

УДК 577.217.34

ВОЗМОЖНОЕ УЧАСТИЕ 3'-КОНЦЕВОГО СЕГМЕНТА 18S рРНК В ПРОЦЕССЕ ИНИЦИИИ ТРАНСЛЯЦИИ НЕКЕПИРОВАННЫХ мРНК У РАСТЕНИЙ

© 2011 г. А. В. Жигайлов¹, Е. С. Бабайлова², Н. С. Полимбетова¹, Д. М. Грайфер²,
Г. Г. Карпова^{2*}, Б. К. Искаков^{1**}

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

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

Поступила в редакцию 04.05.2010 г.

Принята к печати 29.06.2010 г.

Изучена возможность участия 3'-концевого сегмента 18S рРНК, включающего последнюю шпильку 45, в процессе кап-независимой инициации трансляции на рибосомах растений. Показано, что этот сегмент (нуклеотиды 1777–1811) доступен для комплементарных взаимодействий в составе 40S субчастицы. Обнаружено, что в бесклеточной белоксинтезирующей системе из зародышей пшеницы олигонуклеотиды, комплементарные данному сегменту 18S рРНК, специфически ингибируют трансляцию некепированной репортерной мРНК β-глюкуронидазы. В своей 5'-нетранслируемой области эта мРНК содержит лидерную последовательность геномной РНК Y-вируса картофеля (PVY) с участками, комплементарными району 1777–1811. Показано, что соответствующая нуклеотидам 291–316 PVY последовательность, комплементарная большей части 3'-концевого сегмента (а именно, фрагменту 1777–1808) 18S рРНК, обладает способностью усиливать эффективность трансляции репортерных мРНК, если ее поместить в 5'-нетранслируемую область этих мРНК. Полученные результаты указывают на возможность комплементарных взаимодействий между 5'-нетранслируемой областью мРНК и 3'-концевым сегментом 18S рРНК при кап-независимой инициации трансляции.

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

PROBABLE INVOLVEMENT OF 3'-TERMINAL SEGMENT OF 18S rRNA IN TRANSLATION INITIATION OF UNCAPPED mRNAs IN PLANTS, by A. V. Zhigailov¹, E. S. Babaylova², N. S. Polimbetova¹, D. M. Graifer², G. G. Karpova^{2*}, B. K. Isakov^{1**} (¹Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Committee of Science, Ministry of Education and Sciences of the Republic of Kazakhstan, Almaty, 480012 Kazakhstan; ²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, 630090 Russia; e-mail: *karpova@niboch.nsc.ru, **bulat.isakov@mail.ru). A possibility of involvement of 3'-terminal 18S rRNA segment in the cap-independent initiation of translation on plant ribosomes was studied. It was shown that 3'-terminal segment (nucleotides 1777–1811) of 18S rRNA including the last hairpin 45 is accessible for complementary interactions in 40S ribosomal subunits. Oligonucleotides complementary to this segment of rRNA when added to wheat germ cell-free protein synthesizing system were found to specifically inhibit translation of uncapped reporter mRNA coding for β-glucuronidase, which bears in the 5'-untranslated region (UTR) a leader sequence of potato virus Y (PVY) genomic RNA possessing fragments complementary to the region 1777–1811. It was shown that a sequence corresponding to nucleotides 291–316 of PVY, which is complementary to a major portion of the 3'-terminal 18S rRNA segment 1777–1808, when placed into 5'-UTR, is able to enhance translational efficiency of the reporter mRNAs. The results obtained suggest that complementary interactions between mRNA 5'-UTR and 18S rRNA 3'-terminal segment can take place in the course of cap-independent translation initiation.

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

Принятые сокращения: 5'- и 3'-НТО – 5'- и 3'-нетранслируемые области; GUS – β-глюкуронидаза; PVY – Y-вирус картофеля; RN – 4-[N-(2-хлорэтил)-N-метиламино]бензилметил-5'-фосфамидное производное додекадезоксирибонуклеотида рСААТ-GATCCTTCCG; SDS – додецилсульфат натрия.

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

Одна из ключевых особенностей канонической схемы инициации трансляции эукариотических цитоплазматических мРНК заключается в том, что малая рибосомная субчастица связывается с мРНК только после того, как комплекс белковых факторов инициации узнает кеп-структуру на 5'-конце мРНК. Присоединившись к мРНК, 40S субчастица сканирует ее 5'-нетранслируемую область (НТО) до тех пор, пока не узнает инициаторный кодон AUG (см. [1, 2]).

Альтернативный механизм, так называемая внутренняя инициация трансляции, реализуется у эукариот при трансляции некепированных вирусных РНК, содержащих в 5'-НТО специфические структурные элементы (IRES-элементы, от Internal Ribosome Entry Site), способные у вирусов некоторых типов связываться с 40S субчастицами рибосом даже без участия факторов инициации. Благодаря такому механизму инициаторный кодон оказывается в "правильном" положении на 40S субчастице без сканирования мРНК [3]. Есть данные в пользу того, что внутренняя инициация происходит также при трансляции некоторых кепированных клеточных мРНК низших и высших эукариот [4]. Существует мнение, что с помощью этого механизма может осуществляться регуляция селективной трансляции определенных мРНК при росте и дифференцировке клеток и в условиях стресса. Однако следует отметить, что присутствие IRES-элементов в 5'-НТО клеточных мРНК в ряде работ подвергается сомнению (см., например [5]).

Способы взаимодействия разных IRES-элементов с малой рибосомной субчастицей могут принципиально отличаться. Так, например, высокоструктурированный IRES геномной РНК вируса гепатита С при образовании бинарного комплекса с 40S субчастицей взаимодействует только с рибосомными белками [6–8]. Вместе с тем, получены данные, позволяющие предположить, что связывание с 40S субчастицами IRES-элементов в составе кепированных эукариотических мРНК осуществляется за счет комплементарных взаимодействий между 5'-НТО мРНК и рРНК, подобных Шайн-Далгарновским взаимодействиям у прокариот [9]. В частности, такие взаимодействия могут иметь место при внутренней инициации трансляции мРНК гомеодомена фактора транскрипции Gtx [10] и мРНК рибосомного белка S18 *Arabidopsis thaliana*, транскрибируемой с гена *RPS18C* [11]. Комплементарные 18S рРНК последовательности, потенциально способные выполнять функции IRES-элементов, найдены во многих эукариотических мРНК [12] и в геномных РНК вирусов [13], в частности, в 5'-НТО РНК Y-вируса картофеля (PVY) [14]. Очевидно, благодаря такому IRES-элементу некепированная геномная РНК PVY способна эффективно транслироваться в клетке-хозяине в условиях теплового шока, когда большинство клеточных мРНК не могут участвовать в синтезе белка из-за нарушения кеп-зависимого

механизма инициации [14]. Встраивание участка 5'-НТО РНК PVY, комплементарного сегменту 1112–1123 в центральной части 18S рРНК, в 5'-НТО некепированной репортерной мРНК приводило к значительному усилению эффективности трансляции этой мРНК, которая возростала при увеличении числа комплементарных вставок [15]. По-видимому, при внутренней инициации трансляции мРНК с вышеупомянутыми вставками существует возможность комплементарных взаимодействий между их 5'-НТО и центральным доменом 18S рРНК. Недавно мы показали, что олигонуклеотид, антисмысловый по отношению к сегменту 1112–1123 18S рРНК, специфически подавляет трансляцию рекомбинантной мРНК, несущей в своей 5'-НТО последовательность, комплементарную этому сегменту [16].

У прокариот в комплементарных взаимодействиях при инициации трансляции участвует 3'-концевой сегмент 16S рРНК, узнающий последовательность Шайн-Далгарно в 5'-НТО мРНК [9]. Однако, насколько нам известно, до сих пор остается неясным, вовлечен ли соответствующий сегмент 18S рРНК в инициацию трансляции некепированных мРНК, хотя возможность его участия в этом процессе обсуждали ранее [17].

В настоящей работе изучено влияние олигонуклеотидов, комплементарных району 1777–1811 18S рРНК пшеницы, содержащему ее 3'-концевую шпильку 45, на эффективность трансляции некепированной рекомбинантной мРНК. Эта некепированная мРНК кодирует β-глюкуронидазу и содержит в 5'-НТО участки, комплементарные упомянутому району 18S рРНК. Проверена доступность этого района для комплементарных взаимодействий, и изучены энхансерные свойства помещенной в 5'-НТО мРНК последовательности, комплементарной данному району.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, мочевины ("AppliChem"), РНКазин из плаценты человека ("Promega"), РНКазу Н ("BioLabs"). Олигодезоксирибонуклеотиды (олиго-ДНК) "PVY300+", "PVY300–", "83+", "83–", "ARC+" и "ARC–" (их последовательности приведены ниже) синтезированы в Институте Фридриха Мишера, Базель, Швейцария (Friedrich Miescher-Institute, Basel, Switzerland). Полинуклеотидкиназа фага Т4 получена в лаборатории биоорганической химии ферментов Института химической биологии и фундаментальной медицины (ИХБФМ) СО РАН (Новосибирск, Россия). Олиго-ДНК oligo-N и oligo-K и $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (40 МБк/нмоль) синтезированы в лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН. Нуклеотидные последовательности всех олиго-ДНК, использованных в настоящей работе, приведены ниже:

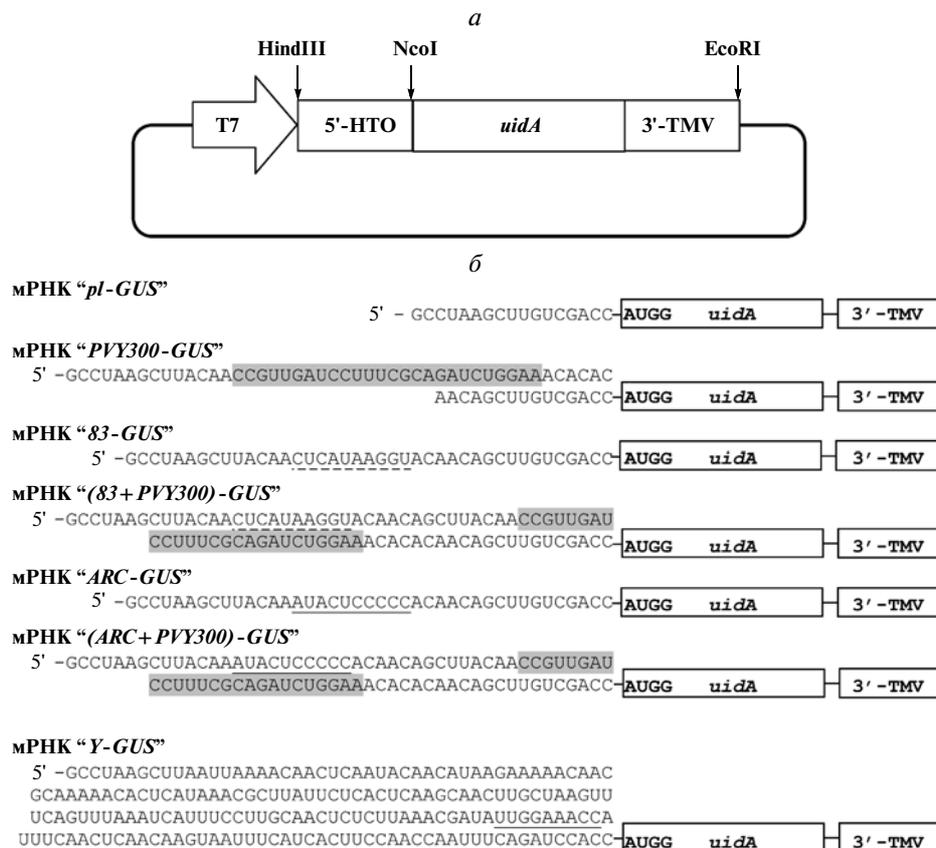


Рис. 1. ДНК-конструкции и рекомбинантные мРНК, полученные на их основе. Карта плазмиды для получения рекомбинантных мРНК (*a*) и схематическое представление мРНК-конструкций “*pl-GUS*”, “*PVY300-GUS*”, “*83-GUS*”, “(*83+PVY300*)-*GUS*”, “*ARC-GUS*”, “(*ARC+PVY300*)-*GUS*” и “*Y-GUS*” (*b*). Обозначения: T7 – промотор бактериофага T7; 5'-HTO – последовательность, соответствующая 5'-HTO в рекомбинантной мРНК; *uidA* – ген, кодирующий β-глюкуронидазу (*GUS*); 3'-TMV – последовательность, соответствующая 3'-HTO геномной РНК вируса табачной мозаики; HindIII, NcoI и EcoRI – уникальные сайты рестрикции. В 5'-HTO рекомбинантных мРНК серым выделены нуклеотиды, составляющие “*PVY300*”, пунктиром подчеркнута последовательность “*83*”, комлементарная участку 1081–1090 н. в центральном домене 18S рРНК пшеницы; сплошной линией подчеркнута последовательность “*ARC*”, комлементарная участку 1113–1122 н. в центральном домене 18S рРНК пшеницы. мРНК “*Y-GUS*” в своей 5'-HTO содержит лидерную последовательность геномной РНК PVY (код доступа в *pub*: X12456), обладающую выраженными энхансерными свойствами; подчеркнуты нуклеотидные последовательности, комлементарные фрагментам 1778–1785 и 1803–1807, в 3'-концевом минидомене 18S рРНК.

“*PVY300+*”:

(5') AGCTTACAACCGTTGATCCTTTTCGCA-GATCTGGAAACACACAAC;

“*PVY300-*”:

(5') CATGGTTGTGTGTTTCCAGATCTGC-GAAAGGATCAACGGTTGTA;

“*83+*”:(5') AGCTTACAACCTCATAAGGTACAAC;

“*83-*”:(5') TGCTGTTGTACSTTATGAGTTGTA;

“*ARC+*”:(5') AGCTTACAATACTCCCCCA-CAAC;

“*ARC-*”:(5') TGCTGTTGTGGGGGAG-TATTTGTA;

“*oligo-N*”:(5') CAATGATCCTTCCG;

“*oligo-K*”:(5') CATGGTCATGACGGACATG.

Для создания ДНК-конструкций использовали любезно предоставленную Д.Р. Галли (Gallie D., Department of Biochemistry, University of California, Отдел Биохимии, Университет Калифорнии) плазмиду “*pl-GUS*”, сконструированную на основе вектора *pBluescript KS II(+)* и содержащую репортерный ген β-глюкуронидазы (*uidA*) [18], а также плазмиды “*83-GUS*”, “*ARC-GUS*” и “*Y-GUS*”, полученные нами ранее [15].

Рекомбинантные ДНК “*PVY300-GUS*”, “(*83+PVY300*)-*GUS*” и “(*ARC+PVY300*)-*GUS*” созданы путем встраивания в плазмиду “*pl-GUS*” по сайту рестрикции HindIII фрагмента ДНК, полученного с помощью гибридизации олиго-ДНК “*PVY300+*” с олиго-ДНК “*PVY300-*”, олиго-ДНК “*83+*” с олиго-ДНК “*83-*” или олиго-ДНК “*ARC+*” с олиго-ДНК “*ARC-*” соответственно (см. рис. 1*a*).

Все конструкции содержали промотор бактериофага T7, 5'-НТО, репортерный ген *uidA* и последовательность, соответствующую 3'-НТО геномной РНК вируса табачной мозаики, и отличались друг от друга только своими 5'-НТО. Нуклеотидные последовательности конструкций проверяли с помощью рестрикционного анализа и секвенирования.

Рекомбинантные мРНК (рис. 1б) получали транскрипцией *in vitro* с помощью РНК-полимеразы бактериофага T7 по методике, описанной ранее [19]. ДНК-конструкции перед транскрипцией линеаризовали по сайту рестриктазы EcoRI.

Трансляцию *in vitro* проводили в бесклеточной системе из зародышей пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта “Казахстанская 4”, полученной согласно [15]. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 20 мМ Трис-ОАс (рН 7.6), 90 мМ КОАс, 2.0 мМ Mg(OAc)₂, 1 мМ АТР, 0.1 мМ GTP, 10 мМ креатинфосфат (“Fluka”), 0.12 мг/мл креатинфосфокиназы (“Sigma”), 0.1 мМ спермидин, по 0.1 мМ каждой из 20 аминокислот, 1 мкг мРНК и 11 мкл экстракта из зародышей пшеницы, приготовленного, как описано [20]. Реакционную смесь инкубировали в течение 1 ч при 26°C.

Эффективность трансляции определяли по активности ее продукта — β-глюкуронидазы (GUS), которую измеряли флуорометрически [18] и выражали в условных единицах.

40S субчастицы рибосом пшеницы сорта “Казахстанская 4” выделяли из зародышей, очищенных от эндосперма, по методике, описанной ранее для рибосомных субчастиц из плаценты человека [21], с небольшими изменениями: соотношение буфера для гомогенизации и зародышей — 6 : 1; буфер содержал ингибитор рибонуклеаз РНКазин из плаценты человека в концентрации 250 ед/мл. Субчастицы перед использованием реактивировали инкубацией в течение 10 мин при 37°C в буфере А (20 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 120 мМ КCl, 13 мМ MgCl₂, 0.5 мМ EDTA). При расчетах принимали, что 1 ОЕ₂₆₀ соответствует 50 пмоль 40S субчастиц.

Фосфорилирование дезоксиолигомеров и синтез алкилирующих производных. Дезоксиолигомеры фосфорилировали по 5'-концу с помощью Т4-полинуклеотидкиназы в присутствии [γ -³²P]АТР. Затем фосфорилированные олигомеры очищали обращенно-фазовой хроматографией на микроколоночном хроматографе Милихром (НПО “Научприбор”, г. Орел), а фосфорилированный oligo-N использовали в синтезе его алкилирующего производного, как описано ранее [22].

Связывание олиго-ДНК с 40S рибосомными субчастицами проводили, инкубируя 4–100 пмоль меченой ³²P 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 алкилирующим производным oligo-N (RN), анализ распределения радиоактивной метки между рРНК и белками в составе модифицированных 40S субчастиц, обработку модифицированных субчастиц протеиназой К, выделение 18S рРНК из модифицированных субчастиц и определение участков 18S рРНК, содержащих ковалентно присоединенный остаток меченого RN (4-[N-(2-хлорэтил)-N-метил-амино]бензилметил-5'-фосфамидное производное oligo-N), с помощью РНКазы H проводили, как описано [16].

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

Для того, чтобы выяснить, вовлечен ли 3'-концевой минидомен 18S рРНК в инициацию трансляции некепированных мРНК, изучали влияние дезоксиолигомеров, комплементарных различным участкам этого домена 18S рРНК пшеницы, на трансляцию рекомбинантной мРНК “Y-GUS” в бесклеточной системе из зародышей пшеницы. Эта мРНК содержала в своей 5'-НТО лидерную последовательность геномной РНК PVY (нуклеотиды 1–184), за которой следовал участок, соответствующий гену *uidA*, и 3'-НТО геномной РНК вируса табачной мозаики (рис. 1б). В качестве дезоксиолигомеров использовали 14-членный oligo-N, полностью комплементарный 3'-концевому участку 1798–1811 18S рРНК, а также 44-членный “PVY300+”, содержащий 26 н. из кодирующей части геномной РНК PVY (нуклеотиды 291–316 с центром в положении примерно 300 н., что и использовано в названии этой последовательности), в значительной степени комплементарный 3'-концевой шпильке 18S рРНК (рис. 2). Контролем служили oligo-K (19 н.) без протяженных участков комплементарности (более 4 н.) к 18S рРНК и “PVY300–” (44 н.), антисмысловой по отношению к “PVY300+” и без комплементарных 18S рРНК последовательностей (более 4 п.н.). Как видно из результатов, представленных на рис. 3, добавление oligo-N и “PVY300+” к бесклеточной системе приводило к значительному ингибированию трансляции мРНК “Y-GUS”, которое усиливалось по мере увеличения концентрации олигомеров, тогда как контрольные олигомеры oligo-K и “PVY300–” мало влияли на эффективность трансляции. Поскольку ни oligo-N, ни “PVY300+” не имеют протяженных участков комплементарности (более 4 н. подряд) к мРНК “Y-GUS”, можно заключить, что подавление трансляции этой мРНК не обусловлено связыванием этих олигомеров с мРНК. Следовательно, полученные данные указывают на возможность участия 3'-концевой шпильки 18S рРНК в трансляции неке-

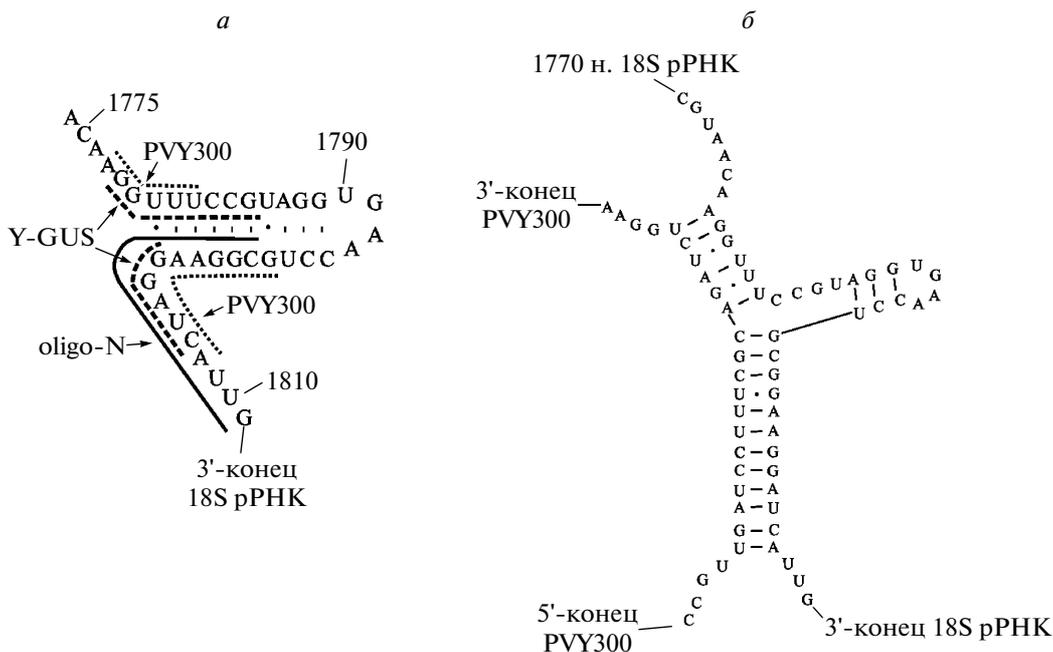


Рис. 2. Вторичная структура 3'-концевого района 18S рРНК пшеницы. За основу взята структура X00755 на сайте <http://www.rna.ccbb.utexas.edu>. Последовательности, комплементарные PVY300, отмечены мелким пунктиром (а), 5'-НТО мРНК “Y-GUS” (крупным пунктиром) и oligo-N (сплошной линией). б – Предсказанные программой *RNA-structure 3.5* комплементарные взаимодействия PVY300 с 3'-концевым районом 18S рРНК пшеницы.

пированных мРНК. Один из возможных механизмов вовлечения этой части рРНК в процесс трансляции может включать ее комплементарные взаимодействия с мРНК в ходе внутренней инициации, поскольку в лидерной области мРНК “Y-GUS” есть фрагменты, комплементарные 3'-концевой шпильке 18S рРНК (см. рис. 2).

С целью оценки степени доступности 3'-концевой шпильки 18S рРНК для комплементарных взаимодействий изучали связывание субчастиц с меченым oligo-N, а в качестве контроля использовали oligo-K. Как видно из данных, приведенных на рис. 4, oligo-N способен эффективно связываться с субчастицами рибосом при 25°C, причем степень связывания, близкая к 1 моль олигомера на 1 моль субчастиц, достигалась уже при концентрации oligo-N, равной 3–4 мкМ (кажущаяся константа ассоциации oligo-N с 40S субчастицами, оцененная из данных рис. 4, равна примерно 10^7 M^{-1}). Контрольный oligo-K в аналогичных условиях с 40S субчастицами практически не связывался (рис. 4), что указывало на специфичность связывания oligo-N с 40S субчастицами. Однако при достаточно высоких (более 4 мкМ) концентрациях oligo-N степень его связывания с 40S субчастицами существенно превышала 1 моль/моль субчастиц, что могло вызываться образованием несовершенных дуплексов олигомера с короткими участками 18S рРНК (длиной до 6 н.), комплементарными oligo-N.

Участки 18S рРНК, с которыми связывается oligo-N, определяли с использованием подхода, основанного на комплементарно-адресованном (сайт-специфичном) алкилировании 18S рРНК в составе

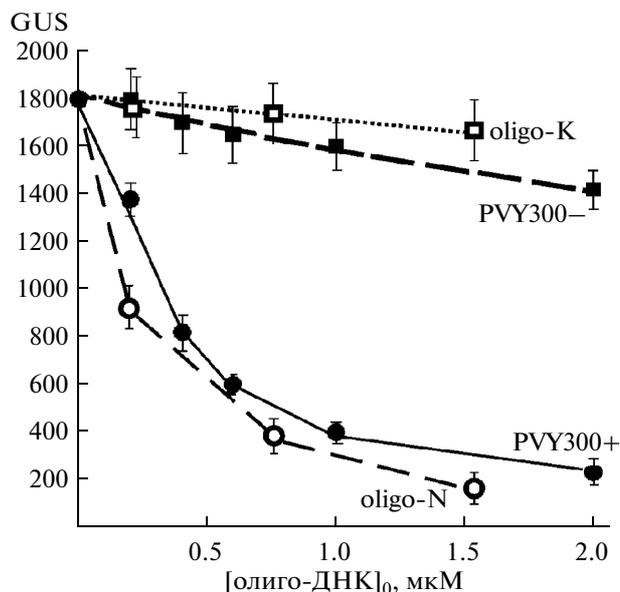


Рис. 3. Влияние различных олиго-ДНК на трансляцию мРНК “Y-GUS” в бесклеточной системе биосинтеза белка из зародышей пшеницы. “GUS” в данном случае – активность β-глюкуронидазы в относительных единицах флуоресценции.

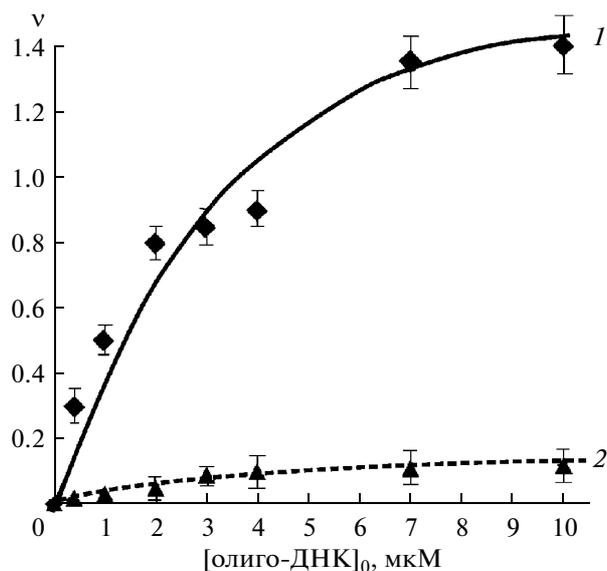


Рис. 4. Изучение доступности 3'-концевого района 1798–1812 18S рРНК в составе 40S субчастиц рибосом пшеницы для связывания комплементарных олигонуклеотидов. Изотермы адсорбции oligo-N (1) и oligo-K (2) на 40S рибосомных субчастицах при 25°C (концентрация 40S субчастиц – 2×10^{-7} М); v – степень связывания, моль олигомера на моль субчастиц.

40S субчастиц 5'-³²P-меченым производным этого олигомера с последующим гидролизом РНК в составе гетеродуплекса с ковалентно связанным олигомером (т.е. в составе ковалентного аддукта) РНКазой Н [23]. Недавно такой подход мы применили для определения участка связывания олигомера, комплементарного фрагменту 1112–1123 в центральном домене 18S рРНК, в 40S субчастицах рибосом пшеницы [16]. При алкилировании 40S субчастиц RN его концентрация была 2 мкМ, что позволяло минимизировать вероятность образования несовершенных гетеродуплексов. Как видно из рис. 4, при этой концентрации степень связывания олигомера с субчастицами была меньше 1 моль/моль субчастиц.

Продукты алкилирования 40S субчастиц меченым RN анализировали с помощью денатурирующего гель-электрофореза в присутствии SDS. Из приведенных на рис. 5 данных видно, что модификации подвергаются как рибосомные белки (им соответствуют радиоактивные полосы на панели б, которых не было при обработке алкилированных субчастиц протеиназой К (рис. 5, 2)), так и 18S рРНК (верхняя радиоактивная полоса, которая не исчезает при обработке алкилированных субчастиц протеиназой К). Модификация субчастиц была специфичной, т.е. происходила в составе гетеродуплекса, образованного 18S рРНК и олигонуклеотидной частью RN, поскольку уровень модификации рибосомных компонентов резко снижался в присутствии избытка немодифицированного oligo-N (рис. 5б, 3). Поло-

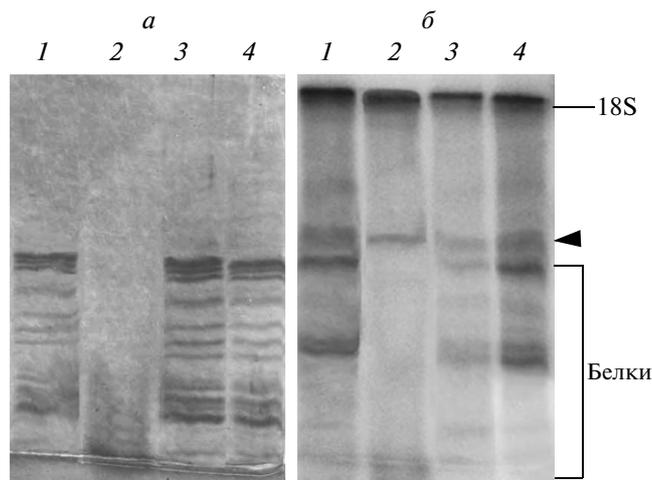


Рис. 5. Электрофоретический анализ в 10%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях распределения шивок 5'-³²P-меченого RN (³²P]RN) между 18S рРНК и белками 40S субчастиц. а – Гель, окрашенный Кумасси G250; б – радиоавтограф того же геля. 1 – Алкилированные 40S субчастицы; 2 – то же после обработки протеиназой К; 3 и 4 – 40S субчастицы, алкилированные [³²P]RN в присутствии oligo-N или oligo-K соответственно. Отмечены радиоактивные полосы, соответствующие модифицированным рибосомным белкам и 18S рРНК; треугольной стрелкой указана полоса небелковой природы.

са небелковой природы в средней части геля, наблюдаемая во всех дорожках, по-видимому, принадлежит фрагменту 18S рРНК, который образуется в результате частичной деградации этой рРНК.

Для определения участка 18S рРНК, модифицированного RN, ковалентный аддукт гидролизовали РНКазой Н и анализировали образовавшиеся меченые фрагменты РНК методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях [23]. Как видно из результатов, приведенных на рис. 6, гидролиз модифицированной 18S рРНК в составе 40S субчастиц приводит к образованию единственного очень короткого меченого фрагмента рРНК (рис. 6, 2), электрофоретическая подвижность которого практически не отличается от подвижности самого RN (рис. 6, 3). Это может быть только в том случае, если в образовании гетеродуплекса принимал участие 3'-концевой сегмент 18S рРНК (см. схему на рис. 6). Таким образом, однозначно доказано, что oligo-N образует гетеродуплекс именно с комплементарной ему последовательностью 1798–1811 18S рРНК пшеницы доступен для взаимодействий с комплементарными ему последовательностями.

Будет ли участок, комплементарный 3'-концевому фрагменту 18S рРНК, проявлять свойства трансляционного энхансера, если его поместить в 5'-НТО некепированных мРНК? Мы создали конструкции, в которых фрагмент кДНК, соответствующий PVY300, находился перед репортерным геном *uidA*,

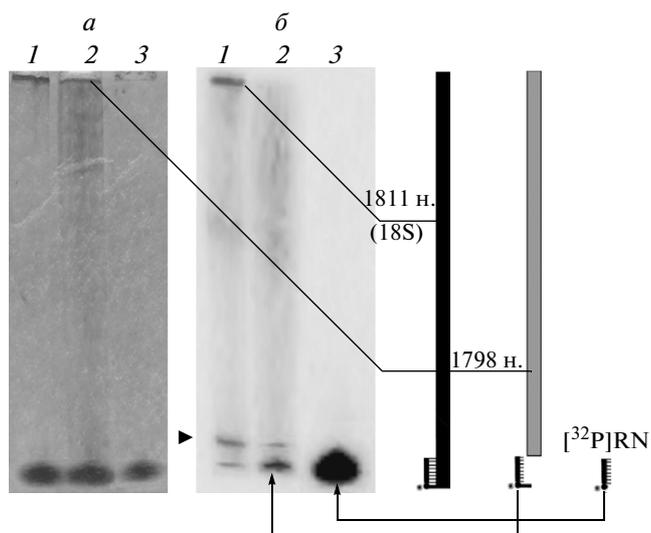


Рис. 6. Электрофоретический анализ в 6%-ном полиакриламидном геле продуктов гидролиза 18S рРНК РНКазой Н. 1 – 18S рРНК пшеницы, считая с [32 P]RN, до обработки РНКазой Н; 2 – то же после обработки РНКазой Н; 3 – реагент [32 P]RN. *a* – Гель, окрашенный “Stains all”; *b* – радиоавтограф геля. Схема гидролиза 18S рРНК представлена справа. Радиоактивный фосфат обозначен звездочкой; продукты, содержащие радиоактивную метку, изображены черными, а немеченый фрагмент рРНК – серым. Стрелкой указан продукт деградации, содержащийся в исходной 18S рРНК.

кодирующим β -глюкуронидазу. С этой целью использовали созданные ранее ДНК-конструкции, которые позволяли получать мРНК с разными 5'-НТО [15, 18]. Первая конструкция (“pl-GUS”) соответствовала мРНК, не содержащей трансляционных энхансеров; вторая (“83-GUS”) – мРНК, 5'-НТО в

которой лишь немного усиливала синтез продукта репортерного гена. Наконец, третья ДНК-конструкция (“ARC-GUS”) соответствовала мРНК, содержащей в 5'-НТО трансляционный энхансер “ARC”, описанный ранее [15]. На основе этих конструкций получены “PVY300-GUS”, “(83 + PVY300)-GUS” и “(ARC + PVY300)-GUS”, содержащие последовательность PVY300 в 5'-НТО. Эти ДНК-конструкции использованы нами для синтеза РНК-транскриптов, названных “pl-GUS”, “83-GUS”, “ARC-GUS”, “PVY300-GUS”, “(83 + PVY300)-GUS” и “(ARC + PVY300)-GUS” (рис. 1), которые транслировали в качестве мРНК в бесклеточной системе биосинтеза белка из зародышей пшеницы. Как видно из результатов, представленных на рис. 7, последовательность PVY300 перед кодирующей частью мРНК во всех случаях приводила к повышению уровня трансляции, причем этот эффект наиболее сильно выражен у трансляционно “слабых” “pl-GUS” и “83-GUS”. Таким образом, встроенная в 5'-НТО мРНК последовательность PVY300, комплементарная 3'-концевому фрагменту 1777–1808 18S рРНК, проявляет свойства трансляционного энхансера.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Последняя 3'-концевая шпилька 18S рРНК (спираль 45 по наиболее широко используемой нумерации, предложенной в работе [25]) и прилегающие к ней одноцепочечные участки входят в консервативную часть вторичной структуры рРНК малых субчастиц (см. <http://www.rna.cccb.utexas.edu>). В 30S субчастицах рибосом прокариот одноцепочечный участок вблизи 3'-конца 16S рРНК доступен для комплементарных взаимодействий, поскольку он узнает последовательность Шайна-Далгарно в мРНК при инициации трансляции у прокариот (его

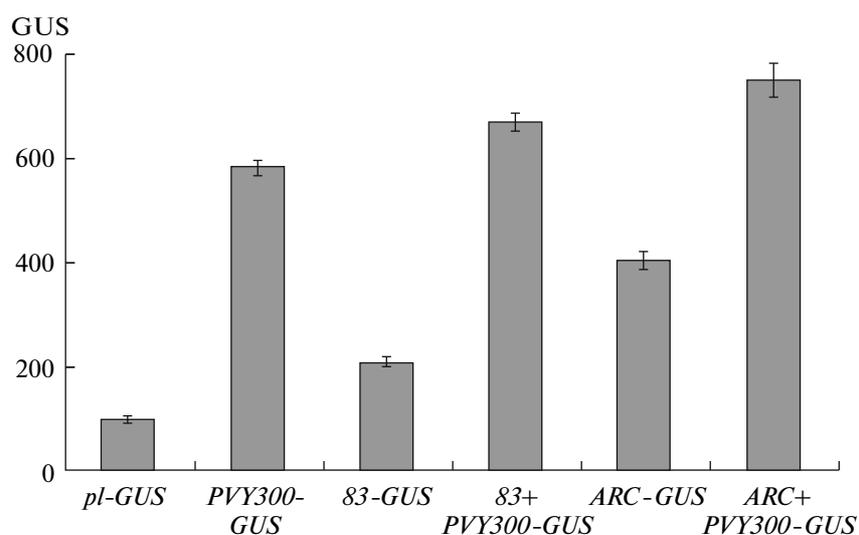


Рис. 7. Уровень трансляции РНК-транскриптов в бесклеточной системе биосинтеза белка из зародышей пшеницы. “GUS” – активность β -глюкуронидазы в относительных единицах флуоресценции.

называют анти-Шайн-Далгарновской последовательностью). Указания на то, что аналогичный фрагмент 18S рРНК экспонирован на поверхности 40S субчастиц рибосом растений, опубликованы ранее [26], но в нашей работе впервые получены доказательства того, что этот фрагмент действительно доступен для комплементарных взаимодействий в составе 40S субчастицы.

Принято считать, что при кеп-зависимой инициации трансляции у эукариот отсутствуют непосредственные взаимодействия между мРНК и 18S рРНК, аналогичные Шайн-Далгарновским. Вместе с тем имеются данные, указывающие на то, что 3'-концевая шпилька 18S рРНК и прилегающие к ней сегменты могут прямо взаимодействовать с теми мРНК, которые способны связываться с субчастицами без участия факторов инициации. Так, фотоактивируемое производное додекарибонуклеотида (короткий аналог мРНК) в составе бинарного комплекса с рибосомами человека сшивалось с фрагментом 1840–1849, гомологичным фрагменту 1779–1788 в спирали 45 18S рРНК пшеницы [27] (см. рис. 2). Эта сшивка могла происходить благодаря образованию несовершенного дуплекса между аналогом мРНК и частично комплементарной ему последовательностью в верхней части спирали 44.

Возможность прямого взаимодействия мРНК с 3'-концевой шпилькой 45 18S рРНК обсуждали в работе [28], где изучали трансляцию геномной РНК вируса желтой карликовости ячменя (BYDV-PAV) в бесклеточной белоксинтезирующей системе из зародышей пшеницы. В 3'-НТО этой РНК расположен участок из 109 н. (обозначен как 3'ТЕ), проявляющий свойства трансляционного энхансера. В состав 3'ТЕ входит фрагмент, комплементарный консервативному у эукариот гексануклеотиду 1802-AGGAUC-1807 в нумерации 18S рРНК пшеницы (рис. 2), положение которого во вторичной структуре соответствует положению анти-Шайн-Далгарновской последовательности 16S рРНК. Добавление в бесклеточную систему из зародышей пшеницы РНК-транскрипта (109 н.), соответствующего энхансеру 3'ТЕ BYDV-PAV, приводило к ингибированию трансляции некепированной рекомбинантной мРНК, содержащей 3'ТЕ в 3'-НТО. В то же время, РНК-транскрипт с нарушенной комплементарностью к 3'-концевому сегменту 18S рРНК не проявлял ингибирующего эффекта. Одно из возможных объяснений этих результатов состоит в осуществлении комплементарных взаимодействий, аналогичных Шайн-Далгарновским, между энхансером 3'ТЕ и последовательностью 1802-AGGAUC-1807.

Использованный в настоящей работе олигомер RVY300+ имеет два участка комплементарности в 18S рРНК: первый охватывает 3'-половину шпильки 45 с прилегающим к ней одноцепочечным 3'-концевым фрагментом рРНК, включающим гексануклеотид 1802-AGGAUC-1807, а второй — 5'-половину

шпильки и примыкающий к ней одноцепочечный участок (рис. 2). Такая “двойная” комплементарность к шпильке 45 18S рРНК обнаружена в РНК многих вирусов, она может играть важную роль в инициации их трансляции [29–31]. В отличие от RVY300+ олигомер oligo-N комплементарен только 3'-концевой части данной шпильки с прилегающим к ней 3'-концевым участком рРНК (рис. 2). Тем не менее, ингибирующий эффект обоих олигомеров на трансляцию мРНК “Y-GUS” оказался практически одинаково сильным (рис. 3). Следовательно, можно предположить, что основной вклад в ингибирование трансляции вносили последовательности, комплементарные 3'-концевой части шпильки 45 с прилегающим к ней 3'-концевым сегментом рРНК, включающим гексануклеотид 1802-AGGAUC-1807.

Ингибирующий эффект олигомеров на трансляцию мРНК может быть обусловлен как их конкуренцией с мРНК за связывание с комплементарным участком 18S рРНК, так и тем, что данный участок рРНК вовлечен либо во взаимодействие с факторами инициации, либо в ассоциацию с большой субчастицей [32]. Действительно, спираль 45 18S рРНК, расположенная в основном на контактной стороне субчастицы в районе платформы возле бороздки между головой и телом [33], участвует в образовании межсубъединичного моста B2b [34] своим нуклеотидом, примыкающим к апикальной петле (G1788 в 18S рРНК пшеницы, см. рис. 2). Этот нуклеотид не входит ни в одну из обсуждаемых в настоящей работе последовательностей 18S рРНК и не примыкает к ним (рис. 2), поэтому маловероятно, что связывание олигомеров с рРНК затрудняет образование моста B2b и, как следствие, ассоциацию субчастиц. Данные о взаимодействии шпильки 45 и прилегающих к ней сегментов с факторами инициации трансляции, насколько нам известно, отсутствуют. Поэтому ингибирующий эффект олигомеров, комплементарных 3'-концевому району 18S рРНК, на трансляцию мРНК не мог быть связан с блокированием участков связывания факторов на 40S субчастице. Следовательно, наиболее приемлемое объяснение данного эффекта состоит в конкуренции между 5'-НТО мРНК и олигомерами за связывание с комплементарными фрагментами в 18S рРНК. Принимая во внимание приведенное обсуждение, логично предположить, что энхансерный эффект RVY300, встроенной в 5'-НТО некепированных мРНК, обусловлен связыванием с комплементарными участками в 3'-концевом сегменте 18S рРНК, которое могло способствовать вовлечению 40S субчастиц в процесс инициации трансляции и приводить к увеличению ее эффективности.

Связывание 40S субчастиц с мРНК в процессе инициации трансляции за счет комплементарных взаимодействий между мРНК и 18S рРНК постулировано ранее в рамках известной гипотезы “рибосомного фильтра” как одного из механизмов контроля трансляции у эукариот [35]. Однако экспери-

ментальные данные, которые указывали бы на существование таких взаимодействий, немногочисленны. Это уже упоминавшиеся данные работ [10, 15, 16], где показана возможность комплементарных взаимодействий между 5'-НТО и центральным доменом 18S рРНК растений, а также достаточно убедительные доказательства того, что последовательность 1750–1764 в 3'-концевом минидомене 18S рРНК *Arabidopsis thaliana* взаимодействует с комплементарным ей фрагментом IRES-элемента в 5'-НТО мРНК рибосомного белка RPS18C [11]. Последовательность 1750–1764 охватывает верхнюю часть спирали 44 в районе декодирующего центра рибосомы и одноцепочечный участок между шпильками 44 и 45. Стоит также отметить, что последовательность, комплементарная фрагменту 1765–1771, прилегающему к нуклеотидам 1750–1764, обнаружена в 5'-НТО некепированной геномной РНК вируса реверсии черной смородины (*Blackcurrant reversion virus*), транскрибирующейся с использованием механизма внутренней инициации [36].

В нашей работе впервые показано, что в комплементарных взаимодействиях с мРНК в процессе кеп-независимой инициации трансляции на рибосомах растений может принимать участие 3'-концевой фрагмент 18S рРНК, включающий 3'-сторону спирали 45 и прилегающий к ней одноцепочечный участок, соответствующий анти-Шайн-Далгарновской последовательности в 16S рРНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kozak M. 2005. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*. **361**, 13–37.
2. Pestova T.V., Lorsch J.R., Hellen C.U. T. 2007. The mechanism of eukaryotic translation initiation in eukaryotes. In: *Translational Control in Biology and Medicine*. Eds Mathews M.B., Sonenberg N., Hershey J.W.B. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 87–128.
3. Pestova T.V., Shatsky I.N., Fletcher S.P., Jackson R.J., Hellen C.U. T. 1998. A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev*. **12**, 67–83.
4. Komar A.A., Hatzoglou M. 2005. Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence. *J. Biol. Chem*. **280**, 23425–23428.
5. Дмитриев С.Е., Андреев Д.Е., Адянова З.В., Теренин И.М., Шатский И.Н. 2009. Эффективная кеп-зависимая трансляция мРНК млекопитающих с длинными и сильно структурированными 5'-нетранслируемыми областями *in vitro* и *in vivo*. *Молекуляр. биология*. **43**, 119–125.
6. Otto G.A., Lukavsky P.J., Lancaster A.M., Sarnow P., Puglisi J.D. 2002. Ribosomal proteins mediate the hepatitis C virus IRES–HeLa 40S interaction. *RNA*. **8**, 913–923.
7. Laletina E., Graifer D., Malygin A., Ivanov A., Shatsky I., Karpova G. 2006. Proteins surrounding hairpin IIIe of the hepatitis C virus internal ribosome entry site on the human 40S ribosomal subunit. *Nucl. Acids Res*. **34**, 2027–2036.
8. Babaylova E., Graifer D., Malygin A., Stahl J., Shatsky I., Karpova G. 2009. Positioning of subdomain IIIe and apical loop of domain II of the hepatitis C IRES on the human 40S ribosome. *Nucl. Acids Res*. **37**, 1141–1151.
9. Voorma H.O. 1996. Control of translation initiation in prokaryotes. In: *Translational Control*. Eds Hershey J.W.B., Mathews M.B., Sonenberg N. Cold Spring Harbor Monograph Ser. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, **30**, 759–777.
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. Vanderhaeghen R., DeClercq R., Karimi M., VanMontagu M., Hilson P., van Lijsebettens 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.
12. Tranque P., Hu M.C.-Y., Edelman G.M., Mauro V.P. 1998. rRNA complementarity within mRNAs: a possible basis for RNA-ribosome interactions and translational control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 12238–12243.
13. Скулачев М.В. 2005. Внутренняя инициация трансляции – разнообразие механизмов и возможная роль в жизнедеятельности клетки. *Успехи биол. химии*. **45**, 123–172.
14. Levis C., Astier-Manificier S. 1993. The 5'-untranslated region of PVY RNA even located in an internal position enables initiation of translation. *Virus Genes*. **7**, 367–379.
15. Akbergenov R.Zh., Zhanybekova S.Sh., Kryldakov R.V., Zhigailov A.V., Polimbetova N.S., Hohn T., Isakov 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.
16. Жигайлов А.В., Грайфер Д.М., Бабайлова Е.С., Полимбетова Н.С., Карпова Г.Г., Исаков Б.К. 2010. Район 1112–1123 центрального домена 18S рРНК в 40S субчастицах рибосом растений: доступность для комплементарных взаимодействий и функциональная роль. *Биоорган. химия*. **36**, 366–374.
17. Kozak M. 1983. Comparison of initiation of protein synthesis in prokaryotes, eukaryotes, and organelles. *Microbiol. Rev*. **47**, 1–45.
18. 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.
19. Gurevich V., Obukhova T.A. 1991. Preparative *in vitro* mRNA synthesis using SP6 and T7 RNA polymerases. *Anal. Biochem*. **195**, 207–213.
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. Грайфер Д.М., Зенкова М.А., Малыгин А.А., Мамаев С.В., Мундус Д.А., Карпова Г.Г. 1991. Участок 18S рРНК, локализованный в области мРНК-связывающего центра рибосом из плаценты человека. *Биоорг. химия*. **17**, 88–98.
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. Brosius J., Dull T.J., Noller H.F. 1980. Complete nucleotide sequence of a 23S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **77**, 201–204.
26. Montesano L., Glitz D.G. 1988. Wheat germ cytoplasmic ribosomes. Structure of ribosomal subunits and localization of N⁶,N⁶-dimethyladenosine by immunoelectron microscopy. *J. Biol. Chem.* **263**, 4932–4938.
27. Demeshkina N., Laletina E., Meschaninova M., Ven'yaminova A., Graifer D., Karpova G. 2003. Positioning of mRNA codons with respect to 18S rRNA at the P and E sites of human ribosome. *Biochim. Biophys. Acta*. **1627**, 39–46.
28. Wang S., Browning K.S., Miller W.A. 1997. A viral sequence in the 3'-untranslated region mimics a 5' cap in facilitating translation of uncapped mRNA. *EMBO J.* **16**, 4107–4116.
29. Pilipenko E.V., Gmyl A.P., Maslova S.V., Svitkin Y.V., Sinyakov A.N., Agol V.I. 1992. Prokaryotic-like *cis* elements in the cap-independent internal initiation of translation on picornavirus RNA. *Cell*. **68**, 119–131.
30. Sheper G.C., Voorma H.O., Thomas A.A.M. 1994. Basepairing with 18S ribosomal RNA in internal initiation of translation. *FEBS Lett.* **352**, 271–275.
31. Yueh A., Schneider R.J. 2000. Translation by ribosome shunting on adenovirus and hsp70 mRNAs facilitated by complementarity to 18S rRNA. *Genes Dev.* **14**, 414–421.
32. Azad A.A., Failla P., Hanna P.J. 1998. Inhibition of ribosomal subunit association and protein synthesis by oligonucleotides corresponding to defined regions of 18S rRNA and 5S rRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**, 51–56.
33. Spahn C.M.T., Beckmann R., Eswar N., Penczek P.A., Sali A., Blobel G., Frank J. 2001. Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae* – tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell*. **107**, 373–386.
34. Spahn C.M., Gomez-Lorenzo M.G., Grassucci R.A., Jorgensen R., Andersen G.R., Beckmann R., Penczek P.A., Ballesta J.P., Frank J. 2004. Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. *EMBO J.* **23**, 1008–1019.
35. Mauro V., Edelman G. 2002. The ribosome filter hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 12031–12036.
36. Karetnikov A., Lehto K. 2007. The RNA2 5'-leader of *Blackcurrant reversion virus* mediates efficient *in vivo* translation through an internal ribosomal entry site mechanism. *J. Gen. Virol.* **88**, 286–297.