

УДК 577.29

ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА *EIF4ESOLANUMTUBEROSUM*, ЯВЛЯЮЩИХСЯ КЛЮЧЕВЫМИ ФАКТОРАМИ ДЛЯ РАЗВИТИЯ ПОТИВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**В.В. Колесникова^{1,2}, Е.Ю. Никонова², О.С. Никонов²**¹ ФГБОУ ВО ПуцГЕНИ, Пуцино, Россия ² ФГБУН Институт белка РАН – лаборатория структурных исследований аппарата трансляции, Пуцино, Россия**Введение**

Картофель (*Solanum tuberosum*) в мире занимает четвертое место среди наиболее важных сельскохозяйственных культур после пшеницы, кукурузы и риса. По данным ФАО Россия входит в пятерку стран лидеров по производству картофеля. В отличие от большинства сельскохозяйственных культур картофель чаще размножают вегетативно клубнями и реже используют семена. При вегетативном способе размножения новому растению достаются болезни старого, в контексте чего наиболее значимыми среди фитопатогенов являются вирусы [1]. Эффективных химических или биологических мер борьбы с вирусами на сегодняшний день нет, поэтому используют метод апикальных меристем для оздоровления существующего посевного материала и активно ведется разработка устойчивых сортов [2]. В последние несколько лет наиболее активно изучают роль в патогенезе эукариотического фактора инициации трансляции 4Е (eIF4Е). Функции eIF4Еу картофеля аналогичны функциям фактора в других организмах: связывание с кэп мРНК при трансляции [3]. Фактор 4Е используется вирусами с кэп-зависимым механизмом трансляции для трансляции своей мРНК, что делает eIF4Е потенциальной мишенью для нарушения вирус – растительного взаимодействия [4]. Объяснение молекулярных механизмов взаимодействия eIF4Е с вирусным белком (Vpg) существенно ускорит процесс селекции и даст начало долгосрочной устойчивости. Большинство сортов *S. tuberosum* являются тетраплоидами (4n=48). eIF4Е в картофеле представлен семейством генов: eIF4Е1, eIF4Е2 и eIF(iso)4Е [5]. Данные о структуре белков и их комплексов помогут объяснить уже описанные в литературе биохимические данные и целенаправленно повлиять на взаимодействие белков. В настоящее время какая-либо структурная информация о белках eIF4Е1, eIF4Е2 и eIF(iso)4Е картофеля отсутствует. Одним из этапов в определении структуры eIF4Е является получение чистого белка в препаративных количествах.

Целью работы было создание методики выделения белков семейства eIF4Е для изучения их структурных и функциональных свойств.

Материалы и методы

Экспрессионный вектор. В качестве основы для создания экспрессионного вектора служила плаزمида pet32a, несущая селективный ген *amp^r* (*bla*). Последовательности генов eIF4Е1, eIF4Е2 и eIF(iso)4Е (MT828880; MT828873; MT828876) клонированы в плазмиду. Для аффинной очистки на смоле Ni-sepharose целевые белки на N-конце содержат последовательность с 6His и протеолитический сайт. После получения чистого препарата N-концевая последовательность может быть удалена с помощью энтерокиназы.

Условия индукции синтеза белка. Полученными векторами трансформировали клетки *E. coli* штамма BL21 DE3/Rosetta, особенностью которого является наличие плазмиды, кодирующей шесть тРНК, соответствующих редким для *E. coli* кодонам, с селективным геном *Cam^r*. Индукция синтеза белка проводилась при 20 °C, OD₅₉₀ = 0,6–0,8 с 0,5 мМ ИПТГ в течение 20 часов.

Условия выделения белков. Все этапы очистки белка производились на льду или +4 °C. Клеточную биомассу ресуспендировали в буфере для лизиса (буфер 1 (таб. 1) в соотношении 1 г биомассы на 5 мл буфера). Разрушение вели на льду в полипропиленовых пробирках Falcon на ультразвуковом дезинтеграторе в режиме: время пульса 1с, пауза 2с, при мощности 40 % в течение 15 мин. Полученный образец центрифугировали при 9800 g в течение 30 мин при 4 °C. С помощью ПААГ ДСН электрофореза определили, что белок находится в супернатанте в растворимой форме, а не в тельцах-включениях в дебрисе.

Супернатант наносили на уравновешенную буфером А колонку с Ni-sepharose (таб. 2). Целевые белки элюировали градиентом буфера Б (0–100 %). Скрининг фракций, содержащих белки, и уровень индукции проводили с помощью ПААГ ДСН электрофореза (рис. 1–2).

Таблица 1 Состав буфера 1
для лизиса клеточной массы

Компонент
Трис-HCl (pH 7,5) 10 mM
NaCl 250 mM
10 % глицерин
ДТТ 2 mM
ДНКаза 2 мкг
PGME 0,1 μM
Ингибиторный коктейль 1 таб. на 50 мл буфера

Таблица 2 Состав буферов
для аффинной хроматографии

Буфер А	Буфер Б
Трис-HCl (pH 7,5) 10 mM	Трис-HCl (pH 7,5) 10 mM
NaCl 250 mM	NaCl 250 mM
ДТТ 2 mM	ДТТ 2 mM
PGME 0,1 μM	PGME 0,1 μM
	Имидазол 400 mM

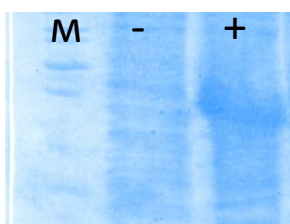


Рисунок 1. ПААГ ДСН электрофореграмма. М – маркер, – до добавления индуктора, + после добавления индуктора и инкубации (eIF4E1)

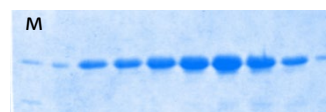


Рисунок 2. ПААГ ДСН электрофореграмма. М – контроль (маркер), фракции с eIF4E1

Результаты и их обсуждение

Достигнутый результат позволяет использовать разработанную методику для получения белков семейства eIF4E в препаративных количествах. Проведение индукции синтеза белка при пониженной температуре препятствует накоплению белка в тельцах-включениях. Использование дополнительных ингибиторов протеаз предотвращает нежелательный протеолиз белков. Все белки семейства eIF4E (eIF4E1, eIF4E2 и eIF(iso)4E) показали высокую склонность к агрегации. Но, несмотря на это, eIF4E сохраняют способность связываться с кэп, и / или с кэп-имитирующим белком (Vpg). PGME в составе буфера позволяет избежать агрегации при очистки белка.

Заключение

Разработанная методика позволяет получить необходимое количество белка для кристаллизации и определения констант связывания eIF4E картофеля с Vpg и кэп. Выделение белка в растворимой форме экономит время и реактивы в сравнении с методами выделения белков из тельц включений, а также гарантирует его функциональную активность. Особенность генно-инженерной конструкции плазмиды позволяет при необходимости избавиться от тагов, не принадлежащих к последовательности гена.

Работа выполнена в рамках Госзадания: АААА-А19–119122490038–8 «Разработка алгоритма направленного изменения средства биологически значимых белков к их молекулярным партнерам»

Литература

1. Анисимов Б.В. Фитопатогенные вирусы и их контроль в семеноводстве картофеля (Практическое руководство). – М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2004, С – 6.
2. Болезни и вредители овощных культур и картофеля / А.К. Ахатов [и др.]. – Москва: Общество с ограниченной ответственностью Товарищество научных изданий КМК, 2013. – 463 с. – ISBN 9785873179183.
3. Carine C., et al. Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg Plant Jn2008 Apr; 54(1):56–68.
4. Michel V, Julio E, Canderesse T, Cotucheau J, Decors C, Volpatti R, Moury B, Glais L, Jacquot E (2019) A complex eIF4E locus impacts the durability of va resistance to Potato virus Y in tobacco. Molecular plant pathology 20(8): 1051–1066.
5. Julio, E. et al. (2015) A eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) is responsible for the “va” tobacco recessive resistance to potyviruses, Plant Mol. Biol. Report., 33, 609–623, doi: 10.1007/s11105–014–0775–4.