N E W S
OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN
SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL
ISSN 2224-5308
Volume 6, Number 318 (2016), 37 – 47

V. Y. Kislitsin, A. V. Zhigailov, N. S. Polymbetova, B. K. Iskakov

RSE «M. A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry», CS MES RK,
Almaty, Kazakhstan.
E-mail: kislitsinval_box@mail.ru ; bulat.iskakov@mail.ru

CLONING, MUTAGENESIS AND EXPRESSION OF cDNA-GENE THAT ENCODES α-SUBUNIT OF TRANSLATION INITIATION FACTOR 2 FROM *ARABIDOPSIS THALIANA* AND ISOLATION OF RECOMBINANT PROTEINS AteIF2α(S56), AteIF2α(S56D) and AteIF2α(S56A)

Abstract. The eukaryotic initiation factor 2 (eIF2) in complex with GTP, delivers onto 40S ribosomal subunit of initiator Met-tRNA$_i$, with which synthesis of almost all proteins begins. This factor is strictly required for selection of correct start codon and for translation initiation of vast majority of eukaryotic mRNAs. In yeast and mammalian cells, phosphorylation of eIF2 at α-subunit brakes translation initiation under various stresses. In plants, the role of phosphorylation of homologous factor (peIF2α) in regulation of protein biosynthesis remains unclear.

In the present work cDNA-gene of eIF2 α-subunit of *Arabidopsis thaliana (AteIF2α(S56))* was amplified and cloned. Using site-directed *in vitro*-mutagenesis two variants of this cDNA were obtained: *AteIF2α(S56D)* and *AteIF2α(S56A)*. The *AteIF2α(S56D)* variant encodes AteIF2α with aspartic acid substituting for serine-56, thus imitating the constitutively phosphorylated state of this subunit. Variant *AteIF2α(S56A)*, with substitution of alanine codon instead of serine-56, encodes unphosphorylatable AteIF2α-subunit. The intact and both mutated variants of *AteIF2α* were cloned in vector pET19b and expressed in *Escherichia coli* cells. At N-termini of recombinant proteins the sequence of 10 histidines (10His-tag) was inserted that is necessary for their isolation. Proteins AteIF2α(S56), AteIF2α(S56D) and AteIF2α(S56A) were isolated by affinity chromatography, dialyzed and concentrated: all of them had correct size of approximately 40 kDa. The AteIF2α(S56) could be phosphorylated by special mPKR kinase in the presence of double-stranded RNA, indicating this subunit is fully functional. These recombinant subunits are necessary for exploration of the role of peIF2α phosphorylation in regulation of protein synthesis in plants.

Keywords: translation initiation factor 2 of plants (peIF2), recombinant α-subunit, cloning, mutagenesis, expression, phosphorylation.

УДК 57.052.6 : 577.217 : 577.218

В. Ю. Кислицин, А. В. Жигайлов, Н. С. Полимбетова, Б. К. Искаков

РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина» КН МОН РК,
Алматы, Казахстан

КЛОНИРОВАНИЕ, МУТАГЕНЕЗ И ЭКСПРЕССИЯ кДНК-ГЕНА α-СУБЪЕДИНИЦЫ ФАКТОРА ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ 2 *ARABIDOPSIS THALIANA* И ВЫДЕЛЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ AteIF2α(S56), AteIF2α(S56D) и AteIF2α(S56A)

Аннотация. Эукариотический фактор инициации трансляции 2 (eIF2) в комплексе с GTP доставляет на 40S рибосомную субчастицу инициаторную Met-tRNA$_i$, с которой начинается синтез практически всех белков. Этот фактор строго необходим для выбора корректного стартового кодона и для инициации трансляции подавляющего большинства эукариотических мРНК. В клетках животных и дрожжей фосфорилирование α-субъединицы eIF2 тормозит инициацию трансляции при различных стрессах. У растений роль фосфорилирования гомологичного фактора (peIF2α) в регуляции биосинтеза белка остается невыясненной.

В настоящей работе амплифицирован и клонирован кДНК-ген α-субъединицы фактора eIF2 из *Arabidopsis thaliana (AteIF2α(S56))*. С помощью сайт-направленного *in vitro*-мутагенеза получены два варианта этой кДНК: *AteIF2α(S56D)* и *AteIF2α(S56A)*. Вариант *AteIF2α(S56D)* кодирует субъединицу AteIF2α с заменой остатка серина в положении 56 на аспарагиновую кислоту, что имитирует ее конститутивно фосфорилированное состояние. Вариант *AteIF2α(S56A)* с заменой кодона серина-56 на триплет аланина кодирует нефосфорилируемую форму AteIF2α. Нативный и оба мутированных варианта кДНК-гена *AteIF2α* клонированы в векторе pET19b и экспрессированы в клетках *Escherichia coli*. На N-конце рекомбинантные белки содержали последовательность 10 гистидинов (10His-tag), необходимую для их выделения. Белки AteIF2α(S56), AteIF2α(S56D) и AteIF2α(S56A) выделяли методом аффинной хроматографии, диализовали и концентрировали: все они имели корректные размеры около 40 кДа. Субъединица AteIF2α(S56) способна фосфорилироваться специфической киназой mPKR в присутствии двуспиральной РНК, что указывает на ее функциональную полноценность. Эти рекомбинантные субъединицы необходимы для исследования роли фосфорилирования peIF2α в регуляции синтеза белков у растений.

Ключевые слова: фактор инициации трансляции 2 растений (peIF2), рекомбинантные α-субъединицы, клонирование, мутагенез, экспрессия, фосфорилирование.

Введение. Фактор eIF2 – белок, присутствующий во всех типах эукариотических клеток, состоит из трех неидентичных полипептидов, обозначаемых α, β и γ, из которых α-субъединица выполняет регуляторную функцию. Этот фактор образует с молекулой GTP и инициаторной метионил-тРНК (Met-tRNA$_i$) тройной комплекс {GTP*eIF2*Met-tRNA$_i$}, который связывается с 40S рибосомной субчастицей (40S-РС), образуя 43S пре-инициаторный комплекс (43S-ПИК). При взаимодействии этого комплекса с мРНК образуется 48S-ПИК, в составе которого 43S-ПИК сканирует мРНК (в направлении 5'→3') в поисках стартового AUG-кодона, в узнавании которого принимают участие антикодон Met-tRNA$_i$, факторы eIF1, eIF1A и eIF5. По достижении стартового кодона фактор eIF5 активирует GTP-азную активность фактора eIF2, который гидролизует молекулу GTP тройного комплекса до GDP, что приводит к высвобождению из 48S-ПИК большинства инициаторных факторов, присоединению 60S-РС и переходу к элонгации полипептидной цепи [1, 2]. После каждого цикла инициации фактор eIF2 высвобождается из 48S-ПИК в виде прочного бинарного комплекса {eIF2*GDP}. Для того чтобы eIF2 мог участвовать в следующем цикле, молекула GDP должна быть заменена на GTP.

В клетках млекопитающих такой обмен не может протекать самостоятельно, так как сродство фактора meIF2 к GDP на два порядка выше, чем к GTP. Обмен гуаниловых нуклеотидов может происходить только при помощи вспомогательного фактора meIF2B. Фактор meIF2B образует комплекс с {meIF2*GDP}, после чего GDP легко диссоциирует. Фосфорилирование α-субъединицы meIF2 ингибирует обмен GDP→GTP, катализируемый фактором meIF2B. Фактор eIF2B не может стимулировать обмен GDP→GTP на meIF2(αP), что приводит к прекращению образования новых тройных комплексов {GTP*meIF2*Met-tRNA$_i$}, к резкому торможению инициации трансляции и остановке синтеза белка в клетках млекопитающих [3, 4]. Аналогичный механизм был найден у дрожжей [1, 4] и считалось, что он функционирует также и в клетках растений.

Однако, согласно нашим данным, молекулярный механизм регуляции активности гомологичного фактора у растений (peIF2) существенно отличается от такового в клетках млекопитающих [5]. В частности, нами было установлено, что сродство peIF2 пшеницы к GDP лишь в 10 раз выше, чем к GTP, тогда как для meIF2 данное превышение составляет два порядка. Вследствие этого, для цикличного функционирования peIF2 растений не требуется фактор eIF2B, который строго необходим у млекопитающих. Из этих данных также следует, что при достаточно высоком соотношении концентраций [GTP]/[GDP] в клетках растений обмен GDP→GTP может происходить независимо от того, фосфорилирован ли peIF2 или нет [5].

Наши результаты подтверждены другими группами исследователей [6 – 9]. У растений до сих пор не обнаружена ни биохимическая активность, ни гены peIF2B-подобного фактора [8]. Кроме того, из четырех протеинкиназ (PKR, HCR, PERK, GCN2), фосфорилирующих α-субъединицу фактора meIF2 в клетках млекопитающих, у растений обнаружены активность и ген только одной pGCN2-киназы. Мутанты с поврежденным геном gcn2 вполне жизнеспособны, хотя и проявляли