

УДК 575.2:577.21

UDC 575.2:577.21

03.00.00 Биологические науки

Biology

**СТАБИЛИЗАЦИЯ МРНК ЗЛАКОВ *IN VITRO* ПОД ВЛИЯНИЕМ КРЕМНИЯ****STABILIZATION OF MRNA CEREALS *IN VITRO* UNDER THE SILICON INFLUENCE**

Плотников Владимир Константинович  
д.б.н., доцент  
[vkpbio21@mail.ru](mailto:vkpbio21@mail.ru)  
ID: 3971-2200

Plotnikov Vladimir Konstantinovich  
Dr.Sci.Biol., Associate Professor  
[vkpbio21@mail.ru](mailto:vkpbio21@mail.ru)  
ID: 3971-2200

Яблонская Елена Карленовна  
д.с.-х. н., доцент  
ID: 2881-4547  
[yablonskay@mail.ru](mailto:yablonskay@mail.ru)

Yablonskay Elena Karlenovna  
Dr.Sci.Agr., Associate Professor  
ID: 2881-4547  
[yablonskay@mail.ru](mailto:yablonskay@mail.ru)

Салфетников Анатолий Алексеевич  
д.с.-х. н., профессор  
[Salfetnikov39@mail.ru](mailto:Salfetnikov39@mail.ru)  
ID: 428377  
Salfetnikov Anatoliy Alexeevich  
*Кубанский государственный аграрный университет, Краснодар, Россия*

Salfetnikov Anatoliy Alekseevich  
Dr.Sci.Agr., Professor  
[Salfetnikov39@mail.ru](mailto:Salfetnikov39@mail.ru)  
ID: 428377  
*Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia*

Ненько Наталья Ивановна  
д.с.-х.н., профессор  
ID: 2257-0373  
*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Северокавказский Федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия, Краснодар, Россия*

Nenko Natalia Ivanovna  
Dr.Sci.Agr., Professor  
ID: 2257-0373  
*Federal State Budgetary Scientific Institution North Caucasian Federal scientific center for horticulture, viticulture, winemaking, Krasnodar, Russia*

В обзорной статье рассматриваются теоретические и экспериментальные предпосылки участия кремния (Si) в регуляции экспрессии генов злаков на уровне стабильности мРНК. Анализируется гипотетическая возможность стабилизации мРНК *in vivo* как следствие замены атомов углерода (C) или фосфора (P) в составе нуклеиновой кислоты на атом кремния. Представлены экспериментальные данные стабилизации мРНК *in vitro* при её соприкосновении в водном растворе с суспензией целита (SiO<sub>2</sub>). В экспериментах использовали препараты мРНК из созревающего зерна кукурузы, а также из зелёных и этиолированных проростков яровой пшеницы, различающихся по длине терминальной поли-(A)-последовательности. Обработка целитом исходных прогретых и непрогретых препаратов РНК практически не вносила изменений в стабильность мРНК. Однако по мере укорочения поли-(A)-хвостов мРНК целит эффективно стабилизировал как суммарную мРНК, так и ряд индивидуальных, ген-специфических мРНК. Очевидно, по мере укорачивания поли-(A)-хвостов происходит изменение пространственной структуры мРНК и ассоциированные с ней белки и катионы магния (Mg<sup>++</sup>) становятся доступными для адсорбции целитом. Прогревание, усиливая уже начавшийся процесс расплавления вторичной

The differential stability of mRNA is an important mechanism for posttranscriptional regulation of gene expression in eukaryotes. Messenger RNA stability is controlled by specific genes and growth conditions. The review examines the theoretical possibility of mRNA stabilization *in vivo* as a consequence of replacing carbon atoms (C) or phosphorus (P), composed of nucleic acid on the silicon (Si) atom. During isolation of poly-(A)<sup>+</sup>mRNA from plant tissues by the two-cycle affinity chromatography on poly-(U)-Sephrose, regular changes in poly-(A)<sup>++</sup>mRNA yield were observed. The changes varied both with the plant genotype and growth conditions. Celite treatment of heated and unheated total RNA preparations from developing corn kernels and from green and etiolated wheat seedlings. Messenger RNA that differed in the length of poly-(A)-sequences was used for hybridization. It is evident that a reduction of poly-(A)-length causes alterations in spatial structure of mRNA, and associated proteins and cations Mg<sup>++</sup> become accessible to celite absorption. Heating promotes melting of secondary structure, already initiated, and increases the efficiency of mRNA stabilization by celite. Interpreting the facts interact celite with mRNA *in vitro* and stabilization of mRNA *in vivo* by cycloheximide with a modern point of view can be

структуры, способствует повышению эффективности стабилизации мРНК целитом. Интерпретация фактов стабилизации мРНК при взаимодействии целита с мРНК *in vitro* и под воздействием циклогексимида *in vivo*, с современной точки зрения может быть конкретизирована с позиции исследований явления РНК-интерференции

considered with the position research of the phenomenon of RNA interference

Ключевые слова: КУКУРУЗА, ПШЕНИЦА, СТАБИЛЬНОСТЬ мРНК, КРЕМНИЙ, УГЛЕРОД, ФОСФОР

Keywords: MAIZE, WHEAT, MRNA STABILITY, SILICON, CARBON, PHOSPHORUS

Doi: 10.21515/1990-4665-132-056

## Введение

Изменение стабильности мРНК является важнейшим компонентом системы регуляции экспрессии генов в клетках эукариот, в том числе и в клетках злаковых растений. Известны многие цис-факторы и транс-факторы, определяющие стабильность мРНК эукариот [19, 26]. Факторы, определяющие стабильность рРНК и тРНК, изучены гораздо слабее. Однако, несомненно, что, важнейшими составляющими системы регуляции стабильности РНК являются рибонуклеазы и катионы магния. Оба этих фактора относятся к транс-факторам стабильности, т.е. факторам, наличие и количество которых определяются эффектом взаимодействия «генотип-среда», в отличие от цис-факторов, определяемых первичной структурой РНК, т.е. только генотипом.

Одним из интереснейших факторов изменения стабильности мРНК растений может быть кремний. Причём теоретически он рассматривается и как цис-фактор и как транс-фактор изменения стабильности РНК.

Кремний – наиболее распространённый элемент в природе. По содержанию в земной коре он занимает второе место после кислорода – соответственно 47 и 28%. Чаще всего в природе кремний встречается в виде кремнезёма – соединений на основе диоксида кремния (IV)  $\text{SiO}_2$  (около 12% массы земной коры). В основном в почве присутствуют кремниевые кислоты, состав которых можно выразить общей формулой

$x\text{SiO}_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$  (метакремниевая  $\text{H}_2\text{SiO}_3$ , ортокремниевая  $\text{H}_4\text{SiO}_4$ , дикремниевые  $\text{H}_2\text{Si}_2\text{O}_5$  и  $\text{H}_{10}\text{Si}_{12}\text{O}_9$ , пирокремниевая  $\text{H}_6\text{Si}_2\text{O}_7$ ).

Растения поглощают только подвижные низкомолекулярные кремниевые кислоты, концентрация которых в почве обычно не превышает 15-20 мг  $\text{SiO}_2$  на 100 г почвы. Наиболее интенсивный вынос кремния из почвы наблюдается на рисовых, пшеничных, ячменных и кукурузных полях.

Кремний выполняет удивительно большое количество функций в жизни растений: оказывает существенное влияние на рост и развитие растений, повышает урожайность и улучшает качество продукции, придает растениям механическую прочность, обеспечивая жесткость различных органов растения, в частности, формируются более прочные клеточные стенки, в результате чего снижается опасность полегания посевов, а также поражения их болезнями и вредителями. Особенно он важен в стрессовых условиях - роль кремния можно сравнить с действием вторичных органических метаболитов, выполняющих в растениях защитные функции [6-9].

Вместе с тем, роль кремния как участника метаболизма растений ещё не вполне ясна. Многие вопросы, касающиеся полифункциональной роли кремния в растениях, остаются малоизученными.

В частности в литературе рассматриваются возможности замены атомов углерода (C) и фосфора (P) в органических веществах растений на атомы кремния (Si). Такие замены в нуклеиновых кислотах теоретически могли бы изменить стабильность РНК (цис-фактор). В тоже время, благодаря великолепным адсорбционным свойствам кремния, он вполне способен изменить контакт РНК с РНК-азами и катионами магния и тем самым изменить её стабильность (транс-фактор).

В настоящей статье рассматриваются теоретические и экспериментальные предпосылки вероятного участия кремния в регуляции экспрессии генов через изменение стабильности мРНК.

### **I. Участие кремния в биологических процессах *in vivo***

В большинстве растений преобладает форма кремния, связанная с высокомолекулярными органическими соединениями. Предполагается, что ортокремниевая кислота (и олигокремниевые кислоты) в клеточной стенке образуют ортокремниевые эфиры с белками и с полисахаридами (пектинами), что и обуславливает термоизоляцию клетки. С белками Si связывается либо через свободные ОН-группы оксиаминокислот (серина, тирозина и треонина), либо посредством N-Si связей с аминогруппами N-концевых аминокислот. В структуре клетчатки кремний, возможно, служит «сшивающим» агентом между сахарными остатками, образуя силоксановые мостики. Клеточную мембрану в этой связи можно рассматривать как своеобразный «биокристалл», включающий органические и минеральные компоненты.

В среднем в живом веществе растений содержится 0,02-0,15% кремния, а наиболее богатые кремнием растения накапливают его до 5%, концентрируя элемент в листьях и хвое. К концентраторам кремния относятся важнейшие сельскохозяйственные культуры (зерновые). Биологически роль кремния сравнима с ролью микроэлементов, что обуславливает его использование в сельском хозяйстве [6-9].

У риса существуют специальные транспортные белки, отвечающие за транспорт кремния. В его геноме обнаружен фрагмент ДНК, кодирующий информацию для синтеза этих белков. Открыто более 100 различных белков, способных транспортировать ионы и кислоты кремния. Эти белки найдены у ячменя, кукурузы, риса. Таким образом, для процессов биосилификации необходимы специфические белки-транспортеры и

разнообразные ферменты. Антагонизм прослеживается как в ферментных (синтез-деполимеризация), та и в транспортных (закачивание-выкачивание) системах, что свидетельствует о возможности живых организмов приспосабливаться как к низким, так и к высоким концентрациям кремния во внешней среде. Кремний может не только включаться в метаболические пути, изменяя экспрессию генов, ответственных за синтез специфических ферментов, но и являться фактором, лимитирующим митотические процессы [11].

*Устоят ли основы биоорганической химии нуклеиновых кислот?*

### 1. Кремний-углерод

В художественных научно-фантастических романах часто использовался сюжет о возможности полной замены углерода в биологических молекулах на кремний, что предавало бы организму уникальные свойства. Эти фантазии основаны на некотором сходстве атомов углерода и кремния, которые находятся в тесном соседстве в 4-ой группе таблицы Д.И. Менделеева.

Энергия связи атомов кремния с атомами углерода (57,6 ккал/моль) приблизительно равна энергии связи атомов углерода друг с другом (58,6 ккал моль), т. е. связь Si—C практически является ковалентной. Большой энергией обладает так называемая силоксанная связь Si—O—Si (89,0 ккал моль).

*In vitro* разработан синтез четырёх типов биологически активных кремнийорганических соединений:

1) Структурно-специфические кремнийорганические соединения, не имеющие органических аналогов (силатраны, некоторые комплексы метилсиликоната Na с гидроксикарбоновыми кислотами б-цис-дифенилгексаметилтетрациклоксилан; последний применяется в

медицине при лечении ряда заболеваний). Некоторые силатраны стимулируют рост растений, дрожжевых грибов, насекомых, птиц, регенерацию соединительной ткани, шерсти, волос.

2) Кремнийорганические аналоги лекарственных средств, в которых один или более атомов С заменены на Si. Синтезированы кремнийорганические соединения, проявляющие гипотензивное, спазмолитическое, антигистаминное, курареподобное и др. виды физиологического действия. Биологически активные кремнийорганические соединения этого типа обычно менее токсичны, чем их углеродные аналоги, и быстрее разрушаются в организме.

3) Биологически активные органические соединения, модифицированные введением в их молекулу кремнийсодержащих групп. Такая модификация повышает активность и пролонгирует действие антибиотиков, стероидных гормонов и других лекарственных средств, а также инсекторепеллентов; подавляет горький вкус ряда лечебных препаратов, уменьшает побочные реакции простагландинов и фосфорорганических инсектицидов.

4) Кремнийорганические соединения, являющиеся донорами необходимого для организма Si (эферы ортокремниевой кислоты, алкоксилатраны) [6-8].

Кроме того в последнее десятилетие разрабатываются методы доставки лекарств и нуклеиновых кислот внутрь клеток мезопористыми кремниевыми наночастицами (МКН). Потенциал МКН как средство доставки биомолекул обеспечивается их уникальной пористой структурой и физическими свойствами, такими как большая площадь поверхности, большой объём, регулируемый размер пор и небольшой разброс их размеров. Созданы методы доставки плазмидной ДНК внутрь клетки,

позволяющие производить замену дефектного гена или восстанавливать его функцию. Доставка малых интерферирующих РНК (siРНК) внутрь клетки может привести к избирательному ослаблению экспрессии или отключению (нокдауну) конкретных генов, в результате целенаправленного усиленного распада соответствующих мРНК [12].

Применение кремнийорганических биостимуляторов в растениеводстве позволяет повысить холодостойкость, выносливость к жаре и засухе, помогает благополучно выйти из стрессовых погодных ситуаций (возвратные заморозки, резкие перепады температуры и т.д.), усиливает защитные функции растений к болезням и вредителям. Препараты снимают угнетающее, седативное действие химических реагентов по защите растений при комплексных обработках. Использование кремнийорганических препаратов в растениеводстве позволяет повысить урожайность сельскохозяйственных культур на 15-55%, ускорить созревание культур на 10-15 дней, улучшить качество и питательную ценность продукции [10].

Вместе с тем, биохимические аспекты метаболизма кремния до сих пор плохо изучены.

В 1953 году французский врач Шарно предположил, что в человеческом организме присутствует особый фермент — силиказа, который освобождает необходимый организму кремний из его соединений. Почти четверть века спустя американский биохимик Шварц выделил и идентифицировал такой фермент из поджелудочной железы, желудка и почек животных.

Силиказы – ферменты, осуществляющие деполимеризацию кремнезема, являются представителями семейства угольных ангидраз относящихся к классу цинкзависимых металлоферментов, гидролизующих

эфир. Силиказа является субстратзависимым ферментом – в ответ на увеличение концентрации кремния резко возрастает экспрессия соответствующего гена [11]

Силиказа оказалась способной высвобождать кремниевую кислоту даже из синтетических кремнийорганических соединений. Она отличается необычайной для ферментов теплостойкостью, даже при нагревании до 100°C в течение 10 минут активность силиказы не снижается.

Полагают, что в силикатных бактериях также имеются ферменты – силиказы, ответственные за разрушение связей Si-O в кристаллических решётках глинистых материалов, а также связей Si-C в кремнийорганических соединениях. Однако в чистом виде эти ферменты не выделены.

## 2. Кремний-фосфор

Вместе с тем в периодической системе элементов Д.И. Менделеева кремний находится в одном ряду непосредственно перед фосфором. Оба элемента относятся к главным подгруппам своих групп.

*In vivo* у животных участие кремния в метаболизме фосфолипидов проявляется, например, в том, что в их составе он может частично замещать фосфор.

Микроскопический грибок *Aspergillus niger* хорошо растёт в среде, где отсутствует фосфор, усваивая кремниевую кислоту, и, наоборот, в присутствии неорганических фосфатов потребление кремния замедляется.

В клетках бактерии *Proteus mirabilis* кремний (Si) конкурирует с фосфором (P). Если бактерии культивировать в кремнийсодержащей среде в отсутствие фосфора, то фосфор, входящий в их состав, постепенно замещается кремнием. Кремний поступает в клетки этих бактерий в виде



аниона силиката или в форме соединения с фосфоглицериновым альдегидом и частично связывается через атом азота с белками, аминокислотами и аминасахарами, а также с углеводами посредством образования связи Si-O-C. Инкубация клеток *Proteus mirabilis* в среде, содержащей глюкозу и силикат натрия ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$ ) приводит к образованию соединений, включающих связи типа Si-OH, Si-C, Si-H и Si-O-C.

Кремний, наряду с фосфором, является основой макроэргических соединений. В живых организмах он входит в состав макроэргических силикатофосфатов, что обуславливает большую эффективность биоэнергетики кремнефильных растений. Сообщалось, что кремний может замещать фосфор в таких биологически значимых фосфатах и нуклеотидах, как фосфоглицериновый альдегид, НАДФ, ФАД, и АТФ и в рибонуклеиновых кислотах. Сообщение о РНК относится к 1956 году (Schwarz R., Baronetzky E. // Naturwiss. 1956. Bd.43. S. 68-70) [14 ].

Ярким представителем кремнефильных растений является рис, у которого кремний присутствует практически во всех тканях растения. Этот элемент обнаружен в значительных количествах в высокоочищенных препаратах нуклеиновых кислот, а также в митохондриях, пластидах и других органоидах клетки.

Высокая потенциальная продуктивность риса по сравнению с иными злаками связывают с более активным использованием кремния в биоэнергетических процессах, протекающих с участием нуклеиновых кислот и митохондрий. Существуют предположения, что этот элемент может входить в состав нуклеотидов и тем самым образовывать в скелете нуклеиновых кислот сахаросиликатные участки, придавая им повышенную прочность. В растениях также функционирует специфический фермент

силиказа, осуществляющий включение неорганического кремния в органические соединения [30].

Предполагается, что в нуклеиновых кислотах риса кремний способен заменить фосфор (в ДНК риса соотношение P/Si 7:1!), что приводит к стабилизации ДНК и РНК, так как связь Si-O-C более прочная, чем P-O-C. Эти предположения были сделаны в СССР в начале 80-ых годов XX века [1-4].

Спустя 30 лет аналогичная история произошла в США с попыткой торпедировать основы биоорганической химии нуклеиновых кислот утверждением, что атомы мышьяка способны заменять фосфор в составе ДНК.

В 2011 году в журнале Science появилась сенсационная статья о том, что американская исследовательница Фелиса Волф-Саймон вместе с коллегами выделила из образцов калифорнийского озера Моно, вода которого обогащена солями мышьяка, необыкновенную галофильную (солелюбивую) бактерию (*Halomonas*, штамм GFAJ-1) в ДНК которой, по мнению авторов, атомы фосфора (P) были заменены на атомы мышьяка (As) [13, 32].

Несмотря на то, что оба элемента относятся к одной пятой группе таблицы Д.И. Менделеева и химические свойства у них сходны, эта находка подрывала основы биоорганической химии нуклеиновых кислот, потому что эфиры мышьяковой кислоты в физиологических условиях гидролизуются гораздо легче, чем эфиры фосфорной кислоты, а значит, каждый мышьяк вместо фосфора – готовая точка разрыва в ДНК. Кроме того, радиус атома мышьяка больше, чем у фосфора, связи его с кислородом на 13% длиннее - после таких даже точечных замен двойная спираль должна утратить форму, с ней не смогут работать никакие ферменты, обслуживающие ДНК.

Эти теоретические возражения были подтверждены экспериментально. Высокополимерная ДНК, когда её осаждают из водного раствора этиловым спиртом, имеет вид волокнисто-студенистого комка, который обычно называют «медузой». Такая ДНК может нести на себе катионы металлов, не специфически адсорбированные из окружающей среды в ходе выделения. Фелисса Волф-Саймон с соавторами исследовали методом масс-спектрометрии ДНК, вырезанную из агарозного геля после электрофореза, не очистив её даже от агарозы. Такой препарат ДНК мог нести не специфически адсорбированные катионы металлов.

Другая американская исследовательница – Розмэри Редфилд, лаборатория которой занималась бактериальной ДНК, была среди самых строгих критиков Фелиссы Волф-Саймон и её соавторов. Она привлекла к очистке ДНК метод ультрацентрифугирования в градиенте хлористого цезия (CsCl), позволяющий разделить молекулы ДНК по плотности, с последующей масс-спектрометрией различных фракций ДНК из GFAJ-1 на содержание мышьяка. И доказала, что мышьяка в этой ДНК нет [13, 33].

Заканчивается ли на этом история о мышьяке в ДНК? Время покажет.

Однако, упомянутые выше теоретические возражения вполне уместны и в случае предполагаемого присутствия кремния в нуклеиновых кислотах риса. Более того, если в случае фосфора и мышьяка оба элемента относятся к одной пятой группе таблицы Д.И. Менделеева и химические свойства у них сходны, то фосфор и кремний находятся в разных группах (4-я и 3-я, соответственно) и различия между ними намного больше, чем между фосфором и мышьяком. К сожалению, в этом случае никто не провёл исследований подобных описанным в работе Розмэри Редфилд. Так что эта гипотеза ещё ждёт своих энтузиастов.

## **II. Эффект взаимодействия кремния и РНК *in vitro***

Если участие кремния в изменении стабильности нуклеиновых кислот *in vivo* является ещё гипотетическим, то стабилизация мРНК при контакте *in vitro* с  $\text{SiO}_2$  в водных растворах вполне очевидный факт.

Во второй половине 90-х годов XX века было экспериментально показано, что  $\text{SiO}_2$ , добавленный в водный раствор магнийсодержащей РНК резко увеличивает стабильность РНК [21, 22, 26].

### **1) Сорбционные свойства двуокиси кремния**

Двуокись кремния ( $\text{SiO}_2$ ) или диоксид кремния (кремнезём, диатомит) — главный компонент почти всех земных горных пород, в частности, кизельгура (другое название - целит), состоящего преимущественно из кремнистых створок разного вида диатомовых водорослей в смеси с глинистым и кремнистым материалом. Кизельгур (целит) обладает большой пористостью, способностью к адсорбции.

Известно, что семейство шведского изобретателя Альфреда Бернарда Нобеля (1833—1896) занималось производством взрывчатого вещества – нитроглицерина, крайне не стойкого, а потому опасного. Когда в результате взрыва погиб брат Нобеля, он сосредоточил свои усилия на усмирении нитроглицерина. В 1866 г. Нобель обнаружил, что кизельгур может впитывать значительные количества нитроглицерина (4 г на 1 г кизельгура). Пропитанный нитроглицерином кизельгур можно было формовать в брикеты. Такие брикеты были совершенно безопасны в обращении, хотя пропитывающий кизельгур нитроглицерин сохранял свою разрушительную силу. Нобель назвал полученную им смесь динамитом. Таким образом, диатомит прославил и обогатил Альфреда Нобеля.

В биохимии нуклеиновых кислот кизельгур долгое время использовался для фракционирования нуклеиновых кислот при помощи

ионообменной хроматографии на колонке, заполненной кизельгуром с адсорбированным метилированным сывороточным альбумином.

Сывороточный альбумин синтезируется в печени и составляет большую часть среди всех сывороточных белков человека и животных. Общая площадь поверхности множества мелких молекул сывороточного альбумина очень велика, поэтому они особенно хорошо подходят для выполнения функции переносчиков многих транспортируемых кровью и плохо растворимых в воде веществ. По этой причине сывороточный альбумин иногда называют «молекулы-такси».

Если сывороточный альбумин метилировать (специальным образом обработать метиловым спиртом), то он приобретает свойства анионообменника для нуклеиновых кислот (ДНК и РНК). При элюции нуклеиновых кислот градиентом соли с колонки МАК (метилованный альбумин-кизельгур) каждая фракция элюируется при соответствующей концентрации хлористого натрия, подразделяясь на транспортную РНК, ДНК и рибосомную РНК. Этот метод сыграл значительную роль в исследовании нуклеиновых кислот.

При определённых условиях метод МАК позволял выделить в концентрированном виде и мРНК, как фракцию РНК прочносвязанную с МАК. Сочетание этого метода и метода выделения мРНК аффинной хроматографией на поли-(У)-сефарозе позволило, в частности, установить, что мРНК созревающего зерна высоколизиновой кукурузы, мутантной по регуляторному гену *opaque-2*, отличается повышенной стабильностью по сравнению с зерном кукурузы дикого типа [26, 29], а мРНК печени крыс при их кормлении кормами, имеющими недостаток незаменимых аминокислот – лизина и триптофана, отличаются пониженной стабильностью по сравнению с мРНК печени крыс, питающихся полноценными кормами [29].

Известен также ряд современных способов выделения и очистки нуклеиновых кислот, включающий связывание нуклеиновых кислот с силикатным сорбентом в среде хаотропных агентов.

## 2) Система отпр

В 90-е годы XX века было показано тождество закономерностей Mg-зависимого распада мРНК в живой клетке (*in vivo*) и в водных растворах (*in vitro*) [20-23]. Это было сделано в ходе двуциклической хроматографии РНК уже только методом аффинной хроматографии на поли-(У)-сефарозе, который является основным методом, позволяющим отделить полиаденилированную мРНК от общего пула РНК клетки.

Суть метода, как известно, состоит в том, что препарат тотальной РНК пропускают через колонку с аффинным носителем в растворе, содержащим относительно высокую концентрацию соли. В этих условиях полимеры носителя (поли-У) гибридизуются с поли-(А)<sup>+</sup>-мРНК и связывают её; рибосомная и транспортная РНК не связываются с аффинным сорбентом. Поли-(А)<sup>+</sup>-мРНК элюируется с колонки слабосолевым раствором при повышенной температуре (50-60°C). Существенным моментом выделения мРНК является возможность доочистки ее от неспецифической примеси рибосомной РНК путем повторного цикла аффинной хроматографии, т.е. получения поли-(А)<sup>++</sup>-мРНК.

В ходе выделения мРНК из проростков пшеницы, ячменя и созревающего зерна кукурузы были отмечены систематические изменения процентного выхода поли-(А)<sup>++</sup>-мРНК от количества поли-(А)<sup>+</sup>-мРНК, впоследствии названного индексом стабильности мРНК (ИС мРНК), отражающим особенности генетики и физиологического состояния растения. Таким образом появилась возможность разработки молекулярно-кинетических маркёров, позволяющих количественно оценивать эффект

взаимодействия «генотип-среда», то есть, норму реакции организма, изменение которой является основной целью селекции.

И сделано это на основе простого метода оценки относительной стабильности мРНК, который получил название *ommp*-системы, от латинского выражения “*omnia mea tecum porto*” – «все свое ношу с собой», так как есть основания предполагать наличие у самих молекул мРНК всех необходимых для дифференциального распада факторов, устойчивых к действию депротеинизирующих агентов, традиционно используемых для очистки РНК (фенол, хлороформом, додецилсульфат натрия, протеиназа К, диэтилпирокарбонат и др.). Система не зависит полностью от основного клеточного метаболизма, хорошо воспроизводима и позволяет проводить исследования относительной стабильности мРНК на широком биологическом материале в сравнительно простых экспериментах [18, 23, 26].

Закономерному распаду мРНК могут быть две причины: фракционирование или распад мРНК в ходе хроматографии. Фракция РНК, которая не сорбировалась поли-У-сефарозой при повторном нанесении на неё поли-(А)<sup>+</sup>-мРНК («проскок»), собирали и подвергали исследованию ионообменной хроматографией на колонке МАК. При этом только 10% материала сорбировалось на МАК - это свидетельствует о том, что в «проскоке», помимо рибосомной РНК, присутствовало большое количество низкомолекулярных продуктов деградации РНК.

Логично было предположить, что распад мРНК осуществляют следовые примеси свободных РНКаз в высокоочищенных препаратах РНК. Для проверки этого предположения смешивали в соотношении 1:1 два препарата суммарной РНК, контрастно различающихся по выходу поли-(А)<sup>++</sup>-мРНК. Каждый раз подобный эксперимент давал рассчитанный средний выход поли-(А)<sup>++</sup>-мРНК  $\pm 1.0\%$ . Кроме того, препарат поли-(А)<sup>+</sup>мРНК, сорбированный на поли-У-сефарозе, подвергали обработке

проназой и протеиназой K, но это не отражалось на выходе поли-(A)<sup>++</sup>-мРНК. Эти факты доказывают отсутствие свободных РНКаз и позволяют предположить, что разрушение мРНК производится ассоциированными РНКазами [21,26].

Многочисленные литературные данные свидетельствуют о том, что остановка синтеза белка в клетках эукариот циклогексимидом приводит к стабилизации короткоживущих мРНК. Это связывают с наличием у эукариот специфических короткоживущих РНКаз, которые быстро распадаются в условиях блокады синтеза белка. Введение циклогексимидом в початок кукурузы (4 мг/початок, 5 ч) приводило к увеличению выхода поли-(A)<sup>++</sup>-мРНК с 40 до 80%; аналогичная обработка циклогексимидом зелёных проростков пшеницы Краснодарская 39 (20 мкг/мл раствора под корни, в течение 5 часов) также приводила к увеличению выхода поли-(A)<sup>++</sup>-мРНК с 15 до 80%. Эти факты позволили сделать предположение о том, что в ходе аффинной хроматографии происходит не только доочистка мРНК от примесей рибосомной РНК, но и частичный распад мРНК, чему, возможно, способствуют короткоживущие белки [26].

Однако являются ли эти короткоживущие белки рибонуклеазами или они участвуют в распаде мРНК *in vitro* опосредовано? Возможно, гипотетические короткоживущие белки участвуют в синтезе комплекса, определяющего явление РНК-интерференции. Здесь важно подчеркнуть, что последующее обнаружение длинных полиаденилированных некодирующих РНК (нкРНК) [16, 26] теоретически позволяет объяснить молекулярный механизм тождественности магний-зависимого распада РНК *in vivo* и *in vitro* тем, что в пуле поли-(A)<sup>+</sup>мРНК в обоих случаях имеются РНК-интерференции (iRNA), осуществляющие дифференциальный распад мРНК за счёт Mg<sup>++</sup>-зависимых рибозимных процессов.



Вторым, очень важным фактом, установленным в ходе изучения варьирования выхода поли-(А)<sup>++</sup>-мРНК, было то, что этот процесс является Mg<sup>++</sup>-зависимым. Потеря ионов магния в ходе выделения РНК приводила к нивелированию каких-либо различий по генетике или физиологии изучаемых объектов.

В основе понимания функционирования системы *оттр* лежит постулат об отсутствии принципиальных различий между механизмами высокоспецифического и неспецифического, катализируемого ионами двухвалентных металлов, гидролиза РНК, аналогичного щелочной и кислотной деградации РНК, но проходящей при невысокой температуре и, часто, при нейтральных значениях рН. Степень и интенсивность распада РНК определяется условиями выделения препарата РНК из тканей растений, которые влияют на состав, количество катионов металлов и особенности их взаимодействия с молекулами РНК.

По данным, полученным методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии, типичные условия, которые применялись для выполнения работ по изучению стабильности суммарной поли-А-содержащей мРНК и ген-специфических мРНК в системе *оттр* обеспечивали в составе высокомолекулярного препарата РНК содержание максимально до 4,0 % катионов магния.

К типичным условиям следует отнести: 1) обеспечивающий защиту РНК от деградации РНКазами состав экстрагирующего буфера: 0, 2М Трис-НСl, рН 8,5; 0,05М MgCl<sub>2</sub>; 2) осаждение нуклеиновых кислот этиловым спиртом без подкисления (осадок хорошо формируется за счёт большой концентрации триса и наличия катионов магния в буфере А); 3) переосаждение препарата РНК концентрированным депротеинизирующим раствором в конечной концентрации: 4М LiCl; 4М мочевины.

Соли РНК в водном растворе подвергаются гидролизу, определяющему, как известно, кислотность раствора в зависимости от

силы основания и кислоты. При вышеуказанных условиях выделения рН водного препарата РНК был около 10, что, вероятно, обусловлено слабощелочными свойствами гидрата окиси магния (или кумулятивным эффектом всех катионов, взаимодействующих с РНК). Распад РНК происходит и в присутствии других катионов двухвалентных металлов (марганец, кобальт, железо), гидрат окиси, которых имеет нейтральное значение, однако скорость деградации возрастает при повышении рН [23, 26].

Предположительно, в РНК остаются только так называемые сайт-специфические катионы магния, относительно прочно связанные с молекулой РНК, в отличие от диффузных катионов магния, легко теряемых при выделении.

Осаждение РНК этиловым спиртом, подкисленным ацетатом калия (натрия) рН 5,3 или уксусной кислотой, приводило к значительному снижению содержания катионов магния в препарате РНК и обуславливало значение рН раствора в пределах 5-6. При этом способность РНК к самораспаду резко ослабевала. Вероятно, в этих условиях утрачивается не только диффузные катионы магния, но и часть сайт-специфического магния [26].

### **3) Эффект взаимодействия целита ( $\text{SiO}_2$ ) с мРНК из созревающего зерна кукурузы**

Следующим методическим шагом стало осознание того, что хроматография как таковая не является необходимым условием распада мРНК. Главным моментом является инкубация водного препарата магнийсодержащей мРНК при повышенной температуре (высокотемпературная элюция поли-(А)<sup>+</sup>-мРНК с колонки). Дальнейшие исследования показали, что распад мРНК происходит при любой температуре, вплоть до температуры жидкого азота. Распад мРНК

происходил как *in vitro*, при хранении водных растворов РНК, так и *in situ*, при хранении растительных тканей в жидком азоте [26].

Для изучения судьбы мРНК в ходе аффинной хроматографии была использована молекулярная гибридизация радиоактивно меченых олигонуклеотидных зондов к мРНК зеинов 19 кДа созревающего зерна обычной кукурузы и мутантной по гену *opaque-2* с поли-(А)-содержащей мРНК непосредственно на колонке поли-(У)-сефарозы. Для гибридизации  $(A)_n65^\circ/(A)_n35^\circ$  использовали матричные РНК, отличающиеся друг от друга по длине поли-(А)-последовательностей.

Относительную длину терминальной поли-(А)-последовательности  $(A)_n65^\circ/(A)_n35^\circ$  - оценивали методом ступенчатой термальной элюции мРНК с колонки поли-(У)-сефарозы при 35°C (коротко хвостовые молекулы мРНК) и 65°C (длинно хвостовые молекулы мРНК).

Препараты РНК непосредственно после выделения имели преимущественно длинно хвостовые молекулы поли-(А)<sup>+</sup>мРНК с соотношением  $(A)_n65^\circ/(A)_n35^\circ = 2,4$  для обычной кукурузы и 2,2 для *o<sub>2</sub>*-кукурузы (мРНК, тип 1). Хранение препаратов суммарной РНК в жидком азоте в течение двух недель приводило к укорочению поли-(А)-последовательностей мРНК и соотношение менялось в сторону короткохвостовых молекул: для нормальной кукурузы оно составляло 0,33, а для *o<sub>2</sub>*-кукурузы - 0,24 (мРНК, тип 2). Вероятно, при этих условиях хранения (-195,8°C) не прекращается деятельность ассоциированных с мРНК РНКаз, определяющих деаденилирование и распад, так как один и тот же препарат поли-(А)-мРНК, разлитый на аликвоты, изменялся с течением времени хранения [26]. Эта закономерность была характерна и для рРНК [29].

Механизм этого процесса, скорее всего, связан с электронно-конформационными взаимодействиями, активирующими действие

ферментов или рибозимных свойств РНК в условиях сверхнизких температур.

Результаты экспериментов позволяли предположить, что процесс дифференциального распада мРНК в ходе аффинной хроматографии определяется ассоциированными с мРНК РНКазы белковой природы. Для доказательства этого факта использовали обработку суммарного препарата РНК типа 1 взвесью целита ( $\text{SiO}_2$ ), специфически взаимодействующего с белками. Обработка целитом в этих экспериментах приводила к увеличению выхода поли-(А)<sup>++</sup>-мРНК только у прогретого препарата суммарной высокополимерной РНК (таблица 1).

Предполагалось, что ассоциированные с мРНК РНКазы белковой природы экранированы вторичной структурой мРНК и это является одной из причин устойчивости ферментов к обработке самыми различными агентами [21, 31].

Таблица 1. Влияние целита на выход поли-(А)<sup>++</sup>мРНК при аффинной хроматографии РНК из зерна о<sub>2</sub>-кукурузы на поли(У)-сефарозе [21, 31]

Вид обработки суммарного препарата РНК	% поли(А) <sup>++</sup> мРНК от поли(А) <sup>++</sup> мРНК
Контроль	58 ± 2
65°, 5 минут	56 ± 2
Целит	57 ± 3
Целит, 65°, 5 минут	71 ± 3

#### **4) Эффект взаимодействия целита ( $\text{SiO}_2$ ) с мРНК**

##### **из зелёных и этиолированных проростков яровой пшеницы**

Более детальное изучение влияния целита ( $\text{SiO}_2$ ) на изменение стабильности мРНК было проведено на РНК из проростков яровой пшеницы с использованием олигонуклеотидного зонда к мРНК гена *waxy*.

В процессе хранения препаратов суммарной высокополимерной РНК из проростков пшеницы в течение шести недель в жидком азоте выход поли-(А)<sup>+</sup>-мРНК снизился с 2,12 до 1,11% у зелёных и с 2,14 до

0,89% у этиолированных проростков. Большая нестабильность мРНК этиолированных проростков - характерная фотопериодическая черта яровых пшениц, у озимых наоборот: свет дестабилизирует суммарную мРНК клетки.

Обработка целитом прогретых и непрогретых препаратов суммарной РНК из зелёных и этиолированных проростков пшеницы с исходным соотношением  $(A)_n65^\circ/(A)_n35^\circ$  практически не вносила изменений в выход поли-(A)<sup>+</sup>-мРНК. Однако по мере укорочения поли-(A)-последовательностей происходило увеличение выхода поли-(A)<sup>++</sup>-мРНК после обработки целитом на 24 и 29% соответственно. Одновременный прогрев и обработка целитом таких препаратов РНК увеличивали выход поли-(A)<sup>++</sup>-мРНК до 45% (табл. 2). Очевидно, по мере укорочения поли-(A)-последовательностей происходит изменение пространственной структуры мРНК - ассоциированные с ней белки (или катионы магния) становятся доступными для адсорбции целитом.

Несмотря на то, что в экспериментах не определялась величина полиаденилирования специфической мРНК *waхu*, а для характеристики препаратов использовали соотношения  $(A)_n65^\circ/(A)_n35^\circ$ , определённые для общего пула полиаденилированных мРНК, совершенно очевидно, что при количественном преобладании молекул с длинными поли(A)-хвостами большое значение для стабилизации мРНК во время обработки целитом имеет прогрев. При этом увеличивался выход поли-(A)<sup>++</sup>-мРНК *waхu* до 47% у зелёных и до 80% у этиолированных проростков.

Прогревание, усиливая уже начавшийся процесс расплавления вторичной структуры, способствует повышению эффективности стабилизации мРНК целитом. Дальнейшее изменение соотношения полиаденилированных молекул РНК в сторону короткохвостовых приводило к тому, что прогрев значительно снижал выход поли-(A)<sup>++</sup>-мРНК. Однако целит и в этом случае эффективно предотвращает мРНК от

деградирующего влияния повышенной температуры. Вместе с тем эффективность стабилизации целитом таких мРНК в отсутствие прогрева значительно ниже по сравнению с длиннохвостовыми молекулами возможно из-за того, что распад большей части мРНК, зависящий от деаденилирования, уже произошёл в ходе хранения суммарной РНК.

Таблица 2. Влияние целита на выход поли-(А)<sup>++</sup>-мРНК из зелёных и этиолированных проростков яровой пшеницы при аффинной хроматографии на поли-(У)-сефарозе в зависимости от соотношения мРНК с длинными и короткими поли-(А)-последовательностями на 3'-конце молекул, % от контроля [21].

Вид обработки суммарного препарата высокополимерной РНК	(A) <sub>n</sub> 65°/(A) <sub>n</sub> 35°							
	зелёные				этиолированные			
	2,08	1,70	1,18	0,56	2,00	1,84	1,67	0,52
Контроль	100	100	100	100	100	100	100	100
65°, 5 мин	96	93	70	58	96	93	75	38
Целит	106	124	120	120	105	129	110	104
Целит, 65°, 5 мин	100	145	127	96	98	144	113	79

Прогревание, усиливая уже начавшийся процесс расплавления вторичной структуры, способствует повышению эффективности стабилизации мРНК целитом. Дальнейшее изменение соотношения полиаденилированных молекул РНК в сторону короткохвостовых приводило к тому, что прогрев значительно снижал выход поли-(А)<sup>++</sup>-мРНК. Однако целит и в этом случае эффективно предотвращает мРНК от деградирующего влияния повышенной температуры. Вместе с тем эффективность стабилизации целитом таких мРНК в отсутствие прогрева значительно ниже по сравнению с длиннохвостовыми молекулами возможно из-за того, что распад большей части мРНК, зависящий от деаденилирования, уже произошёл в ходе хранения суммарной РНК.

Результаты гибридизации с олигонуклеотидным зондом к мРНК гена *waхu* также свидетельствует о взаимосвязи деаденилирования, пространственной структуры и возможного участия белка в распаде мРНК *waхu* (таблица 3).

Сравнивая удельную радиоактивность образцов РНК с разной степенью полиаденилирования, можно отметить, что при изменении соотношения  $(A)_n65^\circ/(A)_n35^\circ$  от максимального значения до минимального содержание мРНК *waхu* падает на 80% от исходного уровня у этиолированных проростков и только на 35% у зелёных проростков, т.е. мРНК *waхu* более стабильна у зелёных проростков, чем у этиолированных.

Таблица 3. Влияние целита на выход поли-(A)<sup>++</sup>-мРНК *waхu* из зелёных и этиолированных проростков яровой пшеницы при аффинной хроматографии на поли-(У)-сефарозе в зависимости от соотношения мРНК с длинными и короткими поли-(А)-последовательностями на 3'-конце молекул, % от контроля [21].

Вид обработки суммарного препарата высокополимерной РНК	$(A)_n65^\circ/(A)_n35^\circ$						
	зелёные			этиолированные			
	2,08	1,70	0,56	2,00	1,84	1,67	0,52
Контроль	100	100	100	100	100	100	100
65°, 5 мин	95	93	58	96	93	75	38
Целит	106	124	120	105	129	110	104
Целит, 65°, 5 мин	100	147	104	91	160	180	95

Возможно, это является одним из факторов, определяющих повышение экспрессии гена *waхu* в проростках яровой пшеницы под действием света. Вместе с тем снижение содержания суммарной поли-(A)<sup>++</sup>-мРНК при этих же условиях происходило на 45 и 55% соответственно. Таким образом, стабильность мРНК *waхu* у этиолированных проростков ниже средней стабильности пула мРНК, в то время как в зелёных проростках стабильность этой специфической мРНК выше средней стабильности мРНК клетки [21].

Естественно, степень деградации РНК была прямо пропорциональна температуре и времени инкубации. Так, инкубация препаратов суммарной РНК 5 мин при 65°C или 3 ч при 36°C давали аналогичные результаты по эффективности деаденилирования и распада суммарной поли-(А)-мРНК проростков и они были схожи с соответствующими изменениями полиаденилирования мРНК зеина 19 кДа созревающего зерна кукурузы

(таблица 4). Ранее аналогичная зависимость распада от температуры была описана для РНК животных [26].

Таблица 4. Влияние  $Mg^{++}$  и целита на эффективность деаденилирования и распад суммарной поли-(A)<sup>+</sup>мРНК проростков пшеницы и ген-специфической мРНК зеина 19 кДа созревающего зерна кукурузы (Z<sub>19</sub>-мРНК, 20-й день после опыления) в *оттр*-системе [26].

А:Б:В	65°C, 5 мин.		36°C, 3 ч		
	поли(A) <sup>+</sup> мРНК, %	(A) <sub>n</sub> 65°/ (A) <sub>n</sub> 35°	поли(A) <sup>+</sup> мРНК, %	(A) <sub>n</sub> 65°/ (A) <sub>n</sub> 35°	поли(A) <sup>+</sup> мРНК Z <sub>19</sub> ,%
- - -	100	1,13±0,11	100	1,29±0,09	100
+ - -	71±5	0,74±0,06	73±5	0,98±0,05	65±3
+ + -	46±1	0,65±0,05	38±3	0,85±0,05	42±2
+ + +	101±6	1,10±0,10	97±4	1,24±0,08	100±3

Примечание. А - температурная обработка РНК, Б - наличие  $Mg^{++}$ , В - обработка РНК целитом; "+" - наличие обработки, "-" - отсутствие обработки.

### 5) Влияние циклогексимида (*in vivo*) и целита (*in vitro*) на содержание катионов магния и стабильность РНК проростков пшеницы

Известно, что ингибитор синтеза белка циклогексимид (ЦГС) осуществляет блокаду трансляции, т.е. блокирует деятельность рибосом. При этом происходит стабилизация мРНК *in vivo*, предположительно в результате распада короткоживущих РНКаз [19]. Вместе с тем, стабилизация мРНК *in vitro* достигается при обработке водного раствора РНК целитом (SiO<sub>2</sub>) [21,31].

Рибосомная РНК (рРНК) также подвергается магний-зависимому распаду в системе *оттр* [22]. Вышеупомянутые два агента противоположно влияют на содержание катионов магния в рРНК: 8-ми часовая инкубация проростков пшеницы на растворе ЦГС при комнатной температуре (20°C) приводила к увеличению содержания магния в рРНК на 40%, а обработка водного раствора рРНК суспензией целита определяла потерю 20% магния от уровня контрольного варианта [24].



Представляло несомненный интерес изучить влияние комбинации воздействия этих двух факторов на степень полиаденилирования и стабильность поли(А)-содержащей мРНК, а также стабильность ген-специфических мРНК проростков пшеницы. Для этого проростки озимой пшеницы сорта Краснодарская 39 инкубировали на растворе ЦГС в течение 6 и 10 часов. *In vivo* обработка проростков пшеницы ЦГС вызывала увеличение индекса стабильности суммарной поли-(А)-содержащей мРНК; дополнительная обработка РНК *in vitro* целитом приводила к дальнейшему увеличению индекса стабильности полиаденилированной РНК (таблица 5).

Таблица 5. Влияние циклогексимида (ЦГИ) на изменение стабильности суммарной полиаденилированной мРНК и трёх специфических мРНК проростков пшеницы в *оттр* системе [26].

Варианты обработки проростков	Отношение (А) <sub>n</sub> 65°/(А) <sub>n</sub> 35° после прогрева в системе <i>in vitro</i> <sup>1)</sup>	Выход поли-(А) <sup>+</sup> мРНК (% от непрогретого контроля)	Радиоактивность специфической поли-(А) <sup>+</sup> мРНК (% от непрогретого контроля)		
			waxu	актин	eEF - 1α
Контроль	0,52	63±1	84±2	108±3	126±4
6 ч. ЦГИ	0,52	73±2	138±3	143±4	182±4
10 ч. ЦГИ	1,02	76±2	73±2	79±2	114±3
6 ч. ЦГИ +целит	1,10	100±4	103±4	77±2	122±2

<sup>1)</sup>- приводится для суммарной поли-(А)<sup>+</sup>мРНК; отношение (А)<sub>n</sub>65°/(А)<sub>n</sub>35° непрогретых образцов составляло 1,25.

Анализ изменений стабильности ген-специфических мРНК актина, субъединицы α фактора элонгации трансляции 1 (eEF-1α) и УДФ-глюкозилтрансферазы (waxu) проводили методом молекулярной гибридизации с соответствующими радиоактивно мечеными олигонуклеотидными зондами на колонке поли(У)-сефарозы (сэндвич-гибридизация). В результате шестичасовой обработки проростков ЦГС значительно увеличилась эффективность гибридизации всех использованных олигонуклеотидных зондов по сравнению с образцами РНК из контрольных растений. При этом наблюдали деаденилирование

поли-(А)-содержащей мРНК контрольных и опытных образцов: соотношение молекул с относительно длинными и относительно короткими поли-(А)-хвостами ( $(A)_n65^\circ/(A)_n35^\circ$ ) снижалось от величины 1,25 у исходных препаратов РНК до 0,57 по окончании инкубации в системе *оттр*.

Напротив, после 10-часовой обработки ЦГС отсутствовал процесс деаденилирования мРНК при инкубации РНК в системе *оттр*: результаты гибридизации были близки или ниже контрольных в противоположность дальнейшему увеличению общей стабильности поли-(А)-содержащей мРНК. Сходные результаты были получены при гибридизации поли-(А)-содержащей РНК из проростков, подвергнутых 6-ти часовой обработке ЦГС, в том случае, если РНК предварительно (перед прогревом в *оттр* системе) обрабатывали целитом (таблица 5). Представленные результаты хорошо интерпретируются, если предположить, что с мРНК ассоциированы две РНКазы, различающиеся по времени жизни. Одна из них - относительно долгоживущая, деаденилирующая мРНК РНКазы, действие которой прекращается только после 10-часовой инкубации проростков с ЦГС. Вторая - разрушающая мРНК РНКазы - относительно короткоживущая, действие которой замедляется уже через 6 часов инкубации проростков с ЦГС.

Таким образом, при инкубации в системе *оттр* водного препарата РНК из контрольных растений происходило деаденилирование и распад мРНК. Блокирование при помощи ЦГС синтеза белка в течение 6 часов замедляло распад поли-(А)-содержащей мРНК *in vitro* на фоне продолжающегося процесса деаденилирования, что приводило к возрастанию индексов стабильности как суммарной, так и индивидуальных поли(А)-содержащих мРНК в результате увеличения количества сайтов гибридизации.

Увеличение экспозиции до 10 часов приводило к полной остановке процесса деаденилирования и стабилизировало мРНК, однако эффективность гибридизации изучаемых транскриптов оставалась на уровне контрольных растений, не обработанных ЦГС. Очевидно, остановка деаденилирования приводила к стабилизации пространственной структуры мРНК и, как следствие, к экранированию части сайтов гибридизации (как и в случае мРНК кукурузы: таблица 4). Это ограничение, связанное с методическими особенностями гибридизации на колонке поли-(У)-сефарозы (как и при использовании ОТ-ПЦР), не сказывается на спектрофотометрическом выявлении процесса стабилизации суммарной поли-(А)-содержащей мРНК.

Обработка целитом РНК из проростков шести часового опыта останавливает действие деаденилирующего фермента (дополнительно к уже инактивированной при помощи ЦГС разрушающей РНКазе), что и приводит к сходству индексов стабильности мРНК 6-часового и 10-часового экспериментов. То есть, обработка РНК целитом, останавливая деаденилирование и распад мРНК, моделирует *in vitro* ситуацию, имеющую место *in vivo* при 10-часовой блокаде синтеза белка. Имеет место кумулятивный эффект действия обработок ЦГС и целитом.

Эти РНКазы, по-видимому, являются ключевыми ферментами, контролирующими время жизни мРНК. Возможно, снижение их активности и является причиной нарушения процесса деаденилирования и распада мРНК в созревающем зерне кукурузы, мутантной по регуляторному гену *opaque-2*. Наличие подобных РНКаз у растений известно [26], однако в нашем случае необходимо допустить, что они очень прочно связаны с мРНК и устойчивы к действию традиционных депротенинирующих агентов.

Вместе с тем не исключено, что здесь имеет место проявление рибозимных свойств мРНК, для детального объяснения которых на

сегодняшний день не имеется достаточной информации. Механизм ингибирования синтеза белка в клетке при помощи ЦГС плохо изучен [26]. ЦГС - молекула с небольшой молекулярной массой (281.3 Да) и, возможно, его взаимодействие с молекулой РНК приводит к незначительному изменению её третичной структуры, достаточному, однако, для ликвидации рибозимных свойств РНК без потери катионов магния. Целит же, в силу своей огромной площади взаимодействия отнимает катионы магния, необходимые для проявления рибозимных свойств РНК. Не исключено, что *in vivo* эти свойства только усиливаются специфическими белками.

**Основной вывод.** Интерпретация фактов взаимодействия целита с мРНК *in vitro* и влияния циклогексимида *in vivo*, с современной точки зрения может быть конкретизирована с позиции исследований явления РНК-интерференции.

Многочисленные литературные данные свидетельствуют о том, что остановка синтеза белка в клетках эукариот циклогексимидом приводит к стабилизации короткоживущих мРНК. Это связывали с наличием у эукариот специфических короткоживущих РНКаз, которые быстро распадаются в условиях блокады синтеза белка [26].

Однако являются ли эти короткоживущие белки рибонуклеазами или они участвуют в распаде мРНК *in vitro* опосредовано? Возможно, гипотетические короткоживущие белки участвуют в формировании комплекса RISC (РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга, состоящий из РНКовых и белковых компонентов), определяющего явление РНК-интерференции – разрушение определённых ген-специфических мРНК. Это белки семейства *Argonaute*. Однако структура белков этого семейства (в литературе обычно обозначаемое, как семейство *piwi/ zwiille/argonaute*, или просто *Argonaut*) не позволяет сделать каких-либо выводов об их биохимической функции. У плодовой мушки известны два гомолога этих

белков: Ago2 ассоциируется с малыми интерферирующими РНК в RISC и осуществляет расщепление мРНК; Ago1 ассоциируется с микроРНК и выполняет функцию ингибитора трансляции мРНК-мишени [16].

Вместе с тем, наличие длинных полиаденилированных не кодирующих РНК [26] теоретически позволяет объяснить молекулярный механизм тождественности магний-зависимого распада РНК *in vivo* и *in vitro* тем, что в пуле поли-(А)<sup>+</sup>мРНК в обоих случаях имеются РНК-интерференции (iRNA), осуществляющие дифференциальный распад мРНК за счёт Mg<sup>++</sup>-зависимых процессов.

### Заключение

В одном из своих выступлений академик А.Л. Курсанов (1902-1999) сравнил проблему регуляции функций с горной вершиной, которую предстоит покорить и только у подножия которой находятся исследователи: "Медицина и сельское хозяйство должны получить доступ к регуляторным механизмам клетки, так как в этом заключены необозримые возможности для практики" [15].

Известны несколько примеров участия того или иного элемента в регуляции обменных процессов у эукариот на уровне стабильности мРНК. Так, примером «прямого» влияния питательного вещества на генную экспрессию через воздействие на стабильность мРНК и эффективность трансляции является контролируемая катионами железа трансляция определённых мРНК.

Показано, что 3'-нетранслируемая область (3'-UTR) мРНК рецептора трансферина человека обеспечивает зависимый от железа контроль стабильности этой мРНК. Делеционные эксперименты позволили идентифицировать фрагменты длиной в 678 нуклеотидов в ДНК, комплементарной мРНК для рецептора, которые определяют стабильность мРНК. Внутри этого фрагмента располагается пять структур «стебель-

петля», дестабилизирующие эту мРНК в присутствии избытка ионов железа.

Сходным образом регулируется трансляция мРНК синтетазы  $\delta$ -аминолевулиновой кислоты и субъединицы  $\beta$ -сукцинатдегидрогеназы позвоночных животных. Но, в этом случае, уже 5'-UTR мРНК белков содержат регуляторный элемент IRE (iron-regulatory element), с которым взаимодействует белок IRP (iron-regulatory protein), акцептирующий ионы железа. В отсутствие железа IRP связывается с IRE и блокирует трансляцию мРНК. Сродство IRP к IRE понижается в 50-100 раз, если он находится в комплексе с ионами железа. Этого оказывается достаточно для вовлечения соответствующих мРНК в трансляцию.

И наоборот, катионы  $Mg^{++}$  стимулируют укорочение терминальной поли-А-последовательности, определяющей стабильность и трансляционную активность мРНК эукариот, через усиление прочности определённых структур, с которыми связываются белки, определяющие деаденилирование молекулы мРНК. Известно, что AU-богатые области на 3'-конце молекулы мРНК, предшествующие терминальной поли-(А)-последовательности и определяющие скорость её деаденилирования, содержат структуры в виде шпилек, устойчивость которых зависит от наличия и количества катионов магния [29]. Вероятно, этим и объясняется обратная зависимость степени полиаденилирования мРНК от количества катионов магния.

Возможно, стабилизация мРНК вызывает ускорение обмена рРНК, что необходимо для эффективного функционирования рибосом. В пользу этого предположения свидетельствуют литературные данные о том, что в опухолевых клетках животных мРНК имеет большее время полужизни по сравнению с таковой нормальных клеток, но рРНК опухолевых клеток содержит на 30-50 % меньше магния и имеет меньшее время полужизни:

оборот рибосом возрастает с 2,4% в сутки до 3,1-3,6% у пациентов с онкологическими заболеваниями [29].

Эти теоретические положения об участии катионов магния в регуляции стабильности РНК объясняют разницу в молекулярных механизмах формирования морозоустойчивости и являются основой простых лабораторных методов оценки морозоустойчивости сортов озимой мягкой пшеницы [25, 27] и озимого ячменя [28].

Многостороннее, многофункциональное участие кремния в биологических процессах растений *in vivo* и стабилизация мРНК злаков при контакте с кремнием ( $\text{SiO}_2$ ) *in vitro*, описанное в настоящей статье, свидетельствует о больших возможностях посттранскрипционных кремний-зависимых процессов регуляции экспрессии генов. Эта малоисследованная область, несомненно, интересна как с теоретической, так и с практической точки зрения.

### Литература

- 1) Алёшин Н.Е., Авакян Э.Р. К вопросу о кремниевом обмене риса // Бюлл. НТИ ВНИИ риса, Краснодар, 1978, вып. 26, с. 16-20.
- 2) Алёшин Н.Е. Кремниевое питание риса // С.-х. за рубежом. Растениеводство, 1982, № 6, с. 9-14.
- 3) Алёшин Н.Е., Авакян Э.Р., Алёшин Е.П. Содержание кремния в РНК риса // Докл. ВАСХНИЛ, 1982, № 6, с. 6-7.
- 4) Алёшин Н.Е. О биологической роли кремния у риса // Вестник с.-х. науки, 1988, № 10, с. 77-85.
- 5) Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Хлебцов Б.Н., Плотников В.К., Хлебцов Н.Г. Оптические свойства конъюгатов коллоидного золота с олиготимидином и их изменение при реакции гибридизации с полиадениловой кислотой // Коллоидный журнал, 2005, Т.67, №4, с. 458-468.
- 6) Воронков М. Г., Зелчан Г. И., Лукевиц Э. Я. Кремний и жизнь. Биохимия, токсикология и фармакология соединений кремния. Изд. 2-е, перераб.и доп. Рига: Зинатне, 1978, 588 с.
- 7) Воронков М.Г. Кузнецов И.Г. Удивительные элементы жизни, Иркутск, 1983, 107 с.
- 8) Воронков М.Г. Кузнецов И.Г. Кремний в живой природе, Новосибирск: Наука, 1984, 155 с.
- 9) Воронков М.Г., Барышок В.П. Силатраны в медицине и сельском хозяйстве, Новосибирск: Изд. СО РАН, 2005, 258 с.
- 10) Глазко В.И., Белопухов С.Л. Нанотехнологии и наноматериалы в сельском хозяйстве, Москва: Изд.РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, 2008, 227с.

11) Гордова В.С., Сапожников С.П., Сергеев В.Е., Карышев П.Б. Основы биосилификации // Вестник Чувашского университета, 2013, №3, с. 401-409.

12) Кисберри Н.А., Япп С.В., Идрис А. Мезопористые кремниевые наночастицы как платформа для доставки нуклеиновых кислот внутрь клетки // Биохимия, 2017, т.82, в. 6, с. 873-882.

13) Клещенко Е., Две дамы, ДНК и мышьяк // Химия и жизнь, 2012, 3 3, с.7-10.

14) Колесников М.П. Формы кремния в растениях // Успехи биологической химии, 2001, т.41, с. 301-332.

15) Курсанов А.Л. Учёный и аудитория. М.; Наука, 1982, 273 с.

16) Мюллер С.(п/р) Нуклеиновые кислоты от А до Я, Москва, БИНОМ, Лаборатория знаний, 2013, 413 с.

17) Насонов А.И., Полежаев С.Л., Радуль А.П., Рядчиков В.Г., Плотников В.К. Взаимосвязь содержания катионов магния ( $Mg^{++}$ ), стабильности РНК и интенсивности метаболизма в клетках эукариот // Труды Кубанского государственного аграрного университета, 2008, 2(11), с.104-110.

18) Ненько Н.И., Плотников В.К., Кузембаева Н.А., Гаража В.Н., Суркова Е.В., Насонов А.И., Пospelова Ю.С., Малюга Н.Г. Влияние препарата фурулан на физиолого-биохимические характеристики созревающего зерна озимой пшеницы // Прикладная биохимия и микробиология, 2007, №6, с. 715-721.

19) Плотников В.К. Стабильность мРНК как фактор регуляции экспрессии генов в клетках эукариот // Успехи современной биологии, 1992, т. 112, вып. 2, с. 186-199.

20) Плотников В.К., Бакалдина Н.Б., Бибишев В.А. Российский патент № 2084133 на изобретение «Способ диагностики физиологического состояния зерновых культур» от 20июля 1997.

21) Плотников В.К., Бакалдина Н.Б. Посттранскрипционная регуляция экспрессии генов: изучение дифференциального распада мРНК растений *in vivo* и *in vitro* // Генетика, 1997, т. 33, №3, с. 343-349.

22) Плотников В.К., Бакалдина Н.Б., Новиков Б.Н., Алексеенко Ж.В., Бибишев В.А., Полежаев С.Л., Рядчиков В.Г. Посттранскрипционная регуляция экспрессии генов эукариот: влияние стрессов на стабильность мРНК *in vitro* // Генетика, 1998, т. 34, № 9, с. 1205-1211.

23) Плотников В.К. Генетико-физиологическая детерминация распада мРНК злаков *in vitro* // Успехи современной биологии, 2003, т. 123, № 1, с. 98-109.

24) Плотников В.К., Насонов А.И., Ладатко А.Г. Вариабельность содержания катионов магния ( $Mg^{++}$ ) в РНК проростков озимой мягкой пшеницы // Сборник статей по материалам конференции «Аминокислотное питание животных и проблема белковых ресурсов», (23 марта, 2004, Краснодар) Краснодар, 2005, с.349 - 352.

25) Плотников В.К., Насонов А.И., Иваненко Е.Е., Кузембаева Н.А., Букреева Г.И., Каленич В.И. Взаимосвязь морозостойкости озимой мягкой пшеницы с содержанием катионов магния в РНК // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии, Москва, 2008, Вып. 2, С. 89-92.

26) Плотников В.К. Биология РНК зерновых культур, Краснодар, Издательство «Эдви», 2009, 375 с.

27) Плотников В.К., Салфетников А.А. 60 лет в строю: особенности молекулярной биологии озимой мягкой пшеницы сорта Безостая 1 // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета, 2016, № 118, С. 627-657.

28) Плотников В.К., Смирнова Е.В., Репко Н.В., Салфетников А.А. Сортоспецифичность действия трилона Б на прорастания семян озимого ячменя //



Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета, 2016, № 120, С. 706-729.

29) Рядчиков В.Г., Плотников В.К. Экспрессия генов эукариот при аминокислотном имбалансе, 2014, Краснодар, КубГАУ, 375 с.

30) Шеуджен А.Х. Биогеохимия. - Майкоп: ГУРИПП "Адыгея", 2003, 1028 с.

31) Plotnikov V.K., Bakaldina N.B. Differential stability of zein mRNA in developing corn kernel // *Plant Molecular Biology*, 1996, V.31., P.507-515.

32) Wolfe-Simon F, Switzer Blum J, Kulp TR, Gordon GW, Hoefft SE, Pett-Ridge J, Stolz JF, Webb SM, Weber PK, Davies PC, Anbar A, Oremland RS. A Bacterium That Can Grow by Using Arsenic Instead of Phosphorus // *Science*, 2011, V.332, № (332) 6034, P.1163-1166.

33) Reaves M.L., Sinha S., Rabinowitz J.D., Kruglyak L., Redfield R.J. Absence of detectable arsenate in DNA from arsenate-grown CFAJ-1 cells // *Science*, 2012, 337(6093): 10.1126/science.1219861 Published online 2012 Jul 8. doi: 10.1126/science.1219861

### References

1) Aljoshin N.E., Avakjan Je.R. K voprosu o kremnievom obmene risa // *Bjull. NTI VNII risa*, Krasnodar, 1978, vyp. 26, s. 16-20.

2) Aljoshin N.E. Kremnievoe pitanie risa // *S.-h. za rubezhom. Rasteniyevodstvo*, 1982, № 6, s. 9-14.

3) Aljoshin N.E., Avakjan Je.R., Aljoshin E.P. Soderzhanie kremnija v RNK risa // *Dokl. VASHNIL*, 1982, № 6, s. 6-7.

4) Aljoshin N.E. O biologicheskoj roli kremnija u risa // *Vestnik s.-h. nauki*, 1988, № 10, s. 77-85.

5) Bogatyrev V.A., Dykman L.A., Hlebcov B.N., Plotnikov V.K., Hlebcov N.G. Opticheskie svojstva konjugatov kolloidnogo zolota s oligotimidinom i ih izmenenie pri reakcii gibridizacii s poliadenilovoj kislotoj // *Kolloidnyj zhurnal*, 2005, T.67, №4, s. 458-468.

6) Voronkov M. G., Zelchan G. I., Lukevic Je. Ja. Kremnij i zhizn'. Biohimija, toksikologija i farmakologija soedinenij kremnija. Izd. 2-e, pererab.i dop. Riga: Zinatne, 1978, 588 s.

7) Voronkov M.G. Kuznecov I.G. Udivitel'nye jelementy zhizni, Irkutsk, 1983, 107 s.

8) Voronkov M.G. Kuznecov I.G. Kremnij v zhivoj prirode, Novosibirsk: Nauka, 1984, 155 s.

9) Voronkov M.G., Baryshok V.P. Silatransy v medicine i sel'skom hozjajstve, Novosibirsk: Izd. SO RAN, 2005, 258 s.

10) Glazko V.I., Belopuhov S.L. Nanotehnologii i nanomaterialy v sel'skom hozjajstve, Moskva: Izd.RGAU-MSHA im. K.A. Timirjazeva, 2008, 227s.

11) Gordova V.S., Sapozhnikov S.P., Sergeev V.E., Karyshev P.B. Osnovy biosilifikacii // *Vestnik Chuvashskogo universiteta*, 2013, №3, s. 401-409.

12) Kisberri N.A., Japp S.V., Idris A. Mezoporistye kremnievye nanochasticy kak platforma dlja dostavki nukleinovyh kislot vnutr' kletki // *Biohimija*, 2017, t.82, v. 6, s. 873-882.

13) Kleshhenko E., Dve damy, DNK i mysh'jak // *Himija i zhizn'*, 2012, 3 3, s.7-10.

14) Kolesnikov M.P. Formy kremnija v rastenijah // *Uspehi biologicheskoj himii*, 2001, t.41, s. 301-332.

15) Kursanov A.L. Uchjonyj i auditorija. M.; Nauka, 1982, 273 s.

16) Mjuller S.(p/r) Nukleinovye kisloty ot A do Ja, Moskva, BINOM, Laboratorija znaniy, 2013, 413 s.

17) Nasonov A.I., Polezhaev S.L., Radul' A.P., Rjadchikov V.G., Plotnikov V.K. Vzaimosvjaz' sodержanija kationov magnija ( $Mg^{++}$ ), stabil'nosti RNK i intensivnosti metabolizma v kletkah jeukariot // Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, 2008, 2(11), s.104-110.

18) Nen'ko N.I., Plotnikov V.K., Kuzembaeva N.A., Garazha V.N., Surkova E.V., Nasonov A.I., Pospelova Ju.S., Maljuga N.G. Vlijanie preparata furolan na fiziologo-biohimicheskie harakteristiki sozrevajushhego zerna ozimoj pshenicy // Prikladnaja biohimija i mikrobiologija, 2007, №6, s. 715-721.

19) Plotnikov V.K. Stabil'nost' mRNK kak faktor reguljacii jekspressii genov v kletkah jeukariot // Uspehi sovremennoj biologii, 1992, t. 112, vyp. 2, s. 186-199.

20) Plotnikov V.K., Bakaldina N.B., Bibishev V.A. Rossijskij patent № 2084133 na izobretenie «Sposob diagnostiki fiziologičeskogo sostojanija zernovyh kul'tur» ot 20ijulja 1997.

21) Plotnikov V.K., Bakaldina N.B. Postranskripcionnaja reguljacija jekspressii genov: izučenie differencial'nogo raspada mRNK rastenij in vivo i in vitro // Genetika, 1997, t. 33, №3, s. 343-349.

22) Plotnikov V.K., Bakaldina N.B., Novikov B.N., Alekseenko Zh.V., Bibishev V.A., Polezhaev S.L., Rjadchikov V.G. Posttranskripcionnaja reguljacija jekspressii genov jeukariot: vlijanie stressov na stabil'nost' mRNK in vitro // Genetika, 1998, t. 34, № 9, s. 1205-1211.

23) Plotnikov V.K. Genetiko-fiziologičeskaja determinacija raspada mRNK zlakov in vitro // Uspehi sovremennoj biologii, 2003, t. 123, № 1, s. 98-109.

24) Plotnikov V.K., Nasonov A.I., Ladatko A.G. Variabel'nost' sodержanija kationov magnija ( $Mg^{++}$ ) v RNK prorostkov ozimoj mjagkoj pshenicy // Sbornik statej po materialam konferencii «Aminokislotoe pitanie zhivotnyh i problema belkovykh resursov», (23 marta, 2004, Krasnodar) Krasnodar, 2005, s.349 - 352.

25) Plotnikov V.K., Nasonov A.I., Ivanenko E.E., Kuzembaeva N.A., Bukreeva G.I., Kalenich V.I. Vzaimosvjaz' morozostojkosti ozimoj mjagkoj pshenicy s sodержaniem kationov magnija v RNK // Izvestija Timirjazevskoj sel'skohozjajstvennoj akademii, Moskva, 2008, Vyp. 2, S. 89-92.

26) Plotnikov V.K. Biologija RNK zernovyh kul'tur, Krasnodar, Izdatel'stvo «Jedvi», 2009, 375 s.

27) Plotnikov V.K., Salfetnikov A.A. 60 let v stroju: osobennosti molekularnoj biologii ozimoj mjagkoj pshenicy sorta Bezostaja 1 // Politematičeskij setevoj jelektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, 2016, № 118, S. 627-657.

28) Plotnikov V.K., Smirnova E.V., Repko N.V., Salfetnikov A.A. Sortospecifičnost' dejstvija trilona B na prorastanija semjan ozimogo jachmenja // Politematičeskij setevoj jelektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, 2016, № 120, S. 706-729.

29) Rjadchikov V.G., Plotnikov V.K. Jekspressija genov jeukariot pri aminokislotnom imbalanse, 2014, Krasnodar, KubGau, 375 s.

30) Sheudzhen A.H. Biogeohimija. - Majkop: GURIPP "Adygeja", 2003, 1028 s.

31) Plotnikov V.K., Bakaldina N.B. Differential stability of zein mRNA in developing corn kernel // Plant Molecular Biology, 1996, V.31., P.507-515.

32) Wolfe-Simon F, Switzer Blum J, Kulp TR, Gordon GW, Hoelt SE, Pett-Ridge J, Stolz JF, Webb SM, Weber PK, Davies PC, Anbar A, Oremland RS. A Bacterium That Can Grow by Using Arsenic Instead of Phosphorus // Science, 2011, V.332, № (332) 6034, P.1163-1166.

33) Reaves M.L., Sinha S., Rabinowitz J.D., Kruglyak L., Redfield R.J. Absence of detectable arsenate in DNA from arsenate-grown CFAJ-1 cells // Science, 2012, 337(6093): 10.1126/science.1219861 Published online 2012 Jul 8. doi: 10.1126/science.1219861