



ВЛИЯНИЕ НЕТРАНСЛИРУЕМЫХ ОБЛАСТЕЙ мРНК РКМζ НА ТРАНСЛЯЦИЮ ЛЮЦИФЕРАЗЫ

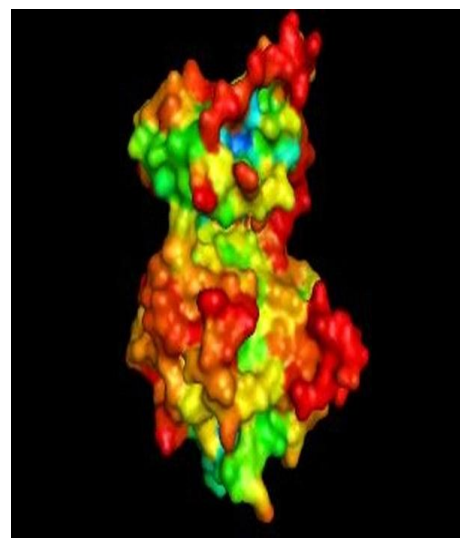
АБАКУМОВА КИРА, БУЯНОВА ЕЛИЗАВЕТА, ЗОТОВА МАРИЯ, НОВИКОВ МИХАИЛ,
ПОПКОВА АЛЁНА, СТЕПАНЬКОВА МАРИЯ

ЛАБОРАТОРИЯ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА

ВВЕДЕНИЕ

Протеинкиназа Мζ:

- Экспрессируется только в мозге
- Обеспечивает долговременную память
- Изначально трансляция подавлена
- Трансляция запускается при активации синапсов



5' нетранслируемая область мРНК РКМζ содержит 6 открытых рамок считывания с которых, возможно, идет синтез регуляторных пептидов.

МЕТОДЫ

1. Амплификация ДНК с помощью ПЦР
2. Очистка ДНК путем выделения из агарозного геля
3. Синтез экзистированной мРНК в реакции run-off транскрипции
4. Трансляция полученных мРНК в in vitro системах (WGE M40 и RRL)

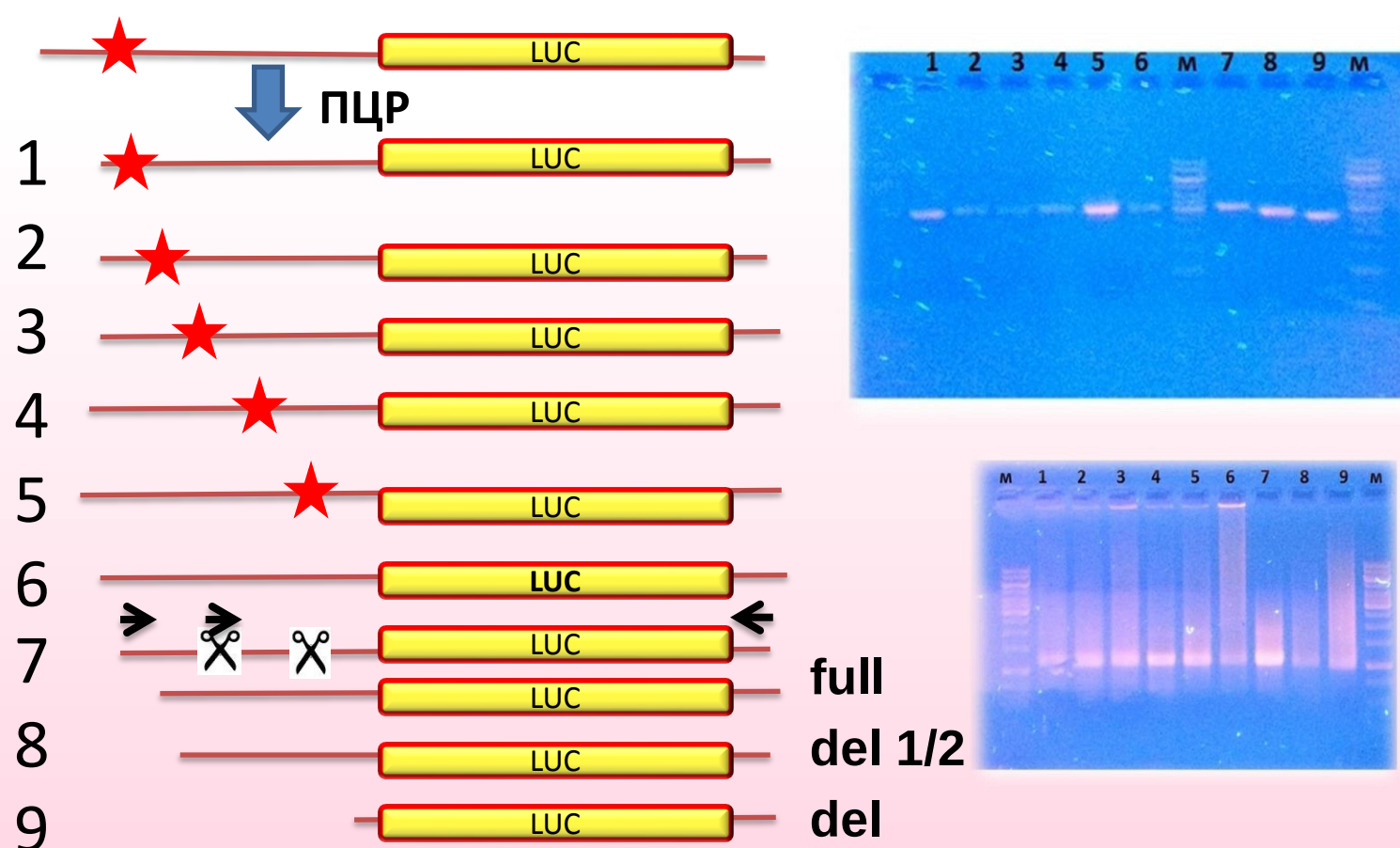


Задача проекта:

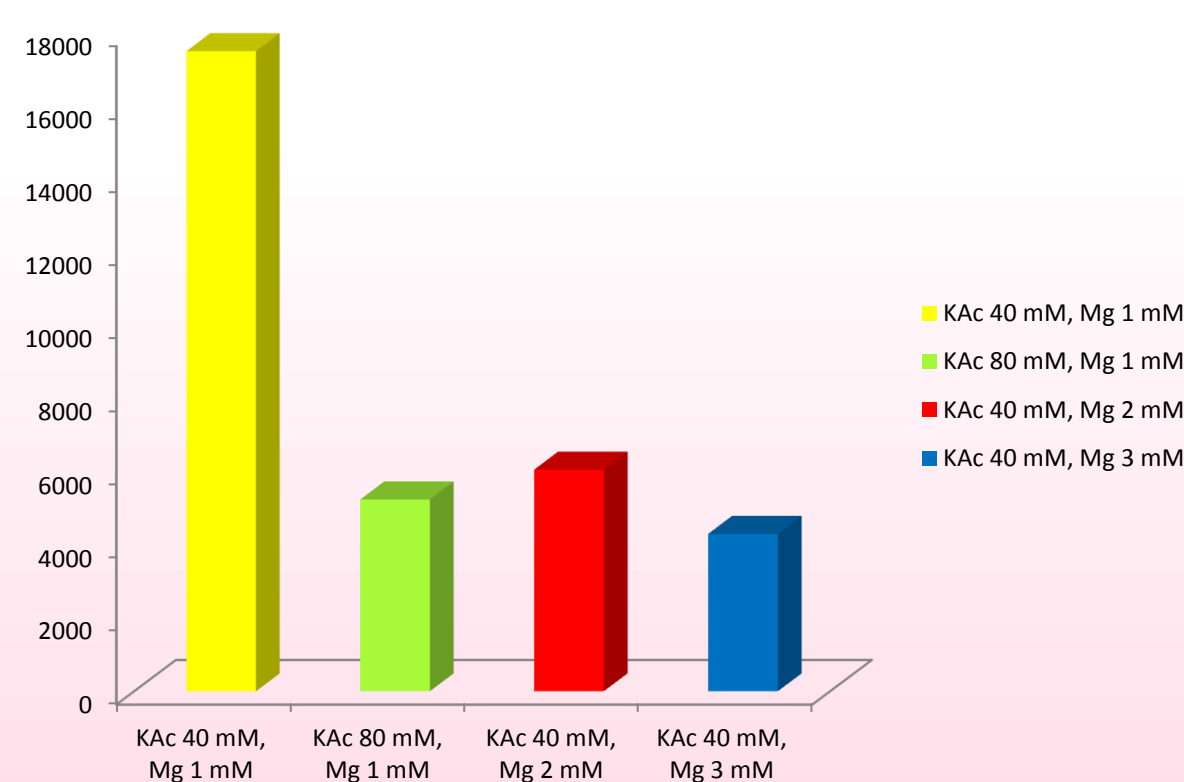
Выявить детерминанты в нетранслируемых последовательностях гена РКМζ, ингибирующие синтез этого фермента в бесклеточной системе трансляции.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Амплификация ДНК с мутациями в открытых рамках считывания в лидере РКМζ и получение мРНК

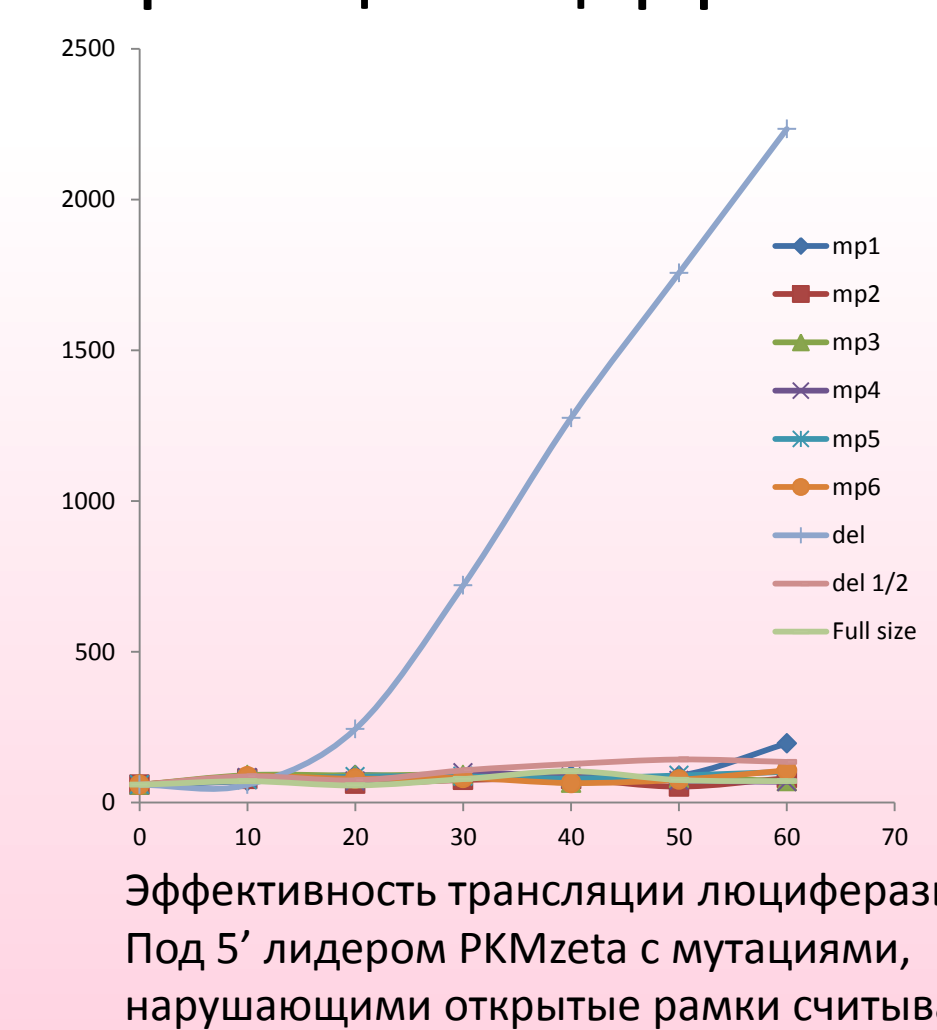


2. Оптимизация условий трансляции

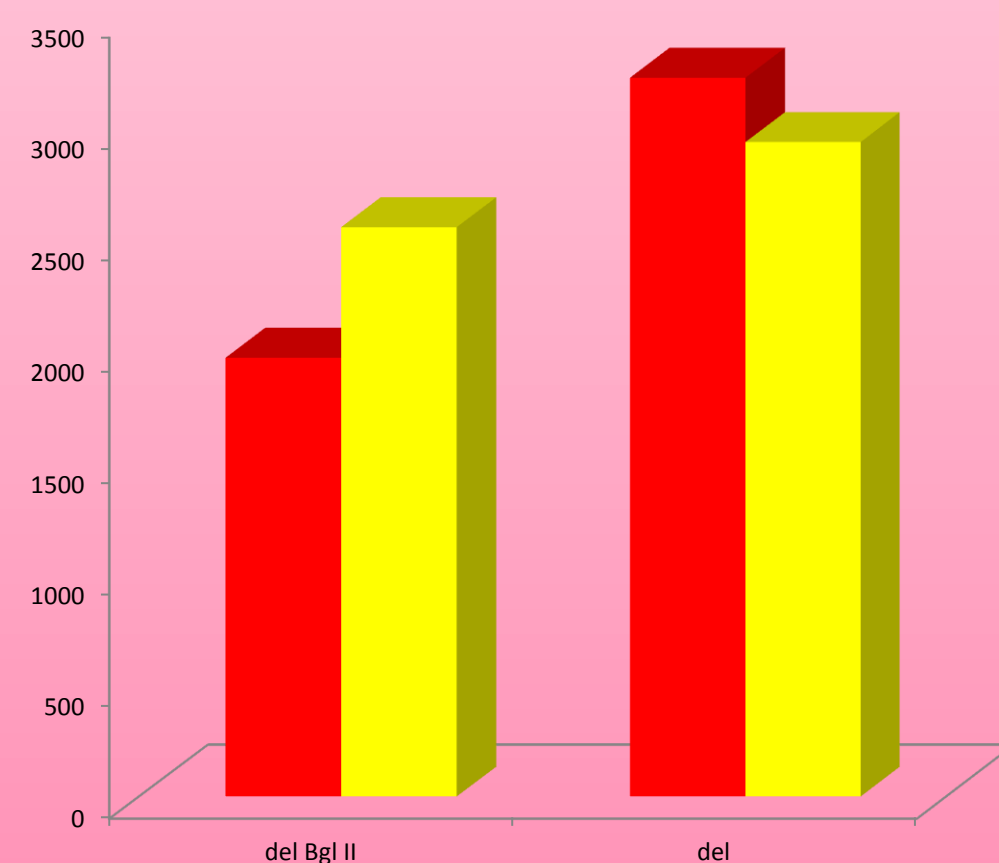
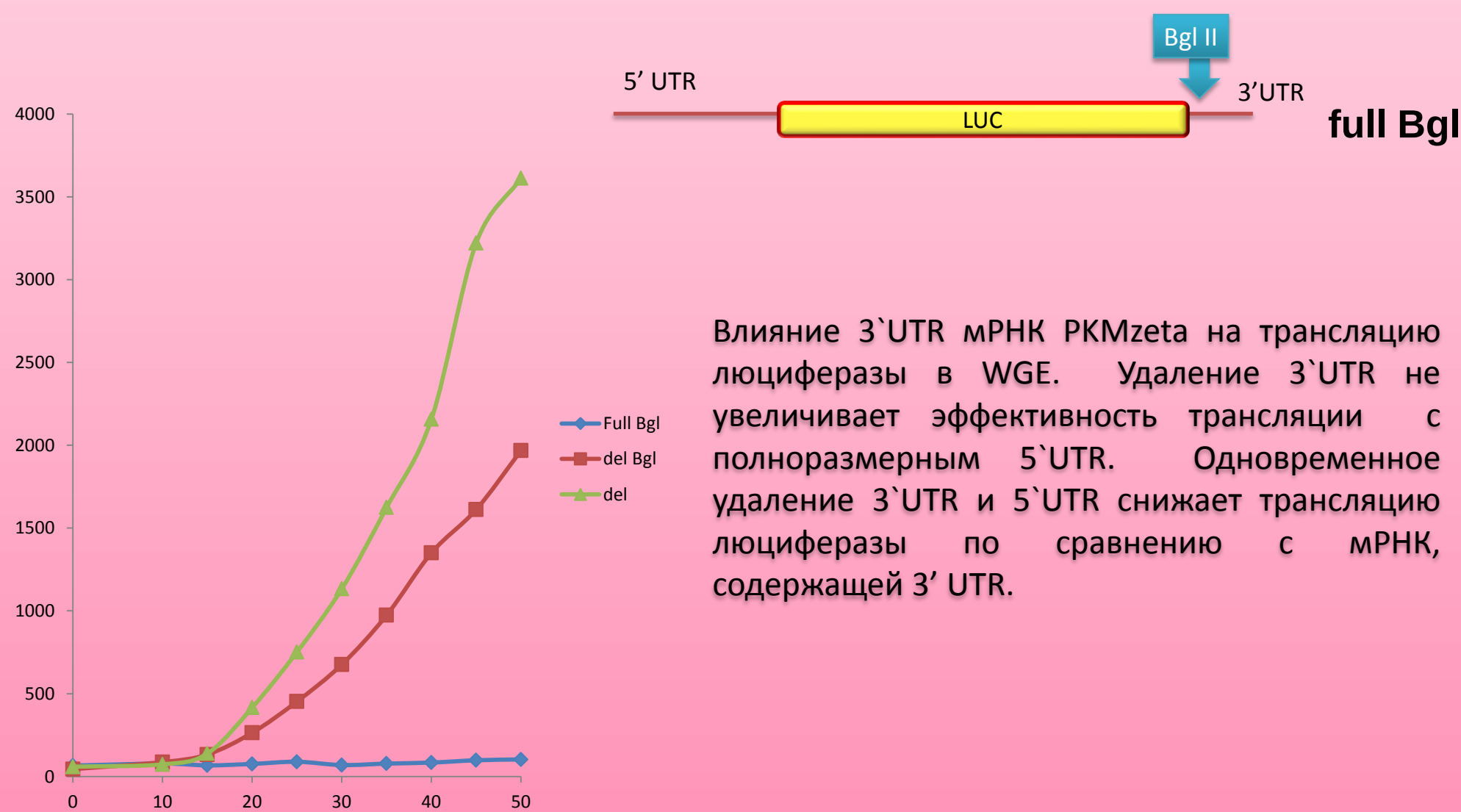


Подбор условий для трансляции в WGE M40. Были протестированы разные концентрации KAc и MgAc. Оптимальной оказалась концентрация KAc 40 mM, MgAc 1 mM.

3. Определение влияния 5'UTR РКМζ на трансляцию люциферазы



4. Определение влияния 3'UTR РКМζ на трансляцию люциферазы



Влияние пурамицина на трансляцию мРНК. Добавление пурамицина в трансляцию ингибировало синтез на мРНК, содержащей 3'UTR и повышало активность люциферазы без 3'UTR. Вероятно это связано с тем, что в отсутствии 3'UTR не происходит эффективной терминации трансляции и новосинтезированная люцифераза остается связанной с рибосомой. Добавление пурамицина отщепляет люциферазу и происходит увеличение ее активности в растворе.

ВЫВОДЫ

1. Определено, что каждая из шести выбранных открытых рамок считывания, с которых, возможно, идет синтез пептидов длиной не более 15 аминокислот, в отдельности не влияет на синтез РКМζ
2. С помощью частичной и полной делеции 5' UTR-области обнаружено, что ингибирующая последовательность находится после 350-го нуклеотида
3. Проверено влияние 3' области на эффективность трансляции и показано, что ее удаление не улучшает трансляцию РКМζ.

Заключение

мРНК, содержащая короткий 5' UTR транслировалась в WGE, но слабо, по сравнению с мРНК, содержащей актиновый и глобиновый UTR. Эти данные позволяют выдвинуть гипотезу о том, что оставшиеся 100 нуклеотидов в 5' области ингибируют трансляцию РКМζ, но в меньшей степени, чем при частичной делеции.