

УДК: 631.811.98 75.117.2.577.2.08

## ИЗМЕНЕНИЕ ПОПУЛЯЦИЙ ФУНКЦИОНАЛЬНО АКТИВНЫХ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ мРНК В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ БЕСКЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМ ПРОТЕИНОВОГО СИНТЕЗА

В. А. Цыганкова<sup>1</sup>      <sup>1</sup>Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев  
Л. И. Мусатенко<sup>2</sup>  
С. П. Пономаренко<sup>3</sup>    <sup>2</sup>Институт ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины, Киев  
Л. А. Галкина<sup>1</sup>  
Я. В. Андрусевич<sup>1</sup>    <sup>3</sup>Государственное предприятие «Межведомственный научно-технологический центр «Агробиотех» НАН и МОЗ Украины, Киев  
А. П. Галкин<sup>1</sup>

E-mail: sponom@ukr.net

В бесклеточных системах протеинового синтеза *in vitro* из проростков пшеницы изучена протеинсинтезирующая активность поли(А)<sup>+</sup>РНК зародышевых осей проростков фасоли без и с обработкой регуляторами роста. Обнаружено, что препараты мРНК, выделенные из растений со стимулируемым ростом как синтетическим (ивином), так и регуляторами природного происхождения (эмистимом, биоланом), обеспечивают более высокий уровень биосинтеза протеина по сравнению с контролем. мРНК, полученные из растений со стимулируемым природными регуляторами ростом, характеризуются более высоким потенциалом в стимуляции синтеза протеина *in vitro*, а также пролонгированной протеинсинтезирующей активностью по сравнению с синтетическим препаратом. Предполагается, что указанные отличия интенсивности и длительности биосинтеза протеина связаны с обнаруженной ранее разницей в популяциях мРНК из контрольных растений и растений со стимулируемым регуляторами ростом.

**Ключевые слова:** бесклеточная система протеинового синтеза из проростков пшеницы, регуляторы роста растений, протеинсинтезирующая активность мРНК *in vitro*.

В настоящее время для получения лекарственных препаратов пептидной или протеиновой природы (интерферонов, антигенов, антител, гормональных препаратов) широко применяется биотехнология на основе генетической инженерии (выделение и клонирование генов, получение кДНК, введение генов в чужеродные про- или эукариотические клетки и наработка продукта протеиновой природы в случае происходящей экспрессии введенных генов — «генов интереса» в трансформированных клетках). Несмотря на существенные успехи, достигнутые в области генно-инженерной биотехнологии, этот подход имеет и свои ограничения: 1) не все гены экспрессируются в чужом окружении из-за несоответствия элементов регуляции реци-

пиентных клеток и донорских генов; 2) экспрессии полицистронных генов (и соответственно мРНК) пока достичь не удалось; 3) не происходит посттрансляционная модификация и формирование структуры многомерных протеинов высших эукариот в бактериальных клетках.

В качестве альтернативы генно-инженерной биотехнологии получения лекарственных протеинов можно использовать бесклеточные системы протеинового синтеза, в которых при обеспечении оптимальных условий возможна наработка протеинов как простых, так и со сложной структурой с устранением всех барьеров несовместимости для трансляции мРНК, программирующих синтез лекарственного протеина. Однако,

несмотря на то, что этот методический подход был предложен гораздо раньше, чем генно-инженерный, детальные разработки возможностей его широкого практического использования не проводились.

В настоящей работе мы рассматриваем суть этой проблемы с точки зрения регуляторики и последовательности процессов, с которыми может быть сопряжен синтез протеина в бесклеточных системах с внесением в них для трансляции не индивидуальных, а суммарных препаратов мРНК, содержащих мРНК для синтеза не только планируемого протеина, но и всей гаммы протеинов клеток.

Впервые такие опыты были успешно поставлены еще в конце 60-х годов прошлого века (краткая информация о них приведена ниже). Целью этой работы является рассмотрение сложной системы регуляции процессов трансляции в бесклеточных системах биосинтеза протеинов, опираясь на современные знания о последовательности механизмов, происходящих в клетках, вовлекаемых в трансляцию каждой из молекул мРНК, присутствующей в суммарной популяции мРНК.

В связи с возрастающим применением физиологически активных соединений в растениеводстве весьма актуальным является исследование их влияния на генетический аппарат клеток растений. Одним из главных критериев оценки действия тех или иных соединений, в том числе регуляторов роста, на геном клеток являются изменения экспрессии генов, включающие процессы транскрипции, процессинг РНК, перенос из ядра в цитоплазму «зрелых» транскриптов (в виде мРНК и рРНК) и трансляции мРНК на рибосомах цитоплазмы.

В предыдущей работе [1] было установлено, что под воздействием регуляторов роста появляются значительные различия в популяциях мРНК, выделенных из клеток контрольных и обработанных регуляторами роста растений. Цель работы состояла в выяснении вопроса, каким образом эти различия проявляются в программируемых мРНК процессах биосинтеза протеинов.

В клетках растений мРНК-частицы [2], перешедшие из ядра в цитоплазму, являются информосомами двух классов: те, что сразу включаются в биосинтез протеина с формированием полирибосом из мРНК и рибосом, и те, которые откладываются в запас — запасные или резервные мРНК, используемые на дальнейших стадиях онтогенеза растений. При переходе информосом в цитоплазму

частично изменяется состав их протеинов, а именно: появляются протеины, которые обеспечивают трансляцию мРНК, и исчезают протеины, обеспечивающие транспорт мРНК из ядра в цитоплазму.

Таким образом, препарат цитоплазматических поли(А)<sup>+</sup>мРНК представляет собой полный набор копий генов (за исключением некоторых поли(А)<sup>-</sup>мРНК, в частности гистоновых мРНК), которые экспрессируются на том или ином этапе онтогенеза растений. Методами молекулярной гибридизации кДНК на определенном этапе онтогенеза с мРНК на других стадиях онтогенеза или с мРНК, выделенных из клеток организмов, находившихся под воздействием тех или иных факторов (например, регуляторов роста), можно определить степень гомологии (или отличий) в популяциях мРНК, с которых осуществляется синтез специфических протеинов.

Ранее нами было показано [1], что под воздействием синтетических и природных регуляторов роста появляются значительные, по сравнению с контролем, отличия в наборе мРНК из клеток опытных растений, которые зависят от природы регулятора роста. Важно знать, каким образом эти отличия будут опосредоваться на конечных продуктах экспрессии генов — протеинах и уровнях протеинсинтезирующей активности разных по своему набору мРНК. Считается, что наиболее целесообразным для решения этих вопросов является использование бесклеточных систем протеинового синтеза, с помощью которых можно получить на них прямые ответы благодаря исключению других факторов регуляции биосинтеза протеина в целостном организме.

В этой работе была поставлена задача: определить, каким образом обнаруженные нами различия между популяциями цитоплазматических мРНК, выделенных из растений, обработанных разными регуляторами роста, опосредуются на уровне и продолжительности синтеза протеина в бесклеточных системах.

## Материалы и методы

**Семена растений и условия их проращивания.** В экспериментах были использованы 4-дневные проростки, полученные из семян фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.) сорта Белозерная. Стерилизованные этанолом семена проращивали в термостате при температуре 26 °С; инкубация семян осуществлялась между листами фильтровальной

бумаги, смоченной дистиллированной водой или 0,1% -ми растворами регуляторов роста растений: ивином, эмистиком, аверкомом. После этого зародышевые оси отделяли от семядолей, промывали дистиллированной водой и использовали для выделения РНК.

**Выделение суммарного препарата РНК.**

Ткань зародышевых осей фасоли разрушали в буферном растворе 1 (0,05М трис-НСl, рН 7,6; 0,01М MgCl<sub>2</sub>; 0,06 М КСl; 1% -й ДДС-На и 4 М гуанидинтиоцианат) [3]. Полученный лизат двукратно обрабатывали горячим (80 °С) водонасыщенным фенолом с хлороформом; РНК из водной фазы осаждали этанолом [4].

Осадок РНК растворяли в буфере, содержащем 0,025 М трис-НСl, рН 8,1, и 0,025 М NaCl [5]. Раствор охлаждали и к одному его объему добавляли равный объем 2,5 М калийфосфатного буфера, рН 8,0, и один объем 2-метоксиэтанола для удаления (осаждения) полисахаридов. Смесь энергично встряхивали при 2 °С и центрифугировали на протяжении 5 мин при 10 000–12 000 g. Прозрачный верхний слой осторожно отбирали и смешивали с равным объемом 0,2 М ацетата натрия, после чего РНК осаждали добавлением при 2 °С 1% раствора цетавлона (цетилтриметиламмоний бромида) в количестве 0,5 мл на 1 мл верхней фазы после центрифугирования. Суспензию инкубировали при 2 °С на протяжении 5 мин, осадок собирали центрифугированием в течение 5 мин при 10 000–12 000 g. Надосадочную жидкость сливали, а осадок промывали дважды 70% -м этиловым спиртом, содержащим 0,1 М ацетат натрия, для удаления цетавлона и перехода РНК в натриевую соль. Осадок после спиртовых промывок сохраняли при низкой температуре (–70 °С).

Степень очистки выделенных препаратов РНК определяли на спектрофотометре, измеряя соотношение A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> и A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub>, которое было ≥ 1,9 и ≥ 2,3 соответственно, что свидетельствует о высокой степени очистки выделенных РНК, практически свободных от протеинов и полисахаридов.

**Отделение поли(А)<sup>+</sup>РНК от поли(А)<sup>-</sup>РНК** проводили путем хроматографии суммарных препаратов РНК на олиго(dT)-целлюлозных колонках [3, 4, 6]. Колонки готовили, заливая их олиго(dT)-целлюлозной пульпой, суспензированной в буфере Б (2,0 мМ трис-НСl, рН 7,4, 0,1 М NaCl, 1 мМ ЭДТА), перемешивали, автоклавировали, затем добавляли 0,1% ДДС-На в стерильную одноразовую стеклянную колонку объемом 5 мл со стекловолнистой упаковкой (автоклави-

рованной) на дне колонки. Через колонку пропускали 3 мл 0,1 М NaOH с 5 мМ ЭДТА, затем колонку промывали H<sub>2</sub>O для уменьшения рН до 8 (по показателю рН бумаги). После этого колонку уравнивали 5 мл буфера А (40 мМ трис-НСl, рН 7,4, 1 М NaCl, 1 мМ ЭДТА), смешивали и автоклавировали, затем добавляли ДДС-На до 0,1% .

Пробу РНК (10 мг) растворяли в 0,14 М NaCl, нагревали до 65 °С в течение 5 мин с целью разрушения дуплексов. Затем добавляли 500 мкл буфера А, нагретого до 65 °С, смешивали и охлаждали до комнатной температуры на протяжении 2 мин. 1 мл этой пробы вносили в колонку, элюат собирали, снова нагревали до 65 °С в течение 5 мин, охлаждали до комнатной температуры 2 мин. Элюат повторно вносили в колонку, которую затем промывали 5 мл буфера Б. Элюат, который не содержал поли(А)<sup>+</sup>РНК, удаляли. Поли(А)<sup>+</sup>РНК с колонки снимали 2–3 объемами буфера следующего состава: 10 мМ трис-НСl (рН 7,5), 1 мМ ЭДТА, 0,05% ДДС-На.

Полимерность выделенной РНК анализировали с помощью электрофореза в 1,5% -м геле агарозы в присутствии 7 М мочевины по методу Локера [7] (гели окрашивали раствором этидиумбромида перед фотографированием фракций РНК в ультрафиолете).

**Трансляцию поли(А)<sup>+</sup>РНК** осуществляли в бесклеточной системе из проростков пшеницы. Функциональную способность мРНК определяли по количеству включения радиоактивной метки в полипептидный материал, используя [<sup>35</sup>S]-метионин в качестве меченой аминокислоты [8, 9]. Полипептиды, синтезированные *de novo* в системе *in vitro*, анализировали методом одномерного гелеэлектрофореза. Полученные гели высушивали с помощью тепловой вакуумной сушилки (ЛКВ, Швеция). Флюорографию гелей осуществляли в соответствии с [10], добавляя флуоресцентный реагент 2,5-дифенилоксазол (ППО) [11], и экспонировали их на протяжении двух месяцев с X-рентгеновской пленкой при –70 °С.

**Состав компонентов бесклеточной системы из проростков пшеницы** [6, 8]. Экстракт из проростков пшеницы в 50 мкл содержал рибосомы, аминоксил тРНК-синтетазы, тРНК, смесь аминокислот (минус метионин) — 4 мкл, 1М калия ацетат — 0–7 мкл, субстрат РНК в H<sub>2</sub>O — 2 мкл, креатинфосфат — 10 мМ, креатинфосфокиназы — 50 мкг/мл, ДТТ — 5 мМ, магния ацетат — 2,5 мМ, калия ацетат — 60 мМ, спермидин — 0,5 мМ, АТР — 1,2 мМ, GTP — 0,1 мМ, NERPES —

12 мМ, [ $^{35}\text{S}$ ] метионин (1,200 Ci/ммоль) при 10 мCi/мл — 2,5 мкл,  $\text{H}_2\text{O}$  — до конечного объема 5,0 мл (конечная концентрация [ $^{35}\text{S}$ ] метионина — 0,5 мCi/мл). Кроме того, в каждую пробу вносили калия ацетат для оптимизации трансляции мРНК. В отдельных опытах добавляли 1 мкл РНКазина из плаценты человека — ингибитора рибонуклеазы (до 40 ед./мкл).

Для преципитации продуктов трансляции в пробы добавляли казаминокислоты, 10% ТХУ и осадок дважды промывали 5% ТХУ, 70%-м этанолом, высушивали и растворяли в муравьиной кислоте. Радиоактивность протеинов определяли в сцинтиляционном счетчике LS 100C (Beckman), используя Millipore AP-15-складчатые стеклофильтры, в сцинтиляторе на основе диоксана, содержащего флуоресцентный реагент 2,5-дифенилоксазол (ППО) [11].

**Выделение РНК-частиц** и их фракционирование в градиенте плотности CsCl осуществляли в соответствии с методами, приведенными в работе [12].

### Результаты и обсуждение

Как уже подчеркивалось, бесклеточная система служит для проверки матричной активности или природной мРНК (поли(А)<sup>+</sup>мРНК), или синтетических полинуклеотидов.

В отделе механизмов трансляции генетической информации Института радиопизики и электроники АН УССР (г. Харьков) группой сотрудников во главе с доктором биологических наук профессором И. Н. Тодоровым еще в середине 60-х годов прошлого века впервые в мире был синтезирован в гетерологичной бесклеточной системе протеинового синтеза (содержащей рибосомы, тРНК, ферменты активации и транспорта аминокислот — аминокил-тРНК синтетазы из бактериальных клеток; АТФ-генерирующая система из печени крыс; препарат мРНК из бычьих аденогипофизов) протеин животного происхождения — адренокортикотропный гормон (АКТГ), состоящий из 39 аминокислотных остатков. Синтезированный протеин по специфическим тестам (стимуляция синтеза кортикостероидов в коре надпочечников *in vitro*; меланоцитстимулирующая активность — потемнение кожи у зеленых лягушек) показывал высокую биологическую активность [13, 14]. Учитывая, что выделенный из аденогипофизов суммарный препарат мРНК содержал матрицы и для синтеза многих других протеинов, интерес представляет изучение всего «спектра» (набора) про-

теинов, синтезированных в бесклеточной системе. Однако в указанных работах авторами это не было сделано.

Разрабатывались также подходы оптимизации условий синтеза нуклеиновых кислот и протеинов в бесклеточных системах [15].

В настоящее время используют 2 типа бесклеточных систем: 1) из проростков пшеницы; 2) из ретикулоцитов кролика [6, 8, 9].

Бесклеточные системы из проростков пшеницы, а также из ретикулоцитов кролика обеспечивают трансляцию *in vitro* широкого спектра вирусных, прокариотических и эукариотических мРНК в протеины [8]. Бесклеточные системы содержат компоненты клеток, необходимых для синтеза протеина: тРНК, рРНК, рибосомы, ферменты активации и транспорта аминокислот, факторы инициации, элонгации и терминации трансляции. Система оптимизируется введением компонентов: фосфокреатинкиназы, фосфокреатина и спермидина для усиления эффективности элонгации полипептидных цепей и, тем самым, для предотвращения преждевременной терминации элонгации, ацетат магния в концентрации, рекомендованной для трансляции большинства видов мРНК [6, 9]. Для инициации трансляции добавляют экзогенные аминокислоты (включая соответствующую меченую аминокислоту) и мРНК. Ацетат калия применяется для обеспечения пригодности бесклеточной системы для трансляции широкого круга мРНК.

В своих опытах для решения поставленных задач мы использовали бесклеточную систему из проростков пшеницы с указанными выше модификациями, которые обеспечивают синтез полноразмерных протеинов.

Суммарная цитоплазматическая мРНК является набором широкого круга матриц как по размеру, так и по функциям, с которых осуществляется синтез огромного количества структурных и функциональных протеинов, в том числе рибосомных и регуляторных (в частности, регуляторов трансляции), а также пептидов, протеинов-ферментов и др. Некоторые авторы [6, 8] обосновывают необходимость добавления в бесклеточную систему ингибиторов РНКаз для предотвращения возможного разрушения РНК матриц, которые вносятся в систему при наличии в ней эндогенных РНКаз, что приводит к синтезу более высокомолекулярных протеинов. Другие авторы считают необязательным добавление в среду ингибиторов РНКаз (например, РНКазина), а вместо этого предлагают 30-минутную преинкубацию бесклеточных систем (до внесения мРНК)

в присутствии добавленной в систему гетерологической РНК (например, тРНК) для «истощения» эндогенных матриц и снижения возможной РНКазной активности.

По нашему мнению, внесение в бесклеточную систему гетерогенной популяции мРНК запускает синтез разнообразных протеинов, в том числе и нуклеаз, которые избирательно разрушают структуры тех или иных поли(А)<sup>+</sup>мРНК по специфическим сайтам (возможно, по типу рестриктаз, фрагментирующих ДНК по специфическим сайтам). Это даст возможность определить продолжительность жизни мРНК в бесклеточных системах в соответствии с имеющимися многочисленными данными литературы о том, что продолжительность жизни разных типов мРНК *in vivo* составляет от нескольких минут до часов и даже суток [6, 16–20].

Возможно, существует широкий спектр специфических РНКаз, разрушающих определенные типы мРНК, детерминируя продолжительность их жизни. Эти внутриклеточные механизмы должны проявляться очевидно не в такой строгой скоординированности, как *in vivo*, но в субординации последовательности синтеза и распада РНКаз соответственно в зависимости от скорости расщепления матриц. Регуляция продолжительности жизни мРНК может также осуществляться путем синтеза защищенных от РНКаз специфических протеинов для тех или иных матриц и скоростью синтеза РНКаз, контролирующей разрушение коротко- и долгоживущих мРНК. В пользу этого свидетельствуют многочисленные данные литературы о наличии в клетках высших эукариот суперсемейств генов РНКаз, разрушающих мРНК с помощью разных механизмов действия [21], которые рассматриваются ниже.

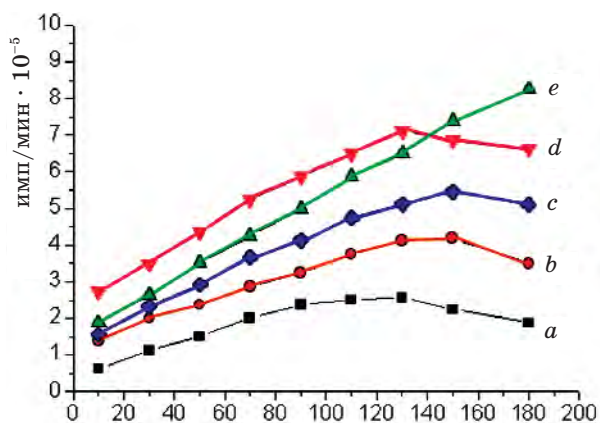
Пролонгированное функционирование мРНК при стимулируемом росте (связанное с формированием увеличенных по размеру по сравнению с нормой тканей и органов и в целом тела растений) очевидно можно объяснить необходимостью наработки значительно большего количества (путем увеличения циклов трансляции) каждого из структурных и функциональных элементов клеток.

Мы использовали классический состав [6, 8] бесклеточных систем из проростков пшеницы. При этом изучали синтез протеина более длительное время, чем это принято, с целью определения времени функционирования мРНК. Для этого через 90 мин в пробы добавляли дополнительно аминокислоты, АТР и ГТР.

Естественно, что в бесклеточных системах, как и в клетках *in vivo*, продолжительность жизни специфических РНКаз должна регулироваться синтезом специфических протеаз, которые последовательно расщепляют молекулы РНКаз после проявления их каталитической активности. Эти процессы осуществляются в определенной согласованности во времени параллельно с синтезом защитных протеинов для долго- и короткоживущих мРНК, что определяется размером мРНК, нуклеотидной последовательностью, возможной респирализацией структуры мРНК (вероятно и образованием шпилечноподобных структур) в процессе инкубации в физиологической среде, а также синтезом соответствующих протеаз. Однако для подтверждения существования такой последовательности рассмотренных биологических процессов необходимо проведение специальных опытов.

Результаты исследований кинетики синтеза протеинов в бесклеточной системе из проростков пшеницы на матрицах поли(А)<sup>+</sup>РНК из контрольных растений и растений со стимулируемым разными регуляторами ростом представлены на рис. 1. По интегральным показателям скорости и длительности синтеза суммарных протеинов наблюдаются существенные отличия. Препараты мРНК, выделенные из растений со стимулированным ростом как синтетическим (ивином), так и регуляторами природного происхождения (эмистимом, аверкомом), обеспечивают, как и в опытах *in vivo* [1], более высокий уровень биосинтеза протеина по сравнению с контролем (рис. 1, кривая *a*) в бесклеточных системах *in vitro* (рис. 1, кривые *b*, *c*, *d*, *e*). мРНК, полученные из растений со стимулируемым природными регуляторами ростом (кривые *c*, *d*, *e*), обладают относительно высоким потенциалом в стимуляции синтеза протеина *in vitro*, а также более пролонгированной протеинсинтезирующей активностью по сравнению с синтетическим препаратом (кривая *b*).

Следует отметить, что препараты поли(А)<sup>+</sup>РНК из растений, которые обрабатывали аверкомом совместно с эмистимом (кривая *c*), проявляют более низкую протеинсинтетическую активность по сравнению с индивидуальными препаратами (кривые *e*, *d*), вероятно за счет конкуренции, возникающей при связывании с сайтами рибосом близкими по структуре мРНК из растений, обработанных аверкомом и эмистимом. Можно предположить, что указанные отличия в уровнях интенсивности и длительности



**Рис. 1. Кинетика включения  $[^{35}\text{S}]$ -метионина в ТХУ-нерастворимый материал в бесклеточной системе из проростков пшеницы с использованием в качестве матрицы поли(A) $^+$ РНК:**

*a* — контроль; включение метки в полипептиды в присутствии в среде поли(A) $^+$ РНК из растений, обработанных соответственно ивином (*b*), эмистимом (*e*), аверкомом (*d*) и совместно аверкомом и эмистимом (*c*)

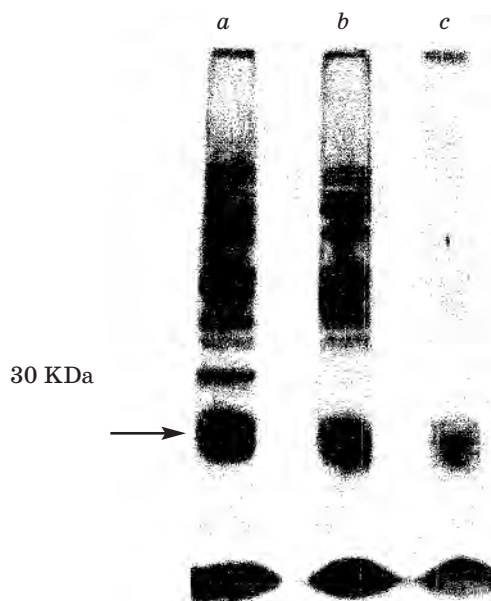
биосинтеза протеина связаны с обнаруженными нами ранее [1] отличиями в популяциях мРНК из контрольных растений и растений, обработанных регуляторами роста.

Возможно, в популяциях мРНК матриц из опытных растений присутствуют мРНК с повышенной функциональной активностью для быстрой наработки определенных ключевых протеинов при ускоренном росте растений (например, протеинов рибосом, активаторов трансляции, структурных протеинов клеточной стенки или ферментов синтеза фитогормонов и др.). Очевидно, скорость и длительность трансляции молекул мРНК определяется прежде всего ее структурными особенностями.

Следует отметить, что добавление в параллельных опытах в пробы ингибитора РНКаз РНКазина приводило к увеличению уровня протеинового синтеза и его длительности начиная с 30-й мин инкубации (возможно за счет нарушения указанной выше природной последовательности распада каждой из молекул мРНК).

На рис. 2 представлены результаты гелеэлектрофореза с последующей флюорографией протеинов, синтезированных в бесклеточной системе из проростков пшеницы. По характеру распределения протеинов в геле можно сделать вывод, что в бесклеточной системе синтезируется весьма гетерогенный по молекулярной массе набор протеинов (от высоко- до низкомолекулярных), причем четких границ между отдельными фракциями нет, по-видимому за счет распределения

протеинов общими массивами, что приводит к перекрыванию радиоактивных треков с протеинов, расположенных рядом в геле, и соответственно к исчезновению границ между отдельными фракциями. Это свидетельствует о высокой функциональной активности выделенных нами препаратов поли(A) $^+$ мРНК. Очевидно, что градиент молекулярных масс протеинов является отражением многообразия молекулярных масс функционально активных мРНК.



**Рис. 2. Флюорографический анализ электрофоретического «спектра» полипептидов, синтезированных с помощью поли(A) $^+$ РНК в бесклеточной системе из проростков пшеницы:**

*a* — поли(A) $^+$ РНК из клеток зародышевых осей фасоли при обработке эмистимом, *b* — аверкомом; *c* — включение метки в синтезированные полипептиды без добавления в среду поли(A) $^+$ РНК (контроль)

Чтобы установить, происходит ли синтез протеаз наряду со структурными протеинами, в наших опытах в бесклеточную систему вносили ингибитор протеаз трипсинового типа — фенолметилсульфонилфторид. Гель-фильтрация продуктов трансляции на сефадексе G-25 четко показала, что добавление ингибитора приводит к существенному изменению соотношения высокомолекулярных и низкомолекулярных протеинов в пользу высокомолекулярных (приблизительно в 2 раза). С нашей точки зрения, это свидетельствует о сбалансированности синтеза и распада протеинов в бесклеточных системах, а не только, как считалось ранее, является результатом возможного разруше-

ния эндогенной РНКазой мРНК матриц. Для того, чтобы представить механизм действия регуляторов роста на функции генетического аппарата клеток растений, необходимо проанализировать имеющиеся данные литературы о процессах реализации генетической информации (закодированной в ДНК) на уровне трансляции.

Известно, что мРНК в процессах трансляции представляет нуклеопротеидный комплекс. В период своего существования мРНК эукариот ассоциируется с разнообразными факторами инициации трансляции, некоторые из них образуют стабильные связи с мРНК, в то время как другие находятся в динамическом состоянии. Эти данные приведены в обзорах [22, 23]. мРНК в комплексе с дифференцированными по функциям протеинами и разными классами малых некодирующих микроРНК (miRNA), малыми интерферирующими РНК (siRNAs), ассоциированными с повторяющимися последовательностями, малыми интерферирующими РНК (rasiRNAs) образуют мессенджер-рибонуклеиновые частицы (мРНП) [24, 25]. Малые РНК (длиной от 21 до 30 нуклеотидов) принимают участие на всех уровнях реализации генетической программы у эукариот. Для процессинга двуцепочечных РНК (dsRNA) необходимы малые РНК и особые классы протеинов: специфичные для dsRNA эндонуклеазы, в частности DICER-эндонуклеаза [23], dsRNA-связывающие протеины, называемые Argonaute-протеинами [26, 27]. Argonaute-протеины содержат два РНК-связывающих домена: Piwi-домен, к которому присоединяются малые РНК своим 5'-концом, и PAZ-домен, связывающий одноцепочечный 3'-конец малых РНК [23]. Эндонуклеаза, расщепляющая молекулы-мишени РНК, располагается на Piwi-домене, и этот домен является гомологичным домену, присутствующему у эндонуклеазы РНК — РНКазы H [23, 26].

Малые РНК совместно с ассоциированными с ними протеинами действуют различными «РНК-молчащими» путями, регулируя транскрипцию, структуру хроматина, целостность генома, мРНК-стабильность, процесс трансляции. РНК могут быть небольшими, но для их образования, созревания и регуляторной функции требуется активность большого количества протеинов.

Эти протеины содержат РНК-связывающий домен, РНК-определяющий мотив (RRM); другие обычно распространенные РНК-связывающие мотивы включают KH-домен, суперспирализованный РНК-связывающий

домен (dsRBD), zinc-finger домены, RGG-боксы и Pumilio-гомологичные домены, которые обнаружены в PUF-протеинах — семействе цитоплазматических мРНП-протеинов, контролирующих трансляцию и стабильность мРНК через связывающие сайты в 3'-нетрансляционных регионах (UTRs) [22, 28, 29]. мРНП-компоненты имеют элементы, найденные практически в каждой мРНК эукариот: 7-метилгуанозинный кэп или ядерный 5'-кэпсвязывающий комплекс (СВК 20/80), либо большое количество кэп-аналогов, присутствующих на 5'-конце всех РНК-полимеразных транскриптов, а также поли (А)<sup>+</sup>-последовательности на 3'-концах мРНК [30, 31].

К числу наиболее распространенных последовательностей в 3'-нетрансляционных регионах (UTRs) мРНК относятся аденилат/уридилатобогатные элементы (AREs), детерминирующие стабильность мРНК и кодирующие протоонкогены, ядерные транскрипционные факторы и цитокины [32]. На AREs-направленную дегградацию мРНК оказывают влияние многие экзогенные факторы, включая форбольные эфиры, ионофоры кальция, цитокины и ингибиторы транскрипции. Таким образом, AREs играют существенную роль в регуляции экспрессии генов на стадиях деления и дифференциации клеток, а также принимают участие в иммунном ответе.

Существует и другой распространенный класс Y-боксы протеинов, а также экзон-объединяющий комплекс (EJC), которые распространены на протяжении всей цепи транскриптов независимо от последовательностей нуклеотидов [33, 34].

Индивидуальные мРНП-компоненты могут служить как адаптеры, позволяющие мРНК взаимодействовать с многочисленными внутриклеточными факторами, которые опосредствуют их субклеточную локализацию, трансляцию и разрушение, а также с разными системами передачи сигналов. Некоторые адаптеры способствуют таким взаимодействиям и соответственно исполняют роль активаторов разных процессов, тогда как другие нарушают взаимодействия и действуют в качестве репрессоров.

Большинство компонентов комплексов цитоплазматических мРНП вначале собираются в ядре на стадии транскрипции и процессинга пре-мРНК. К таким факторам относятся нуклеоцитоплазматические мобильные гЯРНП (hnRNP — heterogeneous nuclear RNP) и SR (serine/arginine rich) протеины, а также EJC-комплекс [22,

34–36]. Как гяРНП, так и SR-протеины имеют РНК-связывающие домены [35]; SR-протеины дополнительно имеют домен, обогащенный серин-аргининовыми дипептидами, который может взаимодействовать с разнообразными протеинами или РНК и подвергаться динамическому фосфорилированию [36]. ЕЈС — вид протеинов, присоединяющийся к мРНК в процессе пре-мРНК сплайсинга. Следует отметить, что локализация ЕЈС внутри ORF (открытой рамки считывания) последовательностей мРНК может положительно влиять на трансляцию, тогда как присутствие ЕЈС в 3′-нетрансляционных регионах (UTR<sub>3</sub>) способствует быстрому разрушению мРНК опосредованно через антисмысловой мРНК-распад (nonsense-mediated mRNA decay — NMD) [34]. Обнаружено, что некоторые SR-протеины могут объединять эти эффекты, хотя преимущественное действие каждого из них зависит от места локализации SR на мРНК [36].

В процессе транспорта мРНП из ядра в цитоплазму через ядерный комплекс пор (nuclear pore complex — NPC) принимают участие такие ядерные протеины, как адаптеры экспорта мРНК, служащие для связывания мРНК с одним или несколькими рецепторными протеинами — компонентами NPC. Значительная роль в экспорте мРНК в цитоплазму принадлежит также ядерным поли(А)-связывающим протеинам PABPN1 и PABPCs, которые являются посредниками во взаимодействии мРНК с рецепторными протеинами — компонентами NPC [22]. После транспортировки мРНП в цитоплазму эти протеины отделяются от мРНК посредством фосфорилирования либо при участии семейства DEH/D-бок-протеинов, принадлежащих к РНК-связывающим нуклеотидным трифосфатазам, которые могут удалять вторичные структуры или протеины от мРНК [37].

Экспортирующиеся в цитоплазму мРНП функционально взаимодействуют через присутствующий в них ядерный 5′кэп-связывающий комплекс (CBC 20/80) с фактором инициации трансляции 4G (eIF4G), который служит посредником для присоединения к мРНП малых рибосомных субъединиц и инициации 5′-3′ сканирования (трансляции) от 5′ UTR до AUG-стартового кодона [38]. Как только стартовый кодон идентифицирован, большие рибосомные субъединицы присоединяются к мРНП и формируют 80S-комплекс, ответственный за биосинтез протеина.

Другие большие изменения в составе мРНП происходят в течение первого пасса-

жа 80S-рибосомы вдоль мРНК — «пионерский раунд» трансляции [39]. При прохождении мРНК между двух рибосомных субъединиц отделяются некоторые ядерные мРНП-протеины, такие как EЈCs, расположенные внутри ORF. Протеины CBC 20/80 и PABPN1 также заменяются мажорным цитоплазматическим кэп-связывающим eIF4E и PABPCs протеинами соответственно. Как только перестройки в структуре мРНК завершены, сеть одновременных взаимодействий между 5′-кэпом, eIF4E, eIF4G, PABPCs и поли(А)-концом проявляется в функциональном круговороте передачи сигналов; эти перестройки облегчают трансляционный контроль регуляторными элементами в 3′UTR, способствуют эффективности реинициации рибосом в период активной трансляции, а также защищают оба конца транскриптов мРНК от деградации [31].

Однако не все экспортированные в цитоплазму мРНК сразу пополняют трансляционно активный пул, часть мРНК может аккумулироваться в виде запасных мРНК, необходимых для последующих стадий развития. Одним из ключевых механизмов торможения трансляционной активности мРНК является существенное сокращение их поли(А)-конца от начальной ядерной длины (200–250 аденозинов) до 20–40 оснований (последовательностей). Это сокращение опосредуется протеином CPEB, который узнает цитоплазматический элемент полиаденилирования (CPE) в 3′UTR. Протеин CPEB также взаимодействует с Maskin-протеином, являющимся конкурентом протеину eIF4G за связь с протеином eIF4E [22]. Таким образом, взаимодействие Maskin-eIF4E протеинов ингибирует трансляцию [40]. Для обратного процесса начала трансляции протеин CPEB переходит в фосфорилированную форму и стимулирует удлинение поли(А)-конца цитоплазматическими поли(А)-полимеразами. Удлиненный поли(А)-конец связывается с протеином PABPCs, который образует комплекс с протеином eIF4G для инициации трансляции [22, 40].

Взаимодействие CPEB-Maskin-eIF4E является одним из примеров трансляционной регуляции с участием «4E ингибиторных протеинов» путем eIF4E-eIF4G-взаимодействия. Некоторые 4E протеины-ингибиторы подобно Maskin-протеину локализуются только в cis-элементах 3′-UTR и таким образом функционируют только в мРНК, содержащих этот элемент. Другой класс «Е4-связывающих протеинов» (4E-BPs) имеет неограниченную локализацию и, следова-



тельно, действует более глобально, взаимодействуя с любыми доступными eIF4E протеинами; в результате происходит ингибирование процесса трансляции мРНК, для которого необходим высокий уровень eIF4E. Этот вариант трансляционной регуляторной схемы является основополагающим для процесса контроля роста и развития клеток, а также ключевым в супрессии роста раковых клеток у эукариот [40].

Период существования мРНК всех эукариотических организмов ограничен и зависит от изменений внутри- и внеклеточных факторов. В ключевом механизме деградации мРНК принимают главное участие энзимы рибонуклеазы (РНКазы), деаденилазы, отщепляющие от мРНК 3'-поли(А)-конец, тогда как 5'-кэп удаляется специфическими энзимами декэпирования [22]. Все «тело» мРНК окончательно деградирует под действием 5' → 3' и 3' → 5' экзо- и эндонуклеаз.

РНКазы у высших растений являются продуктами суперсемейства генов этих энзимов, выполняющих классическую роль в процессинге и деградации мРНК молекул на всех фазах онтогенеза растений, а также участвующих в защите растений от патогенов и других неблагоприятных факторов окружающей среды. На активность РНКаз значительное влияние могут оказывать фитогормоны, изменяя экспрессию генов РНКаз [21, 41, 42]. В настоящее время механизм деградации мРНК по специфическим последовательностям, осуществляемый посредством РНКаз, изучен недостаточно. Деградация большинства мРНК может выполняться РНКазами, специфичность которых определяется другими эффекторными молекулами [21]. К этим эффекторам относятся РНК-связывающие протеины, факторы РНК-локализации или ингибиторы РНКаз. Узнавание специфических нестабильных последовательностей мРНК эффекторными молекулами способно превращать соответствующие транскрипты в более эффективные субстраты для большинства РНКаз. Другой аспект РНК-метаболизма, такой как полиаденилирование, является приоритетным для специфических факторов, которые могут обеспечивать неспецифические энзимы способностью распознавать и различать транскрипты, содержащие специфические последовательности, от транскриптов, у которых эти последовательности отсутствуют [43].

Большинство цитоплазматических транскриптов могут быть защищены от быстрой деградации 5'-кэпом и поли(А)-концом. Удаление кэпа нуклеотидпирофосфатазой [44],

а поли(А)-хвоста поли(А)-нуклеазой [45], или генерация внутреннего расщепления сайт-специфической эндорибонуклеазой [21] может затем служить ограничивающим фактором для разрушения мРНК неспецифическими РНКазами. Например, в клетках растений и дрожжей активность РНКазы — поли(А)-нуклеазы (PAN) зависит от присутствия в молекуле мРНК поли(А)-связывающего протеина (PAB) [45].

Существует также механизм эндонуклеолитической деградации через расщепление по специфическим последовательностям мРНК с участием РНК-индуцированного молчащего комплекса (RISC) в ассоциации с эндогенными малыми интерферирующими РНК (siRNA) [22, 23, 46]. Образуя комплексы с членами семейства Argonaute-протеинов, miRNA и siRNA проявляют активность энзимов, расщепляющих молекулы-мишени мРНК по фосфодиэфирным связям на два фрагмента, причем для этого процесса необходим аденозинтрифосфат (АТФ) [47]. Затем расщепленный 3'-фрагмент разрушается в цитоплазме экзонуклеазой Xrn1, тогда как 5'-фрагмент деградирует в экзосоме, представляющей комплекс энзимов экзонуклеаз, расщепляющих мРНК по 3'- и 5'-концам [48]. У растений и животных в процессе расщепления мРНК с участием miRNA происходит последовательное добавление короткого полиуридинового [poly(U)] хвоста к 3'- и 5'-расщепленным фрагментам [49]. Добавление poly(U) коррелирует с декэпированием и 5' → 3'-разрушением фрагментов расщепления РНК, что свидетельствует об альтернативном участии экзосомы в деградации 5'-продуктов расщепления.

Общий механизм мРНК-деградации также включает элиминацию aberrантных мРНК, которые имеют преждевременный трансляционный стоп-сигнал (антисмысловые мРНК) или у которых отсутствует трансляционный сигнал в целом (антистоп-мРНК) [22, 39, 50]. Такие дефектные мРНК могут появляться как следствие через разные механизмы, включая генетические мутации, неправильный сплайсинг, а также преждевременное полиаденилирование. Эффективная элиминация этих мРНК защищает клетки от потенциально вредных последствий не полностью синтезированных протеинов. Для узнавания антисмысловых и антистоп-мРНК необходимо их функциональное сцепление с рибосомами, которые не имеют возможности завершать процесс трансляции соответствующим образом на антисмысловых и антистоп-мРНК [50, 51]. Такая некорректная

терминация приводит к восстановлению процесса разрушения, преимущественно через взаимодействие с рибосомными высвобождающимися факторами или через незанятый А-сайт тРНК-связывающего «кармана» на рибосоме. Установлено также, что в элиминации aberrantных мРНК принимают участие члены суперсемейства энзимов полимераз  $\beta$ -нуклеотидилтрансфераз, которые добавляют поли(А)-хвост (являющийся сигналом деградации) к aberrantным мРНК, превращая их таким образом в мишень для разрушения в ядерной экзосоме — комплексе энзимов деградации РНК [52–54].

Если в клетках растений процессы деградации каждой из молекул мРНК контролируются генами, которые кодируют специфические РНКазы к каждой структуре мРНК (мРНК), то полученные нами факты повышения стойкости растений (с помощью регуляторов роста) к вирусным патогенам можно объяснить активацией регуляторами роста экспрессии генов синтеза специфических РНКаз — катализаторов деградации (разрушения) вирусных мРНК и других мРНК (мРНК) патогенов. Действительно, когда в среду, на которой выращивали растения, добавляли ингибиторы РНКаз (ванадил-рибонуклеозидные комплексы) [6, 8, 9], резко снижалась стойкость растений к патогенам.

Данные последних лет свидетельствуют о том, что большинство мРНК функционируют в специфических субклеточных структурах или в группах с другими мРНК; соответственно и процесс деградации мРНК эукариот происходит в специфических местах — в дискретном цитоплазматическом пространстве. Цитоплазматические процессинг-тела (P-bodies — PBs) формируют агрегаты вокруг мРНК, которые не принимают активного участия в трансляции [55]. Объединенные с этими структурами мРНК удаляются из трансляционно активного пула; одним из механизмов этого процесса является взаимодействие miRNA с RISC-комплексом [56]. Предполагается, что первоначально miRNA репрессируют трансляцию на этапе присоединения рибосом к мРНК, т. е. на стадии инициации трансляции [57]. Альтернативно они могут «замораживать» рибосомы на мРНК, останавливая элонгацию растущей протеиновой цепи. Репрессия трансляции посредством miRNA не только включает ингибирование биосинтеза белка, но и определяет стабильность мРНК [23]. Малые РНК совместно с Argonaute-протеинами связываются с мРНК и далее передвигаются из цитозоля в сайты разруше-

ния мРНК, называемые «P-bodies» [56, 58]. Попадая в P-тельца, мРНК деградируют, высвобождая miRNA-протеиновый комплекс, который снова возвращается в цитозоль и начинает новый раунд репрессии мРНК.

Другими структурами, которые инактивируют трансляционную активность мРНК, являются стрессовые «гранулы» (SGs) — цитоплазматические структуры, в состав которых входят трансляционно неактивные мРНК, 40S рибосомные субъединицы и мРНК-связывающие протеины TIA-1 и TIAR. Прионподобные домены в TIA-1/TIAR могут самоолигомеризовываться и способствовать SG-сборке [22, 59]. Хотя трансляционный «арест» многих мРНК в условиях стресса служит защитной и адаптивной реакцией организма, в этот период происходит селективная трансляция протеинов «температурного шока», а также некоторых транскрипционных факторов, что позволяет клетке возобновлять стресс-индуцированные повреждения, сохраняя анаболическую энергию. По окончании стресса SG<sub>s</sub> распадаются, а изолированные мРНК пополняют трансляционно активный пул или направляются для деградации в PBs [60].

Достижения последних лет существенно дополнили представление о том, каким образом эукариотические клетки регулируют экспрессию генов на мРНК-уровнях.

Мы предположили, что в бесклеточной системе могут, как и *in vivo*, образовываться (самоорганизацией или самосборкой) функционально активные мРНК за счет синтеза *in vitro* соответствующих протеинов. Для проверки этого из инкубационной среды были изолированы препараты РНК-частиц (вероятно, смесь рибосомных и матричных РНК), которые затем фракционировали в градиенте плотности CsCl. На рис. 3, А представлено распределение препаратов необработанных РНК-частиц, а 3, Б — обработанных малыми дозами бычьей РНКазы (2 мкг/мл), при которых, как видно, рибосомные РНК не разрушаются, а матричные РНК разрушаются полностью.

Этот результат указывает на возможность формирования в бесклеточных системах протеинового синтеза (по аналогии с процессами *in vivo*) как рибосомных, так и матричных функционально активных РНК.

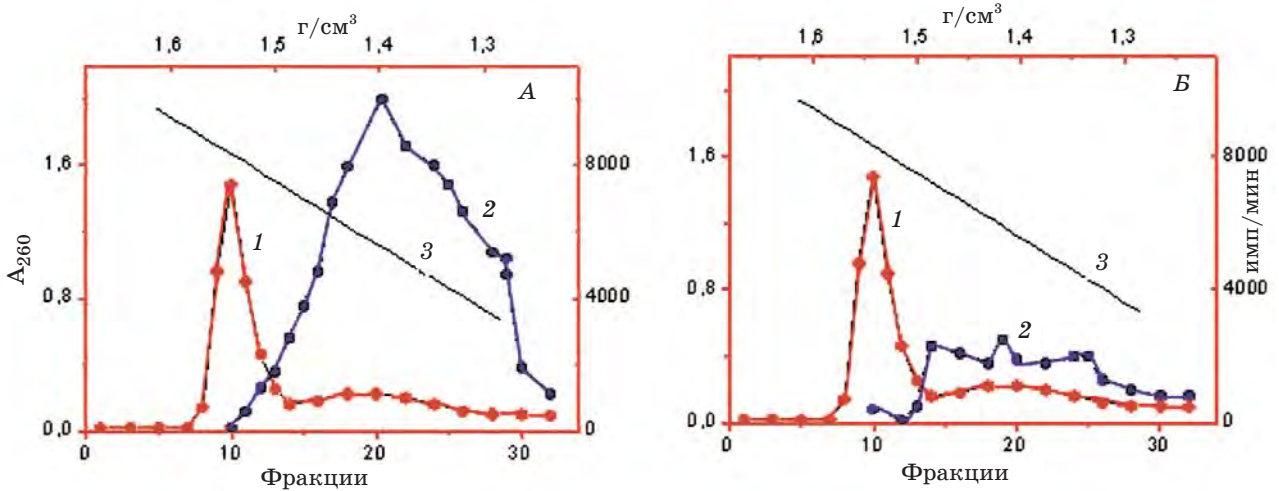


Рис. 3. Распределение в градиенте плотности CsCl РНП-частиц из бесклеточной системы протеинового синтеза пшеницы:

1 — оптическая плотность рРНП; 2 — радиоактивность мРНП; 3 — градиент плотности CsCl; А — РНП-частицы без обработки; В — после обработки РНказой

Приведенные аргументы убедительно показывают, что бесклеточные системы протеинового синтеза можно использовать для изучения регуляции генетических процессов (экспрессии генов) на уровне трансляции

генетической информации. Этот методический прием вероятно может быть использован для: 1) отбора эффективных регуляторов роста; 2) синтеза (наработки) протеинов, применяемых в медицине.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Галкін А. П., Циганкова В. А., Пономаренко С. П. та ін. Особливості змін експресії генів в клітинах рослин під впливом екзогенних регуляторів росту / Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку. Укр. т-во фізіологів рослин. — К.: Логос, 2009. — С. 576–584.
2. Айтхожин М. А., Исаков Б. К. Информосомы растений. — Алма-Ата: Наука, 1982. — 182 с.
3. Davis L. G., Dibner M. D., Battley J. F. Basic methods in molecular biology. — New York: Elsevier Science Publishing Co., Inc., 1986. — 388 p.
4. Aviv H., Leder P. Purification of biologically active messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose // Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. — 1972.— V. 69, N 6. — P. 1408–1412.
5. Методы биологии развития / Под ред. Детлафа Т. А., Бродского В. Я., Гаузе Г. Г. — М.: Наука, 1974. — 619 с.
6. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual. — New York: Cold Spring Harbor Lab, 1982. — 480 p.
7. Locker J. Analytical and preparative electrophoresis of RNA in agarose-urea // Anal. Biochem. — 1979. — V. 98, N 2. — P. 358–367.
8. Promega protocols and applications guide. Second edition. — USA: Promega Corporation, 1991. — 422 p.
9. Marcus A., Efron D., Week D. P. The wheat embryo cell free system // Meth. Enzymol. — 1974. — V. 30.— P. 749–754.
10. Bonner W. M., Laskey R. A. A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels // Eur. J. Biochem. — 1974. — V. 46, N 1. — P. 83–88.
11. Остерман Л. А. Методы исследований протеинов и нуклеиновых кислот. — М.: Наука, 1981. — 250 с.
12. Мусатенко Л. И., Сытник К. М., Пушкарёв В. М. и др. Исследование биосинтеза цитоплазматической РНК в органах зародышевой оси прорастающих семян фасоли // Физиол. раст. — 1983. — Т. 30, вып. 1. — С. 49–57.
13. Тодоров И. Н., Блок Л. Н., Васильченко В. Н. Синтез адренокортикотропного фактора в бесклеточной системе из *Escherichia coli* В. под влиянием рибонуклеиновой кислоты из бычьих аденогипофизов // ДАН СССР. — 1966. — Т. 167, № 2. — С. 461–463.

14. Тодоров И. Н., Васильченко В. Н., Панкова Г. А. и др. О синтезе вещества адренокортикотропной природы, индуцированном в бесклеточной системе *Escherichia coli* информационной рибонуклеиновой кислотой из бычьих аденогипофизов // Биохимия. — 1967. — Т. 32, вып. 2. — С. 283–292.
15. Тодоров И. Н., Галкин А. П., Васильченко Н. В. и др. О синтезе нуклеиновых кислот в периодически обновляемой бесклеточной системе *E. coli* при введении инфекционной ДНК фага  $\chi$  174 и ДНК фага T2 / Сб. «Молекулярные основы жизненных процессов». — К.: Наук. думка, 1966. — С. 88–93.
16. Сингер М., Берг П. В. Гены и геномы. — М.: Мир, 1998. — Т. 1. — 375 с.
17. Гайцхоки В. С. Информационные РНК клеток животных. — М.: Медицина, 1980. — 200 с.
18. Газарян К. Г., Тарантул В. З. Геном эукариот. — Изд. Моск. ун-та, 1983. — 272 с.
19. Тейлор Д., Грин Н., Стаут В. Биология. — М.: Мир, 2002. — 451 с.
20. Reutmans W. J. M., Caers L. I., Carlier A. R. Some aspects of the synthesis of long-lived messenger ribonucleoproteins in developing rye embryos // *Planta*. — 1979. — V. 144. — P. 485–490.
21. Green P. J. The ribonucleases of higher plants // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* — 1994. — V. 45. — P. 421–445.
22. Moore M. J. From birth to death: The complex lives of eukaryotic mRNAs // *Science*. — 2005. — V. 309. — P. 1514–1518.
23. Zamore P. D., Haley B. Ribo-genome: the big world of small RNAs // *Ibid.* — 2005. — V. 309. — P. 1519–1524.
24. Тищенко Е. Н., Дубровная О. В. Эпигенетическая регуляция. Метилирование ДНК генов и трансгенов растений. — К.: Логос, 2004. — 236 с.
25. Тищенко О. М., Дубровна О. В., Топчий Н. М. Метилування ДНК в онтогенезі рослин. — К.: Логос, 2008. — 264 с.
26. Song J. J., Smith S. K., Hannon G. J., Joshua-Tor L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC Slicer activity // *Science*. — 2004. — V. 305. — P. 1434.
27. Hammond S. M., Boettcher S., Caudy A. A. et al. Argonaute2, a Link Between Genetic and Biochemical Analyses of RNAi // *Science*. — 2001. — V. 293. — P. 1146.
28. Gerber A. P., Herschlag D., Brown P. O. Extensive association of functionally and cytologically related mRNAs with Puf Family RNA-binding proteins in yeast // *Plos Biol.* — 2004. — V. 2. — P. 79.
29. Stefl R., Skrisovska L., Allain F. H. T. RNA sequence- and shape-dependent recognition by proteins in the ribonucleoprotein particle // *EMBO reports*. — 2005. — V. 6. — P. 33–38.
30. Fechter P., Brownlee G. G. Recognition of mRNA cap structures by viral and cellular proteins // *J. Gen. Virol.* — 2005. — V. 86. — P. 1239–1249.
31. Mangus D. A., Evans M. C., Jacobson A. Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression // *Gen. Biol.* — 2003. — V. 4 (7). — P. 223.
32. Chen Chyi-Jing A., Shyu Ann-Bin. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation // *TIBS*. — 1995. — V. 20. — P. 465–470.
33. Skabkin M. A., Kiselyova O. I., Chernov K. G. et al. Structural organization of mRNA complexes with major core mRNP protein YB-1 // *Nucl. Acids Res.* — 2004. — V. 32. — P. 5621–5635.
34. Tange T., Nott A., Moore M. J. The ever-increasing complexities of the exon junction complex // *Curr. Opin. Cell Biol.* — 2004. — V. 16, Issue 3. — P. 279–284.
35. Dreyfuss G., Kim V. N., Kataoka N. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2002. — V. 3. — P. 195.
36. Huang Y., Steitz J. A. Surprises along a Messenger's Journey // *Mol. Cell*. — 2005. — V. 17, Issue 5. — P. 613–615.
37. Rocak S., Linder P. DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2004. — V. 5. — P. 232–241.
38. Lejeune F., Ranganathan A. C., Maquat L. E. eIF4G is required for the pioneer round of translation in mammalian cells // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2004. — V. 11. — P. 992.
39. Maquat L. E. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2004. — V. 5. — P. 89.
40. Richter J. D., Sonenberg N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins // *Nature*. — 2005. — V. 433. — P. 477.
41. Brown P. H., Ho T.-H. Barley aleurone layers secrete a nuclease in response to gibberellic acid // *Plant Physiol.* — 1986. — V. 82. — P. 801–806.
42. Brown P. H., Ho T.-H. Biochemical properties and hormonal regulation of barley nuclease // *Eur. J. Biochem.* — 1987. — V. 168. — P. 357–364.
43. Wickens M. How the messenger got its tail: addition of poly(A) in the nucleus // *Trends Biochem. Sci.* — 1990. — V. 15. — P. 277–281.
44. Bartkiewicz M., Sierakowska H., Shugar D. Nucleotide pyrophosphatase from potato tubers. Purification and properties // *Eur. J. Biochem.* — 1984. — V. 143. — P. 419–426.

45. *Sachs A. B., Deardorff J. A.* Translation initiation requires the PAB-dependent poly(A) ribonuclease in yeast // *Cell*. — 1992. — V. 70. — P. 961–973.
46. *Sontheimer E. J., Carthew R. W.* Silence from within: Endogenous siRNAs and miRNAs // *Ibid.* — 2005. — V. 122, Issue 1. — P. 9–12.
47. *Haley B., Zamore P. D.* Kinetic analysis of the RNAs enzyme complex // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2004. — V. 11. — P. 599.
48. *Orban T. I., Izaunralde E.* Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome // *RNA*. — 2005. — V. 11. — P. 459.
49. *Shen B., Goodman H. M.* Uridine Addition After MicroRNA-Directed Cleavage // *Science*. — 2004. — V. 306. — P. 997.
50. *Maquat L. E.* Skiing Toward Nonstop mRNA Decay // *Ibid.* — 2002. — P. 2221–2222.
51. *Amrani N. et al.* A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay // *Nature*. — 2004. — V. 112. — P. 432.
52. *Kadaba S. et al.* Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator tRNA<sup>Met</sup> in *S. cerevisiae* // *Genes Dev.* — 2004. — V. 18. — P. 1227.
53. *LaCava J. et al.* RNA Degradation by the Exosome Is Promoted by a Nuclear Polyadenylation Complex // *Cell*. — 2005. — V. 121. — P. 713.
54. *Vanacova S. et al.* A New Yeast Poly(A) Polymerase Complex Involved in RNA Quality Control // *PloS Biol.* — 2005. — V. 3. — P. 189.
55. *Teixeira D. et al.* Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs // *RNA*. — 2005. — V. 11. — P. 371–382.
56. *Liu J., Valencia-Sanchez M. A., Hannon G. J., Parker R.* MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies // *Nat. Cell Biol.* — 2005. — V. 7. — P. 719.
57. *Olsen P. H., Ambros V.* The *lin-4* Regulatory RNA Controls Developmental Timing in *Caenorhabditis elegans* by Blocking LIN-14 Protein Synthesis after the Initiation of Translation // *Develop. Biol.* — 1999. — V. 216. — P. 671.
58. *Sen C. L., Blau H. M.* Argonaute2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies // *Nat. Cell Biol.* — 2005. — V. 7. — P. 633.
59. *Gilks N. et al.* Stress Granule Assembly Is Mediated by Prion-like Aggregation of TIA-1 // *Mol. Biol. Cell*. — 2004. — V. 15. — P. 5383–5398.
60. *Anderson P., Kedersha N.* Stressful initiations // *J. Cell Sci.* — 2002. — V. 115. — P. 3227–3234.

**ЗМІНЮВАННЯ ПОПУЛЯЦІЙ  
ФУНКЦІОНАЛЬНО АКТИВНИХ  
ЦИТОПЛАЗМАТИЧНИХ мРНК  
У КЛІТИНАХ РОСЛИН ПІД ВПЛИВОМ  
РЕГУЛЯТОРІВ РОСТУ  
ТА БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ПЕРСПЕКТИВИ  
БЕЗКЛІТИННИХ СИСТЕМ  
ПРОТЕЇНОВОГО СИНТЕЗУ**

*В. А. Циганкова<sup>1</sup>  
Л. І. Мусатенко<sup>2</sup>  
С. П. Пономаренко<sup>3</sup>  
Л. О. Галкіна<sup>1</sup>  
Я. В. Андрусевич<sup>1</sup>  
А. П. Галкін<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії  
НАН України, Київ

<sup>2</sup>Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного  
НАН України, Київ

<sup>3</sup>Державне підприємство «Міжвідомчий  
науково-технологічний центр «Агробіотех»  
НАН та МОЗ України, Київ

*E-mail: sponom@ukr.net*

У безклітинних системах протеїнового синтезу *in vitro* з проростків пшениці вивчено протеїнсинтезуючу активність полі(А)<sup>+</sup>РНК із зародкових осей проростків квасолі без та з обробленням регуляторами росту. Виявлено, що препарати мРНК, виділені з рослин зі стимульованим ростом як синтетичним (івіном), так і регуляторами природного походження (емістимом, біоланом), забезпечують вищий рівень біосинтезу протеїну порівняно з контролем. мРНК, що їх отримано з рослин зі стимульованим ростом природними регуляторами, характеризуються вищим потенціалом у стимуляції синтезу протеїну *in vitro*, а також пролонгованою протеїнсинтезуючою активністю порівняно із синтетичним препаратом. Припускають, що зазначені відмінності інтенсивності й тривалості біосинтезу протеїну пов'язані з виявленою раніше різницею в популяціях мРНК з контрольних рослин та рослин зі стимульованим регуляторами ростом.

**Ключові слова:** безклітинні системи протеїнового синтезу з проростків пшениці, регулятори росту рослин, протеїнсинтезуюча активність мРНК *in vitro*.

**CHANGE OF FUNCTIONALLY ACTIVE  
CYTOPLASMICAL mRNA POPULATIONS  
IN PLANT CELLS UNDER GROWTH  
REGULATORS ACTION AND BIOLOGICAL  
PERSPECTIVES OF CELL-FREE SYSTEMS  
OF PROTEIN SYNTHESIS**

*V. A. Tsygankova<sup>1</sup>  
L. I. Musatenko<sup>2</sup>  
S. P. Ponomarenko<sup>3</sup>  
L. O. Galkina<sup>1</sup>  
Ja. V. Andrusевич<sup>1</sup>  
A. P. Galkin<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Bioorganic Chemistry  
and Petrochemistry of National Academy  
of Sciences of Ukraine, Kyiv

<sup>2</sup>Kholodny Institute of Botany of National  
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

<sup>3</sup>State Enterprise «Interdepartmental Research-  
and Technological Center «Agrobiotech»  
of National Academy  
of Sciences and Department of Health  
of Ukraine, Kyiv

*E-mail: sponom@ukr.net*

Protein-synthesized activity of poly(A)<sup>+</sup>mRNA of the embryonic axes of haricot bean germs without and with treatment by growth regulators in the cell-free wheat germ system of protein synthesis *in vitro* was studied. It is found that mRNA preparations isolated from plants with the stimulated growth both a synthetic regulator (ivin) and regulators of natural origin (emistim, biolan) provide higher level of protein biosynthesis as compared with control. mRNAs obtained from plants with the stimulated growth by natural regulators are characterized by higher potential in stimulation of protein synthesis *in vitro*, and by more prolonged protein-synthesized activity as compared with synthetic preparation as well. It is assumed that the indicated difference between intensity and duration of protein biosynthesis is related to difference in mRNA populations out of the control plants and of the plants with stimulated with the regulators growth that have been already found.

**Key words:** the wheat-germ cell-free systems of protein synthesis, plant growth regulators, the protein-synthesized activity of mRNA *in vitro*.