

Жигайлов А.В., Кислицин В.Ю.,
Полиμβетова Н.С.,
Искаков Б.К.

**Обнаружение в клетках
растений новой
цитоплазматической РНК,
соответствующей 5'-концевому
фрагменту 5,3S РНК**

Zhigailov A.V., Kislitsin V.Yu.,
Polimbetova N.S., Iskakov B.K.

**Detection of New Cytoplasmic
RNA Corresponding to
5'-Terminal Fragment of 5.3 S
RNA in Plant Cells**

Жигайлов А.В., Кислицин В.Ю.,
Полиμβетова Н.С.,
Искаков Б.К.

**Өсімдік жасушаларында 5,3S
РНК 5'-ұшына сәйкес келетін
жаңа цитоплазмалық РНК
табылды**

В тотальных препаратах РНК, выделенных из зародышей пшеницы, была обнаружена новая малая цитоплазматическая (мц)РНК размером 55 нуклеотидов, соответствующая 5'-концевому фрагменту 5,3S рРНК, которая, в свою очередь, является продуктом дискретной фрагментации молекулы 18S рРНК. Эта цитоплазматическая РНК была детектирована в клетках растений, относящихся к различным таксонам, а также в клетках печени крысы, так что процесс дискретной фрагментации 18S рРНК, по-видимому, является достаточно универсальным явлением. Установлено, что содержание исследуемой мцРНК в молодых побегах растений значительно ниже, чем в сухих и прорастающих семенах, и что ее содержание повышается, если пророщенные семена подвергались воздействию стрессовой для растений температуры (37°C). Процесс дискретной фрагментации 18S рРНК, возможно, является регуляторным механизмом, запускаемым в клетках растений в ответ на воздействие стрессовых факторов окружающей среды.

Ключевые слова: малые цитоплазматические РНК, дискретная фрагментация, 18s рРНК, тепловой шок.

It was revealed that in total RNA preparations isolated from wheat germ continuously detects small cytoplasmic RNA (scRNA) of about 55 nucleotides corresponding to the 5'-terminal fragment of 5.3S RNA, which in turn, is a fragment of 18S rRNA. This cytoplasmic RNA was detected in plant cells belonging to different taxa, as well as in rat liver cells, so that the investigated process of discrete 18S rRNA fragmentation should be sufficiently universal phenomenon. It was established that the content of investigated 18S rRNA fragment is much lower in young plant shoots rather than in dry and germinating seeds, and that its content increases if germinated seeds were exposed to heat shock (37° C). The process of discrete fragmentation of 18S rRNA probably could be the regulatory mechanism started in response to environmental stress.

Key words: small cytoplasmic RNAs, discrete fragmentation, 18s rRNA, heat shock.

Бидай ұрықтарынан алынған РНК жалпы препараттарында мөлшері 55 нуклеотид болатын жаңа кіші цитоплазмалық (кц) РНК табылды. Ол 5,3S РНК 5'-ұшына сәйкес келеді де өз кезегінде 18S рРНК бөлшектенгенінің өнімі болады. Бұл цитоплазмалық РНК әртүрлі таксондарға жататын өсімдіктер жасушаларында да табылды, сондай-ақ егеуқұйрық бауырының жасушаларында да табылды. Сондықтан 18S рРНК бөлшектенуі тегі кең таралған құбылыс болады. Зерттелген (кц) РНК мөлшері өсімдіктердің жас өскіндерінде, құрғақ және өсіп келе жатқан тұқымдарға қарағанда, анағұрлым аз және оның мөлшері көбейеді, егер өсіп келе жатқан тұқымдарға өсімдіктер үшін жағымсыз температурамен (37°C) әсер етсе. 18S рРНК дискретті бөлшектенуі қоршаған ортаның жағымсыз әсерлеріне жауап ретінде өсімдіктер жасушаларында пайда болатын реттегіш тетік болуы мүмкін.

Түйін сөздер: кіші цитоплазмалық РНК, бөлшектену, 18S рРНК, ыстық шок.

**ОБНАРУЖЕНИЕ
В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ
НОВОЙ
ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ
РНК,
СООТВЕТСТВУЮЩЕЙ
5'-КОНЦЕВОМУ
ФРАГМЕНТУ 5,3S РНК**

Введение

В клетках эукариот, помимо мРНК, тРНК и рРНК, содержатся и другие классы РНК: малые ядерные РНК (мяРНК), малые цитоплазматические РНК (мцРНК), микроРНК (мкРНК) и короткие интерферирующие РНК (киРНК). В клетках эукариот некодирующие РНК значительно превосходят по видовому разнообразию кодирующие мРНК [1]. Физиологическая роль большинства из них остается неизвестной. Некоторые мцРНК являются продуктом дискретной фрагментации более длинных предшественников [2].

Ранее в клетках зародышей пшеницы, во фракции нативных 40S рибосомных субчастиц, которые функционально тождественны преинициаторным трансляционным комплексам, нами была впервые обнаружена мцРНК 5,3S РНК длиной около 135 нуклеотидов. Было установлено, что 5,3S РНК, количество которой увеличивается под действием теплового шока, является продуктом дискретной фрагментации молекулы 18S рРНК, находящейся в составе 40S рибосомных субчастиц [3]. В настоящей работе мы проверяли, является ли вновь открытая нами мцРНК продуктом дискретной фрагментации молекулы 18S рРНК растений и имеет ли она отношение к 5,3S рРНК. Целью работы явилось выявление упомянутой мцРНК в различных образцах растительного происхождения и выяснение конкретных условий ее появления.

Материалы и методы

Объектом исследования служили зародыши пшеницы сорта Казахстанская-4, выделенные согласно [4]. Тотальные препараты РНК выделялись, помимо пшеницы, из следующих видов растений: кукурузы, табака, картофеля, томатов, арабидопсиса, тыквы, дурмана, герани, фасоли, а также из печени крысы.

Выделение тотальных препаратов РНК осуществляли с использованием тризола фирмы «Ambion».

Приготовление [³²P]-меченых и DIG-меченых зондов. В работе использовали олигодезоксирибонуклеотиды (олигоДНК) «5'18S-» (5'-ACAAGCATATGACTACTGGCAGGA-

СААССАGGTA-3') и «as-U9» (5'-AGCTTGCT-GAGTCTCTTСТААТCGTACCGGGGTG-3'). Для получения [³²P]-меченых зондов проводили реакцию кинирования олигоДНК в присутствии 0,01 мМ [³²P]АТФ (185 TBq/mmol) с использованием полинуклеотидкиназы фага Т4 фирмы «Fermentas». Для получения DIG-меченых зондов использовали набор DIG Oligonucleotide 3'-End Labelling Kit фирмы «Roche».

Электрофорез РНК проводили в 15%-м или смешанном (4%/7%/20%) полиакриламидном геле в присутствии 8М мочевины [5].

Нозерн-блоттинг. Перенос на нейлоновую мембрану, уравновешенную в 0,1х Трис-боратном буфере, проводили на приборе для полусухого блоттинга фирмы «Bio-Rad» при силе тока 250 мА в течение 30 минут. По окончании процедуры мембрану сушили и обрабатывали УФ-светом в кросслинкере фирмы «UVP». Гибридизацию мембран с зондами проводили в течение ночи в гибридизационном буфере UltraHyb-oligo фирмы «Ambion» при температуре 60°C. После отмывки мембран проводили их радиоавтографию. Гибридизацию с DIG-мечеными пробами и последующую детекцию с использованием хемилюминисцентного агента проводили с использованием набора DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids фирмы «Roche» по методике производителя.

Результаты и их обсуждение

Ранее в клетках зародышей пшеницы нами были идентифицированы две мцРНК: 5,3S РНК длиной около 135-ти нуклеотидов, которая соответствовала 5'-концевому сегменту 18S рРНК (см. рис. 1) [3]. Для детектирования 5,3S РНК в клетках растений в качестве зонда использовался [³²P]-меченый РНК-транскрипт (размером около 145 нт), транскрибируемый с кДНК, соответствующей по последовательности молекуле 5,3S РНК. Использование такого длинного зонда не позволяло выявить более короткие 5'-концевые фрагменты 18S рРНК. В настоящей работе использовался 35-нуклеотидный зонд «5'18S-», комплементарный 5'-концевым остаткам 18S рРНК пшеницы.

Результаты гибридизационного анализа тотальных препаратов РНК, выделенных из различных растительных объектов с использованием [³²P]-меченого зонда «5'18S-», приведены на рисунке 2.

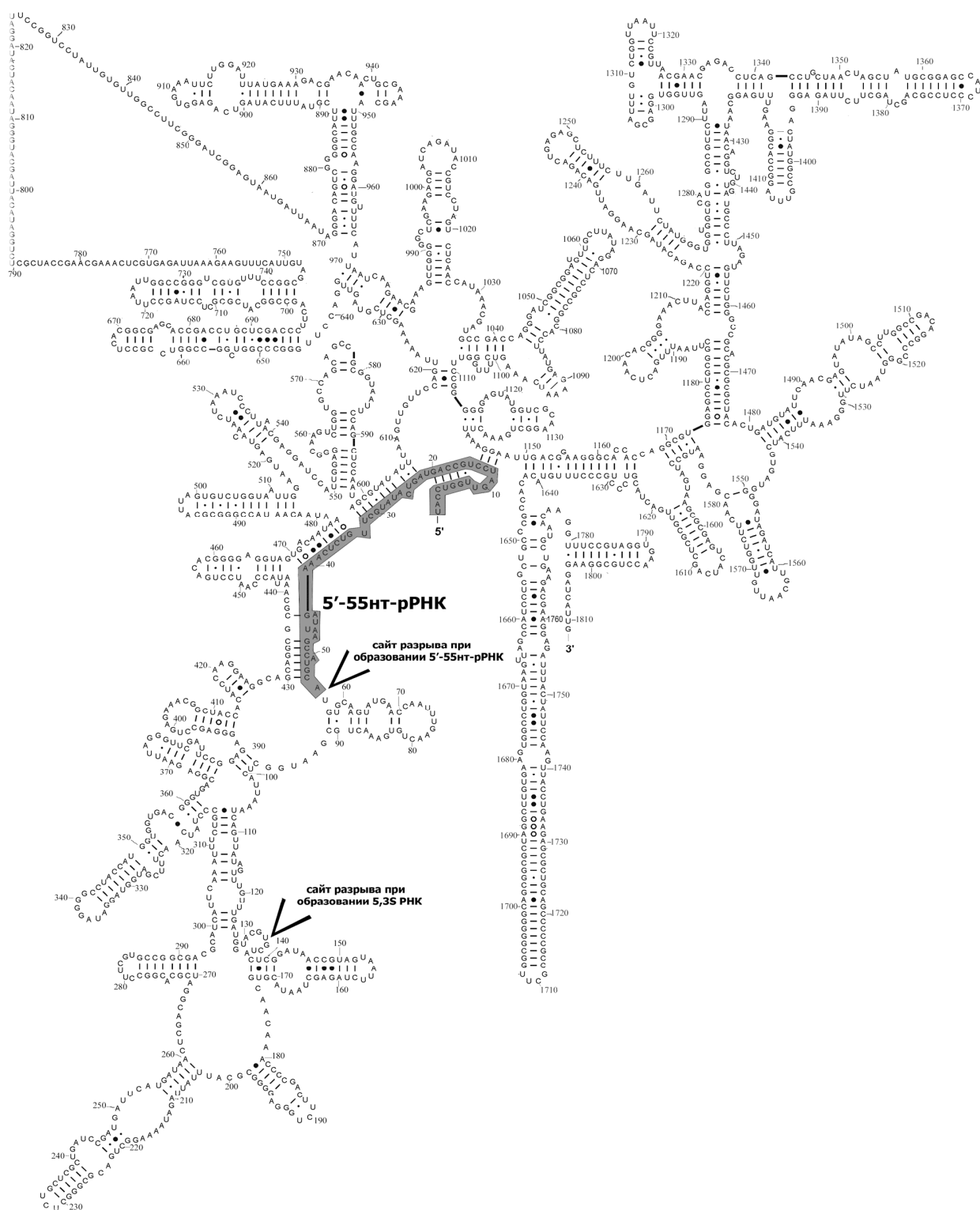
Как видно из данных, представленных на рисунке 2 А, во всех исследуемых образцах обна-

руживается ранее открытая нами 5,3S РНК, соответствующая 134-нуклеотидному 5'-концевому фрагменту 18S рРНК растений. При этом во всех образцах также присутствует более короткий 5'-концевой фрагмент 18S рРНК размером около 55 нуклеотидов, который мы для упрощения назвали «5'-55нт-рРНК». В качестве РНК-маркера использовалась конститутивно экспрессирующаяся в клетках растений 102-нуклеотидная мРНК U6 (мажорная полоса на рисунке 2Б). Из данных, представленных на этом рисунке, также видно, что при воздействии теплового шока (1 час при 37°C) количество «5'-55нт-рРНК» в пророщенных зародышах пшеницы увеличивается приблизительно в два раза (дорожка 2 против дорожки 1 на рис. 2).

Чтобы проверить, влияет ли стадия жизненного цикла растений на содержание в клетках «5'-55нт-рРНК», а также, чтобы проверить, является ли исследуемая дискретная фрагментация 18S рРНК универсальным для растений явлением, мы провели гибридизационный анализ тотальных препаратов РНК, выделенные из сухих (покоящихся), пророщенных зародышей пшеницы и из пятидневных ростков пшеницы, а также препаратов РНК, выделенных из разных видов растений, относящихся к различным таксонам. Результаты эксперимента представлены на рисунке 3. Как видно из данных, представленных на этом рисунке, «5'-55нт-рРНК», не является столь универсальной мцРНК, как 5,3S рРНК. При прорастании семян содержание «5'-55нт-рРНК» в их клетках значительно увеличивается (дорожка 2 против дорожки 1 на рис. 3), при этом в клетках молодых побегов ее содержание снижается вплоть до полного отсутствия (дорожки 4 и 5 на рис. 3). Затем, при старении клеток, содержание данной мцРНК вновь повышается (дорожки 6-9 на рис. 3).

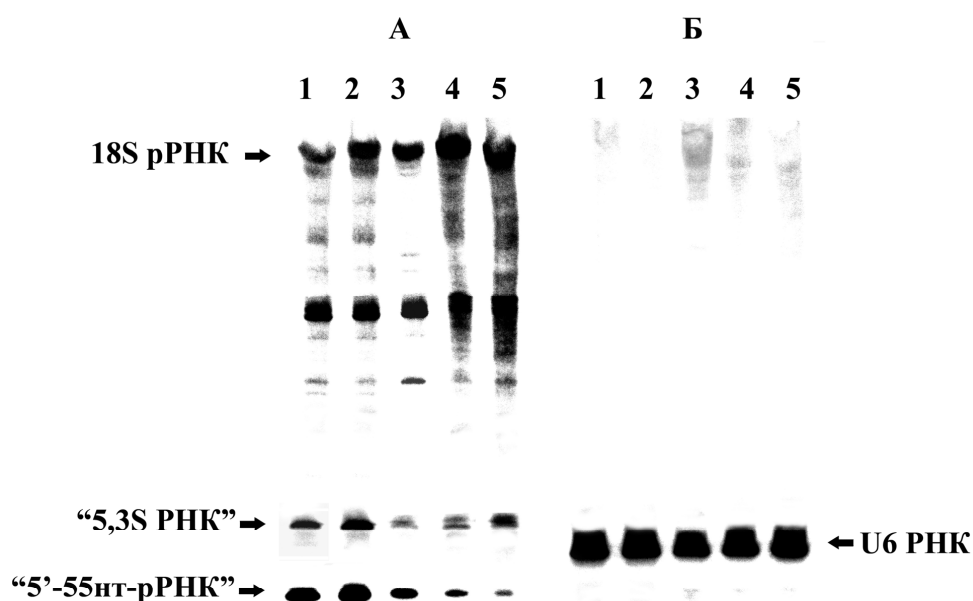
Из данных, представленных на рисунке 2, видно, что «5'-55нт-рРНК» отсутствует в безрибосомном экстракте (дорожка 1 на рис. 3), хотя присутствует в клетках зародышей пшеницы (дорожка 2 на рис. 3). Это говорит о том, что после расщепления молекул 18S рРНК, находящихся в составе 40S рибосомных субчастиц, «5'-55нт-рРНК» остается в составе рибосомных субчастиц.

Судя по данным криоэлектронной микроскопии рибосом растений, а также по данным кроссликинга, участок 50-60 18S рРНК, где предположительно происходит разрыв при отщеплении фрагмента «5'-55нт-рРНК», не экранирован какими-либо рибосомными белками [6].



За основу взята структура X00755 на сайте <http://www.rna.icmb.utexas.edu>;
серым цветом обозначен участок 18S рРНК, соответствующий «5'-55нт-рРНК»

Рисунок 1 – Модель вторичной структуры 18S рРНК пшеницы

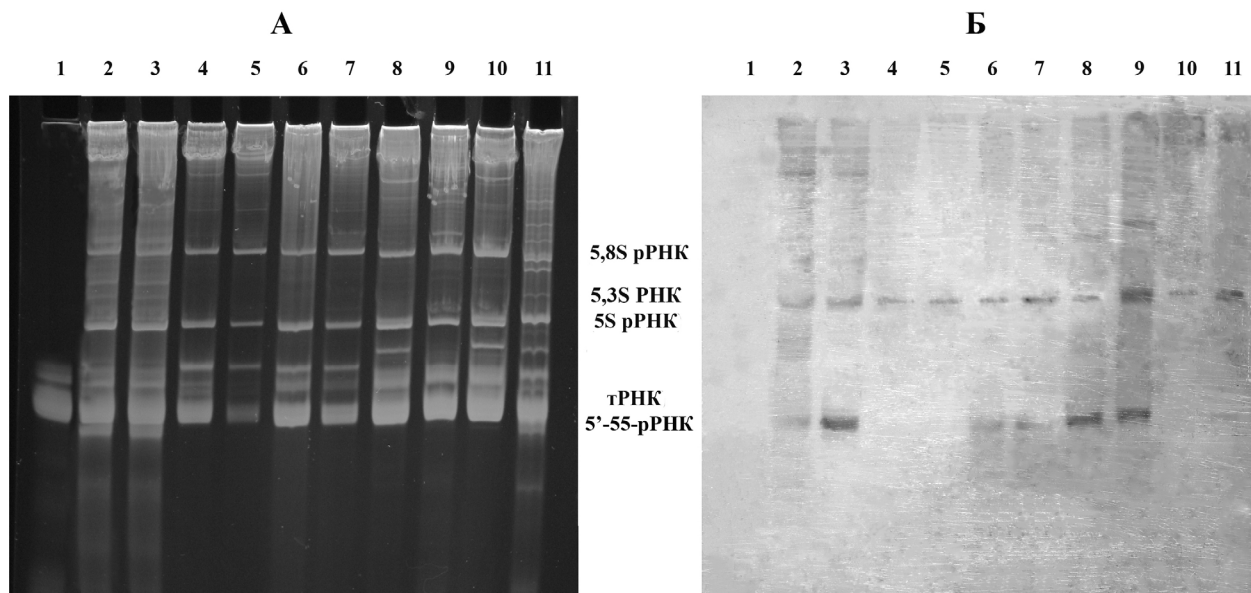


А – гибридизация с [³²P]-меченым зондом «5'18S-»; Б – гибридизация с [³²P]-меченым зондом «as-U6».

На дорожках проанализированы тотальные препараты РНК из следующих объектов:

- 1 – пророщенных зародышей пшеницы без воздействия теплового шока;
- 2 – из пророщенных зародышей пшеницы после их инкубации при 37°C в течение 1 часа;
- 3 – из ростков *Arabidopsis thaliana*; 4 – из ростков *Nicotiana benthamiana*; 5 – из ростков томатов.

Рисунок 2 – Исследование явления скрытой дискретной фрагментации молекулы 18S рРНК растений с ее 5'-конца



А – 15% ПАА-гель, окрашенный бромистым этидием; Б – радиоавтограмма проявленной мембраны.

На дорожках проанализированы препараты РНК, выделенные из следующих объектов:

- 1 – из безрибосомного экстракта из зародышей пшеницы; 2 – из сухих зародышей пшеницы; 3 – из пророщенных зародышей пшеницы; 4 – из проростков пшеницы; 5 – из проростков кукурузы; 6 – из листьев дурмана; 7 – из листьев герани; 8 – из листьев тыквы; 9 – из побегов картофеля; 10 – из побегов фасоли; 11 – из клеток печени крысы.

Рисунок 3 – Гибридизационный анализ тотальных препаратов РНК из различных растительных объектов с использованием DIG-меченого зонда «5'18S-»

В то же время, несмотря на аналогичный способ выделения тотальных препаратов РНК, содержание «5'-55нт-РНК» значительно различалось, в зависимости от стадии вегетации растений, объекта исследования и от того, подвергались ли объекты исследования тепловому шоку или нет. По этой причине процесс дискретной фрагментации молекулы 18S рРНК с образованием «5'-55нт-рРНК» нельзя считать артефактом выделения РНК из растительных объектов. Таким образом, механизмы, лежащие в основе выявленного типа дискретной фрагментации молекулы 18S рРНК растений, остаются неизвестными. Дискретная фрагментация 18S рРНК, возможно, является регуляторным механизмом, запускаемым в клетках растений в ответ

на воздействие стрессовых факторов окружающей среды.

Таким образом, механизмы, лежащие в основе выявленного типа дискретной фрагментации молекулы 18S рРНК растений, остаются неизвестными.

Благодарности. Авторы статьи выражают благодарность профессору Томасу Хону (Thomas Hohn) за сотрудничество в выполнении настоящей работы.

Работа выполнена в рамках грантового проекта 1877/ГФЗ «Изучение молекулярных механизмов взаимодействия мРНК и аппарата трансляции растений для совершенствования технологии синтеза рекомбинантных белков».

Литература

- 1 Baserga S.J. The Diverse World of Small Ribonucleoproteins // Cold Spring Harbor Lab. Press. – 2009. – P. 563. DOI: 10.1101/087969380.24.359.
- 2 Wilusz J.E., Freier S.M., Spector D.L. 3' end processing of a long nuclear-retained non-coding RNA yields a tRNA-like cytoplasmic RNA // Cell. – 2008. – Vol. 135, No. 5. – P. 919–932.
- 3 Zhanybekova S.Sh., Polimbetova N.S., Nakisbekov N.O., Iskakov, B.K. Detection in wheat germ ribosomes of a novel small RNA inducible by heat shock // Biochemistry (Moscow). – 1996. – Vol. 61, No. 5. – P. 621-627.
- 4 Johnston F.B., Stern H. Mass isolation of viable wheat embryo // Nature. – 1957. – Vol. 179. – P. 160-161.
- 5 Martínez-Salas E., et al. Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements // J.G. Virology. – 2001. – Vol. 82. – P. 973-84.
- 6 Manuell A.L., Yamaguchi K., Mayfield S.P. Composition and structure of the 80S ribosome from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: 80S ribosomes are conserved in plants and animals // J. Mol. Biol. – 2005. – Vol. 351. – P. 266-279.