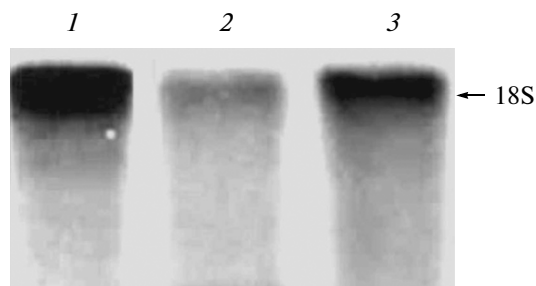


**Рис. 3.** Изотермы адсорбции олиго-ДНК N2 (1) и K (2) на 40S рибосомных субчастицах при 25°C (концентрация 40S субчастиц составляла  $2 \times 10^{-7}$  М);  $v$  – степень связывания, моль олигомера на моль субчастиц.

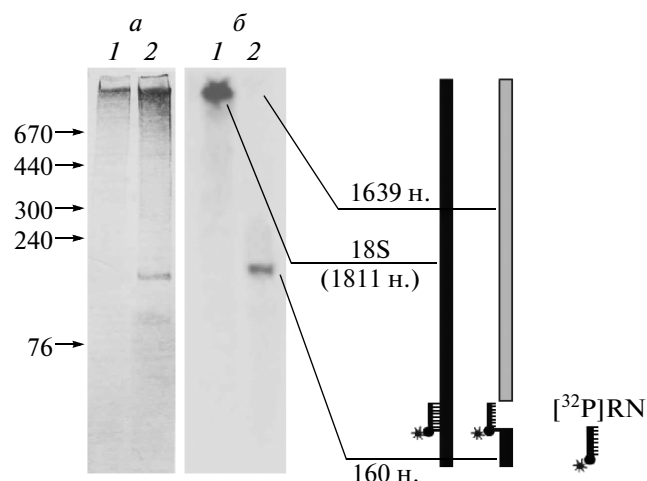
стве контроля использовали олиго-ДНК К, не имеющую в 18S рРНК комплементарных участков протяженностью более 4 н. Как видно из данных, приведенных на рис. 3, олиго-ДНК N2 способна эффективно связываться с 40S субчастицами при 25°C. Степень связывания, близкую к 1 моль олигомера на 1 моль субчастиц, наблюдали при концентрации олигомера, равной 6 мкМ. Величина кажущейся константы ассоциации N2 с субчастицами, оцененная из данных, представленных на рис. 3, составляла примерно  $5 \times 10^6$  М<sup>-1</sup>. Контрольный олигомер К в таких условиях с 40S субчастицами практически не связывался (рис. 3), что указывает на специфичность взаимодействия N2 с 40S субчастицами. Следует отметить, что при концентрации N2 более 6 мкМ степень его связывания с 40S субчастицами заметно превышала 1 моль/моль субчастиц, возможно, вследствие образования несовершенных дуплексов с короткими участками 18S рРНК (до 6 н.), комплементарными N2.

Участки 18S рРНК, с которыми связывается олигомер, определяли с использованием комплементарно-адресованного (сайт-специфичного) алкилирования 18S рРНК в составе 40S субчастиц 5'-<sup>32</sup>Р-меченым производным этого олигомера с последующим гидролизом РНКазой Н РНК в составе гетеродуплекса с ковалентно связанным олигомером (т.е. в составе ковалентного аддукта). Такой подход мы применяли ранее для определения участков связывания олигомеров, компле-

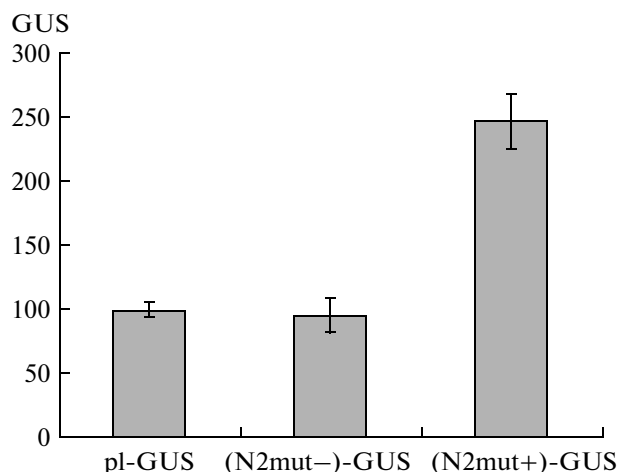
ментарных фрагменту 1112–1123 в центральном домене 18S рРНК [14] и участку в 3'-концевом фрагменте [15], в 40S субчастицах рибосом пшеницы. При алкилировании 40S субчастиц RN2 его концентрация составляла 2 мкМ, что позволяло минимизировать вероятность образования несовершенных гетеродуплексов. Как видно из рис. 3, при такой концентрации степень связывания олигомера с субчастицами значительно меньше 1 моль/моль субчастиц.



**Рис. 4.** Электрофоретический анализ 40S субчастиц, алкилированных 5'-<sup>32</sup>Р-меченым RN2 (<sup>32</sup>Р]RN2), в 10%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Приведена верхняя часть радиоавтографа, содержащая полосы 18S рРНК. 1 – Алкилированные 40S субчастицы; 2 и 3 – 40S субчастицы, алкилированные <sup>32</sup>Р]RN2 в присутствии избытка олиго-ДНК N2 или К соответственно. Отмечены радиоактивные полосы, соответствующие модифицированной 18S рРНК.



**Рис. 5.** Электрофоретический анализ в 6%-ном полиакриламидном геле продуктов гидролиза модифицированной 18S рРНК РНКазой Н. 1 – 18S рРНК пшеницы, сшитая с  $[^{32}\text{P}]\text{RN2}$ , до обработки РНКазой Н; 2 – то же после обработки РНКазой Н. *a* – Гель, окрашенный “Stains all”; *b* – радиоавтограф геля. Схема гидролиза 18S рРНК представлена справа. Радиоактивный фосфат обозначен звездочкой; продукты, содержащие радиоактивную метку, выделены черным, а немеченый фрагмент рРНК – серым. Стрелками слева указаны положения полос маркеров длины фрагментов 18S рРНК, полученных при разрезании немодифицированной рРНК РНКазой Н в присутствии дезоксиолигомеров, комплементарных различным участкам рРНК.



**Рис. 6.** Уровень трансляции РНК-транскриптов в бесклеточной системе биосинтеза белка из зародышей пшеницы. GUS – активность  $\beta$ -глюкуронидазы в относительных единицах флуоресценции.

Продукты алкилирования 40S субчастиц меченым RN2 анализировали с помощью денатурирующего гель-электрофореза в присутствии SDS. Оказалось, что модификации подвергались 18S рРНК и рибосомные белки. Однако белки не были предметом нашего исследования, поэтому на

рис. 4 приведен радиоавтограф только верхней части геля, содержащей полосы рРНК. Видно, что модификация 18S рРНК в составе субчастиц была специфичной, т.е. происходила в составе гетеродуплекса, образованного 18S рРНК и олигонуклеотидной частью RN2, поскольку уровень модификации рРНК резко снижался в присутствии избытка немодифицированной олиго-ДНК N2 (рис. 4, 2) и мало изменялся при избытке контрольного олигомера К (рис. 4, 3).

Результаты определения участка 18S рРНК, модифицированного RN2, приведены на рис. 5. Видно, что гидролиз модифицированной 18S рРНК приводит к появлению единственного меченого фрагмента (рис. 5*b*, 2), электрофоретическая подвижность которого соответствует подвижности короткого фрагмента (160 н.), образующегося при гидролизе 18S рРНК РНКазой Н в участке 1638–1650 (рис. 5, 3). Это однозначно свидетельствует о том, что олигонуклеотидная часть реагента формирует гетеродуплекс с данным участком (см. схему на рис. 5). Следовательно, при связывании с 18S рРНК (рис. 3) олиго-ДНК N2 также образует гетеродуплекс с участком 1638–1650 18S рРНК. Таким образом, данный фрагмент 18S рРНК пшеницы в составе 40S субчастиц доступен для взаимодействий с комплементарными ему последовательностями.

Будет ли нуклеотидная последовательность N2 проявлять свойства трансляционного энхансера? Чтобы ответить на этот вопрос, мы создали две конструкции, которые позволяют синтезировать мРНК с репортерной последовательностью, кодирующей  $\beta$ -глюкуронидазу, и разными 5'-НТО [13, 16]. Одна из конструкций, (N2mut+)-GUS, соответствовала мРНК, в которой N2 располагалась после AUG-кодона перед фрагментом, кодирующим  $\beta$ -глюкуронидазу. Стартовый кодон, с которого начинается этот фрагмент, был заменен смысловым кодоном (рис. 1*b*). Вторая конструкция ((N2mut-)-GUS) соответствовала мРНК, в которой после стартового AUG-кодона находилась последовательность, комплементарная N2 (рис. 1*b*).

При помощи этих конструкций получены РНК-транскрипты (N2mut+)-GUS и (N2mut-)-GUS, которые использовали в качестве мРНК в бесклеточной системе биосинтеза белка из зародышей пшеницы. Транскрипт “(N2mut-)-GUS” служил контролем при изучении энхансерных свойств последовательности N2. Дополнительным контролем была мРНК, синтезированная на основе конструкции pl-GUS [15]. Эта мРНК несла репортерную последовательность и не содержала трансляционных энхансеров.

Как видно из данных, представленных на рис. 6, вставка в мРНК последовательности N2 приводила к значительному (примерно в 2.5 раза) повы-

шению уровня трансляции, в то время как контрольная последовательность такой же длины не влияла существенно на уровень трансляции. Следовательно, участок мРНК, комплементарный фрагменту 18S рРНК в районе декодирующего центра, может проявлять свойства трансляционного энхансера, если его поместить в кодирующую область мРНК сразу после стартового AUG-кодона.

Связаны ли энхансерные свойства N2 с влиянием элементов вторичной структуры мРНК, расположенных с 3'-стороны от AUG-кодона, на эффективность распознавания этого кодона в качестве стартового? Чтобы проверить это предположение был проведен компьютерный анализ возможных вторичных структур фрагментов модельных мРНК, прилегающих с 3'-стороны к AUG-кодону. Такое влияние возможно в тех случаях, когда AUG-кодон находится в неоптимальном контексте и удален на 8–15 н. от участка мРНК с умеренно стабильными элементами вторичной структуры [38]. Оказалось, что последовательность N2+ в мРНК (N2mut+)-GUS, как и N2- в контрольной мРНК (N2mut-)-GUS, способна формировать умеренно стабильную структуру с 5'-концевым сегментом (15 н.) *uidA* (данные не приведены). Однако это не должно было повышать эффективность трансляции, поскольку такая шпильчатая структура могла формироваться только в непосредственной близости от AUG-кодона. Кроме того, в использованных нами мРНК AUG-кодон находится в оптимальном контексте (А в положении –3 и G в положении +4 относительно первого А стартового кодона, см. рис. 1) [38]. Таким образом, нет оснований полагать, что энхансерные свойства N2 связаны с лучшим распознаванием первого AUG-кодона в качестве стартового в результате образования умеренно стабильной вторичной структуры в кодирующей области мРНК (N2mut+)-GUS.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

К настоящему времени строение рибосом эукариот и, в частности, растений, изучено с помощью крио-электронной микроскопии (крио-ЭМ) [39, 40]. Структура рибосом низших эукариот расшифрована также с помощью рентгеноструктурного анализа (РСА) [41, 42]. Тем не менее, прямые данные о расположении мРНК на рибосоме отсутствуют, поскольку разрешение, которого удавалось достичь при крио-ЭМ, не позволяло “видеть” нуклеотиды мРНК, а РСА выполнен в отсутствие мРНК и тРНК. Поэтому о строении мРНК-связывающего центра эукариотической рибосомы можно судить только исходя из данных аффинной модификации рибосом млекопитаю-

щих фотоактивируемыми аналогами мРНК. Методом аффинной модификации удалось идентифицировать структурные элементы рибосомы (нуклеотиды 18S рРНК [34–37, 43, 44], рибосомные белки [35–37, 45] и даже их пептидные фрагменты [46, 47]), соседствующие с мРНК. Согласно этим данным район 1692–1705 18S рРНК (нумерация по 18S рРНК человека), соответствующий фрагменту 1638–1650 в 18S рРНК пшеницы, участвует в формировании области рибосомы, где происходят кодон-антикодоновые взаимодействия. Этот район включает нуклеотиды С1696 и С1698 (взаимодействуют с триплетом мРНК, который примыкает с 3'-стороны к кодону в декодирующем центре [43, 44]), нуклеотид G1702 (соседствует с первым нуклеотидом кодона в Р-участке [35]) и фрагмент 1699–1704, контактирующий с кодоном в Е-участке [44]. Данный район входит в состав консервативного кора вторичной структуры рРНК малых субчастиц, охватывая верхнюю часть 5'-половины спирали h44 и 3'-концевую часть h28. В рРНК цитоплазматических рибосом прокариот и эукариот его последовательность является практически инвариантной (<http://www.rna.ccbb.utexas.edu>). Согласно данным РСА 40S субчастиц низших эукариот [42], обсуждаемый район 18S рРНК открыт для связывания лигандов, что хорошо соответствует результатам нашей работы, показавшим, что фрагмент 1638–1650 18S рРНК пшеницы доступен для комплементарных взаимодействий в составе 40S субчастицы.

Одно из первых указаний на возможность комплементарных взаимодействий в процессе трансляции между мРНК и районом 18S рРНК, в состав которого входят соседствующие части спиралей h28 и h44, получено при изучении энхансерных свойств структурных элементов в 3'-НТО некепированной гРНК вируса хлоротической кольцевой пятнистости гибискуса (HCRSV, *hibiscus chlorotic ringspot virus*) [48]. Так, с помощью сайт-направленного мутагенеза показано, что ключевой энхансерный элемент в 3'-НТО гРНК HCRSV представляет собой участок из 6 н., комплементарных фрагменту спирали h28 в 3'-доме 18S рРНК. Позже было установлено, что при инициации трансляции мРНК рибосомного белка RPS18C *Arabidopsis thaliana* сегмент 18S рРНК 1750–1764 (соответствует сегменту 1758–1772 18S рРНК пшеницы в верхней части спирали h44, см. рис. 2), в состав которого входят нуклеотиды декодирующего центра, может связываться с комплементарным участком в 5'-НТО этой мРНК [49]. Эти результаты вместе с данными компьютерного анализа, согласно которым НТО гРНК вирусов растений содержат участки, комплементарные фрагменту 1638–1650 18S рРНК пшеницы, расположенному в районе декодирующего

центра малой субчастицы рибосомы, дают основания полагать, что этот фрагмент может принимать участие в инициации трансляции РНК за счет комплементарного взаимодействия. В настоящей работе впервые показано, что рассматриваемый фрагмент 18S рРНК может вовлекаться в комплементарные взаимодействия и с последовательностями в кодирующей части некепированных мРНК. Эти взаимодействия могли быть причиной наблюдаемого нами энхансерного эффекта.

Ранее было высказано предположение, что в основе энхансерного эффекта участков 5'-НТО мРНК, комплементарных сегменту в центральном домене 18S рРНК, лежит повышение локальной концентрации 40S субчастиц и связанных с ними факторов инициации трансляции вблизи данных участков мРНК за счет комплементарных взаимодействий с рРНК [12]. По-видимому, наблюдаемый нами энхансерный эффект комплементарного 18S рРНК участка, локализованного в начале кодирующей части мРНК, имеет аналогичную природу. Однако этот эффект (трансляция усиливается в 2.5 раза по сравнению с контрольной мРНК, см. рис. 6) в несколько раз слабее эффекта энхансеров, встроенных в 5'-НТО [12, 13, 15]. По-видимому, при размещении энхансерной последовательности в кодирующей части мРНК расположение 40S субчастиц относительно стартового кодона становится менее удобным для инициации трансляции. Вероятно, в природных мРНК трансляционные усилители в кодирующей части функционируют только при отсутствии таких усилителей в 5'- и 3'-НТО.

Разнообразие трансляционных энхансеров и мест их расположения в вирусных РНК обеспечивает, по-видимому, эффективную трансляцию этих РНК [50, 51], в частности, в необычных условиях (например, в условиях стресса), когда большинство клеточных мРНК не могут участвовать в синтезе белка из-за нарушения канонического механизма инициации трансляции.

Работа поддержана Сибирским отделением Российской академии наук (Интеграционный проект №52), а также программой фундаментальных исследований Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (0106РК00189).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kozak M. 1999. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*. **234**, 187–208.
2. Mathews M.B., Sonenberg N., Hershey J.W.B. 2000. Origins and principles of translational control. In: *Translational Control of Gene Expression*. Eds Sonenberg N., Hershey J.W.B., Mathews M.B., Cold Spring Harbor, N.Y.: CSHL Press, 131.
3. Browning K.S. 1996. The plant translational apparatus. *Plant Mol. Biol.* **32**, 107–144.
4. Rodnina M., Wintermeyer W. 2009. Recent mechanistic insights into eukaryotic ribosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 435–443.
5. Myasnikov A.G., Simonetti A., Marzi S., Klaholz B.P. 2009. Structure-function insights into prokaryotic and eukaryotic translation initiation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**, 300–309.
6. Nakashima K., Darzynkiewicz E., Shatkin A.J. 1980. Proximity of mRNA 5'-region and 18S rRNA in eukaryotic initiation complexes. *Nature*. **286**, 226–230.
7. Tranque P., Hu M.C.-Y., Edelman G.M., Mauro V.P. 1998. rRNA complementarity within mRNAs: A possible basis for mRNA-ribosome interactions and translational control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 12238–12243.
8. Dresios J., Chappell S.A., Zhou W., Mauro V.P. 2006. An mRNA-rRNA base-pairing mechanism for translation initiation in eukaryotes. *Nature Struct. & Mol. Biol.* **13**, 30–34.
9. Mauro V., Edelman G. 2002. The ribosome filter hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 12031–12036.
10. Hu M.C.-Y., Tranque P., Edelman G.M., Mauro V.P. 1999. rRNA-complementarity in the 5'-untranslated region of mRNA specifying the Gtx homeodomain protein: evidence that base-pairing to 18S rRNA affects translational efficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 1339–1344.
11. Chappell S.A., Edelman G.M., Mauro V.P. 2000. 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 1536–1541.
12. Chappell S.A., Dresios J., Edelman G.M., Mauro V.P. 2006. Ribosomal shunting mediated by a translational enhancer element that base pairs to 18S rRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 9488–9493.
13. Akbergenov R.Zh., Zhanybekova S.Sh., Kryldakov R.V., Zhigailov A.V., Polimbetova N.S., Hohn T., Iskakov B.K. 2004. 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. *Nucl. Acids Res.* **32**, 239–247.
14. Жигайлов А.В., Грайфер Д.М., Бабайлова Е.С., Полимбетова Н.С., Карпова Г.Г., Исакаков Б.К. 2010. Район 1112–1123 центрального домена 18S рРНК в 40S субчастицах рибосом растений: доступность для комплементарных взаимодействий и функциональная роль. *Биоорганическая химия*. **36**, 366–374.
15. Жигайлов А.В., Бабайлова Е.С., Полимбетова Н.С., Грайфер Д.М., Карпова Г.Г., Исакаков Б.К. 2011. Возможное участие 3'-концевого сегмента 18S рРНК в процессе инициации трансляции некепированных мРНК у растений. *Молекулярная биология*. **45**, 325–334.
16. Gallie D.R., Feder J.N., Schimke R.T., Walbot W. 1991. Post-transcriptional regulation in higher eukaryotes: the



- role of reporter gene in controlling expression. *Mol. Gen. Genet.* **228**, 258–264.
17. Gurevich V., Obukhova T.A. 1991. Preparative in vitro mRNA synthesis using SP6 and T7 RNA polymerases. *Anal. Biochem.* **195**, 207–213.
  18. Reuter J.S., Mathews D.H. 2010 RNA structure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinformatics.* **11**, 129.
  19. Andronescu M., Condon A., Hoos H.H., Mathews D.H., Murphy K.P. 2010. Computational approaches for RNA energy parameter estimation. *RNA.* **16**, 2304–2318.
  20. Johnston F.B., Stern H. 1957. Mass isolation of viable wheat embryo. *Nature.* **179**, 160–161.
  21. Matasova N.B., Myltseva S.V., Zenkova M.A., Graifer D.M., Vladimirov S.N., Karpova G.G. 1991. Isolation of ribosomal subunits containing intact rRNA from human placenta. Estimation of functional activity of 80S ribosomes. *Anal. Biochem.* **198**, 219–223.
  22. Graifer D.M., Zenkova M.A., Malygin A.A., Mamaev S.V., Mundus D.A., Karpova G.G. 1990. Identification of a site on 18S rRNA of human placenta ribosomes in the region of the mRNA binding center. *J. Mol. Biol.* **214**, 121–128.
  23. Graifer D.M., Malygin A.A., Matasova N.B., Mundus D.A., Zenkova M.A., Karpova G.G. 1997. Studying functional significance of the sequence 980–1061 in the central domain of human 18S rRNA using complementary DNA probes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1350**, 335–344.
  24. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. 1989. *Molecular cloning (a laboratory manual)*. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, **3**.
  25. Zeenko V., Gallie D.R. 2005. Cap-independent translation of tobacco etch virus is conferred by an RNA pseudoknot in the 5'-leader. *J. Biol. Chem.* **280**, 26813–26824.
  26. Basso J., Dallaire P., Charest P.J., Devantier Y., Laliberte J.F. 1994. Evidence for an internal ribosome entry site within the 5' non-translated region of turnip mosaic potyvirus RNA. *J. Gen. Virol.* **75**, 3157–3165.
  27. Wisler G.C., Purcifull D.E., Hiebert E. 1995. Characterization of the P1 protein and coding region of the zucchini yellow mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **76**, 37–45.
  28. Stupina V.A., Yuan X., Meskauskas A., Dinman J.D., 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.
  29. Shirako Y. 1998. Non-AUG translation initiation in a plant RNA virus: a forty-amino-acid extension is added to the N terminus of the soil-borne wheat mosaic virus capsid protein. *J. Virol.* **72**, 1677–1682.
  30. Fabian M.R., White K.A. 2004. 5'-3' RNA-RNA interaction facilitates cap- and poly(A) tail-independent translation of tomato bushy stunt virus mRNA. A potential common mechanism for Tombusviridae. *J. Biol. Chem.* **279**, 28862–28872.
  31. Rakotondrafara A.M., Polacek C., Harris E., 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.
  32. Yusupova G.Zh., Yusupov M.M., Cate J.H.D., Noller H.F. 2001. The path of messenger RNA through the ribosome. *Cell.* **106**, 233–241.
  33. Noller H.F. 2006. Biochemical characterization of the ribosomal decoding site. *Biochimie.* **88**, 935–941.
  34. Demeshkina N., Repkova M., Ven'yaminova A., Graifer D., Karpova G. 2000. 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.* **6**, 1727–1736.
  35. Graifer D., Molotkov M., Styazhkina V., Demeshkina N., Bulygin K., Eremina A., Ivanov A., Laletina E., Ven'yaminova A., Karpova G. 2004. Variable and conserved elements of human ribosomes surrounding the mRNA at the decoding and upstream sites. *Nucl. Acids Res.* **32**, 3282–3293.
  36. Bulygin K., Chavatte L., Frolova L., Karpova G., Favre A. 2005. The first position of a codon placed in the A site of the human 80S ribosome contacts nucleotide C1696 of the 18S rRNA as well as proteins S2, S3, S3a, S30 and S15. *Biochemistry.* **44**, 2153–2162.
  37. Pisarev A.V., Kolupaeva V.G., Yusupov M.M., Hellen C.U.T., Pestova T.V. 2008. Ribosomal position and contacts of mRNA in eukaryotic translation initiation complexes. *EMBO J.* **27**, 1609–1621.
  38. Kozak M. 2005. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* **361**, 13–37.
  39. Manuell A.L., Yamaguchi K., Haynes P.A., Milligan R.A., Mayfield S.P. 2005. Composition and structure of the 80S ribosome from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: 80S ribosomes are conserved in plants and animals. *J. Mol. Biol.* **351**, 266–279.
  40. Armache J.-P., Jarasch A., Anger A.M., Villa E., Becker T., Bhushana S., Jossinet F. et al. 2010. Localization of eukaryote-specific ribosomal proteins in a 5.5-Å cryo-EM map of the 80S eukaryotic ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 19754–19759.
  41. Ben-Shem A., Jenner L., Yusupova G., Yusupov M. 2010. Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science.* **330**, 1203–1209.
  42. Rabl J., Leibundgut M., Ataide S.F., Haag A., Ban N. 2011. Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. *Science.* **331**, 730–736.
  43. Molotkov M., Graifer D., Demeshkina N., Repkova M., Ven'yaminova A., Karpova G. 2005. Arrangement of mRNA 3' of the A site codon on the human 80S ribosome. *RNA Biology.* **2**, 63–69.
  44. Bulygin K., Baouz-Drahy S., Graifer D., Favre A., Karpova G. 2009. Sites of 18S rRNA contacting mRNA 3' and 5' of the P site codon in human ribosome: A cross-linking study with mRNAs carrying 4-thiou-

- ridines at specific positions. *Biochim. Biophys. Acta.* **1789**, 167–174.
45. Molotkov M.V., Graifer D.M., Popugaeva E.A., Bulygin K.N., Meschaninova M.I., Ven'yaminova A.G., Karpova G.G. 2006. mRNA 3' of the A site bound codon is located close to protein S3 on the human 80S ribosome. *RNA Biology.* **3**, 122–129.
46. Хайрулина Ю.С., Молотков М.В., Бульгин К.Н., Грайфер Д.М., Венямина А.Г., Фролова Л.Ю., Шталь И., Карпова Г.Г. 2008. Фрагменты белка S3, соседствующие с мРНК в рибосоме человека при элонгации и терминации трансляции. *Биоорганическая химия.* **34**, 773–780.
47. Khairulina J., Graifer D., Bulygin K., Ven'yaminova A., Frolova L., Karpova G. 2010. Eukaryote-specific motif of ribosomal protein S15 neighbors A site codon during elongation and termination of translation. *Biochimie.* **92**, 820–825.
48. Koh D.Ch.-Y., Liu D.X., Wong S.-M. 2002. A six-nucleotide segment within the 3' untranslated region of hibiscus chlorotic ringspot virus plays an essential role in translational enhancement. *J. Virol.* **76**, 1144–1153.
49. Vanderhaeghen R., DeClercq R., Karimi M., VanMontagu M., Hilson P., VanLijsebettens M. 2006. Leader sequence of a plant ribosomal protein gene with complementarity to the 18S rRNA triggers *in vitro* cap-independent translation. *FEBS Lett.* **580**, 2630–2636.
50. Pettit Kneller E.L., Rakotondrafara A.M., Miller W.A. 2006. Cap-independent translation of plant viral RNAs. *Virus Res.* **119**, 63–75.
51. Thiébeauld O., Pooggin M.M., Ryabova L.A. 2007. Alternative translation strategies in plant viruses. *Plant Viruses.* **1**, 1–20.