

Поиск эффективных сайтов посадки рибосомы с помощью рандомизации 5'-нетранслируемой области бактериальных мРНК.

Андреянова Екатерина Сергеевна

Студент (специалист)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: ekaandreyanova@yandex.ru

В основе жизни всех организмов на земле лежит процесс биосинтеза белка, осуществляемый рибосомой, которая декодирует информацию, записанную в матричной РНК (мРНК), и переводит ее последовательность аминокислот. мРНК участвует в этом процесса в качестве посредника при передаче наследственной информации с ДНК на рибосому, но в то же время сама последовательность и структура мРНК может влиять на уровень трансляции, а, следовательно, и на экспрессию гена.

Эффективность бактериальной трансляции в первую очередь зависит от хорошо известного элемента 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) - последовательности Шайна-Дальгарно, комплементарной 3'-концу 16S рибосомной РНК (рРНК) [1]. Во многих работах была показана зависимость эффективности трансляции от длины и расположения данного сайта, однако, в ходе наших исследований было обнаружено, что далеко не все наблюдаемые для природных мРНК особенности эффективности трансляции могут быть объяснены только исходя из структуры последовательности Шайна-Дальгарно.

Довольно хорошо изучено влияние вторичной структуры мРНК на эффективность трансляции - в большинстве случаев у генов с высоким уровнем экспрессии стабильность вторичной структуры значительно снижена в участке инициации трансляции. Существует RBS Calculator, в основе которого лежит термодинамическая модель, оценивающая силу молекулярных взаимодействий 30S комплекса с мРНК транскриптом, и с помощью него можно предсказать относительную скорость инициации трансляции [2]. В ходе нашей работы была проведена оценка такой скорости для конструкций с различными природными 5'-НТО и сравнивалась с результатами, полученными *in vivo* с использованием конструкции, основанной на двух флуоресцентных белков RFP и CER, первый из которых (RFP) является внутренним контролем, а экспрессия второго (CER) отражает эффективность той или иной 5'-НТО мРНК [3]. В результате было показано, что опять же не все получаемые эффекты можно объяснить стабильностью вторичной структуры мРНК.

Мы разработали новый подход для изучения влияния структуры 5'-НТО на эффективность трансляции, для этого были созданы библиотеки плазмид с рандомизированным участком перед геном CER. Использование клеточного сортера позволило в зависимости от отношения эффективностей трансляции двух флуоресцентных белков RFP и CER с высокой точностью разделять клетки с различными плазмидами. После проведения крупномасштабного секвенирования и применения статистических методов были определены последовательности, отличные от уже известных из литературы, с определенным уровнем экспрессии белков. Для выбранного набора 5'-НТО была сделана оценка с помощью RBS Calculator и оценка транскрибируемости с использованием RT-PCR, чтобы исключить доказательство полученных результатов за счет вклада стабильности вторичной структуры либо транскрипции. Полученные результаты интересны, с одной стороны, с фундаментальной точки зрения, поскольку позволяют лучше понять, как последовательность 5'-нетранслируемой области бактериальных мРНК влияет на эффективность такого сложного процесса, как трансляция. С другой стороны, они могут быть использованы на практике для создания систем регулируемой экспрессии белков в клетках *E. coli*.

Источники и литература

- 1) Ryan K. Shultzaberger, R. Elaine Bucheimer, Kenneth E. Rudd and Thomas D. Schneider. Anatomy of Escherichia coli Ribosome Binding Sites. // J Mol Biol. 2001, 313(1): p. 215-28.
- 2) Howard M. Salis¹, Ethan A. Mirsky², and Christopher A. Voigt. Automated Design of Synthetic Ribosome Binding Sites to Precisely Control Protein Expression. Nat Biotechnol. 2009 October ; 27(10): 946–950.
- 3) Osterman I.A., Prokhorova I.V., Sysoev V.O., Boykova YV, Efremenkova O.V., Svetlov M.S., Kolb V.A., Bogdanov A.A., Sergiev P.V., and Dontsova O.A. Attenuation-based dual-fluorescent-protein reporter for screening translation inhibitors. // Antimicrob Agents Chemother. 2012 56, №4, p. 1774-83.

Слова благодарности

Благодарю своего научного руководителя, Илью Андреевича Остермана, за активное участие в моей исследовательской работе.