

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 577.218, 577.29, 57.088.3, 58.085

Экспрессия гена транскрипционного фактора AtDREB1A под контролем различных 5'-нетранслируемых последовательностей *in vivo*

© 2017 О.В. КАРПОВА^{1,2,*}, А.М. АЛЕКСАНДРОВА¹, Р.М. НАРГИЛОВА¹, Б.К. ИСКАКОВ¹

¹Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, Алматы 050012, Казахстан

²Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы 050040, Казахстан

e-mail: oxkarpova@mail.ru*

Поступила 27.02.2017 г.

Принята в печать 12.04.2017 г.

Транскрипционный фактор AtDREB1A контролирует экспрессию многих индуцибельных генов только в условиях низких температур. В результате экспрессии гена *AtDREB1A* в клетках *E. coli* был получен рекомбинантный белок, способный связываться с синтетической последовательностью индуцибельного промотора гена *rd29A* из *Arabidopsis thaliana*. Проведена транзientная экспрессия гена *AtDREB1A*, стоящего под контролем промотора 35S CaMV, и одного из пяти различных вариантов 5'-НТП (5'-TMV, 5'-PVY, 5'-AMV, 5'-3xARC1 или 5'-pl) в листьях табака одновременно с репортерным геном β-глюкуронидазы (*uidA*), находящимся под контролем синтетического индуцибельного промотора *rd29A*. В результате доказана способность рекомбинантного белка AtDREB1A вызывать индукцию временной экспрессии репортерного гена *uidA*. После проведения сравнительного анализа впервые для белка AtDREB1A показано, что свойства различных 5'-НТП как энхансеров трансляции сильно варьируют.

Ключевые слова: AtDREB1A, индуцибельный промотор, 5'-нетранслируемая последовательность, трансген, трансляционный энхансер, экспрессия.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-5-9-22

При получении трансгенных растений, обладающих повышенной толерантностью к биотическим и абиотическим стрессам и продуцирующих терапевтические и диагностические антитела или съедобные вакцины, возникает необходимость повышения уровня экспрессии трансгена. Для ре-

шения этой задачи часто используют рекомбинантные ДНК-конструкции с конститутивными промоторами вирусного, растительного или синтетического происхождения. Наиболее известными являются промоторы вируса цветной капусты (35S CaMV), вируса мозаики норичника (FMV),

Список сокращений: вгРНК – вирусная геномная РНК; ГМ – генно-модифицированный; гРНК – геномная РНК; НТП – нетранслируемая последовательность; пн – пар нуклеотидов; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ТФ – транскрипционный фактор; AMV (Alfalfa Mosaic Virus) – вирус мозаики люцерны; 3xARC1 (Active Ribosomal RNA Complementary) – лидерная последовательность, содержащая 10 нуклеотидов, которые комплементарны 18S рРНК в положении 1115–1124; CITE (Cap-Independent Translational Element) – кэп-независимый трансляционный элемент; DIG – дигоксигенин; dNTP – дезоксирибонуклеозидтрифосфат(ы); DRE (Dehydration-Responsive Element) – элемент, чувствительный к дегидратации; DREB1A (DRE-Binding factor) – DRE-связывающий фактор; EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) – анализ изменения электрофоретической подвижности; GUS – β-глюкуронидаза; IPTG – изопропил-β-D-1-тиогалактозид; IRES (Internal Ribosome Entry Site) – участок внутренней посадки рибосом; PVY (Potato Virus Y) – вирус Y картофеля; TEV (Tobacco Etch potyvirus) – вирус гравировки табака; TMV (Tobacco Mosaic Virus) – вирус табачной мозаики.

вируса мозаики мирабилиса (MMV), а также промоторы генов убиквинтина и малой субъединицы рибулозобифосфат-карбоксилазы (rbcS).

Кроме того, для обеспечения максимального уровня синтеза белка кодирующие последовательности трансгенов ставят под контроль 5'- и 3'-нетранслируемых последовательностей геномных РНК. Известно, что НТП вРНК играют решающую роль в регуляции экспрессии генов на посттранскрипционном уровне, так как они участвуют в транспорте мРНК из ядра в цитоплазму, влияют на эффективность трансляции, внутриклеточную локализацию и стабильность мРНК [1, 2]. вРНК способны конкурировать с хозяинскими мРНК за аппарат трансляции и направлять белковый синтез растительной клетки в сторону продукции вирусных белков. У многих вРНК отсутствуют кэп-структура (m^7GpppN) на 5'-конце и поли(А)-хвост на 3'-конце гРНК, которые принимают активное участие в процессе инициации трансляции [3–5]. Однако вместо этого внутри 5'- или 3'-НТП расположены сайты внутренней посадки рибосом или кэп-независимые трансляционные элементы [2].

В большинстве случаев IRES-элементы находятся внутри 5'-НТП и содержат последовательности, комплементарные нуклеотидным последовательностям 18S рРНК, тем самым позволяя рибосомам садиться на 5'-конец гРНК в непосредственной близости от инициаторного кодона без сканирования всей молекулы мРНК. Так, гРНК вирусов р. *Potyvirus* семейства *Potyviridae* (TEV; PVY; PPV (Plum Pox virus); TuMV (Turnip Mosaic Virus)) несут 5'-НТП и поли(А)-хвост, обеспечивающие кэп-независимую инициацию трансляции [6–8].

Многие 3'-СІТЕ-элементы, обнаруженные у вирусов семейства *Tombusviridae*, таких, как STNV (Satellite Tobacco Necrosis Virus), TCV (Turnip Crinkle Virus) и TBSV (Tomato Bushy Stunt *Tombusvirus*), выполняют функции поли(А)-хвоста [9–11]. 3'-НТП гРНК этих вирусов содержат последовательности, способные сворачиваться в длинные вторичные структуры типа «стебель–петля», благодаря которым происходит связывание факторов инициации трансляции и доставка их на 5'-конец мРНК. гРНК вирусов BYDV (Barley Yellow Dwarf Virus) семейства *Luteoviridae* и TNV (Tobacco Necrosis Virus) семейства *Tombusviridae* несут трансляционные энхансерные домены внутри как 5'-, так и 3'-НТП [12, 13]. 3'-СІТЕ этих вРНК содержат последовательности, способные формировать вторичные структуры типа «кленового листа», так называемые BYDV-подобные элементы.

РНК–РНК-взаимодействия распространяются на большие расстояния между такими 3'-НТП и 5'-НТП внутри одного и того же вируса, что приводит к связыванию факторов инициации на 5'-конце и также облегчает процесс трансляции [13].

Энхансерными свойствами обладают и многие 5'-НТП кэпированных вРНК. Так, гРНК вируса табачной мозаики (TMV, р. *Tobamovirus*, семейство *Virgaviridae*) имеет 5'-кэп и транслируется с высокой эффективностью благодаря присутствию 5'-лидерной последовательности (5'- Ω), которая содержит несколько консервативных сегментов UUAC и (CAA)_n [14].

Многие исследования направлены на создание искусственных трансляционных энхансеров, которые по своей активности значительно превосходили бы вирусные аналоги и могли бы функционировать как *in vitro*, так и *in vivo* [15, 16].

Присутствие 5'-НТП многих вирусных гРНК перед стартовым кодоном приводит к кратному повышению эффективности трансляции чужеродных кодирующих последовательностей также и в системе *in planta*. Так, Ω -последовательность TMV повышает экспрессию репортерного гена в 2–10 раз в отсутствие поли(А)-хвоста в клетках двудольных и однодольных растений [17, 18]. 5'-НТП AMV (семейство *Bromoviridae*), использованная в качестве лидера в сочетании с промотором 35S CaMV, повышает активность репортерного гена β -глюкуронидазы в 8 раз по сравнению с бинарным вектором рВ1121 [19]. А синтетический энхансер *synJ* усиливает экспрессию репортерного гена от 10 до 50 раз, как в двудольных, так и в однодольных растениях в зависимости от того, в каких тканях корней, стеблей, листьев и т.д. происходит экспрессия [16]. Присутствие 5'-НТП PVY увеличивает уровень трансляции синтетических мРНК в растительных протопластах в 2–10 раз [6, 15].

Сложности при исследовании механизма сигнальной трансдукции и экспрессии генов транскрипционных факторов, которые запускаются в условиях абиотического стресса, возникают в связи с тем, что, во-первых, синтез многих ТФ, как уже сказано, индуцируется только после стресса, происходит в определенных временных рамках и строго регулируется другими участниками сигнальных каскадов, роль большинства из которых до сих пор полностью не изучена, а во-вторых, даже небольшие количества белка могут оказаться достаточными для дальнейшей индукции экспрессии его генов-мишеней; поэтому продукты экспрессии генов ТФ присутствуют в крайне низких концентрациях и диагностировать их

представляется возможным только с помощью высокочувствительных методов. Преодолеть возникающие проблемы при изучении воздействия ТФ на их гены-мишени помогает использование системы «эффектор–репортер». Это один из широко распространенных методов исследования функции как ТФ, так и индуцибельных промоторов, а также поиска белок-связывающих доменов внутри промоторных последовательностей [20–22].

Объектом нашего исследования был ТФ DREB1A (связывающий фактор элемента, чувствительного к дегидратации) из *Arabidopsis thaliana*. Этот белок имеет сигнальную последовательность ядерной локализации, принадлежит к семейству белков ERF/AP2 (Ethylene-Responsive element-binding Factor/APETALA2) и активирует экспрессию многих других индуцибельных генов *COR/RD/LTI* (COld Responsive/Responsive to Dehydration/Low-Temperature-Induced), используя сигнальный путь, независимый от абсцизовой кислоты [20, 23, 24]. Экспрессия гена *AtDREB1A*, стоящего под контролем конститутивного промотора, в трансгенных растениях приводит к повышению толерантности ГМ растений к заморозкам и засухе [20, 21, 23]. Показано, что на холоде в течение нескольких минут происходит экспрессия гена *AtDREB1A*, после чего белковый продукт действует как *транс*-активатор. Благодаря присутствию ДНК-связывающего мотива (AP2-домена), характерного для всех представителей семейства, ТФ AtDREB1A способен связываться с последовательностью TA/GCCGACNT, названной DRE-элементом и обнаруженной в промоторных областях многих генов-мишеней [23–27]. Примером промотора, в нуклеотидной последовательности которого были идентифицированы *cis*-действующие регуляторные DRE-элементы, является индуцибельный промотор гена *rd29A* [23, 24, 27, 28]. Нуклеотидная последовательность этого промотора содержит помимо TATA-бокса и двух DRE-элементов такие белок-связывающие мотивы, как ABRE (ABscisic acid-Responsive Element) и MYC (MYeloCytomato-sis-related element). Это значит, что ген *rd29A*, стоящий под контролем указанного промотора, принимает участие в акклиматизации растений в ответ на различные виды абиотического стресса.

Цель данного исследования состояла в сравнении усиливающего действия различных 5'-НТП (5'pI, 5'TMV, 5'AMV, 5'PVY и 5'3xARC1) в сочетании с конститутивным промотором 35S CaMV на

эффективность трансляции гена ТФ AtDREB1A *in vivo*. Впервые изучена динамика и продолжительность действия всех пяти указанных 5'-НТП на экспрессию гена ТФ AtDREB1A, а также проведен анализ усиливающего эффекта вирусного лидера 5'PVY и синтетической последовательности 5'3xARC1 по сравнению с хорошо изученными энхансерами 5'TMV и 5'AMV в системе «эффектор–репортер».

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Получение рекомбинантных ДНК

Клонирование ДНК-последовательностей проводили согласно [29]. Для клонирования рекомбинантных ДНК были использованы буферы и ферменты фирмы Thermo Scientific (США). Для выделения плазмидной ДНК и очистки ДНК-фрагментов использовали наборы фирмы Roshe (Германия). Для проведения трансформации¹ служили компетентные клетки штамма *E. coli* DH5α (New England Biolabs, Великобритания).

Клонирование кодирующей последовательности гена *AtDREB1A*

Данную последовательность сначала установили с помощью базы данных NCBI GenBank (no. NM118680). Затем препараты тотальных РНК были выделены из листьев *Arabidopsis thaliana* v. Colombia с использованием TRIzol реагента (Sigma, США) согласно инструкции производителя. Полная кодирующая последовательность гена *AtDREB1A* была амплифицирована путем обратной транскрипции (с участием препарата тотальных РНК, обратной транскриптазы Maxima (Thermo Scientific) и олигонуклеотидов oligo(dT)₁₈) и последующей ПЦР. Последнюю проводили с участием праймеров #18-S+NcoI (5'-CT-CTTCTGATCCATGGACTCATTTTCTGCT-3' (здесь и далее подчеркнуты сайты рестрикции) и #19-AS+HpaI (5'-GAGTTTTGTAACTCCATAACGATAC-3'). После очистки и гидролиза рестриктазами NcoI и HpaI фрагмент, содержащий последовательность целевого гена, клонировали в составе плазмидного вектора pET23d (Novagen, США) между сайтами рестрикции NcoI и XhoI. Данный вектор содержит T7-промотор, полилинкерную область для действия рестриктаз и последовательность, кодирующую шесть гистидиновых остатков (6xHis-Tag), расположенную в 3'-концевой области

¹Promega. The source for discovery. Protocols and application guide. USA: Promega Corporation. 1996.

на нитроцеллюлозную мембрану (Roshe) с использованием коммерческих антител (anti-His HPR Conjugate) согласно рекомендациям фирмы 5PRIME. Концентрацию белка после разделения фракций измеряли по методу Брэдфорд [31] и доводили до нужного значения, используя колонки Amicon Ultra-2 (Millipore, США).

EMSA

Реакцию образования комплекса ДНК–белок проводили при температуре 26 °С или 37 °С, как указано в руководстве¹, с небольшими модификациями согласно инструкциям при работе с DIG-мечеными зондами (Roshe). Двухцепочечный фрагмент ДНК размером 632 пн, меченный дигоксигенином (далее обозначен как rd29ADIG+ получали после проведения раунда ПЦР с использованием праймеров #rd29A-S+HindIII и #DRE-AS (5'-GCTTTTGGAACTCATGTCGGTA-3') и ДНК рСАМrd29A в качестве матрицы. Коммерческий концентрат из набора PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roshe) использовали в качестве источника меченых dNTP. Для синтеза немеченого ДНК-фрагмента, обозначенного нами как rd29ADIG– помимо тех же праймеров и матрицы использовали смесь dNTP фирмы Thermo Scientific. После проведения электрофореза в 5%-ном ПААГ (в 0,5-кратном трис-боратном буфере в течение 1 ч при 100 В) ДНК-белковые комплексы переносили на нейлоновую положительно заряженную мембрану (Nylon Membrane, positively charged, Roshe, Германия). Для иммунодетекции образования DIG-меченых комплексов использовали коммерческий набор DIG Luminescent Detection Kit (Roshe) согласно инструкции производителя. При этом для иммунодетекции применяли антитела anti-DIG-AP, а в качестве субстрата использовали CSPD.

Трансформация клеток агробактерий

Для проведения электропорации по стандартной методике использовали компетентные клетки штамма *Agrobacterium tumefaciens* pGV2260S. Процедуру осуществляли на приборе Gene Pulser (BioRad, США) в режиме 25 мФ, 1,8 кВ, 200 Ом. Отбор трансформированных клеток проводили на селективной среде с канамицином (100 мкг/л) и рифампицином (50 мкг/л) (Sigma, США).

Индукция экспрессии гена *uidA* с помощью белка AtDREB1A

При выполнении эксперимента был использован метод, предложенный Karila et al. [32], с некоторыми модификациями. Инокуляцию листьев

табака осуществляли суспензией, состоящей из смеси разбавленных ночных культур агробактерий двух штаммов. Суспензию первого штамма, несущего один из вариантов ДНК-эффektора, в котором присутствует ген *AtDREB1A*, разбавляли до ОП₆₀₀ = 0,7–0,85, второго штамма, содержащего ДНК-репортер рСАМrd29A-uidA – до ОП₆₀₀ = 0,2. Затем 3–4 листа табака *Nicotiana tabacum* v. Sam-sun, выращенного в стерильных условиях на среде Мурасиге–Скуга с добавлением 3%-ной сахарозы (ChemCruz, США) и 0,8%-ного агара (Appli-Chem, Германия), погружали в суспензию смеси агробактерий; все варианты помещали в один и тот же эксикатор, создавая равные условия вакуума для всех образцов. Глубина вакуума, создаваемого водоструйным насосом, колебалось от 18" до 25" Hg Vac (от 0,6 до 0,8 атм.), а время нахождения листьев под вакуумом составляло 5–7 мин. Качество прошедшей инфильтрации контролировали по визуальным изменениям листьев: после вакуумной обработки листовые пластинки в отличие от интактных становились темно-зелеными и прозрачными (как бутылочное стекло). Эксперимент выполняли в трех повторностях.

Далее листья помещали на фильтры, смоченные ММА-буфером (1-кратный набор солей среды Мурасиге–Скуга, 10 мМ 2-(N-морфолино)-этансульфоновая кислота, 20 г/л сахарозы, рН 5,6, и 200 мкМ ацетосирингон (Sigma, США)). Через 2 сут инкуляции листья перекладывали на фильтры, смоченные ММА-буфером, содержащим 500 мкг/л цефотаксима («Красфарма», Россия). Образцы для анализа (по 3 диска диаметром 7 мм из каждого листа) собирали с 3-го по 7-й день с тех участков листьев, где сохранялось тургорное давление. Образцы замораживали и хранили при –70 °С.

Определение активности репортерного белка β-глюкуронидазы (GUS)

Замороженную ткань размалывали стеклянной палочкой до состояния порошка и гомогенизировали в 100 мкл экстракционного буфера согласно Jefferson [33]. Пробы центрифугировали 15 мин при 16000 g, и супернатант переносили в новые пробирки. Количество белка измеряли по методу Брэдфорд [31]. Для определения уровня GUS-активности объем пробы, содержащей 20 мг белка, доводили до 20 мкл, добавляли к ней 10 мкл субстратного буфера (1 мг/мл 4-метилумбелиферил-β-глюкуронида (MU, Sigma) в экстракционном буфере) и инкубировали смесь в течение 30 мин при 37 °С. Реакцию останавливали, добавляя 20 мкл пробы к 2 мл 0,2 М Na₂CO₃ и измеряли

флюоресценцию при 455 нм, используя возбуждающий свет с длиной волны 365 нм, на флюориметре TKO100 (Hofer Scientific Instruments, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рекомбинантный белок AtDREB1A способен связываться с синтетической последовательностью индуцибельного промотора rd29A

Полная кодирующая последовательность гена *AtDREB1A* из *Arabidopsis thaliana* размером 651 пн была клонирована в составе бактериального плазмидного вектора pET23d под контролем промотора бактериофага T7. В ходе клонирования в 3'-концевую область кодирующей последовательности гена *AtDREB1A* была введена His-Tag-последовательность (6xHis) для последующего обнаружения и очистки рекомбинантного белка в клетках *E. coli*.

Далее осуществляли экспрессию рекомбинантной ДНК pET23DR1AHis в клетках *E. coli*. В результате электрофореза продуктов экспрессии в тотальной клеточной фракции анализируемых образцов в отличие от отрицательного контроля (плазида pET23d) были обнаружены белковые продукты с ММ около 32–33 кДа, соответствующие ожидаемому размеру белка AtDREB1A. Иммунодиагностика показала наличие иммуноферментного комплекса на мембране в том же месте, где в ПААГ детектировались ожидаемые белковые продукты (рис. 1a). После синтеза белка AtDREB1A в системе *E. coli* в достаточном количестве была проведена его очистка с помощью Ni-NTA-агарозы. В результате было получено 5 фракций, содержащих различные профили белков (см. рис. 1b). Белковый продукт ожидаемого размера был получен во фракции E2.

Так как ТФ AtDREB1A содержит ДНК-связывающий мотив, необходимо было проверить функциональную способность рекомбинантного белка связываться с промотором, содержащим DRE-элемент. Для этого, прежде всего, были синтезированы DIG-меченый (rd29ADIG+) и немеченый (rd29ADIG-) ДНК-фрагменты, содержащие последовательность индуцибельного промотора гена *rd29A* с 1 по 632 пн. В промоторе rd29A DRE-элемент расположен с 548 по 566 пн; ABRE-последовательность – с 713 по 720 пн; ТАТА-бокс – с 743 по 748 пн; МҮС-элемент – с 764 по 768 пн; транскрипционный старт находится в положении 777. Таким образом, ДНК-фрагменты DIG+ или DIG- содержали только DRE-элемент.

Очищенный белок AtDREB1A и ДНК-фрагмент rd29ADIG+ использовали в реакции связывания друг с другом. После электрофореза и последующего иммуноблотинга было показано образование хемилюминисцентно меченого DIG-комплекса белок–ДНК (см. рис. 1c). Количество DIG-меченого комплекса резко увеличивалось при повышении температуры реакции с 26 °С до 37 °С (сравни дорожки 2–6 и 8–12) в отличие от отрицательного контроля (бычий сывороточный альбумин, данные не приведены). Помимо этого, использование ДНК-фрагмента rd29ADIG- в реакции в качестве молекулы-конкурента приводило к снижению образования DIG-меченого комплекса (сравни дорожки 8 и 9–12). При дальнейшей оптимизации реакции обнаружено, что соотношение 3,0 мкг очищенного белка и 0,2 мкг ДНК-фрагмента rd29ADIG+ позволяет диагностировать образование комплекса ДНК–белок также и при 26 °С (данные не приведены).

Таким образом, было доказано, что полученный нами рекомбинантный транскрипционный фактор AtDREB1A и синтетическая последовательность индуцибельного rd29A-промотора обладают способностью связываться друг с другом *in vitro*.

Различные 5'-НТП являются энхансерами трансляции рекомбинантного белка AtDREB1A *in vivo*

Далее было проведено исследование действия пяти различных 5'-НТП (табл. 1) на уровень экспрессии гена ТФ *AtDREB1A* в растительной системе (табл. 2). Для этого получали рекомбинантные ДНК двух видов. Один вариант ДНК нес репортерный ген β-глюкуронидазы (*uidA*) под контролем индуцибельного промотора rd29A и синтетического энхансера трансляции 5'3xARC1; другой вариант – эффекторный ген транскрипционного фактора AtDREB1A плюс 8xHis под контролем промотора 35S CaMV и одного из пяти вариантов 5'-НТП (5'pl, 5'PVY, 5'TMV, 5'AMV или 5'3xARC1) (рис. 2a, 2b). После трансформации клеток агробактерий были получены штаммы, несущие ДНК pCAMrd29A-*uidA* или ДНК-кассеты [35S CaMV–5'-НТП–*AtDREB1A*–3'-TMV–T-nos] (см. рис. 2a, 2b) в составе pCAMBIA2300 (приведены в колонке «*AtDREB1A*-содержащие (эффектор)» в табл. 2).

Используя вакуумную агроинфильтрацию листьев табака с участием полученных агробактериальных штаммов, была проведена транзиторная экспрессия целевых генов. Дальнейший сравнительный анализ влияния различных вариантов энхансеров на трансляцию ТФ AtDREB1A,

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА AtDREB1A

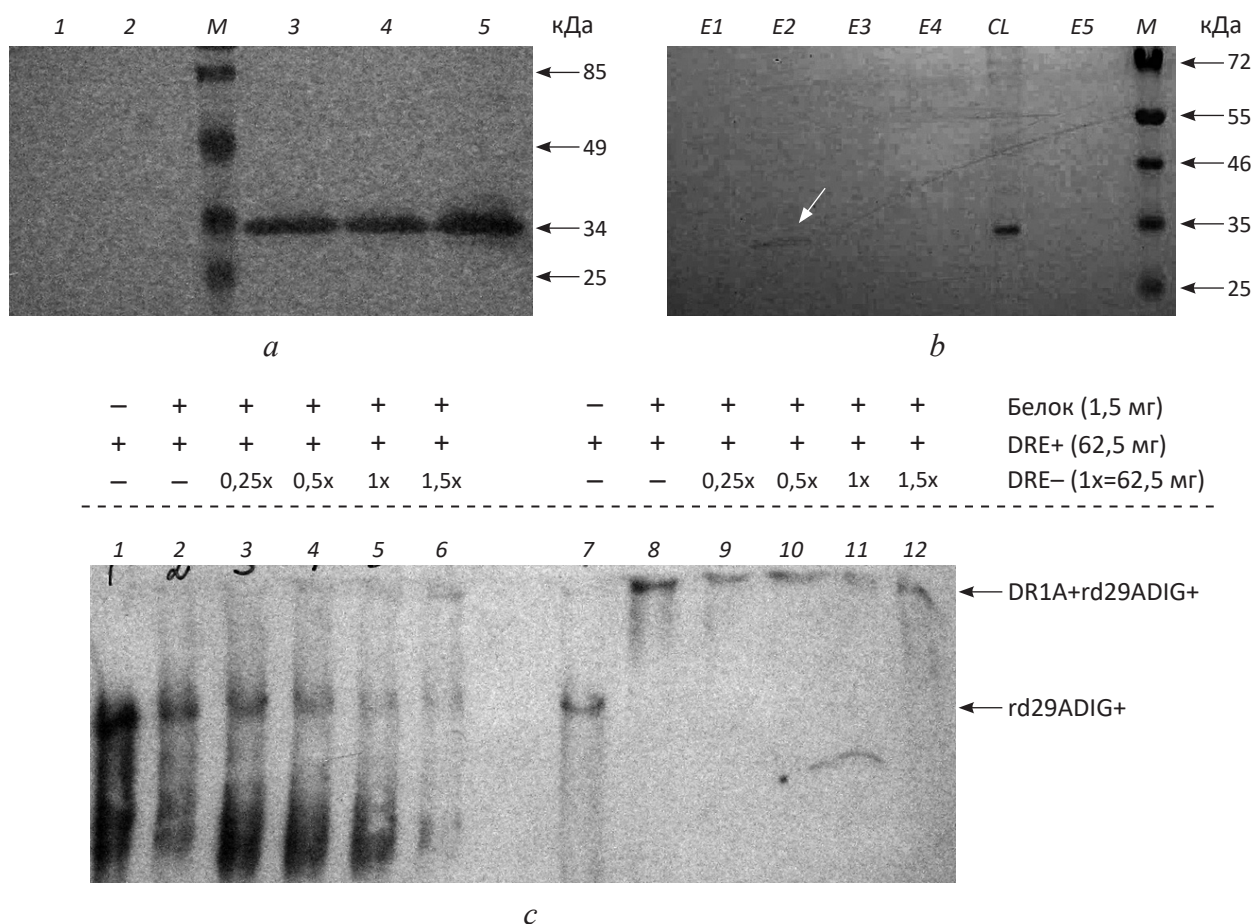


Рис. 1. Результаты анализа продуктов, полученных в результате реакции связывания ДНК-фрагментов rd29ADIG+ и rd29ADIG- с рекомбинантным белком AtDREB1A: *a* – электрофорез в SDS-ПААГ и последующий вестерн-блот-анализ продуктов экспрессии гена *AtDREB1A* в клетках *E. coli* (1, 2 – вектор pET23d, 3–5 – рекомбинантная ДНК pET23DR1AHis, M – маркеры MM #SM0441 (Fermentas)); *b* – электрофорез различных фракций белка (E1, E2, E3, E4 и E5) для разделения фракций использовали буфер для элюции, содержащий 50 мМ, 100 мМ, 150 мМ, 200 мМ или 250 мМ имидазол, соответственно (белковый продукт ожидаемого размера во фракции E2 указан белой стрелкой), CL – клеточный лизат до очистки, M – маркеры MM #SM0671 (Fermentas); *c* – продукты реакции связывания рекомбинантного белка AtDREB1A с ДНК-фрагментами rd29ADIG+ и rd29ADIG- при температуре 26 °С (дорожки 1–6) и 37 °С (дорожки 7–12); справа стрелками обозначено положение в геле комплекса белок–ДНК и DIG-меченой ДНК. Над пунктирной линией указаны компоненты и их количество в реакционных смесях, соответствующие дорожкам: «Белок» – рекомбинантный AtDREB1A, «DRE+» – ДНК-фрагмент, несущий последовательность промотора rd29A и меченный дигоксигенином (DIG), «DRE-» – немеченый ДНК-фрагмент, несущий ту же последовательность, что и фрагмент DRE+

Fig. 1. Analysis of products of rd29ADIG+ and rd29ADIG- DNA fragments binding with AtDREB1A recombinant protein: (a), electrophoresis in SDS-PAG and further Western-blotting of *AtDREB1A* gene expression products in *E. coli* cells (1, 2 – vector pET23d, 3–5 – pET23DR1AHis recombinant DNA, M – MM markers #SM0441 (Fermentas)). (b), electrophoresis of various protein fractions (E1, E2, E3, E4 and E5) elution buffer for the fraction separation contained 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM or 250 mM imidazole, respectively. Protein of expected size in E2 fraction is shown by white arrow. CL, cell lysate before purification; M, MM markers #SM0671 (Fermentas). (c), products of AtDREB1A protein binding to rd29ADIG+ and rd29ADIG- DNA fragments at temperature of 26 °C (lanes 1–6) and 37 °C (lanes 7–12); on the right, positions in gel of DIG-labeled DNA (rd29A) and [protein+DNA] (DR1A+rd29A) complex are indicated by arrows. Compositions of reaction mixtures: Белок is AtDREB1A recombinant protein, DRE+ is DIG-labeled DNA fragment with the sequence of rd29A promoter, DRE- is unlabeled DNA fragment with the same sequence as DRE+ fragment) and component amounts in reaction are listed above broken line

сопряженную с последующей индукцией репортерного гена *uidA*, выполняли на основании оценки активности белка GUS в образцах, взятых с 3-го по 7-й день инкубации (см. рис. 2c). В качестве отрицательных вариантов использовали ва-

рианты АБ- (инфильтрация в буфере без агробактерий) и «без и/ф» (листья просто инкубировали в смеси клеток агробактерий, аналогичной использованной для варианта 5'PVY, без вакуумирования). В этих вариантах обнаружен

Полные нуклеотидные последовательности различных 5'-НТП, использованных в работе**Full nucleotide sequences of various 5'-UTR used**

5'-НТП	Нуклеотидная последовательность 5'– 3'	Число нуклеотидов
5'pl	gcctaagctt gtcgaccatg g	17
5'3xARC1	ccagcttaca atactcccc асаасаgctt асааactcc cccac aacagcttac aatactcccc сасаасаgct tgcgaccat gg	83
5'TMV	ggatccccag ctttatttt асаасааtta ссаасаааа саааа ааааааааа attacaatta ctatttacaа ttacagtcga ccatgg	87
5'AMV	ggatccaagc ttgttttat tttaatttt ctttcaata ctcc accatgg	48
5'PVY	aaataaaaac аactcaatac аacataаааа ааааааааааааааааааааа actcataaac gcttattctc actcaagcaа cttgctaagt ttcag ttaaatcat ttcttgcaа ttctcttaааа cgatattgga ааааа ttcaactca асааgтааtt tcatacttc сааасааttt tagat ccatgg	183

Примечание: жирным шрифтом отмечен инициаторный кодон; подчеркнут *NcoI*-сайт.

Footnote: initiatory codon is typed bold; *NcoI*-site is underlined.

Бактериальные штаммы и ДНК-конструкции, использованные для проведения агроинfiltrации**Bacteria strains and DNA constructs used for agroinfiltration**

Штамм	Рекомбинантные ДНК	
	<i>AtDREB1A</i> -содержащие (эффектор)	<i>uidA</i> -содержащие (репортер)
АБ–	Не использовали	Не использовали
без и/ф	[35S–5'PVY– <i>AtDREB1A</i> –3'TMV–T-nos]	[rd29A–5'3xARC1– <i>uidA</i> –3'TMV–T-nos]
pCAMBIA	Использовали вектор pCAMBIA2300	То же
k+(rd+5'3xARC1)	Не использовали	» »
5'PVY	[35S–5'PVY– <i>AtDREB1A</i> –3'TMV–T-nos]	» »
5'TMV	[35S–5'TMV– <i>AtDREB1A</i> –3'TMV–T-nos]	» »
5'pl	[35S–5'pl– <i>AtDREB1A</i> –3'TMV–T-nos]	» »
5'3xARC1	[35S–5'3xARC1– <i>AtDREB1A</i> –3'TMV–T-nos]	» »
5'AMV	[35S–5'AMV– <i>AtDREB1A</i> –3'TMV–T-nos]	» »

Примечание: «АБ–» – в ходе вакуумной инfiltrации листья погружали в MMA-буфер без агробактерий; «без и/ф» – инкубацию листьев проводили в смеси агробактерий, аналогичной использованной для варианта 5'PVY, без проведения вакуумной инfiltrации; pCAMBIA – вектор pCAMBIA2300 использовали в качестве эффектора в паре с вектором, несущим репортерный ген; k+(rd+3xARC1) – листья погружали в суспензию агробактерий с рекомбинантной ДНК только одного вида, несущей репортерный ген *uidA* под контролем промотора rd29A и 5'3xARC1

Footnote: АБ–, leaves were plunged during vacuum infiltration in MMA buffer without agrobacteria; без и/ф, leaves were incubated in the mixture of agrobacteria that is similar with that used for variant 5'PVY without vacuum infiltration; pCAMBIA, vector pCAMBIA2300 was used as effector in pair with vector that bore reporter gene; k+(rd+3xARC1), leaves were plunged in agrobacterial suspension with recombinant DNA of a single type containing reporter gene of *uidA* under the control of promoter rd29A and 5'3xARC1

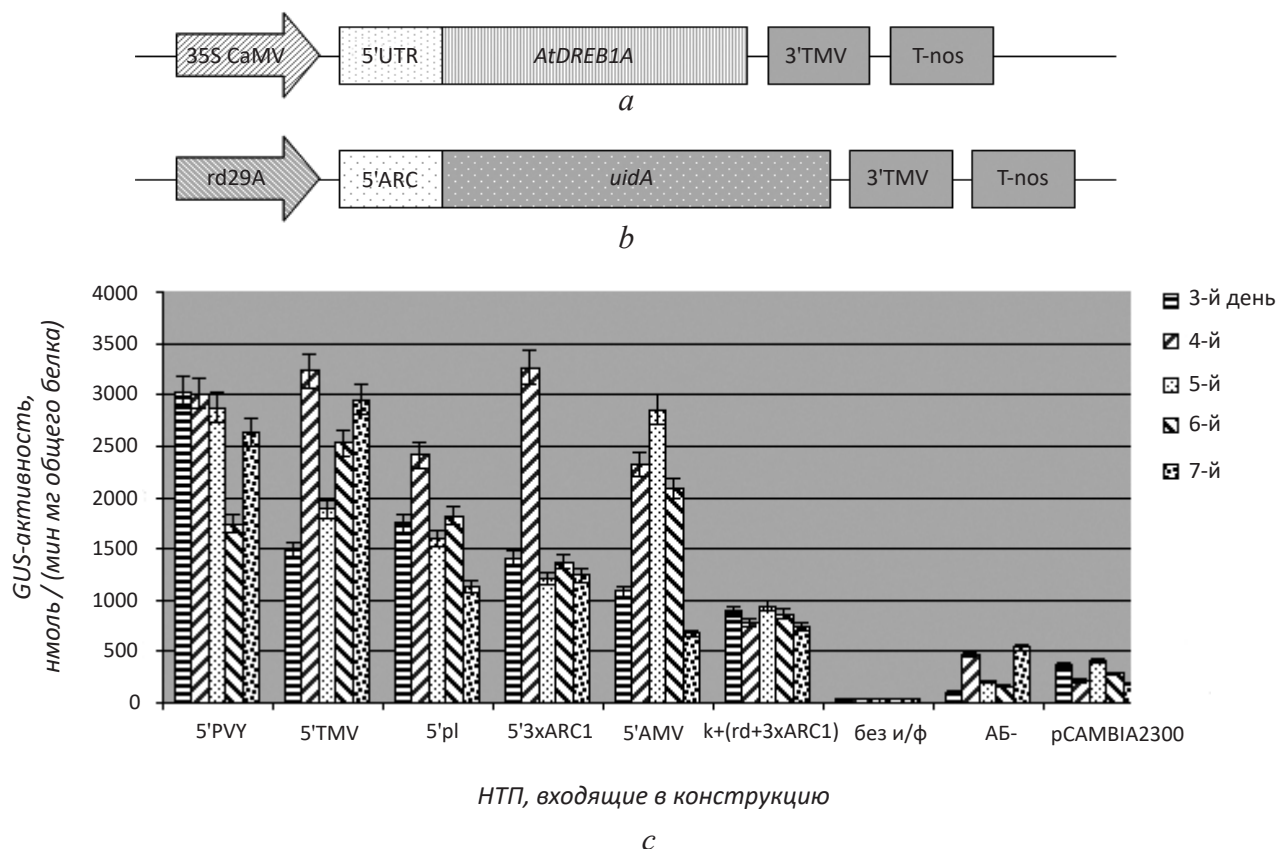


Рис. 2. Схематическое изображение рекомбинантных ДНК-кассет эффектора (a) и репортера (b), клонированных в составе бинарного агробактериального вектора pCAMBIA2300 по сайтам рестрикции *Hind*III и *Bam*HI и использованных для изучения экспрессии генов *AtDREB1A* и *uidA*, находящихся под контролем различных 5'-НТП, в системе *in vivo* (5'UTR означает 5'PVY, 5'TMV, 5'AMV, 5'3xARC1 или 5'pl (обозначения см. в примечании к табл.2)), и GUS-активность в системе эффектор–репортер (c). Статистическую обработку данных по GUS-активности вели попарно относительно варианта АБ-. Достоверные результаты ($P \leq 0,05$) получены для конструкции с НТП 5'PVY на 4-й, для конструкций с 5'pl и 5'AMV – на 5-й день инкубации

Fig. 2. Schematic depiction of recombinant DNA cassettes of effector (a) and reporter (b) that are cloned in binary agrobacterial vector at restriction sites for *Hind*III and *Bam*HI and used to study *in vivo* expression of *AtDREB1A* and *uidA* genes under the control of various 5'-UTRs: 5'UTR means 5'PVY, 5'TMV, 5'AMV, 5'3xARC1 or 5'pl. (c), GUS activity in effector–reporter system. «без и/ф» means that leaves were incubated in the agrobacterial mixture similar with that used for 5'PVY variant without vacuum infiltration; АБ- means that leaves were plunged in MMA buffer without agrobacteria during vacuum infiltration; pCAMBIA means that vector pCAMBIA2300 was used as effector paired with reported gene-bearing vector. Statistical processing of data on GUS activity was performed in pairs relative to АБ- variant. Reliable results ($P \leq 0,05$) were obtained for 5'PVY UTR construct on the 4th, and for 5'pl and 5'AMV constructs on the 5th day of incubation

минимальный уровень GUS-активности (≤ 500 нмоль/(мин·мг общего белка), как и в варианте pCAMBIA2300, который использовали для того, чтобы определить, оказывает ли какое-либо влияние нуклеотидная последовательность этого вектора на экспрессию репортерного гена.

Сравнение экспрессии целевых генов для остальных вариантов векторов проводили по отношению к k+(rd+3xARC1) (или k+), для инокуляции которого брали только один штамм агробактерий, содержащий репортерный ген.

В ходе сравнительного анализа было отмечено, что различные 5'-НТП усиливают экспрессию гена *AtDREB1A* в разной степени. В целом за все время

(с 3-го по 7-й день) для варианта 5'3xARC1 отмечено наименьшее увеличение уровня экспрессии среди всех 5'НТП. Хотя на 4-й день наблюдалось резкое усиление экспрессии гена *uidA* (в 4,2 раза по отношению k+), но этот эффект был нестабилен и резко снижался уже на следующий день.

Наилучший результат показали два варианта – 5'PVY и 5'TMV. У второго усиление экспрессии достигало максимального эффекта на 4-й и 7-й день не только по сравнению с контрольным вариантом k+ (в 4,1 и 3,9 раза, соответственно), но и по сравнению с вариантами других ДНК-эффекторов (см. рис. 2c). У варианта 5'PVY наблюдали стабильный энхансерный эффект в течение

продолжительного времени (с 3-го по 5-й и на 7-й день показания для этого варианта в 3,2–3,4 и 3,0 раза, соответственно, превышали k^+).

Таким образом, показано, что экспрессия рекомбинантного гена *AtDREB1A*, стоящего под контролем конститутивного промотора 35S CaMV, приводит к эффективной индукции временной экспрессии репортерного гена *uidA* в системе *in vivo*. Эффективность трансляции рекомбинантного белка *AtDREB1A* варьировала в значительной степени в зависимости от того, под контролем какой 5'-НТП находился ген этого ТФ.

Итак, в настоящей работе изучали временную экспрессию гена ТФ *AtDREB1A*, а также влияние различных 5'-НТП на уровень трансляции рекомбинантного белка *AtDREB1A in vivo*. В ходе подготовительной работы нами были синтезированы последовательности гена *AtDREB1A* и индуцибельного промотора гена *rd29A*; проведена экспрессия гена *AtDREB1A* в системе *E. coli*, а также доказано, что полученный рекомбинантный белок и последовательность синтетического промотора *rd29A*, несущего DRE-элемент (TACCGACAT, согласно результатам секвенирования), являются функционально активными (см. рис. 1с). Эти эксперименты согласуются с результатами других групп исследователей, которые обнаружили, что именно благодаря присутствию DRE-мотива внутри промотора *rd29A* продукты экспрессии укороченного варианта кодирующей последовательности рекомбинантного белка *AtDREB1A* могут формировать в системе *in vitro* комплексы с коротким фрагментом размером в 71 нуклеотид, который соответствует 3'-области промотора *rd29A* [28, 34].

Для доказательства образования комплекса ДНК–белок использовали метод EMSA, который широко применяется для изучения взаимодействия отдельных транскрипционных факторов с их ДНК-мишенями [33, 34]. С помощью этого метода уже была установлена точная нуклеотидная последовательность внутри DRE-мотива, с которой в отличие от другого фактора того же семейства – *AtDREB2A* – предпочитает связываться ТФ *AtDREB1A* [34]. Белок *AtDREB1A* имеет высокую степень сродства к последовательности A/GCCGACNT, а белок *AtDREB2A* узнает не только этот набор нуклеотидов, но и A/GCCGACNA/G/C. Мы показали, что белковый продукт, ТФ *AtDREB1A*, полученный нами в ходе экспрессии гена в клетках *E. coli*, можно синтезировать в количестве, достаточном для исследования ДНК–белковых взаимодействий. Кроме того, было установлено, что оптимальной температурой для об-

разования комплекса ДНК–белок *in vitro* является температура теплового шока 37 °С. Используемый метод может быть предложен для получения рекомбинантного белка *AtDREB1A* с целью изучения механизма его взаимодействия с ТФ HOS1, ICE1 и MYB15, которые непосредственно влияют на экспрессию гена *AtDREB1A* в условиях абиотического стресса [35–37].

У арабидопсиса накопление РНК-транскриптов гена *AtDREB1A* начинается уже через 15–40 мин после начала воздействия низких температур [20, 28]. Кроме того, экспрессия трансгена *AtDREB1A*, находящегося под контролем конститутивного промотора 35S CaMV, приводит к запуску экспрессии многих других генов даже без воздействия какого-либо температурного стимула, а также повышает толерантность трансгенных растений к заморозкам [20, 21]. Исходя из этого и используя метод *транс*-активации экспрессии репортерного гена β -глюкуронидазы (*uidA*), стоящего под контролем промотора *rd29A*, с помощью белка *AtDREB1A*, предложенного в качестве индуктора, был проведен сравнительный анализ воздействия различных 5'-НТП на эффективность трансляции белка *AtDREB1A*; при этом особое внимание обращали на продолжительность действия каждой лидерной последовательности.

Анализ проводили относительно варианта $k^+(rd+3xARC1)$ (или k^+) (см. рис. 2с). Уровень GUS-активности для этого варианта был довольно высок, хотя экспланты и не были помещены в условия низких температур. Вакуумная агроинфильтрация как физическая манипуляция является по сути стрессовым воздействием на клетки (поранение плюс дисбаланс, вносимый в клеточные процессы). Она могла привести к запуску экспрессии многих генов ТФ не только семейства *DREB1*, но и таких семейств, как *DREB2A*, *AREB/ABF*, *MYC/MYB*, *STZ/ZAT*, *RAP* и др. [38, 39], которые реагируют на поранение и являются, в свою очередь, индукторами других генов-мишеней. Последовательность промотора *rd29A*, вводимая *in trans*, помимо фактора *AtDREB1A* может также связываться со многими ТФ перечисленных семейств, приводя к увеличению экспрессии репортерного гена. Поэтому значение GUS-активности для варианта k^+ является, скорее всего, совокупным показателем как транзientной экспрессии репортерного гена, так и дополнительной индукции гена со стороны нативных транскрипционных факторов.

GUS-активность для варианта *pCAMB1A* была значительно ниже, чем для k^+ , хотя, согласно ожиданиям, эти значения должны были

быть приблизительно одинаковыми. Возможное объяснение эффекта состоит в соотношении РНК-транскриптов, которые образуются в результате агроинфильтрации. В клетках, в которые попала пара pCAMBIA и k+, предпочтительнее синтезируются РНК-транскрипты, соответствующие гену устойчивости к канамицину (этот ген находится под контролем более сильного промотора 35S CaMV внутри Т-ДНК в pCAMBIA2300), отвлекая на себя основные клеточные ресурсы. В случае варианта k+(rd+3xARC1) соотношение синтезируемых РНК-транскриптов может измениться в пользу последовательностей, стоящих под контролем промотора rd29A.

Анализ активности белка GUS у исследованных штаммов по сравнению с вариантом k+ позволил установить, что каждая из пяти использованных нами 5'-НТП (5'TMV, 5'3xARC1, 5'PVY, 5'pl или 5'AMV) в сочетании с конститутивным промотором 35S CaMV повышает эффективность трансляции белка ТФ AtDREB1A (см. рис. 2с).

Лидерные последовательности 5'TMV, 5'3xARC1, 5'PVY и 5'AMV обладают способностью в разной степени увеличивать уровень трансляции мРНК *in vitro* и *in vivo* благодаря содержащимся в них внутренним кэп-независимым трансляционным элементам [6, 14, 15, 17–19]. В наших экспериментах наиболее высокая GUS-экспрессия была отмечена у вариантов 5'PVY и 5'TMV (соответственно в 3,1 и в 2,9 раза выше по сравнению с k+), а также у 5'3xARC1 (на 4-й день в 4,2 раза выше по отношению к k+).

В случае 5'PVY наблюдали не только максимальные значения эффективной трансляции белка, но и наиболее продолжительный энхансерный эффект. Вероятнее всего, это происходило благодаря присутствию у этого варианта сайта внутренней посадки рибосом [6, 15]. Кроме того, предполагается, что 5'PVY содержит дополнительный сайт поп-AUG-инициации трансляции (неопубликованные данные), который опознается трансляционным аппаратом как растений, так и животных [40].

5'TMV несет внутренние консервативные последовательности [14], благодаря которым проявляются его энхансерные свойства. Считается, что в отличие от кэп-зависимого [4] и кэп-независимого сканирования с участием IRES-элементов [2, 8], инициация трансляции на 5'-Ω TMV происходит по альтернативному пути за счет того, что вся структура этой лидерной последовательности участвует в пространственной укладке на основе неканонических взаимодействий нуклеотидов [41]. Положительную динамику в течение относительно

долгого времени показала также оценка GUS-активности у этого варианта: помимо максимума, который наблюдали на 4-й день, происходило постепенное нарастание экспрессии гена *uidA* с 5-го по 7-й день (см. рис. 2с). Fan и сопр. [18] установили, что Ω-последовательность демонстрирует наиболее активное воздействие на экспрессию генов в клетках не однодольных, а двудольных растений. А присутствие этого лидерного олигонуклеотида в дополнение к кэпу усиливает трансляцию мРНК в протопластах табака эффективнее, чем 5'-НТП гРНК вирусов TNV, STNV, BYMV и TBSV, несущих 3'-CITE. Этот эффект объясняется сохранением стабильности молекул мРНК в течение более длительного времени.

У варианта 5'3xARC1 хороший энхансерный эффект был получен только на 4-й день и не был таким продолжительным, как в других вариантах, хотя эта лидерная конструкция и несет последовательность, которая комплементарна 18S рРНК и является IRES-элементом [15]. По-видимому, одного этого свойства недостаточно для проявления продолжительного усиления трансляции ТФ.

Варианты ДНК-эффекторов с 5'pl и 5'AMV в ходе экспрессии гена *uidA* также показали преимущество перед вариантом k+, но динамика GUS-активности у них была различной. Вариант 5'AMV демонстрировал эффект плавного нарастания экспрессии, которое достигает максимума на 5-й день, и такого же плавного снижения экспрессии с 5-го по 7-й день.

Согласно нашим результатам, вариант 5'pl показал достаточно эффективную временную экспрессию репортерного гена в листьях табака: максимум GUS-активности был зарегистрирован уже на 3-й и 4-й день (соответственно в 2,0 и 3,1 раза превышающий уровень k+). Затем наблюдалось падение экспрессии, и на 7-й день ее уровень приближался к значениям, полученным для k+. Это подтверждает тот факт, что для эффективной индукции экспрессии генов-мишеней с помощью ТФ AtDREB1A достаточны даже небольшие количества этого транскрипционного фактора. Интересно, что ранее 5'pl использовали в качестве отрицательного контроля: в экспериментах по трансляции различных мРНК в бесклеточной системе синтеза белка из зародышей пшеницы эта последовательность не проявляла способности усиливать трансляцию белка [15, 40].

Сравнительный анализ энхансерных свойств некэпированных вариантов 5'PVY, 5'TMV, 5'3xARC1 и 5'pl в бесклеточной системе пшеницы *in vitro* проводили и ранее [15, 40]. Эффективность

трансляции синтетических мРНК, у которых репортерный ген находится под контролем НТП 5'PVY, 5'TMV или 5'3xARC1, превышает эффективность трансляции мРНК с лидерной последовательностью 5'pl соответственно в 10, 14 и 14,7 раза [15]. А эффективность трансляции мРНК, содержащих репортерный ген под контролем 5'PVY и 5'TMV, в 2,3 раза выше по сравнению с мРНК, несущими последовательности 5'AMV и 5'pl [40]. Согласно нашим результатам, средние значения GUS-активности исследованных вариантов не так сильно отличались от средних данных для 5'pl: для вариантов 5'PVY и 5'TMV они были выше соответственно в 1,5 и 1,4 раза, а для лидерных последовательностей 5'3xARC1 и 5'AMV оставались приблизительно на уровне варианта 5'pl. Однако в разные дни максимум активности характеризовались варианты с различными лидерными олигонуклеотидами: на 4-й день – 5'3xARC1 (в 1,4 раза выше) и 5'TMV (в 1,34 раза выше), на 5-й день – 5'PVY и 5'AMV (оба варианта в 1,8 раза выше), на 7-й – 5'PVY и 5'TMV (в 2,3 и в 2,6 раз выше, чем 5'pl). Хотя окружение инициаторного кодона (последовательность Козак) во всех случаях было одинаковым (см. табл. 1), все использованные в экспериментах 5'-НТП имели различную длину, нуклеотидный состав, а, следовательно, и вторичную структуру, и ряд особых свойств, которые облегчают инициацию трансляции.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод, что выбранные нами 5'-НТП являются энхансерами процесса трансляции ТФ AtDREB1A и имеют различный временной оптимум действия в системе *in vivo*. Вирусные лидерные последовательности 5'PVY, 5'TMV и 5'AMV проявляют более длительный эффект на уровень трансляции белка, чем искусственный энхансер 5'3xARC1 и нативная последовательность 5'pl. Дальнейшее использование сочетания различных промоторов и 5'-НТП наряду с выбором трансгена может позволить направленно регулировать уровень экспрессии генов ТФ при создании трансгенных растений, устойчивых к биотическим и абиотическим стрессам.

Работа выполнена в рамках грантового финансирования научных исследований (4538/ГФ4) и НТП «Разработка биотехнологических основ создания и мониторинга генетически модифицированных растений с улучшенными хозяйственно-ценными признаками» (О.0677) Министерства науки и образования Республики Казахстан.

Авторы благодарят доктора Д.Р. Галли (D.R. Gallie, University of California, Riverside, CA, USA) за предоставленную плазмиду pl-GUS.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mignone F., Gissi C., Liuni S., and Pesole G. Untranslated regions of mRNA. *Genome Biology*, 2002, 3(3), 1–10. <http://genomebiology.com/2002/3/3/reviews/0004.1>
2. Kneller E., Rakotondrafara A., Miller W. A. Cap-independent translation of plant viral RNAs. *Virus Research*, 2006, 119(1), 63–75. doi: 10.1016/j.virusres.2005.10.010
3. Haar T., Gross J., Wagner G., McCarthy J. The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2004, 11(6), 503–511. doi: 10.1038/nsmb779
4. Browning K. Plant translation initiation factors: it is not easy to be green. *Biochem. Soc. Trans*, 2004, 32(4), 589–591. doi: 10.1042/BST0320589
5. Kahvejian A., Svitkin Y., Sukarieh R., M'Boutchou M., Sonenberg N. Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev*, 2005, 19(1), 104–113. doi: 10.1101/gad.1262905
6. Levis C., Astier-Manifacier S. The 5' untranslated region of PVY RNA, even located in an internal position, enables initiation of translation. *Virus Genes*, 1993, 7(4), 367–379. doi: 10.1007/BF01703392
7. Gallie D.R. Cap-independent translation conferred by the 5' leader of tobacco etch virus is eukaryotic initiation factor 4G dependent. *J. Virol.*, 2001, 75(24), 12141–12152. doi: 10.1128/JVI.75.24.12141-12152.2001
8. Sim'on-Buela L., Guo H.S., Garcia J.A. Cap-independent leaky scanning as the mechanism of translation initiation of a plant viral genomic RNA. *J. Gen. Virol.*, 1997, 78(10), 2691–2699. doi: 10.1099/0022-1317-78-10-2691
9. Meulewaeter F., Danthinne X., van Montagu M., Cornelissen M. 5'- and 3'-sequences of satellite tobacco necrosis virus RNA promoting translation in tobacco. *Plant J.*, 1998, 14(2), 169–176. doi: 10.1046/j.1365-313X.1998.00104.x
10. Wu B., White K. A primary determinant of cap-independent translation is located in the 3'-proximal region of the tomato bushy stunt virus genome. *J. Virol.*, 1999, 73(11), 8982–8988.
11. Qu F., Morris T. Cap-independent translational enhancement of turnip crinkle virus genomic and subgenomic RNAs. *J. Virol.*, 2000, 74(3), 1085–1093. doi: 10.1128/JVI.74.3.1085-1093.2000
12. Lipzig R., Gultyaev A., Pleij C., Montagu M., et al. The 5' and 3' extremities of the satellite tobacco necrosis virus translational enhancer domain contribute differentially to stimulation of translation. *RNA*, 2002, 8(2), 229–236. doi: 10.1017.S1355838201018076

13. Treder K., Kneller E., Allen E., et al. The 3' cap-independent translation element of Barley yellow dwarf virus binds eIF4F via the eIF4G subunit to initiate translation. *RNA*, 2008, 14(1), 134–47. doi: 10.1261/rna.777308
14. Gallie D., Walbot V. Identification of the motifs within the tobacco mosaic virus 5'-leader responsible for enhancing translation. *Nucleic Acids Res.*, 1992, 20(17), 4631–4638. PMID: PMC334193
15. Akbergenov R., Zhanybekova S., Kryldakov R., et al. 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 Res.*, 2004, 32(1), 239–247. doi: 10.1093/nar/gkh176
16. Kanoria S., Burma P.A. 28 nt long synthetic 5'UTR (synJ) as an enhancer of transgene expression in dicotyledonous plants. *BMC Biotechnology*, 2012, 12, 85–98. <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/12/85>
17. Gallie D., Sleat D., Watts J., et al. The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts *in vitro* and *in vivo*. *Nucleic Acids Res.*, 1987, 15(8), 3257–3273. PMID: PMC340728
18. Fan Q., Treder K., Miller W. Untranslated regions of diverse plant viral RNAs vary greatly in translation enhancement efficiency. *BMC Biotechnology*, 2012, 12, 22–31. <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/12/22>
19. Datla R., Bekkaoui F., Hammerlindl J., et al. Improved high-level constitutive foreign gene expression in plants using an AMV RNA4 untranslated leader sequence. *Plant Sci.*, 1993, 94(1-2), 139–149. doi: 10.1016/0168-9452(93)90015-R
20. Novillo F., Alonso J.M., Ecker J. FR., and Salinas J. CBF2/DREB1C is negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*. *PNAS*, 2004, 101(11), 3985–3990. doi: 10.1073/pnas.0303029101
21. Oh S.-J., Song S.I., Kim Y.S. et al. *Arabidopsis* CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiology*, 2005, 138(1), 341–351. doi: 10.1104/pp.104.059147
22. Saibo N., Lorenc T., and Oliveira M. Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stress. *Annals of Botany*, 2009, 103(4), 609–623. PMID: PMC2707349 doi: 10.1093/aob/mcn227
23. Kashuga M., Miura S., Shinozaki K., and Yamaguchi-Shinozaki K. A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant Cell Physiol.*, 2004, 45(3), 346–350.
24. Mizoi J., Shinozaki K., and Yamaguchi-Shinozaki K. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta – Gene Regulatory Mechanisms*, 2012, 1819(2), 86–96. doi: 10.1016/j.bbagr.2011.08.004
25. Wang H., Datla R., Georges F., et al. Promoters from Kin1 and cor6.6, two homologous *Arabidopsis thaliana* genes: Transcriptional regulation and gene expression induced by low temperature, ABA osmoticum and dehydration. *Plant Mol. Biol.*, 1995, 28(4), 605–617. doi: 10.1007/BF00021187
26. Baker S., Wilhelm K., Thomashow M. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Mol. Biol.*, 1994, 24(5), 701–713. doi: 10.1007/BF00029852
27. Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature or high-salt stress. *Plant Cell*, 1994, 6, 251–264.
28. Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y. et al. Two transcription factors, DREB1 and DREB2A, with an EREBP/AR2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1998, 10(8), 1391–1406. doi: 10.1105/tpc.10.8.1391
29. Sambrook J., Russel D. Molecular cloning. A laboratory manual. N.Y.: Cold Spring Harbor, 2001, 1–3, 1.31–7.94.
30. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 1987, 19, 11–15.
31. Bradford, M.M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72, 248–254.
32. Kapila J., Rycke R., Van Montagu M., and Angenon G. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science*, 1997, 122(1), 101–108. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452\(96\)04541-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452(96)04541-4)
33. Jefferson R., Kavanagh T., and Bevan M. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.*, 1987, 6, No. 13, 3901–3907.
34. Sakuma Y., Maruyama K., Osakabe Y., et al. Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell*, 2006, 18(5), 1292–1309. doi: 10.1105/tpc.105.035881
35. Chinnusaty V., Ohta M., Kanrar S., et al. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev.*, 2003, 17(8), 1043–1054. doi: 10.1101/gad.1077503
36. Agarwal M., Hao Y., Kapoor A. et al. A R2R3 type MYB transcription factor is involved in cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. *J. Biol. Chemistry*, 2006, 281(49), 37636–37645. doi: 10.1074/jbc.M605895200

37. Dong C., Agarwal M., Zhang Y., et al. The negative regulator of plant cold response, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *PNAS*, 2006, 103(21), 8281–8286. doi: 10.1073/pnas.0602874103
38. Zhang J.Z., Creelman R.A., Zhu J.-K. From laboratory to field. Using information from Arabidopsis to engineer salt, cold and drought tolerance in crops. *Plant Physiology*, 2004, 135, 615–621. www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.104.040295
39. Saibo N. J., Lourenco T., Oliveira M.M. Transcriptional factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Ann. Botany*, 2009, 103, 609–623. doi:10.1093/aob/mcn227
40. Beisenov D., Stanbekova G., Nadirova I., et al. Expression of a sheep pox virus gene in plant systems under the control of plant virus regulatory elements and with sub-cellular targeting. *Biosci. Biotechnol. Res. Asia*, 2016, 131(1), 1–8.
41. Kovtun A., Shirokikh N., Gudkov A., Spirin A. The leader sequence of tobacco mosaic virus RNA devoid of Watson-Crick secondary structure possesses a cooperatively melted, compact conformation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 358(1), 368–372. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.04.152

In vivo Expression of Gene for AtDREB1A Transcriptional Factor under the Control of Various 5'-Untranslated Regions

O.V. KARPOVA^{1,2,*}, A.M. ALEKSANDROVA¹, R.M. NARGILOVA¹, and B.K. ISKAKOV¹

¹The Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, 050012, Almaty Kazakhstan

²The Institute of Plant Biology and Biotechnology, 050040, Almaty Kazakhstan

e-mail: oxkarpova@mail.ru*

Received February 27, 2017

Accepted April 12, 2017

Abstract—The transcription factor AtDREB1A only controls the expression of many inducible genes under low temperature conditions. The recombinant protein capable of binding with a synthetic sequence of rd29A inducible promoter from *Arabidopsis thaliana* has been obtained as a result of the expression of the gene *AtDREB1A* in *E. coli*. The transient expression of the gene *AtDREB1A* under the control of the constitutive promoter 35S CaMV and one of five different 5'-UTR (5'-TMV, -PVY, -AMV, 3xARC1 or 5'pl) was carried out in tobacco leaves simultaneously with the gene of β -glucuronidase (*uidA*) under the control of synthetic inducible promoter rd29A. As a result, the capacity of AtDREB1A recombinant protein to induce the in vivo transient expression of the reporter gene *uidA* was established. After the comparative analysis, it was shown for the first time for the AtDREB1A protein that the properties of various 5'-UTRs as translational enhancers vary greatly.

Key words: AtDREB1A, expression, inducible promoter, transgene, translational enhancer, 5'-untranslated region.

Acknowledgements—The work was performed within the framework of Research Grant Financing (4538/GF4) and Scientific-Technical Program “Development of Biotechnological Bases of Construction and Monitoring of Genetically Modified Plants with Improved Economically Valuable Properties” (O.0677) of the Ministry of Science and Education of the Kazakhstan Republic.

The authors are grateful to Dr. D.R. Gallie (University of California, Riverside, CA, USA) for the provided plasmid of pl-GUS.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-5-9-22