

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ В РАСТЕНИЯХ

А.А. Тюрин¹, О.С. Павленко¹, К.В. Кабардаева¹, О.А. Гра¹, В.С. Фадеев¹,
О.Н. Мустафаев², И.В. Голденкова-Павлова¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия, alexjofar@gmail.com

²Бакинский государственный университет, Баку, Азербайджан. orkhan@bioset.org

Аннотация. Диссонанс между уровнями мРНК и белка заботит исследователей с самого начала генно-инженерной эпохи. Однако ввиду ряда причин основной акцент в подобных исследованиях до последнего десятилетия делался лишь на анализе активности промоторов, изучении способов контроля транскрипции. Тем не менее, трансляция как этап предполагает более тонкий инструментарий для управления экспрессией гетерологичных генов. В представленной работе мы рассмотрим лишь небольшую группу подходов к конструированию тонко настраиваемых систем экспрессии чужеродных генов в растениях.

Ключевые слова: трансляция, трансгенные растения, мРНК, регуляторные элементы

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1401-1402

Как известно, инициация трансляции – критический момент, контролируемый целым спектром регуляторных элементов, было бы неразумным упускать такую возможность. Ключевым элементом, среди прочих, выступает 5'-нетранслируемая область (5'-НТО). 5'-НТО важна как сама по себе, т.е. огромное значение имеют её структурные характеристики (размер и нуклеотидный состав), так и являясь контейнером для разного рода функционально активных мотивов – регуляторных элементов: upstream открытых рамок считывания и стартовых кодонов, сайтов внутренней посадки рибосомы, G-квадруплексов, рибопереключателей и т.п. Непосредственное отношение к 5'-НТО в плане локализации имеет и окружение стартового кодона – консенсусная последовательность Козак.

В рамках представленной работы мы исследовали возможность улучшить экспрессию целевых генов в растениях путём модификации 5'-нетранслируемой области. Проведя элементарный статистический анализ, а также изучив опыт аналогичных исследований, мы выяснили следующие особенности 5'-НТО растений (на примере *A. thaliana*): размер этих элементов для большинства генов модельных растений лежит в пределах 70-120 н.о., содержание гуанина и цитозина – 37-40%. Однако, очевидно, что сами по себе эти параметры мало, что значат. Вторым этапом нашего исследования стал поиск определённых мотивов в массиве 5'-НТО генов с высоким уровнем экспрессии модельного организма. Результатом биоинформатического анализа стала консенсусная последовательность длиной 87 н.о. Далее для верификации гипотезы о том, что 5'-нетранслируемая область такого рода будет выступать в качестве трансляционного энхансера, мы клонировали полученную консенсусную последовательность в вектор (для транзientной экспрессии в растениях), содержащий ген репортерного белка лихеназы. Нами показано увеличение уровня экспрессии по сравнению с контролем (вектор без трансляционного энхансера) на 35%.

Следующим важным этапом трансляции является элонгация. В нашей работе мы рассматривали зависимость эффективности экспрессии от нуклеотидного состава кодирующей последовательности целевого гена. Подобные работы проводились и ранее, однако большинство из них было сфокусировано на оптимизации кодонового состава путём приведения его в соответствие с профилем кодонов высоко

экспрессируемых генов. Тем не менее, мы сочли важным тот факт, что кодоновый состав описанных выше генов может и не содержать превалирующих по концентрации триплетов, т.е. быть сугубо специфичным для генов домашнего хозяйства, и таким образом, проявлять своего рода негибкость в плане интеграции в этот профиль дополнительных единиц трансляции. Как решение этой гипотетической задачи нами было предложено использовать оптимизацию кодового состава по полногеномному распределению частот встречаемости триплетов. В качестве модельных мы использовали гены лихеназы, эритропоэтина и интерферона- α -2A человека. Для верификации использовали метод транзientной экспрессии в растениях.

Трансляция, как отмечалось выше, – важный, ключевой процесс, но не единственный. Уже синтезированные протеины часто нуждаются в защите от протеолиза. Для выхода из сложившегося затруднения также предложен ряд приемлемых решений: компартментализация, экскреция, ингибирование протеаз, слияние с белок-стабилизирующими партнёрами (БСП) и пр. Тут мы использовали последний подход, избрав в качестве БСП термостабильную лихеназу, о которой упоминалось выше. Особенностью данного фермента является его бифункциональность – наличие и репортерных свойств и возможность использовать его в качестве БСП. Лихеназа прекрасно выдерживает и транскрипционно-трансляционные слияния, и достройки небольших полипептидных последовательностей в область внутренних неструктурированных линкеров. Повышенная устойчивость к протеолизу и термостабильность также делают данный белок выгодным кандидатом на роль белок-стабилизирующего партнёра. В нашей работе выход модельного белка–интерферона увеличивался в полтора раза при слиянии его с лихеназой. Кроме этого, лихеназа предоставляет прекрасную возможность упростить процесс предварительной очистки путём прогревания тотальных лизатов с последующим удалением денатурированных белков.

Из сказанного выше можно сделать вывод о том, что транскрипция – не единственный этап, на котором возможна точная регулировка экспрессии генов. Последующие этапы дают не меньший, но даже больший инструментарий для достижения тонкой настройки экспрессионной машины клетки на синтез целевых гетерологичных полипептидов.

GENETIC DETERMINANTS FOR EFFICIENT EXPRESSION OF HETEROLOGOUS GENES IN PLANTS

A.A. Turin¹, O.S. Pavlenko¹, K.V. Kabardaeva¹, O.A. Gra¹, V.S. Fadeev¹,
O.N. Mustafaev², I.V. Goldenkova-Pavlova¹

¹K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia,
irengold58@gmail.com

²Baku State University, Baku, Azerbaijan; *orkhan@bioset.org*

Abstract. Since the dawn of genetic engineering epoche dissonance between mRNA and protein levels worries a lot of researchers. Due to a set of different reasons the main emphasis in the investigations was made only on analysis of promoters activity. However translation as a stage suggests more precision tools for heterologous genes control. In this paper we consider only little group of approaches for designing of fine tuning plant systems of heterologous gene expression.

Keywords: *translation, transgenic plants, mRNA, regulatory elements*