

УДК 577.217.347

Е.С.Козина (6 курс, каф. ЭФ),
Н.Г.Соболева, к.ф.-м.н., н.с. ПИЯФ РАН, В.И.Катунин, к.б.н., с.н.с. ПИЯФ РАН

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО МЕХАНИЗМА ПРОГРАММИРУЕМОГО СДВИГА РАМКИ СЧИТЫВАНИЯ (-1 FRAMESHIFTING), ПРОИСХОДЯЩЕГО НА РИБОСОМЕ В ПРОЦЕССЕ ТРАНСЛЯЦИИ

Одной из наиболее важных особенностей биосинтеза белка является способность рибосомы поддерживать правильную рамку считывания мРНК. Потеря нормальной рамки считывания имеет катастрофические последствия для синтеза отдельного белка, так как из-за того, что мРНК не имеет специальных знаков пунктуации, рибосома уже не имеет возможности восстановить ее снова, и синтезируется совершенно иная последовательность аминокислот в белке. Частота совершения рибосомами ошибок при поддержании правильной рамки считывания на случайной последовательности мРНК очень низка: вероятность меньше чем $5 \cdot 10^{-5}$ на кодон, что на порядок меньше, чем частота включения неправильной аминокислоты.

В тоже время, наличие особых сигналов в мРНК увеличивает вероятность проскальзывания тРНК на рибосоме, что приводит к тому, что иногда до 50% рибосом изменяют рамку считывания. Сигналы в мРНК, вызывающие сдвиг рамки считывания на один нуклеотид назад, так называемый “-1 frameshifting”, широко распространены в ретротранспозонах, мобильных элементах, и являются жизненно важными для эукариотических РНК-содержащих вирусов, в частности, в вирусе иммунодефицита человека. Для HIV-1 «frameshifting» – это механизм регуляции экспрессии вирусной РНК-зависимой ДНК-полимеразы.

Сдвиг рамки считывания на один нуклеотид вызывается двумя важными элементами мРНК: гептануклеотидной slippery последовательностью, X-XXY-YYN, где непосредственно происходит сам сдвиг рамки, и расположенной через 6-8 нуклеотидов после нее областью мРНК, обладающей вторичной структурой (это либо шпилька либо псевдоузел (pseudoknot)). Транспортные РНК, декодирующие slippery последовательность и взаимодействующие с конкретными сайтами рибосомы, играют не менее важную роль в процессе программируемого сдвига рамки считывания.

Цель работы - изучение молекулярного механизма программируемого сдвига рамки считывания “-1 frameshifting”, происходящего на рибосоме в процессе трансляции и установление возможной корреляции между наличием модификаций нуклеотидов в тРНК и уровнем программируемого сдвига рамки считывания. Для этого предложена экспериментальная модельная система, позволяющая следить за последовательностью событий, происходящих на рибосоме в процессе сдвига рамки считывания на один нуклеотид назад *in vivo* и *in vitro*.

Сконструированный ген мРНК, как показало секвенирование, содержал все структурные элементы, необходимые для осуществления эффективного программируемого “-1 frameshifting”: последовательность Шайн-Дальгарно, стартовый кодон AUG, кодирующий fMet, и непосредственно за ним следующие кодоны: UAU, UUA, AAG, UUU, CGA, последовательно кодирующие пять аминокислот: Tyr, Leu, Lys, Phe, Arg. “Slippery” последовательность представлена тетра нуклеотидом A-AAG, вызывающим проскальзывание лизиновой тРНК.

В качестве стимуляторного сигнала взят псевдоузел из вируса бронхита птиц (coronavirus avian infectious bronchitis virus), содержащий 45 нуклеотидов, который образует вторичную структуру, и, по литературным данным (Liphardt et al., 1999), способен увеличивать эффективность “-1 frameshifting“ *in vitro* до 46%.

Непосредственно за псевдоузлом расположены подряд два стоп-кодона UAA. При отсутствии сдвига рамки считывания, стоп-кодоны прочитываются, трансляция завершается. Продуктом в данном случае является короткий белок. В случае сдвига рамки, стоп-кодоны уже не являются таковыми, и рибосомы продолжают трансляцию гена, кодирующего белковый фактор трансляции EF-Tu, имеющий His⁶-tag. Появление белкового продукта с молекулярной массой около 46kDa, способного связываться с Ni-NTA агарозой, является прямым доказательством существования программируемого сдвига рамки считывания в созданном конструкторе.

Для получения короткой мРНК, необходимой для экспериментов *in vitro*, сразу за стоп-кодонами введен сайт рестрикции BglII

На данном этапе ведется интенсивная препаративная работа, завершение которой позволит перейти непосредственно к изучению кинетики и термодинамики взаимодействия мРНК и тРНК на рибосоме во время программируемого сдвига рамки считывания. Для этого уже выделена и очищена РНК полимеразы фага T7, необходимая для синтеза матричной РНК *in vitro*. Подобраны условия оптимального синтеза *in vitro* модельной мРНК а также условия ее очистки методом FPLC на колонке MonoQ HR5/5, выделены и очищены соответствующие индивидуальные тРНК: тРНК^{fMet}, тРНК^{Tyr}, тРНК^{Leu}, тРНК^{Lys}, тРНК^{Phe}, тРНК^{Val}. Очищенная матрица была проверена в тестах по инициации связывания и оказалась на 100% активной.

Таким образом, получены следующие результаты:

1. Сконструированный ген модельной мРНК содержит все структурные элементы, необходимые для осуществления эффективного программируемого “frameshifting“.
2. Доказано наличие сдвига рамки считывания *in vivo* в модельной мРНК.
3. Синтезированная *in vitro* модельная мРНК эффективно образует инициаторный комплекс на 70S рибосомах.

В дальнейшем планируется создать три контрольных конструктора на основе той же плазмиды, необходимых для количественной оценки эффективности сдвига рамки считывания в системах *in vivo* и *in vitro*; завершить биохимическое тестирование мРНК, содержащей программируемый -1 сдвиг рамки считывания, оценить уровень программируемого “frameshifting“ в условиях *in vitro*; измерить кинетику образования пентапептида fMetTyrLeuLysPhe(Val) методом «погашенного потока».