

А.В. Жигайлов<sup>1\*</sup>, Р.Ж. Акбергенов<sup>2</sup>

Н.С. Полимбетова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина», Казахстан, г. Алматы

<sup>2</sup>Институт медицинской микробиологии, Швейцария, г. Цюрих

\*e-mail: andrzhig@gmail.com

## ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ В РЕГУЛЯЦИИ ДИСКРЕТНОЙ ФРАГМЕНТАЦИИ 18S РРНК РАСТЕНИЙ

В стрессовых условиях клетки должны быстро сокращать уровень общей трансляции мРНК, поддерживая при этом синтез некоторых специальных белков, которые помогают сопротивляться стрессу. У животных и дрожжей торможение скорости синтеза белка в основном связано с модификацией активности факторов инициации и элонгации трансляции. В клетках растений многие из этих регуляторных механизмов не реализуются. Мы предполагаем, что у растений функционирует альтернативный механизм подавления трансляции мРНК, связанный с сайт-специфической фрагментацией молекул 18S рРНК в составе 40S рибосомных субчастиц. Понимание молекулярных механизмов ответа растений на стрессовые воздействия является основой для повышения эффективности селекционного процесса с целью получения устойчивых к стрессам сортов экономически важных видов растений. Нами было обнаружено, что во время теплового шока в клетках различных видов растений накапливаются дискретные молекулы РНК, представляющие собой 5'-концевые фрагменты 18S рРНК, остающиеся связанными в составе рибосомных субчастиц. В настоящей работе методом гибридизации нуклеиновых кислот проведено исследование РНК-интерференции как возможного механизма, опосредующего явление дискретной фрагментации 18S рРНК растений в ответ на тепловой шок. Молекулы микроРНК, комплементарные целевым участкам 18S рРНК, по которым осуществлялись ее разрывы с образованием стресс-индуцированных 5'-концевых РНК-фрагментов, обнаружены не были. Выявленные в ходе работы малые 5'-концевые фрагменты 18S рРНК предлагаются использовать как новый тип биомаркеров стресса в клетках растений. Отработанная методика гибридизации нуклеиновых кислот с использованием DIG-меченого зонда, комплементарного высоко консервативному 5'-концевому участку 1-35 18S рРНК растений может быть использована для эффективного детектирования этих РНК-маркеров стресса.

**Ключевые слова:** дискретная фрагментация 18S рРНК, тепловой шок, цитоплазматические РНК, трансляция мРНК, 40S рибосомные субчастицы.

A.V. Zhigailov<sup>1\*</sup>, R.Zh. Akbergenov<sup>2</sup>, N. S. Polimbetova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>RSE "M.A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry", Kazakhstan, Almaty

<sup>2</sup>Institute for Medical Microbiology, Switzerland, Zurich

\*e-mail: andrzhig@gmail.com

### Study of the role of RNA-interference in the regulation of discrete fragmentation of 18S rRNA in plants

Under stressful conditions, cells must rapidly reduce the level of total mRNA translation, while maintaining the synthesis of some special proteins that help resist stress. In animals and yeast, the inhibition of protein synthesis is mainly associated with the modification of the translation initiation and elongation factors. In plant cells, many of these regulatory mechanisms are not realized. We hypothesize that plants have an alternative mechanism for suppressing mRNA translation associated with site-specific fragmentation of 18S rRNA molecules within 40S ribosomal subunits. Understanding the molecular mechanisms of plant response to stress is the basis for increasing the efficiency of the breeding process in order to develop stress-resistant varieties of economically important plant species. We found that during a heat shock, discrete RNA molecules accumulate in the cells of various plant species, which are 5'-terminal fragments of 18S rRNA that remain bound in the composition of ribosomal subunits. In this work, the method of nucleic acid hybridization was used to study RNA-interference as a possible mechanism mediating the phenomenon of discrete fragmentation of 18S rRNA in plants in response to heat shock.

MicroRNA molecules complementary to the target regions of 18S rRNA, through which its rupture was carried out with the formation of stress-induced 5'-terminal RNA fragments, were not found. The small 5'-terminal fragments of 18S rRNA revealed during the work are proposed to be used as a new type of stress biomarkers in plant cells. The optimized nucleic acid hybridization technique using a DIG-labeled probe complementary to the highly conserved 1-35 5'-end region of plant 18S rRNA can be used to efficiently detect these stress RNA markers.

**Key words:** discrete fragmentation of 18S rRNA, heat shock, cytoplasmic RNA, translation of mRNA, 40S ribosomal subunits.

А.В. Жигайлов<sup>1\*</sup>, Р.Ж. Акбергенов<sup>2</sup>, Н.С. Полимбетова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>РМК «М.А. Айтхожин атындағы Молекулалық биология мен биохимия ғылыми-зерттеу институты», Қазақстан, Алматы қ.

<sup>2</sup>Медициналық микробиология институты, Швейцария, Цюрих қ.

\*e-mail: andrzhig@gmail.com

### Өсімдіктердегі 18S рРНҚ-ның дискретті фрагментациясын реттеудегі РНҚ-интерференциясының рөлін зерттеу

Стрессік жағдайларда жасушалар стресске қарсы тұруға көмектесетін кейбір арнайы белоктардың синтезін сақтай отырып, жалпы мРНҚ трансляциясының деңгейін тез төмендетуі керек. Жануарлар мен ашытқыларда белок синтезінің жылдамдығының тежелуі негізінен трансляцияны бастау және ұзарту факторларының белсенділігінің модификациясымен байланысты. Өсімдік жасушаларында бұл реттеу механизмдерінің көпшілігі жүзеге асырылмайды. Біз өсімдіктерде 40S рибосомалық суббөлшектердің ішінде 18S рРНҚ молекулаларының сайтқа дискретті фрагментациясымен байланысты мРНҚ трансляциясын басу үшін балама механизмі бар деп болжаймыз. Өсімдіктердің стресске реакциясының молекулярлық механизмдерін түсіну шаруашылық маңызы бар өсімдік түрлерінің күйзеліске төзімді сорттарын алу мақсатында селекциялық процестің тиімділігін арттырудың негізі болып табылады. Жылу соққысы кезінде әртүрлі өсімдік түрлерінің жасушаларында дискретті РНҚ молекулалары жинақталатынын анықтадық, олар рибосомалық суббірліктерде байланысқан 18S рРНҚ-ның 5'-терминалды фрагменттері болып табылады. Бұл жұмыста РНҚ-интерференциясын зерттеу үшін нуклеин қышқылының гибридизациясы әдісі өсімдіктердегі жылу соққысына жауап ретінде 18S рРНҚ-ның дискретті фрагментациясы құбылысының делдалдық мүмкін болатын механизмі ретінде пайдаланылды. 18S рРНҚ мақсатты аймақтарына комплементарлы микроРНҚ молекулалары табылмады, олар арқылы оның үзілуі стресс-индукцияланған 5'-терминалды РНҚ фрагменттерінің түзілуімен жүзеге асырылды. Жұмыс барысында анықталған 18S рРНҚ-ның шағын 5'-терминалды фрагменттерін өсімдік жасушаларында стресс биомаркерлерінің жаңа түрі ретінде пайдалану ұсынылады. Өсімдік 18S рРНҚ-ның жоғары сақталған 5'-аймағына 1-35 тізбекте DIG таңбаланған зондты қолданатын жетілген нуклеин қышқылын гибридтеу әдісі осы стресс РНҚ маркерлерін тиімді анықтау үшін пайдаланылуы мүмкін.

**Түйін сөздер:** 18S рРНҚ-ның дискретті фрагментациясы, жылу соққысы, цитоплазмалық РНҚ, мРНҚ трансляциясы, 40S рибосомалық суббірліктер.

### Сокращения и обозначения

ПАА-гель – полиакриламидный гель; Трис-Трис(гидроксиметил)аминометан; eEF2 – эукариотический фактор элонгации трансляции 2; eIF2 – эукариотический фактор инициации трансляции 2; RIPs – белки, инактивирующие рибосомы; 4E-BPs – белки, связывающие эукариотический фактор инициации трансляции 4E.

### 1. Введение

Биосинтез белка – достаточно энергозатратный процесс, и в стрессовых условиях процесс трансляции большинства клеточных мРНҚ ингибируется чтобы сэкономить ресурсы и обе-

спечить преимущественный синтез стрессовых белков. Было описано несколько молекулярных механизмов ингибирования синтеза белка, реализующихся в клетках млекопитающих и дрожжей.

Один из таких механизмов заключается в фосфорилировании эукариотического фактора элонгации трансляции 2 (eEF2), которое приводит к его неспособности связывания с рибосомами. Инактивация eEF2 ведет к тотальному подавлению биосинтеза белка в клетках животных и дрожжей. Фосфорилирование eEF2 осуществляется высокоспецифичной протеинкиназой eEF2 (eEF2K), активирующейся в условиях резкого снижения концентрации АТФ в цитозоле клеток [1]. Но у растений не обнаруживается эндоген-

ной активности eEF2K ни в обычных условиях [2], ни при стрессах [3].

Второй известный механизм подавления уровня трансляции мРНК запускается в условиях аминокислотного голодания и опосредуется eIF4E-связывающими белками (4E-BPs), которые предотвращают связывание eIF4E с m7G-кэп-структурой мРНК, а значит, и формирование 48S-преинициаторного комплекса [4]. Но таких ингибиторных белков не было найдено в клетках растений [5]; в растительных геномах даже не было найдено ортологов генов 4E-BPs [6].

Еще один важный механизм подавления биосинтеза белка эукариот заключается в фосфорилировании  $\alpha$ -субъединицы фактора eIF2 специфическими протеин-киназами, что в клетках млекопитающих и дрожжей приводит к блокированию GTP-обменного белка eIF2B и резкому ингибированию стадии инициации трансляции мРНК [7]. Однако, рециркуляция тройственного комплекса в клетках растений может осуществляться без участия eIF2B [8], а фосфорилирование eIF2 $\alpha$  в растительных системах *in vitro* не приводит к сильному ингибированию синтеза белка [9]. Кроме того, из четырех протеинкиназ (PKR, HCR, PERK, GCN2), фосфорилирующих  $\alpha$ -субъединицу eIF2 в клетках млекопитающих, у растений обнаружены активность и ген только одной рGCN2-киназы, а само фосфорилирование у eIF2 $\alpha$  растений не является универсальным ответом на все виды стрессов [10].

Таким образом, в клетках растений хорошо описанные для млекопитающих и дрожжей механизмы подавления биосинтеза белка за счет модификации трансляционных факторов либо используются в ограниченных пределах, либо не реализуются вовсе. Мы считаем, что у растений может функционировать другой механизм торможения синтеза белка, запускающийся при некоторых абиотических и биотических стрессах, и что он связан с расщеплением молекулы 18S рРНК в составе 40S рибосомных субчастиц по определенным сайтам.

Ранее нами на нескольких растительных объектах был описан процесс расщепления молекулы 18S рРНК, приводящий к образованию 5'-концевых фрагментов размером 132-134 нуклеотидов [11] и 54-57 нуклеотидов [12], а также 3'-концевого фрагмента размером около 100 нуклеотидов [13]. Наши данные вполне сочетаются с данными полно-транскриптомного анализа, показавшем, что разрывы в 28S-, 18S-, и

5,8S- рРНК происходят не рандомизированно, а дискретно, то есть, каких-то фрагментов рибосомных РНК в клетке выявляется значительно больше, чем других фрагментов [14].

Процесс разрезания РНК широко используются клетками во время процессинга рибосомных РНК из их предшественника в ходе биогенеза рибосом [15]. Кроме того, у про- и эукариотических организмов реализуется механизм подавления биосинтеза белка за счет расщепления молекулы 28S рРНК из большой (60S) рибосомной субчастицы по альфа-сарциновой петле с отщеплением 3'-концевого РНК-фрагмента Эндо ("Endo fragment") [16]. Таким образом действуют токсины растений (рицин, абрин и модецин), грибов ( $\alpha$ -сарцин) и бактерий (Шига-токсин) [17]. Возможно, аналогичные эндонуклеазы и опосредующие апуринизацию гликозилазы (как в случае белков, инактивирующих рибосомы, RIPs), но нацеленные не на 28S рРНК, а на 18S рРНК в составе малых (40S) рибосомных субчастиц, активируются в клетках растений во время стресса и таким образом приводят к временному или стойкому подавлению трансляции мРНК.

Одним из возможных механизмов дискретной фрагментации рРНК в клетках эукариот в ответ на стрессы является процесс РНК-интерференции: либо за счёт выщепления из шпилечных структур рРНК микроРНК, либо с вовлечением экзогенных микроРНК. Так, недавно было показано, что рибосомные РНК в клетках животных могут выступать в качестве предшественников неканонических микроРНК [18, 19], которые выщепляются из состава 28S рРНК, 18S рРНК и 5,8S рРНК, а также из спейсерных рибосомных участков ITS1 и ITS2 при своем созревании. Важно, что выщепление таких микроРНК в клетках животных наблюдается в основном в стрессовых условиях, а в отсутствии стресса оставшиеся от выщепления малые фрагменты рибосомных РНК достаточно быстро элиминируются клеточными экзонуклеазами [19]. Аналогичные механизмы разрезания молекул 18S рРНК могут осуществляться и в клетках растений. В настоящей работе исследуется возможный механизм сайт-направленного расщепления 18S рРНК растений с участием гипотетических микроРНК, нацеленных на участки, по которым происходят разрывы этой молекулы в ответ на стрессовые воздействия среды.

## 2. Материалы и методы исследования

### 2.1. Гипотеза

Во время теплового шока в клетках растений синтезируются микроРНК, комплементарные участкам 41-75 и 116-150 18S рРНК.

### 2.2. Материалы

В работе использовались реагенты фирм “Sigma”, “Roche”, “Thermo Fisher Sci.”, “Amersham”, “Ambion” и “Bio-Rad”. Олигодезоксирибонуклеотиды (олигоДНК) «5’18S» (5’-acaagcatatgactactggcaggatcaaccaggta), «si-5’-75nt» (5’-agattaagccatgcatgtgcaagtatgaaccaatt), «si-5’-135nt» (5’-gtttgtttgatgtgacgtgctactcggataaccgt) и «miR173» (5’-tttcgcttacacagagaatca) были синтезированы *de novo* в компании “Sigma”. Для радиоактивного мечения олигоДНК использовали [ $\gamma$ - $^{32}$ P]АТФ (185 ТБк/ммоль) фирмы “Perkin Elmer”. В качестве объектов исследования использовали зародыши и ростки пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Казахстанская 10, побеги *Arabidopsis thaliana* экотипа Columbia, побеги *Nicotiana benthamiana* и *Solanum lycopersicum*, выращенные в световой комнате.

### 2.3. Методы исследования

*Выравнивание нуклеотидных последовательностей 18S рРНК*, взятых из базы данных NCBI, проводили в программе MEGA-X.

*DIG-мечение олигомера «5’18S»*, комплементарного участку 1-35 18S рРНК *T. aestivum* L. (PDB: 3J5Z\_d) осуществлялось с использованием DIG Oligonucleotide 3’-End Labeling Kit (Roche) по методике производителя.

*Для получения радиоактивно меченых зондов* использовали олигоДНК: «si-5’-75nt», «si-5’-135nt» и «miR173». Эти олигоДНК были фосфорилированы по 5’-концу Т4-полинуклеотидкиназой (Thermo Fisher Sci.) в присутствии [ $\gamma$ - $^{32}$ P]АТФ по методике производителя.

*Для имитации теплового шока* четырехдневные проростки пшеницы, пророщенные при 26°C, были помещены на 8 часов при температуре 37°C. Контрольные проростки в течение этих же восьми часов росли при 26°C.

*Тотальные препараты РНК* выделяли из 0,1 г сырой массы листовых дисков с использованием Tri-реагента (Sigma) по методике производителя.

*Электрофорез РНК* проводили в 8% полиакриламидном (ПАА) геле в присутствии 8М мочевины. Гели окрашивали в растворе, содержащем 0,2 мг/мл бромистого этидия

(Sigma) и анализировали в проходящем УФ-свете.

*Нозерн-блоттинг.* В случае использования DIG-меченой пробы, перенос на нейлоновую мембрану, уравновешенную в 0,1х Трис-боратном буфере, проводили на приборе для полусухого блоттинга (Sci-Plas) при силе тока 250 мА в течение 30 мин. После переноса мембрану сушили и обрабатывали в течение 2 мин УФ-светом 10 мДж/см<sup>2</sup> в кросслинкере (UVP). Гибридизацию с DIG-мечеными пробами и последующую детекцию полос с использованием хемиллюминисцентного агента проводили с использованием набора DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids (Roche) по методике производителя. Температура гибридизации составляла 50°C. Для детекции связавшихся DIG-меченых зондов использовали конъюгаты антител Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments (Roche). Проявку блотов осуществляли с использованием коммерческого субстрата для щелочной фосфатазы CSPD (Roche). В случае использования [ $^{32}$ P]-меченых зондов, РНК переносили на мембраны Hybond-N+ (Amersham) методом влажного электроблоттинга при 10 В в 0,1х Трис-боратном буфере в течение ночи. Гибридизацию в этом случае проводили при 35°C при использовании гибридизационного буфера UltraHyb-oligo hybridization buffer (Ambion) в течение ночи. Отмывку мембран осуществляли в 6 X SSC, 0,1% (в/о) SDS, при 35°C по 30 мин. Авторадиографию отмытых мембран проводили на фосфоримиджере (Bio-Rad).

## 3. Результаты исследования и их обсуждение

Для исследования процесса фрагментации рРНК малой рибосомной субчастицы в норме и при тепловом шоке был необходим зонд, комплементарный достаточно консервативному участку 18S рРНК растений, чтобы его можно было использовать на различных растительных объектах. Для проверки степени консервативности 5’-концевого участка 18S рРНК растений было проведено выравнивание в программе MEGA-X нуклеотидных последовательностей 18S рРНК видов растений, относящихся к различным таксономическим группам. Результаты анализа представлены на рисунке 1. Как видно из данных, представленных на этом рисунке, лишь в позициях «1» и «4» наблюдаются полиморфизмы, остальные позиции нуклеотидов являются высоко консервативными у растений.

Таким образом, исходя из консенсусной последовательности, полученной в ходе проведенного компьютерного анализа, был синтезирован

35-нуклеотидный олигонуклеотид «5'18S», комплементарный 5'-концевому участку 18S рРНК растений.

	TACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCAATATGCTTGT	Семейство	Группа растений
1. <i>Rhodomonas mariana</i> _X01374	U A C C U G G U U G A U C C U C C A G U A G U C A U A U G C U U U U	Pyrenomonadaceae	Красные водоросли
2. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> _M32703	U A C C U G G U U G A U C C U C C A G U A G U C A U A U G C U U U U	Chlamydomonadales	Зеленые водоросли
3. <i>Brachythecium ruabulum</i> _X04256	A A C C U G G U U G A U C C U C C A G U A G U C A U A U G C U U U U	Brachytheciales	Мхи
4. <i>Zamia pumila</i> _M20017	U A C C U G G U U G A U C C U C C A G U A G U C A U A U G C U U U U	Zamiaceae	Голососеменные
5. <i>Gnetum leyboldii</i> _L24045	U A C C U G G U U G A U C C U C C A G U A G U C A U A U G C U U U U	Gnetaceae	
6. <i>Ananas comosus</i> _D29786	U A C C U G G U U G A U C C U C C A G U A G U C A U A U G C U U U U	Bromeliaceae	Покрытосеменные однодольные
7. <i>Lilium formosanum</i> _D29775	U A C C U G G U U G A U C C U C C A G U A G U C A U A U G C U U U U	Liliaceae	
8. <i>Triticum aestivum</i> _AJ272181	U A C C U G G U U G A U C C U C C A G U A G U C A U A U G C U U U U	Poaceae	Покрытосеменные однодольные
9. <i>Curcuma aromatica</i> _AB047708	U A C C U G G U U G A U C C U C C A G U A G U C A U A U G C U U U U	Zingiberaceae	
10. <i>Ribium palmatum</i> _AB115750	A A C C U G G U U G A U C C U C C A G U A G U C A U A U G C U U U U	Polygonaceae	Покрытосеменные двудольные
11. <i>Platanus gineg</i> _D63275	A A C C U G G U U G A U C C U C C A G U A G U C A U A U G C U U U U	Araliaceae	
12. <i>Luffa quinquefolia</i> _AF008957	U A C U G G U U G A U C C U C C A G U A G U C A U A U G C U U U U	Cucurbitaceae	Покрытосеменные двудольные
13. <i>Limonium arboreum</i> _AF206953	U A C U G G U U G A U C C U C C A G U A G U C A U A U G C U U U U	Plumbaginaceae	
14. <i>Rafflesia keithii</i> _L24041	U A C U G G U U G A U C C U C C A G U A G U C A U A U G C U U U U	Rafflesiaceae	Покрытосеменные двудольные
15. <i>Cucumis sativus</i> _AF206894	U A C U G G U U G A U C C U C C A G U A G U C A U A U G C U U U U	Cucurbitaceae	
16. <i>Strawberry</i> _X15590	U A C C U G G U U G A U C C U C C A G U A G U C A U A U G C U U U U	Rosaceae	Покрытосеменные двудольные
17. <i>Paeonia brownii</i> _AF274802	U A C C U G G U U G A U C C U C C A G U A G U C A U A U G C U U U U	Paeoniaceae	
18. <i>Helianthus annuus</i> _KF707534	U A C C U G G U U G A U C C U C C A G U A G U C A U A U G C U U U U	Asteraceae	Покрытосеменные двудольные
19. <i>Populus tremuloides</i> _AF206999	U A C U G G U U G A U C C U C C A G U A G U C A U A U G C U U U U	Salicaceae	
20. <i>Glycine max</i> _X02023	U A C U G G U U G A U C C U C C A G U A G U C A U A U G C U U U U	Fabaceae	Покрытосеменные двудольные
21. <i>Solanum tuberosum</i> _X07238	U A C C U G G U U G A U C C U C C A G U A G U C A U A U G C U U U U	Solanaceae	
22. <i>Arabidopsis thaliana</i> _AC006837	U A C C U G G U U G A U C C U C C A G U A G U C A U A U G C U U U U	Brassicaceae	Покрытосеменные двудольные
23. <i>Begonia bosniaca</i> _AF308948	U A C U G G U U G A U C C U C C A G U A G U C A U A U G C U U U U	Begoniaceae	
24. <i>Abelia triflora</i> _AJ290004	U A C C U G G U U G A U C C U C C A G U A G U C A U A U G C U U U U	Caprifoliaceae	

Сверху представлена консенсусная нуклеотидная последовательность, соответствующая олигонуклеотиду «5'18S».

В колонке слева представлены виды растений с указанием номеров GenBank.

Рисунок 1 – Выравнивание нуклеотидных последовательностей 18S рРНК растений в программе MEGA-X для разработки зонда с целью детекции ее 5'-концевых фрагментов

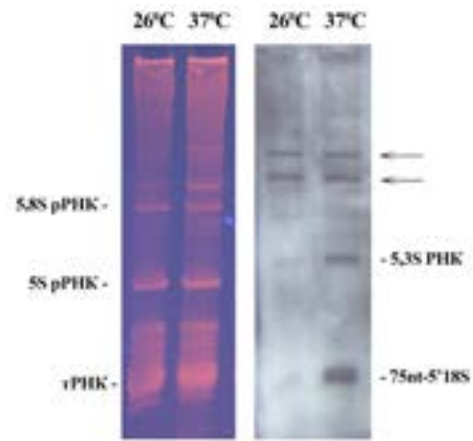
Для оценки степени дискретной фрагментации 18S рРНК в ростках пшеницы в норме и при тепловом шоке был проведен нозерн-блот анализ с использованием зонда «5'18S-DIG» после электрофоретического разделения в ПАА-геле тотальных препаратов РНК, выделенных из ростков пшеницы, подвергшихся и не подвергшихся тепловому шоку. Результаты анализа представлены на рисунке 2. Как видно из данных, представленных на этом рисунке, два малых 5'-концевых фрагмента 18S рРНК (5,3S РНК, размером около 134 нуклеотидов и 75nt-5'18S, размером около 75 нуклеотидов), содержание которых существенно повышалось при повышенной для растений температуре (37°C). Следует отметить, что фосфорилирование eIF2α не наблюдается при тепловом шоке [3, 9], в то время как уровень трансляции большинства мРНК при тепловом шоке сильно снижается [20]. Таким образом, дискретная фрагментация 18S рРНК с образованием двух малых 5'-концевых фрагментов этой молекулы наблюдается во время теплового шока, и нарушение целостности рРНК малых рибосомных

субчастиц, происходящее вследствие такой фрагментации, может являться причиной снижения уровня трансляции мРНК в растительных клетках.

Следует отметить, что на блоте, представленном на рисунке 2, в дополнение к 5,3S РНК и 75nt-5'18S можно видеть еще фрагменты большего размера (более 200 нуклеотидов), содержание которых в клетках ростков пшеницы не повышалось в ответ на тепловой шок (отмечены стрелкой на рисунке 2).

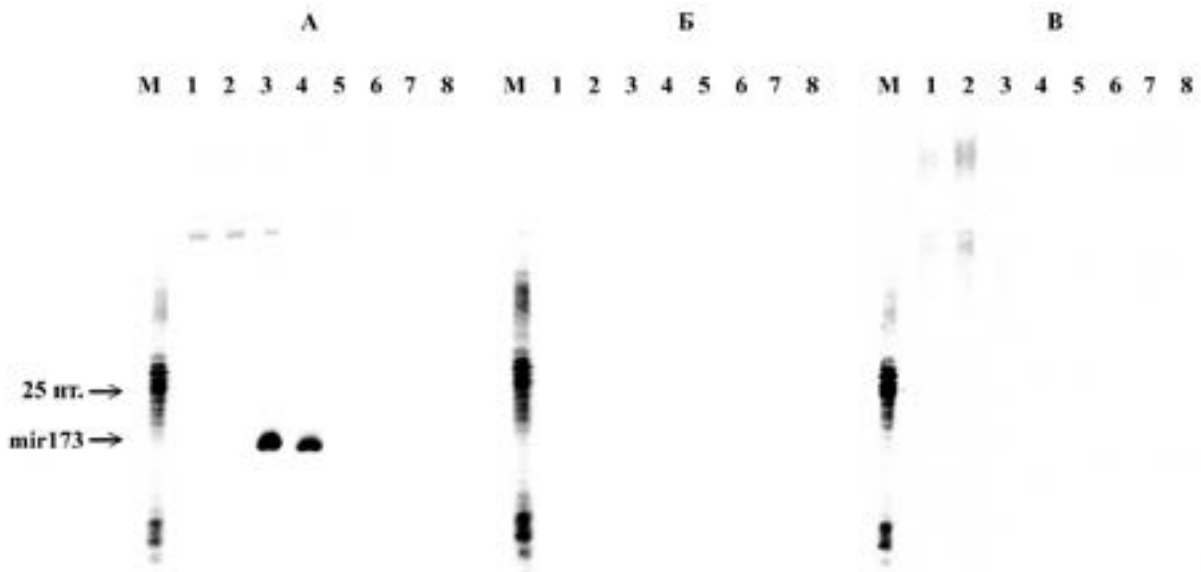
Одним из возможных молекулярных механизмов появления в клетках растений малых фрагментов 18S рРНК могла быть РНК-интерференция (вернее, разрезание рРНК комплексом RISK, ассоциированным со специфическими микроРНК или миРНК). У растений этот механизм расщепления РНК широко вовлечен не только в процесс морфологического развития и созревания, но также и в активацию защитных механизмов во время самых различных стрессов. Чтобы проверить, появляются ли в клетках растений при тепловом шоке специфические гипотетические микроРНК, нацелен-

ные на сайты разрезания молекулы 18S рРНК, которые могли приводить к образованию фрагментов ~ 134 нт. (5,3S РНК) и ~ 55 нт. (75nt-5'18S), были сконструированы соответствующие радиоактивно меченые зонды. ОлигоДНК «si-5'-75nt» соответствовал по нуклеотидной последовательности участку 41-75 18S рРНК *T. aestivum* L., а олигоДНК «si-5'-135nt» – участку 116-150 18S рРНК *T. aestivum* L. В качестве положительного контроля был использован олигоДНК «miR173», комплементарный микроРНК ath-MIR173 *Arabidopsis thaliana* (GenBank: LM608299), которая присутствует на постоянной основе в побегах арабидопсиса. Эти три радиоактивно меченых олигоДНК были использованы в качестве зондов при проведении нозерн-блот анализа тотальных препаратов РНК, выделенных из растений разных видов, подвергшихся и не подвергшихся воздействию теплового шока. Результаты анализа представлены на рисунке 3.



Слева представлен ПАА-гель, справа – блот того же геля. Стрелками указаны фрагменты более 200 нуклеотидов, содержание которых не коррелировало со стрессовыми условиями.

**Рисунок 2** – Нозерн-блот анализ с использованием «5'18S-DIG» зонда для выявления малых 5'-концевых фрагментов 18S рРНК 8-дневных ростков пшеницы, подверженных (37°C) и не подверженных (26°C) тепловому шоку



А – «miR173»; Б – зонд «si-5'-135nt»; В – зонд «si-5'-75nt». М – РНК-маркер. На дорожках 1-8 анализировались тотальные РНК: 1 – из зародышей пшеницы, пророщенных при 26°C; 2 – из зародышей пшеницы, пророщенных при 37°C; 3 – из ростков *Arabidopsis thaliana*, не подверженных воздействию теплового шока; 4 – из ростков *A. thaliana* после 8 ч. инкубации при 37°C; 5 – из ростков *Nicotiana benthamiana*, не подверженных воздействию теплового шока; 6 – из ростков *N. benthamiana* после 8 ч. инкубации при 37°C; 7 – из ростков *Solanum lycopersicum*, не подверженных воздействию теплового шока; 8 – из ростков *S. lycopersicum* после 8 ч. инкубации при 37°C.

**Рисунок 3** – Нозерн-блот анализ с использованием радиоактивно меченых зондов с целью выявления потенциальных микроРНК, способных вызвать разрывы молекулы 18S рРНК растений

Как видно из данных, представленных на этом рисунке, в тотальных препаратах РНК, выделенных из растений разных видов, в том числе, пшеницы, не было выявлено каких-то коротких (19-23 нт) РНК, комплементарных участкам 41-75 и 116-150 18S рРНК растений (рисунки 4Б и 4В), следовательно, должен быть какой-то иной механизм, приводящий к разрывам цепи рРНК малой рибосомной субчастицы в стрессовых условиях и накоплению малых 5'-концевых фрагментов 18S рРНК, 5,3S РНК и 75nt-5'18S. Эти механизмы дискретной фрагментации молекулы 18S рРНК в составе 40S рибосомных субчастиц еще предстоит выявить в дальнейшем. Технически метод выявления микроРНК сработал в эксперименте, поскольку на рисунке 3А в дорожках 3 и 4 была выявлена контрольная микроРНК *A. thaliana* ath-MIR173.

Несмотря на то, что целевые микроРНК к заданным участкам 18S рРНК растений выявить не удалось, полностью исключить роль RISK-комплексов в появлении в растительных клетках малых 5'-концевых фрагментов 5,3S РНК и 75nt-5'18S нельзя. Среди вторичных структур рРНК в составе рибосомных субчастиц достаточно много совершенных и несовершенных шпильчатых структур, которые могут сами по себе служить субстратом для RISK. Согласно данным биоинформатического анализа ридов после полно-РНКового секвенирования на NGS-платформах в пределах последовательностей 18S рРНК растений были предсказаны несколько мишеней для вырезания неканонических микроРНК (PHAS) [21]. Аналогичные участки, являющиеся потенциальными предшественниками неканонических микроРНК, были выявлены в пределах последовательностей 18S рРНК животных [18, 19].

В любом случае, мы считаем, что рибосомные РНК являются не столько предшественниками каких-то регуляторных микроРНК, сколько главной мишенью для регуляторных эффекторов, а разрезание молекул рибосомных РНК, главным образом, молекул 18S рРНК в составе 40S рибосомных субчастиц является основным способом ингибирования трансляции мРНК в клетках растений. В составе 40S рибосомных субчастиц 5'-концевой участок 18S рРНК вовлечен в формирование центрального псевдоузла, целостность которого крайне важна для нормального функционирования рибосомы [22]. Участок же 18S рРНК, по которому происходит предполагаемый разрыв с образованием

5,3S РНК, в составе 40S субчастицы, согласно предсказанной 3D-структуре эукариотических рибосом [22], контактирует с RPS6 – единственным рибосомным белком малой рибосомной субчастицы, подвергаемым регуляторному фосфорилированию [23], выполняющим важную структурообразующую функцию в эукариотических рибосомах [24] и клеточном гомеостазе [25].

Биосинтез белка – один из важнейших анаболических процессов, осуществляющихся в живых клетках, поэтому знание механизмов его регуляции имеет важное фундаментальное значение. В отличие от животных и дрожжей, для которых эти механизмы в целом хорошо описаны, конкретные молекулярные механизмы подавления трансляции мРНК в клетках растений во время тех или иных стрессовых воздействий, остаются мало изученными. При этом, знание таких механизмов может существенно облегчить процесс выведения новых сортов экономически значимых сельскохозяйственных культур, устойчивых к неблагоприятным факторам окружающей среды. По способности быстро реагировать на молекулярном уровне на такие стрессовые воздействия можно проводить отбор перспективных линий тех или иных видов растений. В этом отношении малые 5'-концевые фрагменты 18S рРНК вполне могут быть использованы в качестве биомаркеров стресса нового типа.

### Заключение

При тепловом шоке в клетках растений не наблюдается фосфорилирование каких-либо трансляционных факторов или рибосомных белков, хотя обнаруживается стабильное и сильное подавление общего уровня биосинтеза белка. Нами было показано, что при повышенной температуре в клетках растений происходит накопление дискретных малых 5'-концевых фрагментов 18S рРНК. Эти малые рибосомные РНК, 5,3S-РНК (133-134 нт.) и 75nt-5'18S (54-56 нт.) могут служить РНК-маркерами теплового шока растений.

В ходе работы была разработана методика детектирования этих стрессовых РНК-маркеров методом гибридизации нуклеиновых кислот с использованием DIG-меченого зонда, комплементарного консенсусной 35-и 5'-концевой нуклеотидной последовательности 18S рРНК растений. Показано, что этот участок РНК малой рибосомной субчастицы

высоко консервативен у растений, поэтому зонд «5'18S-DIG» может быть использован для исследования процесса дискретной фрагментации 18S рРНК растений, относящихся к различным таксономическим группам. Разработанная в ходе работы методика на основе гибридизации нуклеиновых кислот с использованием DIG-меченого зонда к 5'-концевому участку 18S рРНК растений позволяет эффективно выявлять 5,3S-РНК и 75nt-5'18S – новые биомаркеры стресса растений.

Исследована роль РНК-интерференции как потенциального механизма дискретной фрагментации молекулы 18S рРНК в составе 40S рибосомных субчастиц с ее 5'-конца. МикроРНК, комплементарных целевым участкам, по которым мог осуществляться разрыв цепи 18S рРНК с образованием 5,3S-РНК и 75nt-5'18S, обнаружено не было. Следовательно, в клетках растений реализуется иной молекулярный механизм, приводящий к образованию этих малых фрагментов рибосомной РНК.

## Благодарности

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

## Конфликт интересов

Все авторы ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

## Источник финансирования

Работа выполнена в рамках программы ИРН OR11465447 «Разработка высокочувствительных молекулярно-биологических, биохимических тестов для детекции патогенов, влияющих на потребительские качества конечного продукта, на основе мониторинга возбудителей заболеваний сельскохозяйственных культур», финансируемой Комитетом науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

## Литература

- 1 Ballard D.J., Peng H.-Y., Das J.K., Kumar A., Wang L., Ren Y., Xiong X., Ren X., Yang J.-M., Song J. Insights into the pathologic roles and regulation of eukaryotic elongation factor-2 kinase // *Front. Mol. Biosci.* – 2021. – Vol.8. – P. 839.
- 2 Smailov S.K., Lee A.V., Iskakov B.K. Study of phosphorylation of translation elongation factor 2 (EF-2) from wheat germ // *FEBS Lett.* – 1993. – Vol. 321. – P. 219–223.
- 3 Gallie D.R., Le H., Caldwell C., Browning K.S. Analysis of translation elongation factors from wheat during development and following heat shock // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – 1998. – Vol.245. – P. 295-300.
- 4 Hernandez G., Altmann M., Lasko P. Origins and evolution of the mechanisms regulating translation initiation in eukaryotes // *Trends Biochem. Sci.* -2010. – Vol.35. – P. 63-73.
- 5 Echevarria-Zomeno S., Yanguiz E., Fernandez-Bautista N., Castro-Sanz A.B., Ferrando A., Castellano M.M. Regulation of translation initiation under biotic and abiotic stresses // *Int. J. Molec. Sci.* – 2013. – Vol.14. – P. 4670-4683.
- 6 Browning K.S., Bailey-Serres J. Mechanism of cytoplasmic mRNA translation // *Arabidopsis Book.* – 2015. – Vol.13. – P. e0176.
- 7 Baird Th.D., Wek R.C. Eukaryotic initiation factor 2 phosphorylation and translational control in metabolism // *Adv. Nutr.* – 2012. – Vol. 3. – P. 307-321.
- 8 Shaikhin S.M., Smailov S.K., Lee A.V., Kozhanov E.V., Iskakov B.K. Interaction of wheat germ translation initiation factor 2 with GDP and GTP // *Biochimie.* – 1992. – Vol. 74. – P. 447–454.
- 9 Zhigailov A.V., Alexandrova A.M., Nizkorodova A.S., Stanbekova G.E., Kryldakov R.V., Karpova O.V., Polimbetova N.S., Halford N.G., Iskakov B.K. Evidence That Phosphorylation of the  $\alpha$ -subunit of eIF2 does not essentially inhibit mRNA translation in wheat germ cell-free system // *Front. Plant Sci.* – 2020. – Vol. 11. – P. 936.
- 10 Immanuel T.M., Greenwood D.R., MacDiarmid R.M. A critical review of translation initiation factor eIF2 $\alpha$  kinases in plants – regulating protein synthesis during stress // *Funct. Plant Biol.* – 2012. – Vol. 39. – P. 717–735.
- 11 Zhanybekova S.S., Polimbetova N.S., Nakisbekov N.O., Iskakov B.K. Detection of a new small RNA, induced by heat shock, in wheat seed ribosomes // *Biochemistry (Moscow).* – 1996. – Vol. 61. – P. 862-870.
- 12 Жигайлов А.В., Полимбетова Н.С., Дошанов Х.И., Искаков Б.К. Обнаружение в клетках растений новой 55-нуклеотидной цитоплазматической РНК, соответствующей 5'-концевому фрагменту 18S РНК // *Вестник КазНУ, Серия биологическая и медицинская.* – 2014. – №1. – С. 191-194.
- 13 Жигайлов А.В., Полимбетова Н.С., Боранкул Р.И., Искаков Б.К. Исследование дискретной фрагментации 18S рРНК в составе 40S рибосомных субчастиц клеток растений // *Вестник Казну. Серия биологическая.* – 2013. – №2. – С. 81-87.
- 14 Chen Z., Sun Y., Yang X., Wu Z., Guo K., Niu X., Wang Q., Ruan J., Bu W., Gao S. Two featured series of rRNA-derived RNA fragments (rRFs) constitute a novel class of small RNAs // *PLoS ONE.* – 2017. – Vol. 12. – P. e0176458.



- 15 Henras A.K., Plisson-Chastang C., O'Donohue M.F., Chakraborty A., Gleizes P.E. An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes // *Wiley Interdiscip Rev. RNA*. – 2015. – Vol. 6. – P. 225–242.
- 16 Endo Y. Mechanism of action of ricin and related toxins on the inactivation of eukaryotic ribosomes // *Cancer Res. Treat.* – 1988. – Vol.37. – P. 75–89.
- 17 Kast A., Klassen R., Meinhardt F. rRNA fragmentation induced by a yeast killer toxin // *Mol. Microbiol.* – 2014. – Vol. 91, No.3. – P. 606-617.
- 18 Castellano L., Stebbing J. Deep sequencing of small RNAs identifies canonical and non-canonical miRNA and endogenous siRNAs in mammalian somatic tissues // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – Vol. 41. – P. 3339–3351.
- 19 Locati M.D., Pagano J.F.B., Abdullah F., Ensink W.A., van Olst M., van Leeuwen S., Nehrlich U., Spaink H.P., Rauwerda H., Jonker M.J., Dekker R.J., Breit T.M. Identifying small RNAs derived from maternal- and somatic-type rRNAs in zebrafish development // *Genome*. – 2018. – Vol.61. – P. 371-378.
- 20 Gallie D.R., Caldwell C., Pitto L. Heat shock disrupts cap and poly(A) tail function during translation and Increases mRNA stability of introduced reporter mRNA // *Plant physiol.* – 1995. – Vol.108. – P. 1703–1713.
- 21 Zheng Y., Wang S., Sunkar R. Genome-wide discovery and analysis of phased small interfering RNAs in Chinese sacred lotus // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9. – P. e113790.
- 22 Heuer A., Thomson E., Schmidt C., Berninghausen O., Becker T., Hurt E., Beckmann R. Cryo-EM structure of a late pre-40S ribosomal subunit from *Saccharomyces cerevisiae* // *Elife*. – 2017. – Vol. 6. – P. e30189.
- 23 Williams A.J., Werner-Fraczek J., Chang I-F., Bailey-Serres J. Regulated phosphorylation of 40S ribosomal protein S6 in root tips of maize // *Plant Physiol.* – 2003. – Vol.132. – P. 2086-2097.
- 24 Sergiev P.V., Lavrik I.N., Dokudovskaya S.S., Dontsova O.A., Bogdanov A.A. Structure of the decoding center of the ribosome // *Biochemistry (Moscow)*. – 1998. – Vol.63. – P. 963–976.
- 25 Obomighie I., Lapenas K., Murphy B.E., Bowles A., Bechtold U., Prischi F. The Role of Ribosomal Protein S6 Kinases in Plant Homeostasis // *Frontiers in molecular biosciences*. –2021. – Vol.8. – P. 636560.

#### References

- 1 Ballard D.J., Peng H.-Y., Das J.K., Kumar A., Wang L., Ren Y., Xiong X., Ren X., Yang J.-M., Song J. (2021) Insights into the pathologic roles and regulation of eukaryotic elongation factor-2 kinase. *Front. Mol. Biosci.*, vol. 8, pp. 839.
- 2 Baird Th.D., Wek R.C. (2012) Eukaryotic initiation factor 2 phosphorylation and translational control in metabolism. *Adv. Nutr.*, vol. 3, pp. 307-321.
- 3 Browning K.S., Bailey-Serres J. (2015) Mechanism of cytoplasmic mRNA translation. *Arabidopsis Book*, vol.13, pp. e0176.
- 4 Castellano L., Stebbing J. (2013) Deep sequencing of small RNAs identifies canonical and non-canonical miRNA and endogenous siRNAs in mammalian somatic tissues. *Nucleic Acids Res.*, vol. 41, pp. 3339–3351.
- 5 Chen Z., Sun Y., Yang X., Wu Z., Guo K., Niu X., Wang Q., Ruan J., Bu W., Gao S. (2017) Two featured series of rRNA-derived RNA fragments (rRFs) constitute a novel class of small RNAs. *PLoS ONE*, vol. 12, pp. e0176458.
- 6 Echevarria-Zomeno S., Yanguéz E., Fernandez-Bautista N., Castro-Sanz A.B., Ferrando A., Castellano M.M. (2013) Regulation of translation initiation under biotic and abiotic stresses. *Int. J. Molec. Sci.*, vol.14, pp. 4670-4683.
- 7 Endo Y. (1988) Mechanism of action of ricin and related toxins on the inactivation of eukaryotic ribosomes. *Cancer Res. Treat.*, vol.37, pp. 75–89.
- 8 Gallie D.R., Caldwell C., Pitto L. (1995) Heat shock disrupts cap and poly(A) tail function during translation and Increases mRNA stability of introduced reporter mRNA. *Plant physiol.*, vol.108, pp. 1703–1713.
- 9 Gallie D.R., Le H., Caldwell C., Browning K.S. (1998) Analysis of translation elongation factors from wheat during development and following heat shock. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, vol. 245, pp. 295-300.
- 10 Henras A.K., Plisson-Chastang C., O'Donohue M.F., Chakraborty A., Gleizes P.E. (2015) An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdiscip Rev. RNA.*, vol. 6, pp. 225–242.
- 11 Hernandez G., Altmann M., Lasko P. (2010) Origins and evolution of the mechanisms regulating translation initiation in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.*, vol.35, pp. 63-73.
- 12 Heuer A, Thomson E, Schmidt C, Berninghausen O, Becker T, Hurt E, Beckmann R. (2017) Cryo-EM structure of a late pre-40S ribosomal subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *Elife*, vol. 6, pp. e30189.
- 13 Immanuel T.M., Greenwood D.R., MacDiarmid R.M. (2012) A critical review of translation initiation factor eIF2 $\alpha$  kinases in plants – regulating protein synthesis during stress. *Funct. Plant Biol.*, vol. 39, pp. 717–735.
- 14 Kast A., Klassen R., Meinhardt F. (2014) rRNA fragmentation induced by a yeast killer toxin. *Mol. Microbiol.*, vol. 91, pp. 606-617.
- 15 Locati M.D., Pagano J.F.B., Abdullah F., Ensink W.A., van Olst M., van Leeuwen S., Nehrlich U., Spaink H.P., Rauwerda H., Jonker M.J., Dekker R.J., Breit T.M. (2018) Identifying small RNAs derived from maternal- and somatic-type rRNAs in zebrafish development. *Genome*, vol.61, pp. 371-378.
- 16 Obomighie I., Lapenas K., Murphy B.E., Bowles A., Bechtold U., Prischi F. (2021) The Role of Ribosomal Protein S6 Kinases in Plant Homeostasis. *Front. Mol. Biosci.*, vol.8, pp. 636560.
- 17 Sergiev P.V., Lavrik I.N., Dokudovskaya S.S., Dontsova O.A., Bogdanov A.A. (1998) Structure of the decoding center of the ribosome. *Biochemistry (Moscow)*, vol.63, pp. 963–976.
- 18 Shaikhin S.M., Smailov S.K., Lee A.V., Kozhanov E.V., Iskakov B.K. (1992) Interaction of wheat germ translation initiation factor 2 with GDP and GTP. *Biochimie*, vol. 74, pp. 447–454.

- 19 Smailov S.K., Lee A.V., Iskakov B.K. (1993) Study of phosphorylation of translation elongation factor 2 (EF-2) from wheat germ. *FEBS Lett.*, vol. 321, pp. 219–223.
- 20 Williams A.J., Werner-Fraczek J., Chang I.-F., Bailey-Serres J. (2003) Regulated phosphorylation of 40S ribosomal protein S6 in root tips of maize. *Plant Physiol.*, vol.132, pp. 2086-2097.
- 21 Zhanybekova S.S., Polimbetova N.S., Nakisbekov N.O., Iskakov B.K. (1996) Detection of a new small RNA, induced by heat shock, in wheat seed ribosomes. *Biochemistry (Moscow)*, vol. 61, pp. 862-870.
- 22 Zheng Y., Wang S., Sunkar R. (2014) Genome-wide discovery and analysis of phased small interfering RNAs in Chinese sacred lotus. *PLoS ONE*, vol. 9, pp. e113790.
- 23 Zhigaylov A.V., Polimbetova N.S., Borankul R.I., Iskakov B.K. (2013) Issledovaniye diskretnoy fragmentatsii 18S rRNK v sostave 40S ribosomnykh subchastits kletok rasteniy [Investigation of discrete fragmentation of 18S rRNA in 40S ribosomal subunits of plant cells]. *Vestnik Kaznu. Seriya biologicheskaya*, vol. 2, pp. 81-87.
- 24 Zhigaylov A.V., Polimbetova N.S., Doshchanov Kh.I., Iskakov B.K. (2014) Obnaruzheniye v kletkakh rasteniy novoy 55-nukleotidnoy tsitoplazmaticheskoy RNK, sootvetstvuyushchey 5'-kontsevomu fragmentu 18S rRNK [Detection in plant cells of a new 55-nucleotide cytoplasmic RNA corresponding to the 5'-terminal fragment of 18S rRNA]. *Vestnik KazNU, Seriya biologicheskaya i meditsinskaya*, vol.1, pp. 191-194.
- 25 Zhigaylov A.V., Alexandrova A.M., Nizkorodova A.S., Stanbekova G.E., Kryldakov R.V., Karpova O.V., Polimbetova N.S., Halford N.G., Iskakov B.K. (2020) Evidence That Phosphorylation of the  $\alpha$ -subunit of eIF2 does not essentially inhibit mRNA translation in wheat germ cell-free system. *Front. Plant Sci.*, vol. 11, pp. 936.