



УДК 577.212.3;577.217.343'112

5'-ОБЛАСТЬ КДНК РИБОСОМНОГО БЕЛКА S26 НОРКИ: СЕКВЕНИРОВАНИЕ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ

© 1995 г. Ю. А. Сутурина, М. Л. Филипенко, А. И. Муравлев,
Г. Г. Карпова, Н. П. Мертвецов*

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 16.09.94 г. После доработки 05.07.95 г.

С использованием полимеразной цепной реакции клонирована 5'-область кДНК рибосомного белка S26 норки (RPS26). Определена нуклеотидная последовательность 5'-нетранслируемой области (4'-UTR) размером 24 н. о. и часть кодирующей области (120 н. о.) мРНК RPS26. Сравнение последовательностей кодирующих областей мРНК RPS26 норки и человека выявило 90.8% гомологии между ними. Проведен сравнительный анализ известных последовательностей 5'-UTR мРНК RPS26 норки, человека, крысы, а также мРНК белков S31 дрозофилы и стр-5 нейроспоры, гомологичных RPS26 млекопитающих. В 5'-UTR мРНК RPS26 у разных видов обнаружена высококонсервативная 9-звенная последовательность, непосредственно прилегающая к AUG-кодону.

Ключевые слова: мРНК, трансляция, рибосомные белки.

Основной компонент аппарата трансляции клетки – рибосома. Уровень биосинтеза белка значительно варьирует в процессе роста и жизнедеятельности клетки, поэтому должны существовать специфические регуляторные механизмы, обеспечивающие координацию синтеза различных компонентов рибосом и контроль их сборки при изменении физиологических условий. Полученные к настоящему времени данные [1 - 4] позволяют предположить, что одним из таких механизмов является регуляция уровня трансляции мРНК рибосомных белков. Ряд экспериментальных данных [4, 5] указывает на том, что 5'- и 3'-нетранслируемые области (5'- и 3'-UTR) мРНК рибосомных белков играют важную роль в регуляции их синтеза на уровне трансляции. В связи с этим можно предположить, что 5'- и 3'-UTR мРНК рибосомных белков разных видов содержат консервативные участки как в первичной, так и во вторичной структурах, которые непосредственно отвечают за регуляцию уровня трансляции. Возможно, эти последовательности связываются с определенными регуляторными белками или РНК, в результате чего блокируется трансляция мРНК. В настоящей работе определена нуклеотидная последовательность 5'-области кДНК рибосомного белка S26 норки и проведен сравнительный анализ соответствующих последовательностей для разных видов.

Для получения фрагментов кДНК с целью их клонирования использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). На основе известной первичной структуры мРНК RPS26 человека [6] были выбраны дезоксирибоолигонуклеотиды – праймеры для ПЦР. Амплификацию проводили с использованием S26-специфичного праймера M350, а также векторспецифичного праймера M327. В качестве матрицы использовали суммарную ДНК из амплифицированной библиотеки кДНК из селезенки норки в векторе λ ZAP11. Продукты амплификации анализировали электрофорезом в 6% ПААГ. Фрагменты ДНК размером более 300 н. о. элюировали из геля и клонировали в векторе pTZ19RJL2 на тупым концам [7]. Полученные рекомбинантные клоны были секвенированы методом Сэнгера [8]. В результате была определена нуклеотидная последовательность 5'-нетранслируемой области мРНК RPS26 норки размером 24 н. о. и часть (120 н. о.) кодирующей области. Сравнение последовательности кодирующей области мРНК норки с соответствующей последовательностью для человека [6] выявило 90.8% гомологии между ними (рис. 1). Было обнаружено 10 нуклеотидных замен, из которых две (в позициях 98 и 99) приводят к замене одной аминокислоты (Leu \rightarrow Cys, TTG \rightarrow TGT).

Для выявления консервативных и вариабельных участков UTR проведен сравнительный анализ известных последовательностей 5'-UTR мРНК белка S26 норки, человека, крысы [9], а также белков S31 дрозофилы [10] и стр-5 нейроспоры [11], гомологичных белку S26 млекопитающих.

Использованы сокращения: UTR – нетранслируемая область мРНК, ПЦР – полимеразная цепная реакция, RPS26 – рибосомный белок S26.

* Автор для переписки. Факс: (3832) 351665. E-mail: Mertv@modul. bioch. nsk. su.

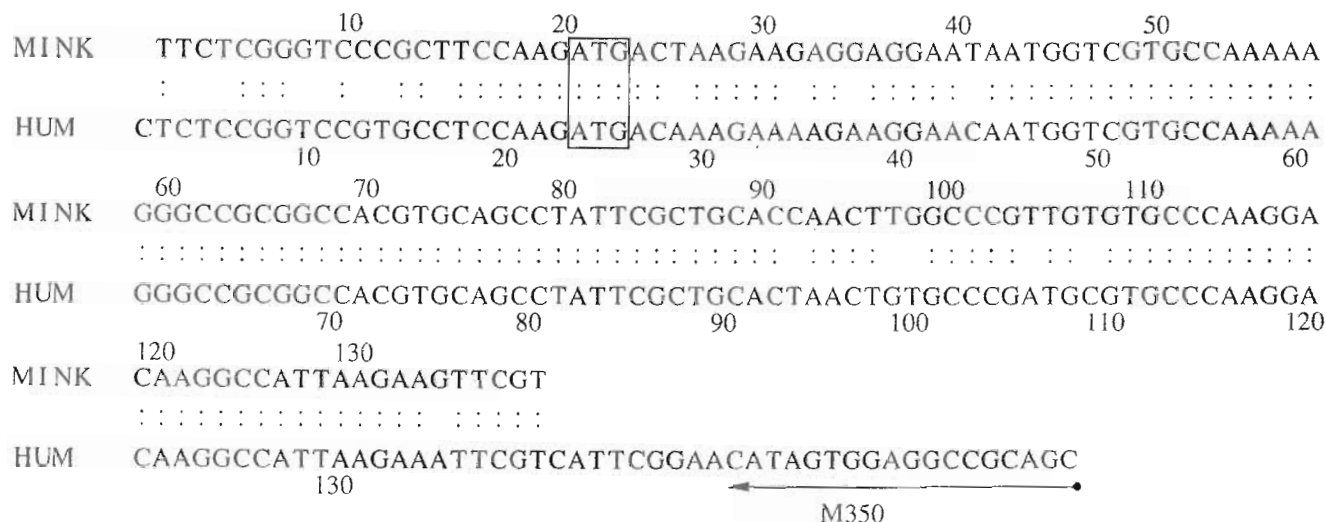


Рис. 1. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей кДНК рибосомного белка S26 норки (MINK) и человека (HUM). Иницирующий кодон ATG выделен рамкой. Позиция амплификационного праймера M350 указана стрелкой.

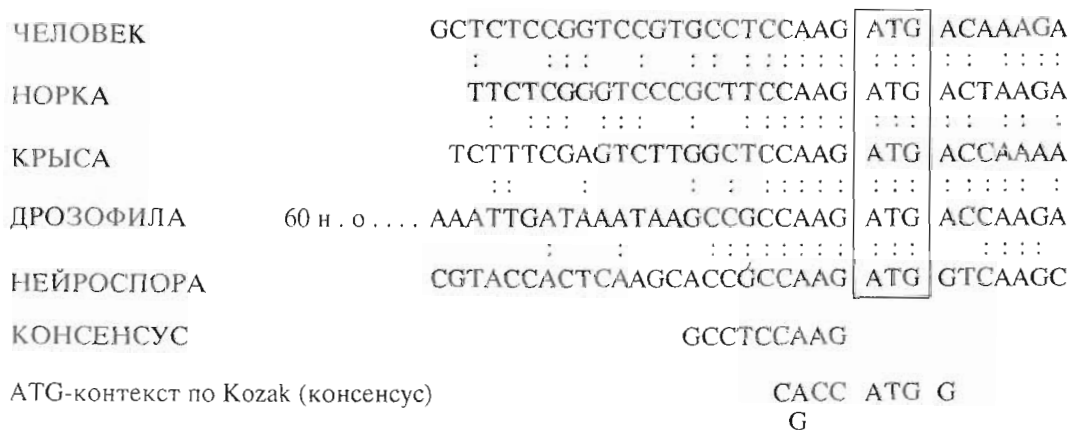


Рис. 2. Сравнительный анализ известных последовательностей 5'-UTR кДНК RPS26 норки, человека, крысы, а также белков S31 дрозофила и сгр-5 нейроспоры, гомологичных RPS26 млекопитающих. Внизу приведена консенсусная последовательность участка 5'-UTR перед ATG-кодоном согласно данной работе, а также ATG-контекст по Kozak [22].

Была обнаружена высококонсервативная 9-звенная последовательность, непосредственно прилегающая к AUG-триплету (рис. 2). Наличие одной и той же консервативной нуклеотидной последовательности в 5'-UTR мРНК таких удаленных в эволюционном плане видов, как человек, дрозофила и нейроспора, согласуется с предположением о возможной функциональной роли этой последовательности в процессе регуляции трансляции. Маловероятно, чтобы, не имея определенных функций, эти последовательности сохранялись в ходе эволюции.

Анализ 5'-UTR мРНК некоторых других рибосомных белков крысы и человека показал, что тетра nukлеотид CAAG, предшествующий AUG-кодону мРНК белка S26, также расположен перед иницирующими кодонами мРНК рибосомных белков S3, S6, S26, S29, L6, L17, L23, L23a, L37. В мРНК белков S11, S17, S19, S27, L3, L22, L26,

L30, L31, L34, L36, L38, L44 этот тетра nukлеотид встречается с одной нуклеотидной заменой, преимущественно по 1-му или 4-му положению. Согласно данным Kozak [12], для эффективного узнавания рибосомой иницирующего кодона AUG последний должен находиться в благоприятном нуклеотидном окружении. На основании анализа 699 мРНК позвоночных Kozak предложила консенсусную последовательность C(A/G)CC, предшествующую AUG-кодону. Однако обнаруженный нами в структуре мРНК белка S26 тетра nukлеотид CAAG отличается от предпочтительного нуклеотидного окружения иницирующего кодона, описанного Kozak, заменами пиримидинов на пурины в 3-м и 4-м положениях (рис. 2). Высокая консервативность непосредственно прилегающей к AUG-кодону области мРНК рибосомных белков может не только отражать особенности окружения иницирующего кодона, присущие

группе мРНК рибосомных белков высших эукариот, но и быть обусловленной участием этой области в регуляции трансляции.

Можно предположить, что модуляция уровня трансляции происходит в результате связывания определенных регуляторных белков с найденными в 5'-UTR мРНК белка S26 консервативными последовательностями. К настоящему времени уже есть отдельные сообщения о существовании мРНК-специфичных белковых факторов, непосредственно влияющих на уровень трансляции [13].

Нуклеотидная последовательность кДНК RPS26 норки зарегистрирована в EMBL Data Library (№ X79237).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали *Taq*-ДНК-полимеразу, ДНК-лигазу фага T4, эндонуклеазы рестрикции *PvuII* и *HincII*, Y-GAL (Biopol, Москва). Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы О.А. Батуриной (НИБХ СО РАН). Библиотека кДНК из селезенки норки любезно предоставлена Е.С. Белоусовым (ИЦиГ СО РАН).

Для выделения суммарной ДНК из библиотеки кДНК 200 мкл фаговой суспензии с титром 10^{12} дважды обрабатывали смесью фенол-хлороформ. ДНК осаждали из водной фазы добавлением 2 объемов этанола с последующим растворением в 20 мкл воды. 2 мкл полученного раствора использовали для амплификации специфической кДНК. ПЦР выполняли в 50 мкл буфера, содержащего 67 мМ трис-НСl (рН 8.9), 16 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.5 мМ MgCl_2 , 0.01% Tween-20, 10 мМ β -меркаптоэтанол, 100 мкМ dNTP, 1 мкМ праймеры, 2 ед. акт. *Taq*-ДНК-полимеразы. Амплификацию осуществляли в течение 35 циклов в следу-

ющем режиме: денатурация – 94°C, 1 мин; отжиг праймеров – 55°C, 1 мин; полимеризация – 72°C, 1 мин. ПЦР проводили на ДНК-амплификаторе “БИС” (пос. Кольцово Новосибирской обл.). Лигирование, трансформацию и отбор рекомбинантных клонов выполняли как описано в работе [7]. Гомологию нуклеотидных последовательностей рассчитывали с использованием программы DNASIS (Hitachi). Нуклеотидные последовательности мРНК рибосомных белков крысы и человека были взяты из EMBL-банка нуклеотидных последовательностей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mager W.H. // Biochim. Biophys. Acta. 1988. V. 949. P. 1 - 15.
2. Loreni F., Amaldi F. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 205. P. 1027 - 1032.
3. Amaldi F., Pierandrei-Amaldi P. // Enzyme. 1990. V. 44. P. 93 - 105.
4. Levy S., Avni D., Hariharan N., Perry R.P., Meyuhas O. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 3319 - 3323.
5. Mariottini P., Amaldi F. // Mol. Cell. Biol. 1990. V. 10. P. 816 - 822.
6. Филипенко М.Л., Владимиров С.Н., Муравлев А.И., Карпова Г.Г., Мертвецов Н.П. // Биоорганическая химия. 1994. Т. 20. С. 644 - 649.
7. Маннатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
8. Chen E.Y., Seeburg P.H. // DNA. 1985. V. 4. P. 165 - 170.
9. Kuwano Y., Nakonishi O., Nabeshima Y., Tanaka T., Ogata K. // J. Biochem. 1985. V. 97. P. 983 - 992.
10. Itoh N., Ohta K., Ohta M., Kawasaki T., Yamashina I. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. P. 441.
11. Wang Z., Tarawneh K.A., Free S.J. // Curr. Genet. 1993. V. 23. P. 330 - 333.
12. Kozak M. // J. Cell Biol. 1989. V. 108. P. 229 - 241.
13. Klausner R.D., Rouault T.A., Harford J.B. // Cell. 1993. V. 72. P. 19 - 28.

Sequencing and Comparative Analysis of 5'-Terminal Region of Mink S26 Ribosomal Protein cDNA

Yu. A. Suturina, M. L. Filipenko, A. I. Muravlev, G. G. Karpova, and N. P. Mertvetsov*

Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
pr. akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

Abstract – The 5'-terminal region of the mink S26 ribosomal protein cDNA was cloned using polymerase chain reaction. The nucleotide sequences of the 5'-UTR (24 bp) and a 120-bp fragment of the coding region of the RPS26 mRNA were determined. The homology between the coding regions of the human and mink RPS26 mRNAs proved to be 90.8%. The nucleotide sequences of the 5'-UTRs of mink, human, and rat RPS26 mRNAs, as well as mRNAs of the *Drosophila* S31 protein and *Neurospora* crp-5 protein, which are homologous to mammalian RPS26, were compared. A highly conserved 9-bp sequence located immediately upstream of the AUG codon was revealed in the 5'-UTR of the RPS26 mRNAs from different species.

Key words: mRNA, translation, ribosomal proteins.

* To whom correspondence should be addressed.