

УДК 577.217:577.21

ЭНХАНСЕРЫ ТРАНСЛЯЦИИ ДЛЯ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ РАСТЕНИЙ

© 2014 г. А.В. Кочетов^{1,2}, Е.А. Филипенко¹, О.Г. Смирнова¹, В.К. Шумный^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: ak@bionet.nsc.ru;

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 9 октября 2014 г. Принята к публикации 23 октября 2014 г.

Трансгенные растения широко используются для проведения фундаментальных и прикладных исследований. Эффективная экспрессия трансгенов зависит от правильного выбора служебных элементов при планировании структуры генетической конструкции, в частности, важное значение имеет структура 5'-нетранслируемого района, влияющая на эффективность инициации трансляции мРНК. В статье рассмотрены характеристики 5'-НТП, определяющие эффективность трансляции мРНК в клетках растений, а также различные трансляционные энхансеры.

Ключевые слова: трансгенные растения, генная инженерия, трансляция, характеристики мРНК, энхансеры.

ХАРАКТЕРИСТИКИ мРНК ГЕНОВ РАСТЕНИЙ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ОБЩУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ

«Линейное сканирование» – базовый эукариотический механизм инициации трансляции

Считается, что в клетках эукариот инициация трансляции (взаимодействие рибосомы и мРНК, а также поиск и распознавание стартового кодона) может происходить по двум основным путям: по механизму «линейного сканирования» и с помощью сайтов внутренней инициации трансляции. Кроме этого, существует несколько модификаций основных механизмов (шунтирование потока рибосом, трансляционные энхансеры) (Kozak, 2005; Jackson *et al.*, 2010). «Линейное сканирование» может рассматриваться в качестве механизма, используемого «по умолчанию», поскольку все остальные варианты требуют присутствия в структуре мРНК дополнительных сигналов. В большинстве случаев типичные генетические

конструкции для экспрессии трансгенов в растениях (особенно для фундаментальных исследований) не содержат специальных сигналов и трансляция мРНК трансгена происходит по механизму «линейного сканирования».

Согласно этому механизму, 40S субъединица рибосомы в комплексе с факторами инициации трансляции и метиониновой инициаторной тРНК распознает кеп на 5'-конце мРНК и линейно (т. е. последовательно и непрерывно) движется вдоль матрицы в 3'-направлении в поиске стартового кодона трансляции. По-видимому, в большинстве случаев в качестве стартового кодона у эукариот используется триплет AUG, хотя результаты последних высокопроизводительных экспериментов (Ribo-seq) показали, что в клетках млекопитающих и дрожжей рибосомы могут с высокой частотой распознавать не-AUG триплеты (Ingolia *et al.*, 2009, 2011). Однако в настоящее время данных по не-AUG стартовым кодонам недостаточно для их адекватной интерпретации и они не принимаются в расчет в процедурах картирования структуры эукариотических генов. Известно, что распознавание триплета AUG в качестве сайта инициации

трансляции (**translation initiation site, TIS**) зависит от его нуклеотидного окружения (контекста): если контекст оптимален, большинство 40S-субъединиц рибосом распознает AUG и иницирует на нем трансляцию. Однако, если контекст субоптимален, часть 40S-субъединиц рибосом не сможет распознать такой стартовый кодон, пропустит его, продолжит сканирование в 3'-направлении и может иницировать трансляцию на нижерасположенном стартовом кодоне (так называемом механизме «leaky scanning»). Соотношение количества 40S субъединиц рибосом, распознавших и пропустивших стартовый кодон в субоптимальном контексте, в основном зависит от характеристик его нуклеотидного контекста и некоторых структурных особенностей мРНК (Kozak, 2005; Jackson *et al.*, 2010).

Контекст стартового кодона трансляции

Хорошо известно, что частоты нуклеотидов в позициях вокруг стартового кодона трансляции отклоняются от средних по соответствующему функциональному району мРНК (5'-нетранслируемой последовательности (5'-НТП) и белок-кодирующей части (**coding DNA sequence, CDS**)). Считается, что консенсусная последовательность соответствует оптимальному контексту, т. е. варианту нуклеотидного окружения, обеспечивающему распознавание стартового кодона подавляющим большинством 40S субъединиц рибосом, поступивших на мРНК. У млекопитающих консенсус контекста стартового кодона выглядит как GCCRCCAUGG (R = A или G). Относительная значимость нуклеотидов в разных позициях была оценена экспериментально (хотя и не систематически). Показано, что позиции -3 и +4 особенно значимы. Контексты AnnAUGn и GnnAUGG считаются близкими к оптимальным, контекст YnnAUGH (Y = U или C; H = не G) считается наименее эффективным (наиболее «пропускающим»). Относительную «силу» других вариантов контекста оценить трудно. Считается, что если в позиции -3 расположен пиримидиновый нуклеотид (U или C), эффективность распознавания увеличивается в тех случаях, когда в остальных позициях расположены нуклеотиды, соответствующие консенсусу (Kozak, 2005; Jackson *et al.*, 2010; Volkova, Kochetov, 2010).

Структура контекста стартового кодона у однодольных растений близка к таковой у млекопитающих (консенсус GCRGCARCCAUGGC), в то время как у двудольных растений она отличается (консенсус AAAAAAAAAAMAUGGC; M = A или C) (Cavener, Ray, 1991). Показано, что наиболее значимыми позициями контекста стартового кодона трансляции в клетках растений также являются -3 и +4; к числу существенных минорных позиций относят -2, -1, +5. Варианты контекста GCCAUGGC и AAAUGGC были наиболее эффективными в протопластах кукурузы и табака соответственно (Lukaszewicz *et al.*, 2000). Были сделаны попытки систематического сравнительного анализа эффективности вариантов контекста стартового кодона, в частности, перебор вариантов контекста в позициях от -3 до -1 показал, что эффективная трансляция наблюдалась для контекстов (A/G)(a/c)(a/g)AUG в клетках *Arabidopsis thaliana* и (A/G)(u/C)(g/C)AUG в клетках *Oryza sativa* (прописные буквы соответствуют более эффективному варианту) (Sugio *et al.*, 2010). В другом исследовании было найдено, что в клетках *A. thaliana* эффективность трансляции мРНК репортерного гена при изменении структуры 5'-НТП могла изменяться в 200 раз. Аденины в позициях от -5 до -1 оказывали наиболее положительный эффект на распознавание стартового кодона (уридины в этих позициях были наименее эффективны). В целом эффективность трансляции положительно коррелировала с присутствием аденинов в позициях от -21 до -1 (Kim *et al.*, 2014).

Размер 5'-НТП

Существует ограничение на минимальный размер 5'-НТП: показано, что если лидерный район меньше 15 нуклеотидов, то часть поступающих на 5'-конец мРНК 40S субъединиц рибосом не сможет распознать такой сайт инициации трансляции. По-видимому, это связано с особенностями организации 48S-комплекса, взаимодействующего с мРНК – в его структуре антикодон инициаторной мет-тРНК расположен на расстоянии в 13–15 н. от края комплекса, движущегося вдоль мРНК в 3'-направлении. При посадке комплекса на 5'-конец мРНК те триплеты AUG, которые расположены на этом

или меньшем расстоянии от 5'-конца, могут не распознаваться в качестве сайтов инициации трансляции вследствие конформационных затруднений (Kozak, 2005; Jackson *et al.*, 2010). Принципиальных ограничений на верхний предел размера 5'-НТП нет: если лидерный район мРНК не содержит триплетов AUG (так называемых **upstream AUG, uAUG**) и не формирует стабильную вторичную структуру, то он может обеспечивать эффективную посадку 40S субъединиц рибосом и их перемещение до сайта инициации трансляции. Однако чем больше размер 5'-НТП, тем выше вероятность формирования стабильных шпильки или появления uAUG по случайным причинам (например вследствие мутаций). Считается, что размер лидерного района между 50 и 75 нуклеотидами является наиболее благоприятным, тогда как 5'-НТП больше 175 нуклеотидов чаще способны уменьшать трансляционную активность мРНК генов растений (Kawaguchi, Bailey-Serres, 2005).

Вторичная структура мРНК

Стебле-петлевые структуры (шпильки) даже при их относительно небольшой стабильности способны существенно снизить трансляционную активность мРНК, если они расположены близко к 5'-концу матрицы. Предполагают, что при таком расположении шпильки могут мешать взаимодействию кэпа и кеп-связывающего комплекса eIF-4F. **Стабильные шпильки**, расположенные не на 5'-конце лидерного района, также способны снижать интенсивность трансляции, так как 40S субъединица рибосомы должна разрушить вторичную структуру (с помощью факторов инициации трансляции с РНК-геликазной активностью), что приводит к замедлению процесса линейного сканирования (Kozak *et al.*, 2005; Jackson *et al.*, 2010). Несмотря на то что представления о роли вторичной структуры в 5'-НТП в трансляционном процессе выглядят достаточно простыми, предсказание как вторичной структуры, так и ее ингибирующего эффекта весьма проблематично. По-видимому, молекулы мРНК в цитоплазме существуют в виде динамичного набора взаимопереходящих друг в друга конформаций, причем взаимодействия РНК с рибосомами,

факторами трансляционного аппарата и другими белками могут стабилизировать определенные сегменты матрицы в расплетенном состоянии. Эта область структурной биологии требует дополнительных высокопроизводительных экспериментов (Kertesz *et al.*, 2010), что позволит накопить больше данных и построить адекватные модели.

Обычно считается, что 5'-НТП с меньшим содержанием G+C могут обеспечить более высокую эффективность инициации трансляции, так как комплементарные взаимодействия между этими нуклеотидами вносят больший вклад в энергию вторичной структуры (Kozak, 2005; Kawaguchi, Bailey-Serres, 2005). Однако эта точка зрения не является полностью верной, так как нуклеотидная последовательность может содержать много G и C в сумме, но их соотношение может быть сильно сдвинуто в сторону одного из нуклеотидов и в таком случае число комплементарных взаимодействий будет небольшим. Было показано, что эукариотические 5'-НТП специфически характеризуются дисбалансом в содержании комплементарных нуклеотидов (Kochetov *et al.*, 2002a, b, 2005), причем более эффективно транслируемые матрицы также характеризуются более выраженным дисбалансом в содержании G/C и A/U (Kochetov *et al.*, 1998, 1999).

Типичные причины низкой эффективности трансляции мРНК трансгена в растениях

Список существенных характеристик 5'-НТП включает: размер больше 30 нуклеотидов (предпочтительно между 40 и 80 н.), отсутствие uAUG, отсутствие стабильной вторичной структуры (по крайней мере вблизи 5'-конца молекулы), оптимальный контекст стартового кодона (пуриновый нуклеотид в позиции -3, желательнее гуанин в позиции +4; контекст aaaAUG предпочтителен для двудольных, a/gccAUG – для однодольных растений). Нужно отметить, что 5'-НТП – важный структурный элемент генетической конструкции. В литературе встречается много случаев, в которых белок-кодирующая часть изучаемого гена клонирована в стандартном векторе с неоптимизированным лидерным районом. Например, при клонировании в pVi121 5'-НТП будет слишком коротким, а контекст стартового кодона субоптимальным.

Кроме этого, в векторах 5'-НТП часто содержит элементы полилинкера с сайтами рестрикции, представляющими собой инвертированные повторы, что может приводить к формированию стабильных вторичных структур. Неудивительно, что использование модифицированного варианта рВи121 с улучшенным 5'-НТП обеспечило 10-кратное увеличение уровня экспрессии гена-репортера (De Amicis *et al.*, 2007).

Другая проблема может быть связана с потенциальным использованием альтернативных стартовых кодонов. Если 5'-НТП слишком короток или стартовый кодон расположен в субоптимальном контексте, трансляция может инициироваться на нижерасположенном (следующем) AUG. Если такой альтернативный TIS расположен в той же рамке считывания, что и CDS, может синтезироваться укороченная с N-конца изоформа белка. Этот механизм используется для синтеза некоторых клеточных белков, например, митохондриальная и ядерная изоформы ДНК-лигазы 1 *A. thaliana* синтезируются с одной мРНК с двух последовательно расположенных стартовых кодонов AUG, первый из которых расположен в субоптимальном контексте (Sunderland *et al.*, 2004). Показано, что альтернативные стартовые кодоны и механизм «leaky scanning» используются для синтеза пластидной и цитоплазматической/ядерной изоформ тРНК-лигазы *A. thaliana* и *O. sativa*, пластидной и митохондриальной изоформ протопорфириногенаксидазы шпината, ДНК-полимеразы арабидопсиса и т. п. (Christensen *et al.*, 2005; Englert *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2001). Однако, если следующий AUG расположен в рамке +1 или +2, то такой альтернативный стартовый кодон будет соответствовать небольшой рамке считывания, полностью отличной от аннотированной CDS. По-видимому, довольно большая часть эукариотических (в том числе и растительных) мРНК может содержать альтернативные рамки считывания и кодировать дополнительные изоформы известных белков или новые полипептиды (Kochetov, 2008; Bazykin, Kochetov, 2011; Ingolia *et al.*, 2009, 2011). Небольшие белки могут выполнять ряд важных функций у растений (регулировать процессы роста и развития, участвовать в защите от фитопатогенов и т. п.) и их изучение считается актуальным направлением развития современной

геномики и протеомики (Andrews, Rothnagel, 2014; Marmioli, Maestri, 2014).

Возможность присутствия альтернативных сайтов инициации трансляции должна приниматься во внимание в тех случаях, когда трансгенные растения используются в качестве модели для исследования функций конкретных генов. Следует учесть, что если стартовый кодон изучаемого гена был расположен в субоптимальном контексте, а в созданной для его изучения генетической конструкции был использован оптимальный контекст (для увеличения уровня экспрессии), то существует вероятность, что такая модель не будет полностью адекватной, так как альтернативные рамки считывания в модельном трансгенном растении транслироваться не будут.

ТРАНСЛЯЦИОННЫЕ ЭНХАНСЕРЫ, УСИЛИВАЮЩИЕ ОБЩУЮ (НЕСПЕЦИФИЧЕСКУЮ) ТРАНСЛЯЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ мРНК

Многие РНК-позитивные вирусы растений в ходе эволюции выработали механизмы, позволяющие их мРНК транслироваться на очень высоком уровне (Nicholson, White, 2011). Было показано, что некоторые 5'-НТП вирусного или клеточного происхождения способны усиливать эффективность трансляции гетерологичных мРНК в тех случаях, когда они использованы вместо аутологичных лидерных районов. Эти так называемые «трансляционные энхансеры» могут использоваться при планировании генетических конструкций. 67-нуклеотидный 5'-НТП вируса табачной мозаики («Omega leader») (Gallie *et al.*, 1987a) является наиболее широко используемым трансляционным энхансером в генной инженерии растений. Он позволяет существенно усилить эффективность трансляции гетерологичных мРНК в клетках двудольных растений (Fan *et al.*, 2012). Механизмы, лежащие в основе этого эффекта, не вполне понятны: было показано, что эта нуклеотидная последовательность может взаимодействовать с факторами инициации трансляции eIF4G и eIF3, а также с HSP101 (Gallie, 2002). В составе энхансера выделяют (CAA)_n – повтор, способный формировать специфическую структуру,

вовлеченную во взаимодействие с клеточными белками (Agalarov *et al.*, 2011). С нашей точки зрения, 5'-НТП вируса табачной мозаики может рассматриваться в качестве типового элемента генетической конструкции в тех случаях, когда необходимо увеличить уровень синтеза трансгенного белка (нужно отметить, что для биопродукции в технологических целях обычно используют специально разработанные более продвинутые подходы (см. Nopo *et al.*, 2012; Акуа, Shaul, 2013; Meshcheriakova *et al.*, 2014)). Другой распространенный трансляционный энхансер – 5'-НТП РНК4 вируса мозаики люцерны (Gallie *et al.*, 1987b). Он короче и несколько менее эффективен в сравнении с Омегалидером, но также был использован во многих экспериментах для увеличения трансляционной активности мРНК трансгенов в растениях. Эти два 5'-НТП представляют собой классические примеры кеп-зависимых трансляционных энхансеров, имеющих в инструментарии генной инженерии растений.

Известно несколько других 5'-НТП, для которых была показана способность усиливать трансляционную активность гетерологичных мРНК в клетках растений. Однако следует учитывать тот факт, что во многих случаях такое усиление было продемонстрировано в сравнении с контрольными конструкциями, у которых 5'-НТП был взят из векторной плазмиды и трансляционная активность репортерных мРНК в контроле могла быть ниже, чем у растительных матриц (как в случае рBi121, см. выше). Возможно, некоторые из таких «трансляционных энхансеров» представляли собой 5'-НТП, оптимизированные для взаимодействия с аппаратом трансляции в клетках растений (т. е. их активность не определялась какими-то дополнительными механизмами).

В качестве примеров таких усилителей трансляции можно привести 65-нуклеотидный лидерный район глутаминсинтетазы сои (Ortega *et al.*, 2012; контрольный вектор САНБИА 2301 содержал 5'-НТП размером 20 н.). 5'-НТП из мРНК генов *HSP18.2*, *HSP17.4*, *HSP81-1*, *HSP81-2*, *HSP81-3* усиливали трансляцию репортерных мРНК в клетках табака и арабидопсиса (рBi121 был использован как контроль) (Dansako *et al.*, 2003). 5'-НТП мРНК генов алкогольдегидрогеназы арабидопсиса,

табака и риса усиливали трансляцию репортерных конструкций в клетках табака, 5'-НТП гена алкогольдегидрогеназы риса также обладала энхансерными свойствами в клетках *Oryza sativa* (Satoh *et al.*, 2004; Sugio *et al.*, 2008; Matsui *et al.*, 2009). Список трансляционно активных 5'-НТП включает также ряд других примеров (Yamamoto *et al.*, 1995; De Loose *et al.*, 1995; Kanoria, Burma, 2012).

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ЭНХАНСЕРЫ ТРАНСЛЯЦИИ

Известно, что эффективность трансляции мРНК может регулироваться тканеспецифически или зависеть от определенной фазы развития организма (Mustroph *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012). Трансляционные энхансеры такого типа были найдены в мРНК ферредоксина, 5'-НТП которой содержит так называемые светочувствительные элементы, присутствие которых приводит к быстрому снижению эффективности трансляции при наступлении темноты (Hansen *et al.*, 2001). Недавно были проведены высокопроизводительные эксперименты, показавшие, что изменение эффективности трансляции при изменении освещенности характерно для мРНК целого ряда генов растений (Juntawong, Bailey-Serres, 2012; Liu *et al.*, 2012). Другие примеры ткане- и стадийспецифических трансляционных энхансеров включают 5'-НТП гена *ntp303* табака (Hulzink *et al.*, 2002), *RbcS1* амаранта (Patel *et al.*, 2006) и т. п.

ТРАНСЛЯЦИЯ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

Хорошо известно, что разные виды абиотических стрессов приводят к специфическому снижению трансляционной активности большинства мРНК, в то время как часть матриц сохраняет трансляционную активность (Munoz, Castellano, 2012; Ueda *et al.*, 2012; Echevarría-Zomeco *et al.*, 2013; Roy, Arnim, 2013). Похожие изменения в трансляционной активности мРНК были найдены и при развитии вирусной инфекции (Moeller *et al.*, 2012). Механизмы, регулирующие эти процессы и регуляторные сигналы, опосредующие стресс-специфическую трансляционную активность мРНК, остаются малоизученными (Matsuura *et al.*, 2010).

Следует отметить, что растения часто оказываются в стрессовых условиях. Даже модельные эксперименты, которые проводят на трансгенных растениях, могут быть нацелены на выявление функций генов растений в стрессовых условиях (воздействие патогенов, засуха, изменение температуры и т. п.). Если экспрессия трансгена должна поддерживаться во время стресса, необходимо учесть это обстоятельство при планировании генетической конструкции. Было показано, что 5'-НТП некоторых стресс-индуцируемых генов способны обеспечить стресс-специфическую трансляцию мРНК репортерных генов. Например, 5'-НТП мРНК гена *FAD3* арабидопсиса обеспечивала 2-кратное усиление эффективности трансляции репортерной мРНК при низкотемпературном стрессе (Wang, Xu, 2010). 5'-НТП мРНК гена алкогольдегидрогеназы кукурузы усиливала трансляцию мРНК трансгена в клетках *Nicotiana benthamiana* в условиях кислородного голодания и теплового шока (Mardanov *et al.*, 2007). Омега-лидер также придавал мРНК трансгена способность транслироваться в условиях теплового шока (Gallie, 2002). Некоторые сигналы, обеспечивающие стресс-специфическую трансляцию при тепловом шоке, были недавно обнаружены в 5'-терминальной части 5'-НТП ряда клеточных мРНК (Matsuura *et al.*, 2008, 2013).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этой статье кратко рассмотрены структура 5'-НТП мРНК растений и влияние этого функционального района на эффективность экспрессии трансгенов. Трансляция мРНК является одной из критических стадий процесса экспрессии, определяющих интенсивность синтеза белка, поэтому правильный выбор 5'-НТП является одной из важных предпосылок эффективного планирования экспериментов с трансгенными растениями.

Авторы признательны программе РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития» и РФФИ (14-04-01036) за поддержку.

ЛИТЕРАТУРА

Agalarov S.C., Sogorin E.A., Shirokikh N.E., Spirin A.S. Insight into the structural organization of the omega leader of TMV RNA: the role of various regions of the

- sequence in the formation of a compact structure of the omega RNA // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011. V. 404. P. 250–253.
- Akua T., Shaul O. The Arabidopsis thaliana MHX gene includes an intronic element that boosts translation when localized in a 5' UTR intron // *J. Exp. Bot.* 2013. V. 64. P. 4255–4270.
- Andrews S.J., Rothnagel J.A. Emerging evidence for functional peptides encoded by short open reading frames // *Nat. Rev. Genet.* 2014. V. 15. P. 193–204.
- Bazykin G.A., Kochetov A.V. Alternative translation start sites are conserved in eukaryotic genomes // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. P. 567–577.
- Cavener D.R., Ray S.C. Eukaryotic start and stop translation sites // *Nucl. Acids Res.* 1991. V. 19. P. 3185–3192.
- Christensen A.C., Lyznik A., Mohammed S. *et al.* Dual-domain, dual-targeting organellar protein presequences in Arabidopsis can use non-AUG start codons // *Plant Cell.* 2005. V. 17. P. 2805–2816.
- Dansako T., Kato K., Satoh J. *et al.* 5' untranslated region of the HSP18.2 gene contributes to efficient translation in plant cells // *J. Biosci. Bioeng.* 2003. V. 95. P. 52–58.
- De Amicis F., Patti T., Marchetti S. Improvement of the pBI121 plant expression vector by leader replacement with a sequence combining a poly(CAA) and a CT motif // *Transgenic Res.* 2007. V. 16. P. 731–738.
- De Loose M., Danthinne X., Van Bockstaele E. *et al.* Different 5' leader sequences modulate b-glucuronidase accumulation levels in transgenic *Nicotiana tabacum* plants // *Euphytica.* 1995. V. 85. P. 209–216.
- Echevarría-Zomeño S., Yáñez E., Fernández-Bautista N., Castro-Sanz A.B. Regulation of translation initiation under biotic and abiotic stresses // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. P. 4670–4683.
- Englert M., Latz A., Becker D. *et al.* Plant pre-tRNA splicing enzymes are targeted to multiple cellular compartments // *Biochimie.* 2007. V. 89. P. 1351–1365.
- Fan Q., Treder K., Miller W.A. Untranslated regions of diverse plant viral RNAs vary greatly in translation enhancement efficiency // *BMC Biotechnol.* 2012. V. 12. P. 22.
- Gallie D.R. The 5'-leader of tobacco mosaic virus promotes translation through enhanced recruitment of eIF4F // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30. P. 3401–3411.
- Gallie D.R., Sleat D.E., Watts J.W. *et al.* The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts *in vitro* and *in vivo* // *Nucl. Acids Res.* 1987a. V. 15. P. 3257–3273.
- Gallie D.R., Sleat D.E., Watts J.W. *et al.* A comparison of eukaryotic viral 5'-leader sequences as enhancers of mRNA expression *in vivo* // *Nucl. Acids Res.* 1987b. V. 15. P. 8693–8711.
- Hansen E.R., Petracek M.E., Dickey L.F., Thompson W.F. The 5' end of the pea ferredoxin-1 mRNA mediates rapid and reversible light-directed changes in translation in tobacco // *Plant Physiol.* 2001. V. 125. P. 770–778.
- Hulzink R.J., Groot de P.F., Croes A.F. *et al.* The 5'-untranslated region of the ntp303 gene strongly enhances translation during pollen tube growth, but not during pollen maturation // *Plant Physiol.* 2002. V. 129. P. 342–353.
- Ingolia N.T., Ghaemmaghami S., Newman J.R., Weissman J.S. Genome-wide analysis *in vivo* of translation with nucle-

- otide resolution using ribosome profiling // *Science*. 2009. V. 324. P. 218–223.
- Ingolia N.T., Lareau L.F., Weissman J.S. Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes // *Cell*. 2011. V. 147. P. 789–802.
- Jackson R.J., Hellen C.U.T., Pestova T. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2010. V. 10. P. 113–127.
- Juntawong P., Bailey-Serres J. Dynamic light regulation of translation status in *Arabidopsis thaliana* // *Front. Plant Sci.* 2012. V. 3. P. 66.
- Kanoria S., Burma P.K. A 28 nt long synthetic 5'UTR (synJ) as an enhancer of transgene expression in dicotyledonous plants // *BMC Biotechnol.* 2012. V. 12. P. 85.
- Kawaguchi R., Bailey-Serres J. mRNA sequence features that contribute to translational regulation in *Arabidopsis* // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. P. 955–965.
- Kertesz M., Wan Y., Mazor E. *et al.*, Genome-wide measurement of RNA secondary structure in yeast // *Nature*. 2010. V. 467. P. 103–107.
- Kim Y., Lee G., Jeon E. *et al.* The immediate upstream region of the 5'-UTR from the AUG start codon has a pronounced effect on the translational efficiency in *Arabidopsis thaliana* // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. P. 485–498.
- Kochetov A.V. Alternative translation and hidden coding potential of eukaryotic mRNAs // *BioEssays*. 2008. V. 30. P. 683–691.
- Kochetov A.V., Ischenko I.V., Vorobiev D.G. *et al.* Eukaryotic mRNAs encoding abundant and scarce proteins are statistically dissimilar in many structural features // *FEBS Lett.* 1998. V. 440. P. 351–355.
- Kochetov A.V., Ponomarenko M.P., Frolov A.S. *et al.* Prediction of eukaryotic mRNA translational properties // *Bioinformatics*. 1999. V. 15. P. 704–712.
- Kochetov A.V., Sarai A., Rogozin I.B. *et al.* The role of alternative translation start sites in generation of human protein diversity // *Mol. Genet. Genomics*. 2005. V. 273. P. 491–496.
- Kochetov A.V., Sarai A., Vorob'ev D.G., Kolchanov N.A. The context organization of functional regions in yeast genes with high-level expression // *Mol. Biol. (Mosk)*. 2002a. V. 36. P. 1026–1034.
- Kochetov A.V., Svirnik O.A., Rogozin I.B. *et al.* Context organization of mRNA 5'-untranslated regions of higher plants // *Mol. Biol. (Mosk)*. 2002b. V. 36. P. 649–656.
- Kozak M. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes // *Gene*. 2005. V. 361. P. 13–37.
- Liu M.J., Wu S.H., Chen H.M. Widespread translational control contributes to the regulation of *Arabidopsis* photomorphogenesis // *Mol. Syst. Biol.* 2012. V. 8. P. 566.
- Lukaszewicz M., Feuermann M., Jerouville B. *et al.* *In vivo* evaluation of the context sequence of the translation initiation codon in plants // *Plant Sci*. 2000. V. 154. P. 89–98.
- Mardanov E.S., Zamchuk L.A., Ravin N.V. The 5' untranslated region of the maize alcohol dehydrogenase gene provides efficient translation of mRNA in plants under stress conditions // *Mol. Biol. (Mosk)*. 2007. V. 41. P. 1002–1008.
- Marmioli N., Maestri E. Plant peptides in defense and signaling // *Peptides*. 2014. V. 56. P. 30–44.
- Matsui T., Asao H., Ki M. *et al.* Transgenic lettuce producing a candidate protein for vaccine against edema disease // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2009. V. 73. P. 1628–1634.
- Matsuura H., Ishibashi Y., Shinmyo A. *et al.* Genome-wide analyses of early translational responses to elevated temperature and high salinity in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell. Physiol.* 2010. V. 51. P. 448–462.
- Matsuura H., Shinmyo A., Kato K. Preferential translation mediated by Hsp81-3 5'-UTR during heat shock involves ribosome entry at the 5'-end rather than an internal site in *Arabidopsis* suspension cells // *J. Biosci. Bioeng.* 2008. V. 105. P. 39–47.
- Matsuura H., Takenami S., Kubo Y. *et al.* A computational and experimental approach reveals that the 5'-proximal region of the 5'-UTR has a cis-regulatory signature responsible for the heat stress-regulated mRNA translation in *Arabidopsis* // *Plant Cell. Physiol.* 2013. V. 54. P. 474–483.
- Meshcheriakova Y.A., Saxena P., Lomonosoff G.P. Fine-tuning levels of heterologous gene expression in plants by orthogonal variation of the untranslated regions of a nonreplicating transient expression system // *Plant Biotechnol. J.* 2014. V. 12. P. 718–727.
- Moeller J.R., Moscou M.J., Bancroft T. *et al.* Differential accumulation of host mRNAs on polyribosomes during obligate pathogen-plant interactions // *Mol. Biosyst.* 2012. V. 8. P. 2153–2165.
- Mustroph A., Zanetti M.E., Jang C.J. *et al.* Profiling translomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in *Arabidopsis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. P. 18843–18848.
- Munoz A., Castellano M.M. Regulation of translation initiation under abiotic stress conditions in plants: Is it a conserved or not so conserved process among eukaryotes? // *Comp. Funct. Genomics*. 2012:406357.
- Nicholson B.L., White K.A. 3' Cap-independent translation enhancers of positive-strand RNA plant viruses // *Curr. Opin. Virol.* 2011. V. 1. P. 373–380.
- Nopo L., Woffenden B.J., Reed D.G. *et al.* Super-promoter: TEV, a powerful gene expression system for tobacco hairy roots // *Methods Mol. Biol.* 2012. V. 824. P. 501–526.
- Ortega J.L., Wilson O.L., Sengupta-Gopalan C. The 5' untranslated region of the soybean cytosolic glutamine synthetase $\beta(1)$ gene contains prokaryotic translation initiation signals and acts as a translational enhancer in plants // *Mol. Genet. Genomics*. 2012. V. 287. P. 881–893.
- Patel M., Siegel A.J., Berry J.O. Untranslated regions of FbRbcS1 mRNA mediate bundle sheath cell-specific gene expression in leaves of a C4 plant // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 25485–25491.
- Roy B., Arnim von A.G. Translational regulation of cytoplasmic mRNAs // *Arabidopsis Book*. 2013. V. 11. e0165.
- Satoh J., Kato K., Shinmyo A. The 5'-untranslated region of the tobacco alcohol dehydrogenase gene functions as an effective translational enhancer in plant // *J. Biosci. Bioeng.* 2004. V. 98. P. 1–8.
- Sugio T., Matsuura H., Matsui T. *et al.* Effect of the sequence context of the AUG initiation codon on the rate of translation in dicotyledonous and monocotyledonous plant cells // *J. Biosci. Bioeng.* 2010. V. 109. P. 170–173.
- Sugio T., Satoh J., Matsuura H. *et al.* The 5'-untranslated region of the *Oryza sativa* alcohol dehydrogenase gene functions

- as a translational enhancer in monocotyledonous plant cells // *J. Biosci. Bioeng.* 2008. V. 105. P. 300–302.
- Sunderland P.A., West C.E., Waterworth W.M., Bray C.M. Choice of a start codon in a single transcript determines DNA ligase I isoform production and intercellular targeting in *Arabidopsis thaliana* // *Biochem. Soc. Transact.* 2004. V. 32. P. 614–616.
- Ueda K., Matsuura H., Yamaguchi M. *et al.* Genome-wide analyses of changes in translation state caused by elevated temperature in *Oryza sativa* // *Plant Cell. Physiol.* 2012. V. 53. P. 1481–1491.
- Volkova O.A., Kochetov A.V. Interrelations between the nucleotide context of human start AUG codon, N-end amino acids of the encoded protein and initiation of translation // *J. Biomol. Struct. Dynam.* 2010. V. 27. P. 611–618.
- Wang C.T., Xu Y.N. The 5' untranslated region of the FAD3 mRNA is required for its translational enhancement at low temperature in *Arabidopsis* roots // *Plant Sci.* 2010. V. 179. P. 234–240.
- Watanabe N., Che F.-S., Iwano M. *et al.* Dual targeting of spinach protoporphyrinogen oxidase II to mitochondria and chloroplasts by alternative use of two in-frame initiation codons // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 20474–20481.
- Yamamoto Y.Y., Tsuji H., Obokata J. 5'-leader of a photosystem I gene in *Nicotiana sylvestris*, *psaDb*, contains a translational enhancer // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 12466–12470.

TRANSLATIONAL ENHANCERS FOR PLANT GENE ENGINEERING

A.V. Kochetov^{1,2}, E.A. Filipenko¹, O.G. Smirnova¹, V.K. Shumny^{1,2}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: ak@bionet.nsc.ru;

² Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia

Summary

Transgenic plants are often used in both fundamental and applied research. It is well known that transgene expression strongly depends on the genetic construct design. In particular, 5'-UTR is an important element, as it influences mRNA translation efficiency and the protein synthesis rate. The review considers 5'-UTR features controlling translation efficiency in plant cells and some useful translational enhancers.

Key words: transgenic plants, gene engineering, translation, mRNA features, enhancers.