

ЭНХАНСЕРЫ ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ ТРАНСЛЯЦИИ В УСЛОВИЯХ ТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА

А.С. Низкородова¹, Р.У. Мусабаев¹, Н.Ж. Каримов², Б.К. Искаков¹

¹Республиканское государственное предприятие «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина» комитета науки министерства образования и науки Республики Казахстан, Алматы, Казахстан, *anna_niz@mail.ru*

²Республиканское государственное предприятие «Институт биологии и биотехнологии растений» комитета науки министерства образования и науки Республики Казахстан, Алматы, Казахстан, *peksg@gmail.com*

Аннотация. Был исследован стимулятор трансляции TPS (Translation-initiation Promoting Site), присутствующий в 5'-нетранслируемых последовательностях прокариотических мРНК с высоким уровнем экспрессии. TPS комплиментарен сайту 5'-GGAUCA-3' на 3'-конце 16S рРНК. При сочетании TPS с Шайн-Далгарно (SD) было показано достоверное повышение уровня экспрессии по сравнению с одной только SD в клетках *E. coli* в стрессовых условиях: в 5,5 раз при понижении температуры (25 °C), и почти в 2 раза при повышении (44 °C).

Ключевые слова: Шайн-Далгарно, инициация трансляции, прокариотическая экспрессия, энхансер

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1316-1320

Инициация трансляции у прокариотических организмов происходит благодаря комплиментарному взаимодействию 5'-нетранслируемой последовательности (5'-НТП) мРНК (последовательности Шайн-Далгарно) и 3'-концевой последовательности 16S рРНК (анти-Шайн-Далгарно) [Shine, Dalgarno, 1975]. Тем не менее, подобный механизм инициации не является универсальным для прокариот – многие прокариотические мРНК лишены последовательности Шайн-Далгарно (SD), что не мешает их экспрессии [Ivanov et al., 1997; Wu, Janssen, 1997]. Более того, было показано, что для некоторых микробных геномов количество генов с SD меньше количества генов без SD [Chang et al., 2006] и каким образом иницируется трансляция таких «не-SD» генов прокариотических организмов пока неизвестно.

Анализ последовательностей прокариотических мРНК с высоким уровнем экспрессии выявил наличие в их 5'-НТП последовательности 5'-UGAUCC-3', располагавшейся в районе от -84 н. до -12 н. перед стартовым кодоном [Thanaraj, Pandit, 1989]. Эта последовательность комплиментарна сайту 5'-GGAUCA-3' на 3'-конце 16S рРНК, предшествующему последовательности анти-Шайн-Далгарно (рис. 1). Было высказано предположение, что данная последовательность, названная TPS (Translation-initiation Promoting Site) [Thanaraj, Pandit, 1989], является сайтом связывания рибосом, аналогичным последовательности Шайн-Далгарно. При анализе генов *S. cerevisiae* с высоким уровнем экспрессии также была обнаружена последовательность TPS, а при анализе 18S рРНК у 40 видов эукариотических организмов анти-TPS была обнаружена у всех видов без исключения и без вариаций последовательности [Thanaraj, Pandit, 1989].

Нами были получены конструкции на основе плазмиды pET23c, кодирующие ген β-глюкуронидазы (GUS) под управлением T7-промотора и T7-терминатора транскрипции и отличающиеся своими 5'-НТП (табл. 1).

Полученными конструкциями трансформировали клетки *E. coli* экспрессионного штамма BL-21(DE3), проводили индукцию экспрессии 1 mM IPTG и инкубировали клетки при разных температурных режимах (25 °C, 37 °C, 44 °C) в течение часа. Температура культивирования 37 °C была взята за физиологический оптимум, 25 °C –

Таблица 2.

Относительный уровень экспрессии β -глюкуронидазы при разных температурах культивирования клеток

Конструкции	Температура культивирования 25 °С		Температура культивирования 37 °С		Температура культивирования 44 °С	
	Уровень экспрессии по отношению к emp	Уровень экспрессии по отношению к SD	Уровень экспрессии по отношению к emp	Уровень экспрессии по отношению к SD	Уровень экспрессии по отношению к emp	Уровень экспрессии по отношению к SD
emp	1,00	0,08*	1,00	0,03*	1,00	0,01*
SD	12,47*	1,00	38,42*	1,00	94,06*	1,00
TPS	1,28	0,10*	0,93	0,02*	1,38	0,01*
TPSfar	0,53*	0,04*	1,02	0,03*	1,20	0,01*
TPS-SD	1,57	0,13*	6,67*	0,17*	4,33*	0,05*
SD-TPS	1,24	0,10*	2,31	0,06*	2,24	0,02*
TPS SD	14,46*	1,16	39,69*	1,03	78,75*	0,84
TPSlongSD	68,31*	5,48*	51,61*	1,34	177,29*	1,88*

Примечания: * – отличие между выборками достоверно ($p \leq 0,05$). Уровень значимости, соответствующий фактическому t -критерию, рассчитывался в Microsoft Excel как двухвыборочный t -тест с неравными дисперсиями и двусторонним распределением; для каждой из конструкций количество повторов измерений составляло 10 и более.

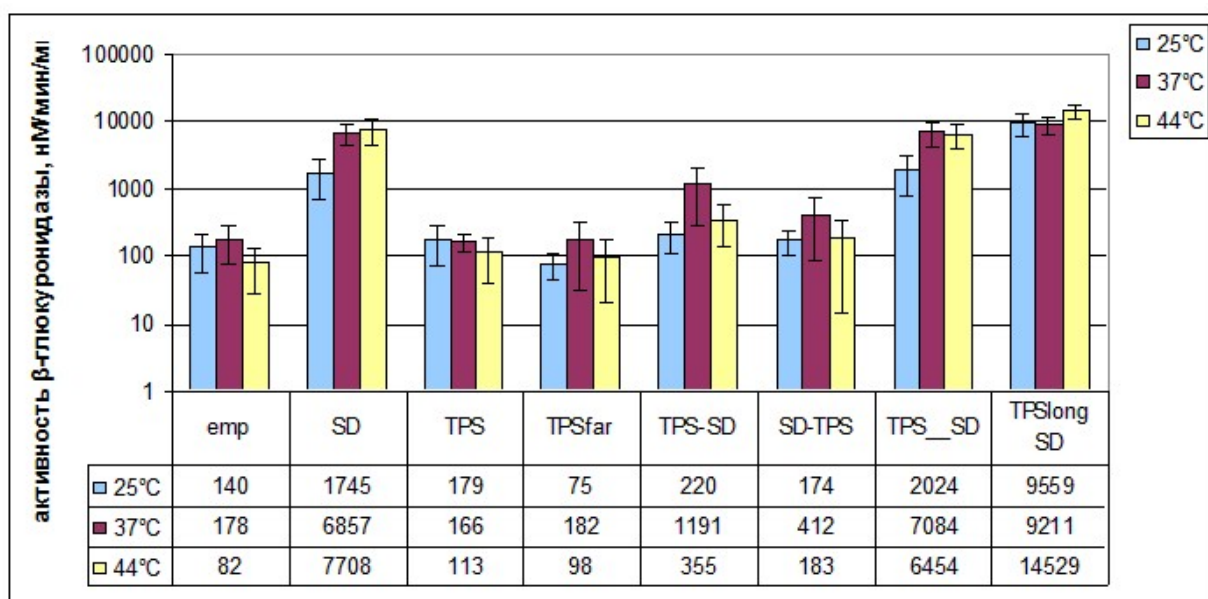


Рис. 2. Активность β -глюкуронидазы при различных температурах культивирования клеток *E. coli*.

Различные комбинации последовательностей TPS и SD относительно друг друга демонстрировали различные уровни энхансерной активности при разных температурах культивирования (рис. 2). Причем длина спейсерного участка между этими элементами имела определяющее значение. При отсутствии спейсерной последовательности (TPS-SD) уровень экспрессии GUS в сравнении с последовательностью SD был достоверно в ~6-20 раз ниже, то есть наличие сайта TPS вплотную к SD препятствовало стандартному связыванию SD с анти-Шайн-Далгарно на 16S рPHK. При наличии короткой спейсерной последовательности (TPS_SD) уровень экспрессии не отличался от контрольного при всех температурных режимах культивирования. При увеличении

длины спейсера до 30 н. (**TPSlongSD**) наблюдалось достоверное повышение уровня экспрессии по сравнению с **SD** в стрессовых условиях: в 5,5 раз при понижении температуры и почти в 2 раза при повышении. В то же время при оптимальной температуре культивирования разницы в уровне экспрессии отмечено не было.

Полученные данные позволяют сделать предположение об изменении конформации бактериальных рибосом в условиях температурных стрессов, что может приводить к связыванию мРНК с 16S рРНК в иных участках, чем при стандартной температуре культивирования. Причем конформационные изменения могут быть различны в зависимости от вида стресса (повышение или понижение температуры). Таким образом, сайт TPS, расположенный на оптимальном расстоянии от стартового кодона, позволяет увеличивать уровень инициации трансляции в условиях температурного стресса, то есть является не усилителем трансляции в полном смысле, а именно стимулятором трансляции (Translation-initiation Promoting Site), как было предложено Thanaraj T.A. [Thanaraj, Pandit, 1989].

Литература

Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – V. 72. – P. 248–254.

Cervera M. Histochemical and fluorometric assays for *uidA* (GUS) gene detection // *Methods in Molecular Biology*. – 2002. – V. 286. – P. 203–212.

Chang B., Halgamuge S., Tang S-L. Analysis of SD sequences in completed microbial genomes: non-SD-led genes are as common as SD-led genes // *Gene*. – 2006. – V. 373. – P. 90–99.

Ivanov L., Aleksandrova R., Dragulev B., Abou-Haidar M. A second putative mRNA binding site on the *E. coli* ribosome // *Gene*. – 1995. – V. 160. – P. 75–79.

Ron E.Z., Davis B.D. Growth rate of *Escherichia coli* at elevated temperatures: limitation by methionine // *J. Bacteriol.* – 1971. – V. 107. – P. 391–396.

Shine J., Dalgarno L. Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. // *Nature*. – 1975. – V. 254. – P. 34–38.

Thanaraj T.A., Pandit M.W. An additional ribosome-binding site on mRNA of highly expressed genes and a bifunctional site on the colicin fragment of 16S rRNA from *Escherichia coli*: important determinants of the efficiency of translation-initiation // *NAR*. – 1989. – V. 17. – P. 2973–2985.

Thanaraj T.A., Pandit M.W. Translation-initiation promoting site on transcripts of highly expressed genes from *Saccharomyces cerevisiae* and the role of hairpin stems to position the site near the initiation codon // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. – 1990. – V. 7. – P. 1279–1289.

Wu C., Janssen G. Expression of streptomycete leaderless mRNA encoding chloramphenicol acetyltransferase in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* – 1997. – V. 179. – P. 6824–6830.

ENHANCERS OF PROKARYOTIC TRANSLATION UNDER THE TEMPERATURE STRESS

A.S. Nizkorodova¹, R.U. Musabaev¹, N.Zh. Karimov², B.K. Iskakov¹

¹State Research Institute of Molecular Biology and Biochemistry named after M.A. Aytkozhin, Almaty, Kazakhstan, *anna_niz@mail.ru*

²State Research Institute of Plants' Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan, *peksg@gmail.com*

Abstract. The novel translation stimulator TPS (Translation-initiation Promoting Site), presented in the 5'-untranslated sequences of prokaryotic mRNAs with a high expression level, was studied. TPS is complimentary to the 5'-GGAUCA-3' site at the 3'-end of 16S rRNA. When TPS was combined with Shine-Dalgarno (SD), a significant increase in expression level was shown in comparison with SD alone in *E. coli* cells under stress conditions – 5.5 times greater at 25 °C, and almost 2-fold greater at 44 °C.

Keywords: *Shine-Dalgarno, translation initiation, prokaryotic expression, enhancer*