

УДК: 577.123.2: 577.217: 577.217.34

*А.В. Жигайлов, Н.С. Полимбетова, Р.И. Боранқұл, Б.К. Искаков

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

*E-mail: andrzhib@gmail.com

Исследование дискретной фрагментации 18S рРНК в составе 40S рибосомных субчастиц клеток растений

Работа посвящена изучению явления дискретной фрагментации молекулы 18S рРНК в составе малых (40S) рибосомных субчастиц клеток растений. Выявлено, что в тотальных препаратах РНК, выделенных из зародышей пшеницы, постоянно обнаруживается малая цитоплазматическая РНК размером около 100 нуклеотидов, соответствующая 3'-концевому фрагменту 18S РНК. Этот 3'-концевой фрагмент 18S рРНК был детектирован в клетках растений, относящихся к различным таксонам, а также в клетках животных, так что данный процесс дискретной фрагментации 18S рРНК, по-видимому, является достаточно универсальным явлением. Установлено, что содержание исследуемого фрагмента 18S рРНК в молодых побегах растений значительно ниже, чем в сухих и прорастающих семенах, и что его содержание повышается, если пророщенные семена подвергались воздействию стрессовой для растений температуры (37°C). Сделано предположение, что такой тип фрагментации 18S рРНК является одним из способов дерегуляции биосинтеза белка посредством нарушения целостности рибосомной РНК и разобщения связи между ее структурными и функциональными доменами.

Ключевые слова: дискретная фрагментация 18S рРНК, тепловой шок, малые цитоплазматические РНК, рибосомные 40S субчастицы растений.

A. V. Zhigailov, N.S. Polimbetova, R.I. Borankulova, B.K. Isakov

Investigation of the discrete fragmentation of 18S rRNA in the composition of 40S ribosomal subunits of plant cells

This paper studies the phenomenon of discrete fragmentation of 18S rRNA molecule in the composition of small (40S) ribosomal subunits of plant cells. It was revealed that in total RNA preparations isolated from wheat germ continuously detects small cytoplasmic RNA of about 100 nucleotides corresponding to the 3'-terminal fragment of 18S RNA. This 3'-terminal fragment of the 18S rRNA was detected in plant cells belonging to different taxa, as well as in animal 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). It is suggested that this type of 18S rRNA fragmentation is one of the ways of protein synthesis deregulation by disrupting the integrity of ribosomal RNA and separation of relationships between its structural and functional domains.

Key words: discrete 18S rRNA fragmentation, heat shock, small cytoplasmic RNAs, plant 40S ribosomal subunits.

А.В. Жигайлов, Н.С. Полимбетова, Р.И. Боранқұл, Б.К. Искаков

Өсімдіктер жасушаларының 18S рРНК бөлшектенуін 40S рибосомалық суббөлшектер құрамында зерттеу

Жұмыс өсімдіктер жасушаларының 18S рРНК бөлшектенуі кіші (40S) рибосомалық суббөлшектер құрамында өтетініне арналған. Бидай ұрығынан алынған РНК жалпы препараттарында 100 нуклеотидтей ұзындығымен 18S рРНК 3'-ұштық бөлігіне сәйкес келетін кіші цитоплазмалық РНК үнемі кездесетіні айқындалды. Бұл 18S рРНК 3'-ұштық бөлігі әртүрлі таксонға жататын өсімдіктер жасушаларында және жануарлар жасушаларында табылды, сондықтан 18S рРНК бөлшектенуі тегі жалпы құбылыс сияқты. Өсімдіктердің жас өскіндерінде 18S рРНК зерттелген бөлігінің мөлшері құрғақ және өсіп келе жатқан дәндіден едәуір төмен екені анықталды, бірақ өсіп келе жатқан дәнді өсімдіктер үшін жағымсыз температураға (37°C) шалдықтырса оның мөлшері өседі. 18S рРНК бөлшектенуінің мұндай түрі белок биотүзілуін рибосомалық РНК тұтастығын және оның құрылымдық пен әрекеттік домендері арасындағы байланысты бұзу арқылы реттегіш әдісі деген болжам жасалды.

Түйін сөздер: 18S РРНК бөлшектенуі тегі, ыстық шок, кіші цитоплазмалық РНК, өсімдіктердің 40S рибосомалық суббөлшектері.

Растения, являясь неподвижными организмами, подвергаются самым различным стрессовым воздействиям: тепловому шоку, засухе и обезвоживанию, холодному стрессу, не имея возможности избежать или ослабить их. На подобные воздействия они отвечают, в частности, программированным изменением экспрессии генов как на уровне транскрипции [1], так и на трансляционном уровне [2]. Большое внимание привлекает изучение механизмов регуляции трансляции мРНК у растений, находящихся в стрессовых условиях, поскольку изменения на уровне трансляции мРНК происходят быстрее, чем наступают изменения на уровне транскрипции генов [3].

Воздействие стресса приводит к перестройкам в белоксинтезирующем аппарате, к каковым относятся изменения в содержании и локализации факторов трансляции, изменения степени фосфорилирования факторов трансляции и рибосомных белков, а также изменения в структуре самих рибосом [4].

Наиболее изученными механизмами блокирования инициации трансляции мРНК во время стрессовых воздействий в клетках млекопитающих является блокировка кэп-связывающего эукариотического фактора инициации 4Е (eIF4Е) специфическими связывающими белками (eIF4Е-BPs), приводящая к подавлению кэп-зависимой трансляции [5, 6], а также фосфорилирование α -субъединицы фактора инициации eIF2, специфическими протеин киназами, что приводит к связыванию и "аресту" GDP/GTP-обменивающего фактора eIF2В и тотальному ингибированию биосинтеза белка [7, 8].

У растений, по-видимому, отсутствуют оба этих механизма подавления трансляции в ответ на действие стрессовых факторов: у растений не функционируют eIF4Е-BPs (в геноме *Arabidopsis thaliana* отсутствуют даже гены этих белков), и растениям для замены комплекса eIF2-GDP на eIF2-GTP не требуется наличие фактора eIF2В [9, 10]. Таким образом, механизмы, лежащие в основе ответа растительных клеток на стрессовые воздействия окружающей среды, остаются неизвестными.

Хотя во время различных стрессовых воздействий в белоксинтезирующем аппарате клетки происходит ряд изменений, ведущих к

подавлению синтеза белка, некоторые клеточные и многие вирусные мРНК в таких условиях могут продолжать свою экспрессию [11]. Использование трансляционных усилителей при создании трансгенных растений может не только повысить эффективность экспрессии рекомбинантного гена, но и сохранить его экспрессию в стрессовых условиях [12].

В данной работе впервые представлены результаты исследований, свидетельствующие об одной из ответных реакций растений на тепловой шок, а именно отрезание фрагмента с 3'-конца 18S РНК малой субъединицы рибосомы (так называемого "фрагмента X-100"), размер которого составлял 100-110 нуклеотидов. Целью работы явилось выявление упомянутого фрагмента в различных образцах растительного происхождения и выяснение конкретных условий его появления.

Материалы и методы

Объектом исследования служили зародыши пшеницы (сорта Казахстанская 4), которые проращивали в присутствии 1%-ной глюкозы и антибиотиков широкого спектра действия (50 Ед./мл ампициллина, 50 Ед./мл стрептомицина) при 26°C в течение 18 часов в темноте. Из сухих (покоящихся) и пророщенных зародышей пшеницы выделяли тотальные препараты РНК, рибосомы и безрибосомный экстракт (S100). Тотальные препараты РНК выделялись, помимо пшеницы, из следующих видов растений: кукурузы, табака, картофеля, томатов, арабидопсиса, тыквы, дурмана, герани, фасоли, а также из клеток печени крысы.

Компьютерный анализ последовательностей нуклеиновых кислот проводили с использованием компьютерных программ *RNA-structure 3.5* и *Blast*. Нуклеотидные последовательности были взяты из базы данных NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Тепловой шок. Пророщенные зародыши пшеницы либо вегетирующие растения помещались на 1 час в термостат с температурой, установленной на 37°C. После инкубации из растительных объектов выделяли тотальные препараты РНК либо рибосомы.

Безрибосомный экстракт (S100) и рибосомы получали, как описано [14].

Выделение тотальных препаратов РНК из растительных объектов. Для выделения тотальных препаратов РНК применяли стандартные методы: метод с использованием фенола, тризола, буфера СТАВ [17].

Приготовление [³²P]-меченых и DIG-меченых зондов. Для исследования явления дискретной фрагментации молекулы 18S рРНК растений использовали олигодезоксирибонуклеотид (олигоДНК) «3'18S»: (5')CAATGATCCTTCCGCAG GTTCACCTACGGAACCT, комплементарный 35-и 3'-концевым нуклеотидам 18S рРНК пшеницы. Для детекции гипотетических микро-РНК, потенциально способных участвовать в гидролитическом расщеплении молекул 18S рРНК с образованием фрагмента X-100, использовали олигоДНК «si-X»: (5')TCGGATCGCGGCGAC-GGGGGCGGTTCGCCGCCCCC. Для детекции мяРНК U6, использовавшейся в качестве стандарта для нормализации содержания РНК и РНК-маркера, применяли олигоДНК «as-U9», комплементарный консервативному участку этой мяРНК: (5')AGCTTGCTGAGTCTCTTAATCGTACCGGGGTG. В качестве положительного контроля при анализе микроРНК использовали олигоДНК «as-mir173», комплементарный конститутивно экспрессируемой в *A. thaliana* микроРНК mir173: (5')GTGATTTCTCTCTGCAAGCGAA.

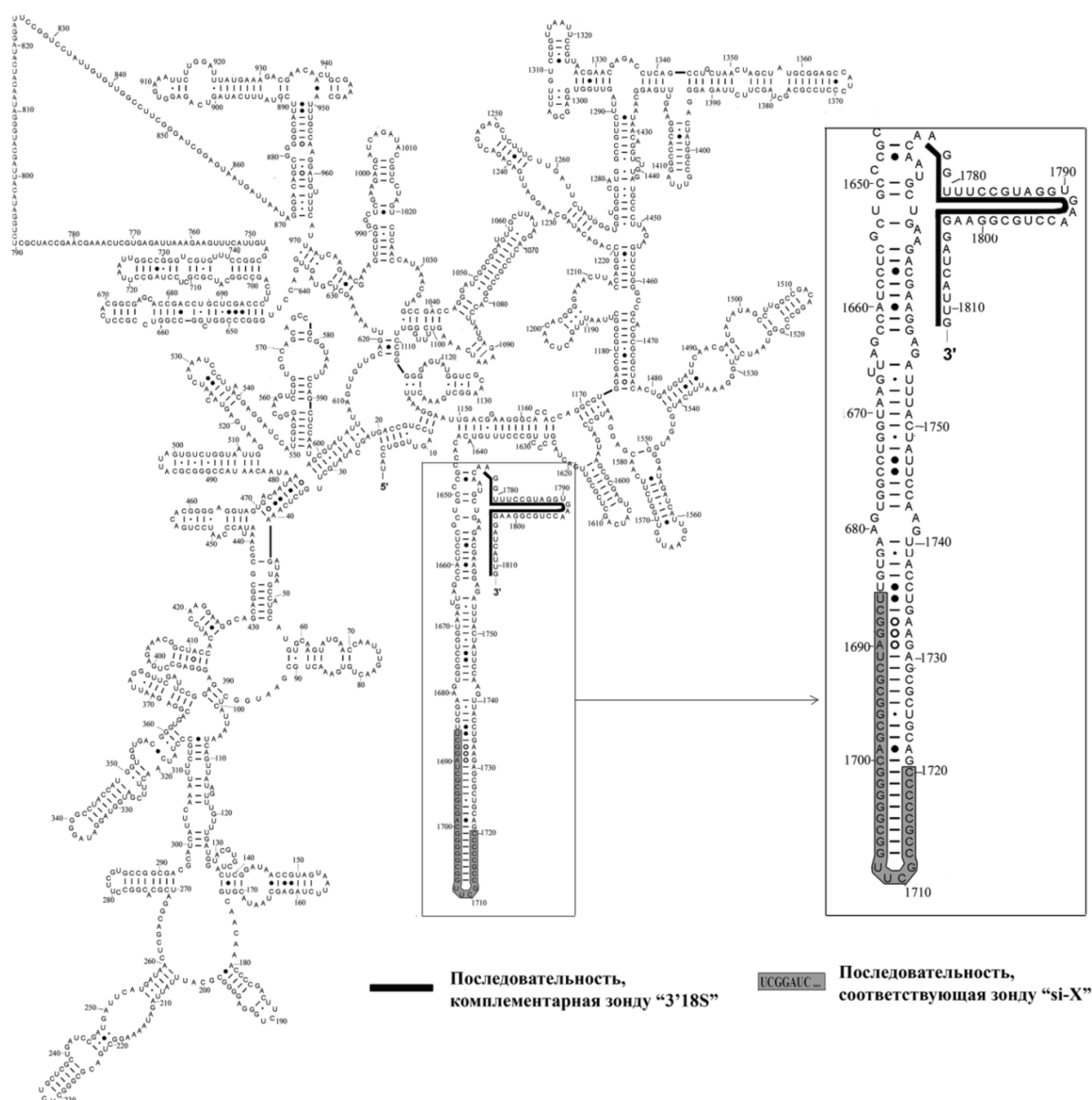
Для получения [³²P]-меченых зондов проводили реакцию кинирования олигоДНК в присутствии 0,01 мМ [γ -³²P]АТФ (185 ТВq/mmol (5000 Ci/mmol)) с использованием полинуклеотидкиназы фага Т4 фирмы «Fermentas». Для получения DIG-меченых зондов использовали набор *DIG Oligonucleotide 3'-End Labelling Kit* фирмы «Roche» (Cat# 03353575910).

Электрофорез РНК проводили в 15%-ном, 8%-ном или смешанном (4%/7%/20%) полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (в присутствии 2,2М формальдегида, либо 8М мочевины) [17].

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. Гибридизацию мембран с зондами проводили в течение ночи в гибридизационном буфере *UltraHyb-oligo* фирмы «Ambion» (Cat# 8663) при температуре 60°C для зондов «3'18S» и «as-U6», либо при температуре 35°C для зондов «si-X» и «as-mir173». После отмывки мембран проводили их радиоавтографию. Гибридизацию с DIG-мечеными пробами и последующую детекцию полос проводили с использованием набора *DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids* фирмы «Roche» (Cat# 11363514910) по методике производителя.

Результаты и их обсуждение

Ранее нами в клетках зародышей пшеницы во фракции нативных 40S рибосомных субчастиц была идентифицирована малая цитоплазматическая (мцРНК) 5,3S РНК длиной около 135-и нуклеотидов, которая по нуклеотидной последовательности соответствовала 5'-концевому сегменту 18S рРНК (см. рисунок 1) [14]. Мы установили, что 5,3S РНК, количество которой под действием теплового шока увеличивается в 5-6 раз, локализуется в 40S субчастицах моно- и полирибосом и не диссоциирует в условиях высокой ионной силы [14]. Дальнейшие эксперименты показали, что 5,3S РНК имеет, по-видимому, универсальное распространение в клетках растений и животных. Эти данные позволяют предположить, что 5,3S РНК может участвовать в регуляции синтеза белка в клетках растений при тепловом шоке на уровне инициации трансляции. Последнее предположение подтверждается данными о взаимодействии 5,3S РНК клеток зародышей пшеницы с eIF-2, но не с eEF-2. [14].

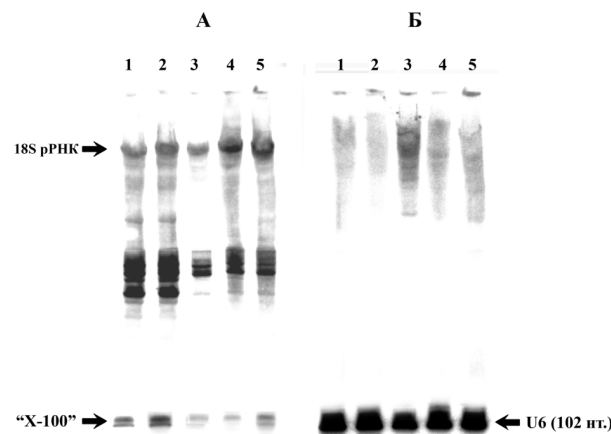


за основу взята структура X00755 на сайте <http://www.rna.icmb.utexas.edu>;
часть 3'-концевого домена выделена и показана отдельно справа

Рисунок 1 – Модель вторичной структуры 18S рРНК пшеницы

Таким образом, 5,3S РНК, судя по всему, является продуктом фрагментации молекулы 18S рРНК со стороны ее 5'-конца. В настоящей работе мы решили проверить, не образуется ли подобный продукт фрагментации 18S рРНК с ее 3'-конца. Исходя из литературных источников, можно заключить, что 3'-концевой район 18S рРНК (см. рисунок 1) важен для процесса трансляции у эукариот [15].

Для исследования явления дискретной фрагментации молекулы 18S рРНК в клетках растений мы создали [32 P]-меченые и DIG-меченные зонды, комплементарные 35- и 3'-концевым остаткам 18S рРНК пшеницы. Результаты гибридизационного анализа тотальных препаратов РНК, выделенных из различных растительных объектов с использованием [32 P]-меченого зонда «3'18S», приведены на рисунке 2.



А – гибридизация с $[^{32}\text{P}]$ -меченым зондом «3'18S»; Б – гибридизация с $[^{32}\text{P}]$ -меченым зондом «as-U6». Стрелками указаны полосы, соответствующие фрагменту 18S рРНК, фрагменту X-100 (слева) и мяРНК U6 (справа). На дорожках были проанализированы тотальные препараты 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.

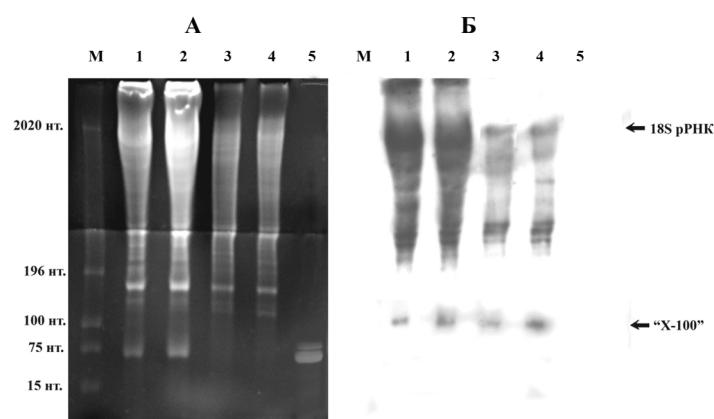
Рисунок 2 – Радиоавтографический анализ мембраны после переноса с 4%/7%/20% ПАА-геля

Как видно из данных, представленных на рисунке 2А, во всех исследуемых образцах обнаруживался фрагмент 18S рРНК (обозначенный нами «фрагментом X-100»), приблизительно равный по размеру мяРНК U6 (102 нуклеотида).

Из данных, представленных на рисунке 2, также видно, что фрагмент X-100 обнаруживается в тотальных препаратах РНК, выделенных не только из пшеницы, но и из других видов растений. Фрагмент X-100 был обнаружен также в препаратах РНК, выделенных из кукурузы, картофеля, табака,

дурмана, тыквы, фасоли, герани, и печени крысы, что может служить свидетельством того, что обнаруженный тип дискретной фрагментации молекулы 18S рРНК является универсальным явлением.

Чтобы выяснить локализацию фрагмента X-100, мы выделяли рибосомы из зародышей пшеницы, после чего изолировали из них рибосомную РНК. Рибосомную РНК сравнивали с препаратами РНК, из безрибосомного экстракта (S100). Результаты эксперимента приведены на рисунке 3.



А – 4%/8%-ПАА-гель; Б – радиоавтограмма проявленной мембраны после переноса и гибридизации с DIG-меченным зондом «3'18S». М – РНК-репер. На дорожках 1-4 проанализированы следующие образцы: 1 – тотальный образец РНК, выделенный из пророщенных зародышей пшеницы, не подвергнутых тепловому шоку; 2 – тотальный образец РНК, выделенный из пророщенных зародышей пшеницы, подвергнутых тепловому шоку; 3 – рибосомная РНК, выделенная из зародышей пшеницы, не подвергнутых тепловому шоку; 4 – рибосомная РНК, выделенная из зародышей пшеницы, подвергнутых тепловому шоку; 5 – РНК, выделенная из безрибосомного экстракта (S100). Стрелками справа указаны 18S рРНК и фрагмент X-100.

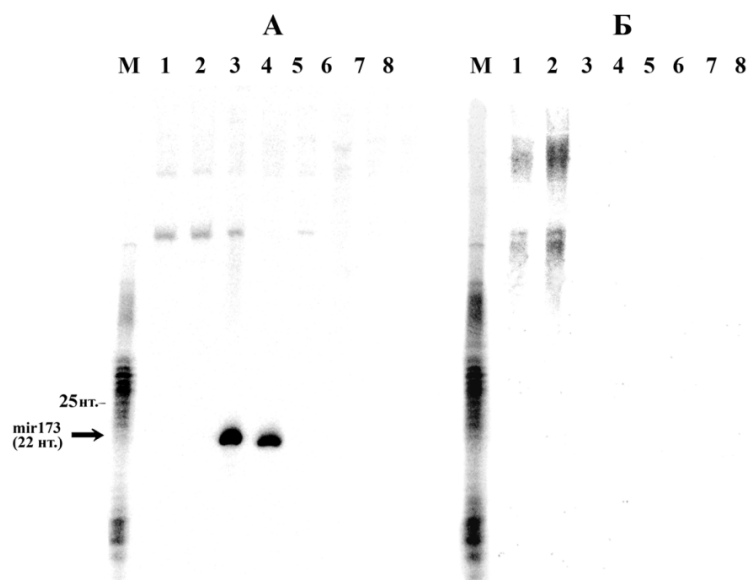
Рисунок 3 – Электрофоретический анализ локализации фрагмента X-100 в цитоплазме клеток

Как видно из данных, представленных на этом рисунке, фрагмент X-100 обнаруживается в рибосомной фракции, но не в безрибосомном экстракте. То есть, после разрезания или разрыва молекулы 18S рРНК в районе 1764-1769, 3'-концевой фрагмент этой молекулы остается в составе рибосомных субчастиц и не высвобождается в цитозоль клеток.

Следует отметить, что при инкубации пророщенных зародышей пшеницы в течение одного часа при 37°C (тепловой шок) содержание фрагмента X-100 в них существенно возросло (дорожка 2 против дорожки 1 на рисунке 2 и дорожки 2 и 4 против дорожек 1 и 3 на рисунке 3).

Одним из возможных механизмов, приводящих к образованию фрагмента X-100, мо-

жет быть синтез микроРНК, комплементарных участку 1686-1720 18S рРНК и последующее разрезание этой молекулы белковым комплексом RISK [16]. Для проверки данной гипотезы мы предприняли попытку найти в цитоплазме клеток растений микроРНК, комплементарные участку 1686-1720 18S рРНК растений. Мембраны после переноса с ПАА-геля, в котором анализировались различные препараты РНК, гибридизовали с [³²P]-меченым зондом, имеющим последовательность, соответствующую участку 1686-1720 18S рРНК пшеницы (зонд «si-X») (см. рисунок 1). В качестве положительного контроля использовали [³²P]-меченный зонд «as-mir173», комплементарный микроРНК *A. thaliana* mir173. Результаты эксперимента приведены на рисунке 4.



А – радиоавтограмма мембраны после переноса и гибридизации с [³²P]-меченым зондом «as-mir173»; Б – радиоавтограмма мембраны после переноса и гибридизации с [³²P]-меченым зондом «si-X». М – РНК-маркер; на дорожках 1 – 8 проанализированы препараты РНК, выделенные из следующих образцов: 1 – из пророщенных зародышей пшеницы, не подверженных воздействию теплового шока; 2 – то же, после теплового шока; 3 – из растений *A. thaliana*, не подверженных воздействию теплового шока; 4 – то же, после теплового шока; 5 – из растений *Nicotiana benthamiana*, не подверженных воздействию теплового шока; 6 – то же, после теплового шока; 7 – из растений томатов, не подверженных воздействию теплового шока; 8 – то же, после теплового шока.

Рисунок 4 – Электрофоретический анализ тотальных препаратов РНК, выделенных из различных объектов на предмет присутствия в них микроРНК, комплементарных участку 1686-1720 18S рРНК растений

Как видно из рисунка 4Б, во всех анализируемых тотальных препаратах РНК отсутствуют микроРНК, комплементарные участку 1686-1720 18S рРНК растений. В то же время, контроль дал положительный результат (наличие полосы раз-

мером 22 нуклеотидов в дорожках 3 и 4, соответствующей микроРНК *A. thaliana* mir173). Таким образом, РНК-интерференцию можно исключить из возможных механизмов, лежащих в основе образования фрагмента X-100 в клетках растений.

Можно предположить, что появление фрагмента X-100 в клетках растений на определенных жизненных стадиях и при определенных условиях может обуславливаться RIPs-подобными белками, которые инактивируют рибосомы посредством сайт-специфической апуринизации молекулы 28S рРНК по остатку А₄₃₂₄, что ведет к расщеплению молекулы рРНК большой рибосомной субчастицы в этом месте [17]. Однако на сегодняшний день нет каких-либо указаний на то, что RIPs могут осуществлять апуринизацию нуклеотидов в молекуле 18S рРНК эукариот.

Одним из возможных причин образования фрагмента X-100 может быть механический разрыв 18S рРНК, происходящий в районе последовательности 1708-1711, формирующей петлю спирали 44 в ходе выделения РНК. В то же время, несмотря на аналогичный способ выделения тотальных препаратов РНК, содержание фрагмен-

та X-100 значительно различалось, в зависимости от стадии вегетации растений и от того, подвергались ли объекты исследования тепловому шоку, или нет. По этой причине неправомерно относить фрагмент X-100 к артефактам, связанным с методом выделения РНК из клеток растений.

Таким образом, механизм, вовлеченный в процесс дискретной фрагментации молекулы 18S рРНК с образованием фрагмента X-100, пока остается неизвестным.

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» (№ гос. Регистрации: 0113РК00354).

Литература

- 1 Hirayama T., Shinozaki K. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future // *Plant Journal*. – 2010. – V. 61. – P. 1041-1052.
- 2 Echevarria-Zomeno S., et al. Regulation of translation initiation under biotic and abiotic stresses // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – V.14. – P. 4670-4683.
- 3 Floris M., et al. Post-transcriptional regulation of gene expression in plants during abiotic stress // *Int. J. Mol. Sci.* – 2009. – V.10. – P. 3168-3185.
- 4 Muench D.G., Zhang C., Dahodwala M. Control of cytoplasmic translation in plants // *WIREs RNA*. – 2012. – V.3. – P. 178-194.
- 5 Sukarieh R., Sonenberg N., Pelletier J. The eIF4E-binding proteins are modifiers of cytoplasmic eIF4E relocalization during the heat shock response // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2009. V. 296. – P. C1207-C1217.
- 6 Proud C.G. Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery // *Biochem. J.* – 2007. – V. 403. – P. 217-234.
- 7 Merrick W.C. Eukaryotic protein synthesis: still a mystery // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285. – P. 21197-21201.
- 8 Baird Th.D., Wek R.C. Eukaryotic initiation factor 2 phosphorylation and translational control in metabolism // *Adv. Nutr.* – 2012. – V. 3. – P. 307 – 321.
- 9 Shaikhin S.M., Smailov S.K., Lee A.V., Kozhanov E.V., Iskakov B.K. Interaction of wheat-germ translation initiation factor - eIF2 with GDP and GTP // *Biochimie*. –1992. – V. 74. – P. 447-454.
- 10 Zhang Y., Wang Y., Kanyuka K., Parry M.A.J., Powers S.J., Halford N.G. GCN2-dependent phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor-2a in Arabidopsis // *J. of Exp. Botany*. – 2008. – V. 59. – No. 11. – P. 3131-3141.
- 11 Immanuel T.M., Greenwood D.R., MacDiarmid R.M. A critical review of translation initiation factor eIF2 α kinases in plants - regulating protein synthesis during stress // *Functional Plant Biology*. – 2012. – V. 39. – P. 717-735.
- 12 Bushell, M., Wood, W., Clemens, M.J., Morley, S. J. Changes in the integrity and association of eukaryotic protein synthesis initiation factors during apoptosis // *Eur. J. Biochem.* – 2000. – V. 267. – P. 102-114.
- 13 Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Molecular cloning (a laboratory manual)*. – N.Y: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. – V. 3.
- 14 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. – V. 61. – No. 5. – P. 621-627.
- 15 Martínez-Salas E., Ramos R., Lafuente E., López de Quinto S. Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements // *J. of General Virology*. – 2001. – V. 82. – P. 973-84.
- 16 Dykxhoorn D.M., Novina C.D., Sharp P.A. Killing the Messenger: Short RNAs that Silence Gene Expression // *Mol. Cell Biology*. – 2003. – V. 4. –P. 457-467.
- 17 Endo, Y., and Tsurugi, K. RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1987. – Vol. 262, No. 17. – P. 8128-8130.