

УДК 577.214.37

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК, РАСПОЛОЖЕННЫЕ ПЕРЕД ГЕНОМ 4,5 SH РНК, МОГУТ ОКАЗЫВАТЬ ВЛИЯНИЕ НА ЕГО ТРАНСКРИПЦИЮ РНК-ПОЛИМЕРАЗой III IN VITRO И В ЖИВОЙ КЛЕТКЕ

А.П. Коваль, Д.А. Крамеров

(Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН; Лаборатория эволюции геномов эукариот; e-mail: panikoval@yandex.ru)

Данная работа посвящена изучению влияния последовательностей, прилегающих к гену 4,5SH РНК мыши, на его транскрипцию РНК-полимеразой III. Ген 4,5SH РНК содержит внутренний промотор, однако мы обнаружили, что различные 5'-прилегающие последовательности могут как ингибировать его транскрипцию, так и обеспечивать ее высокую эффективность в системе *in vitro*. Требования к структуре фланкирующих ген последовательностей в живой клетке оказались выше — только 5'-прилегающая последовательность из генома мыши оказалась способна обеспечивать эффективную транскрипцию гена 4,5SH РНК.

Ключевые слова: РНК-полимераза III, 4,5SH РНК, малые РНК.

Данная работа посвящена 4,5SH РНК — одной из некодирующих РНК грызунов, имеющей значительную гомологию с 7SL РНК-родственными ретропозонами грызунов (B1-элемент) и приматов (Alu-элемент). Эта РНК длиной 94 нуклеотида распространена только среди представителей 6 семейств из отряда грызунов [1]. Гены 4,5SH РНК транскрибируются РНК-полимеразой III и имеют внутренний промотор, состоящий из боксов А и В [2, 3]. Известно, что в геноме мыши длинная (около 4 т.п.н.) последовательность, содержащая ген 4,5SH РНК, образует кластер из 500 tandemно организованных повторов [4]. Функции данной РНК остаются неизвестными, хотя показано, что 4,5SH РНК ассоциирована с поли(А)-содержащими молекулами РНК в живой клетке [4] и взаимодействует с девятью различными клеточными белками *in vitro* [5]. Целью работы было определить роль последовательностей, прилегающих к гену 4,5SH РНК в его транскрипции.

Материалы и методы

Генетические конструкции получали с помощью ПЦР с дальнейшим клонированием в вектор pGEM-T (Promega) по протоколу фирмы-производителя. Транскрипцию *in vitro* осуществляли согласно методу, предложенному Weil et al. (1978) [6], используя экстракт клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ). Транфекцию клеток линии HeLa вели с помощью Ex-Gen 500 *in vitro* Transfection Reagent (Fermentas) по протоколу фирмы-производителя в течение 20 ч. РНК выделяли методом экстракции гуанидин-тиоцианатом [7].

Результаты

Значение 5'-фланкирующих последовательностей для транскрипции гена 4,5SH РНК in vitro

Чтобы определить, насколько 5'-прилегающие последовательности важны для транскрипции изучаемого гена, нами были получены конструкции, содержащие ген 4,5SH РНК мыши с различными вариантами 5'-прилегающих последовательностей: с геномной последовательностью 4,5SH-повтора длиной 50 и 700 н.п. и с двумя вариантами (Dir-PL и Rev-PL) последовательности полилинкера плазмиды pGEM-T.

В результате транскрипции *in vitro* с использованием экстракта клеток АКЭ было показано, что при сохранении геномной 5'-фланкирующей последовательности транскрипция гена 4,5SH РНК была эффективной (рис. 1). При замене геномной 5'-фланкирующей последовательности гена 4,5SH РНК на последовательность полилинкера Rev-PL плазмиды pGEM-T транскрипция оставалась эффективной, хотя и уменьшалась на 40%. При использовании же в качестве матрицы для синтеза РНК конструкции с 5'-прилегающей последовательностью полилинкера Dir-PL эффективность транскрипции очень резко падала — до 0,1% от уровня первоначальной транскрипции. Следовательно, 5'-прилегающие последовательности важны для транскрипции гена 4,5SH РНК, хотя и чужеродная последовательность может обеспечивать эффективную транскрипцию *in vitro*.

Чтобы исследовать влияние различных нуклеотидных последовательностей на транскрипцию гена 4,5SH РНК, были созданы семь конструкций, в ко-

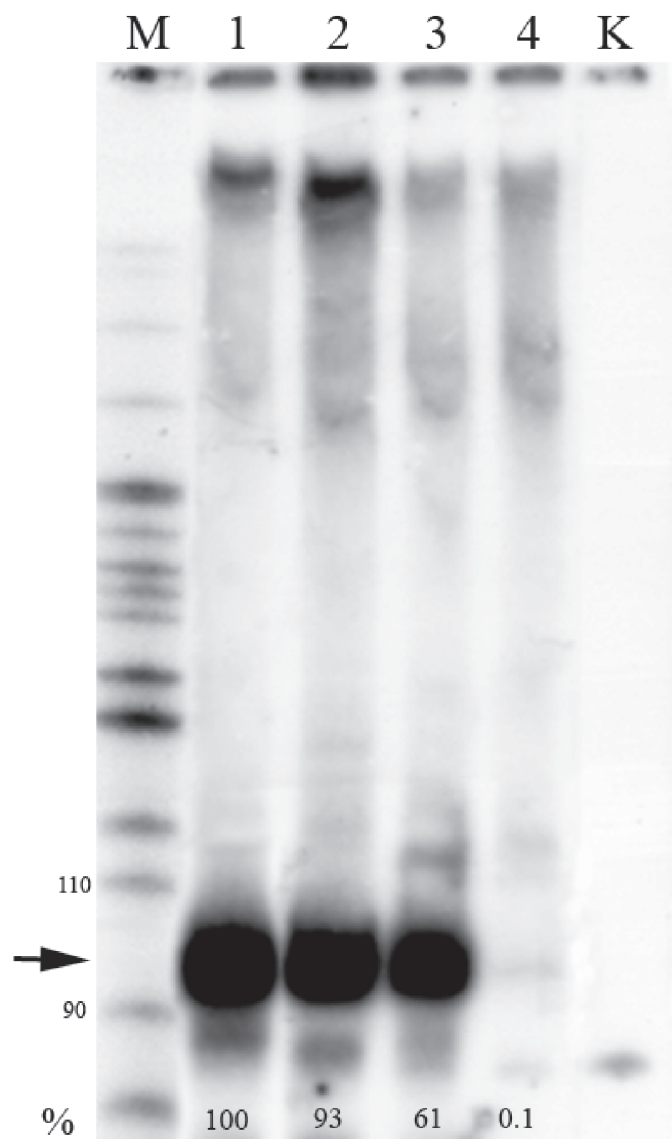


Рис. 1. Транскрипция *in vitro* гена 4.5SH РНК мыши в составе конструкций с различными 5'-прилегающими последовательностями: геномная последовательность мыши длиной 700 н.п. (дор. 1), 50 нп (дор. 2) и последовательности полилинкера плазмиды pGEM-T, обозначенные Rev-PL (дор. 3) и Dir-PL (дор. 4). Цифры под дорожками — интенсивность радиоактивного сигнала, выраженная в процентах (за 100% взят сигнал конструкции с геномной 5'-прилегающей последовательностью длиной 700 нп)

торых перед геном 4,5SH РНК в искусственно введенный сайт *EcoRI* были вставлены различные случайные последовательности из генома мыши длиной от 50 до 200 п.н. При транскрипции этих конструкций *in vitro* можно было наблюдать, что для различных 5'-прилегающих последовательностей уровень транскрипции изменяется, не превышая 22,4%, но не падая ниже 4,5% от уровня транскрипции конструкции с прилегающей к гену 4,5SH РНК геномной последовательностью (данные не приведены). Значит, случайно выбранные последовательности хоть и не обеспечивают высокой эффективности транскрипции гена 4,5SH РНК, однако не снижают ее уровень почти до нуля.

Для более подробного исследования эффекта ингибирования транскрипции были созданы конструкции с замещением фрагментов полилинкера Dir-PL на фрагменты геномной 5'-прилегающей к гену 4,5SH РНК последовательности длиной соответственно 26 пн и 38 пн. В ходе транскрипции *in vitro* этих конструкций при удлинении геномной 5'-фланкирующей последовательности эффективность транскрипции основного продукта нарастала. Однако наблюдалось появление дополнительной полосы, соответствующей длине продукта около 120 н. В специальном опыте с использованием РНКазы Н было показано, что РНК длиной 120 н образовывалась при инициации транскрипции в точке, расположенной за 30 н до обычного старта транскрипции (данные не приведены). Следовательно, при транскрипции *in vitro* 5'-прилегающие к гену последовательности могут играть большую роль, определяя как эффективность транскрипции, так и выбор точки ее инициации.

Транскрипция гена 4,5SH РНК мыши в культуре клеток HeLa

В дальнейшей работе было проанализировано, сохраняются ли в живой клетке особенности транскрипции *in vitro* гена 4,5SH РНК. Для этого была проведена транзитная трансфекция клеток HeLa плазмидами, содержащими ген 4,5SH РНК. После этого клеточную РНК анализировали Нозерн-гибридизацией с зондом, специфичным к 4,5SH РНК. Оказалось, что 4,5SH РНК обнаруживалась только в случае конструкции с геномной 5'-фланкирующей последовательностью 4,5SH повтора мыши, тогда как при трансфекции плазмидами с 5'-прилегающими последовательностями как Dir-PL, так и Rev-PL 4,5SH РНК не детектировалась (рис. 2).

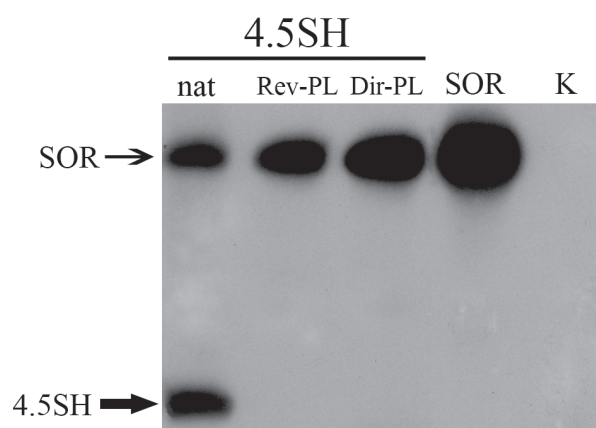


Рис. 2. Радиоавтограф результатов Нозерн-гибридизации препаратов клеточной РНК после транзитной трансфекции клеток HeLa плазмидами, содержащими ген 4,5SH РНК мыши с геномной (nat) 5'-прилегающей последовательностью, и последовательностями полилинкера плазмиды pGEM-T (Rev-PL и Dir-PL). Внутренний контроль — котрансфекция плазмидой, содержащей элемент SOR

Многообразие эффектов, оказываемых 5'-прилегающими последовательностями на транскрипцию, позволяет сделать следующие выводы: 1) 5'-фланкирующая последовательность Dig-PL является крайне неблагоприятной для транскрипции гена 4,5SH РНК; 2) воздействие 5'-прилегающей последовательности Rev-PL на транскрипцию гена 4,5SH РНК различается в системе *in vitro* и в живой клетке, т.е. требования к последовательностям, обеспечива-

ющим эффективную транскрипцию гена 4,5SH РНК в живой клетке, по-видимому, значительно выше, чем в системе *in vitro*; 3) геномная 5'-фланкирующая последовательность 4,5SH-повтора обеспечивает высокоэффективную транскрипцию гена 4,5SH РНК *in vitro* и в живой клетке. Очевидно, эта нуклеотидная последовательность была оптимизирована в ходе эволюции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gogolevskaya I.K., Koval A.P., Kramerov D.A. Evolutionary history of 4.5S RNA // *Mol. Biol. Evol.* 2005. Vol. 22. P. 1546—1554.

2. Leinwand L.A., Wydro R.M., Nadal-Ginard B. Small RNA molecules related to the Alu family of repetitive DNA sequences // *Mol. Cell. Biol.* 1982. N 2. P. 1320—1330.

3. Harada F., Takeuchi Y., Kato N. Molecular cloning and *in vitro* transcription of rat 4.5S RNAH genes // *Nucleic Acids Res.* 1986. N 14. P. 1629—1642.

4. Schoeniger L.O., Jelinek W.R. 4.5S RNA is encoded by hundreds of tandemly linked genes, has a short half-life, and is hydrogen bonded *in vivo* to poly(A)-terminated RNAs

in the cytoplasm of cultured mouse cells // *Mol. Cell. Biol.* 1986. N 6. P. 1508—1519.

5. Hirose Y., Harada F. Mouse nucleolin binds to 4.5S RNAH, a small noncoding RNA // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. Vol. 365. P. 62—68.

6. Weil P.A., Segall J., Harris B., Ng S.Y., Roeder R.G. Faithful transcription of eukaryotic genes by RNA polymerase III in systems reconstituted with purified DNA templates // *J. Biol. Chem.* 1979. Vol. 254(13). P. 6163—6173.

7. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Ann. Biochem.* 1987. Vol. 162. P. 156—159.

Поступила в редакцию
28.05.10

DNA SEQUENCES LOCATED BEFORE 4.5SH RNA GENE CAN HAVE A GREAT IMPACT ON ITS TRANSCRIPTION BY RNA POLYMERASE III IN VITRO AND IN THE WHOLE CELL

A.P. Koval, D.A. Kramerov

4,5SH RNA genes contain an internal RNA polymerase III promoter consisting of A and B boxes. To analyze the influence of the various sequences inserted upstream from 4,5SH RNA gene we used *in vitro* transcription and transfection in the whole cell. We found that various 5'-flanking sequences could increase or decrease the transcription efficiency of a mouse 4,5SH RNA gene, but the experiments did not reveal the correlations between the structure of the 5'-flanking sequences and their influence on the transcription level. Apparently, there are a lot of sequences favorable for 4,5SH RNA genes transcription.

Key words: *small RNA, 4,5SH RNA, internal promoter.*

Сведения об авторах

Коваль Анастасия Павловна — канд. биол. наук, науч. сотр. ИМБ РАН. Тел. (499)135-99-97; e-mail: ranikoval@yandex.ru

Крамеров Дмитрий Александрович — докт. биол. наук, проф., зав. лабораторией эволюции геномов эукариот ИМБ РАН. Тел. (499)135-99-97; e-mail: kramerov@eimb.ru