

ISSN 2518-1629 (Online),
ISSN 2224-5308 (Print)

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ҰЛТТЫҚ ҒЫЛЫМ АКАДЕМИЯСЫНЫҢ
Өсімдіктердің биологиясы және биотехнологиясы институтының

Х А Б А Р Л А Р Ы

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
Института биологии и биотехнологии растений

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN
of the Institute of Plant Biology and Biotechnology

**БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ МЕДИЦИНА
СЕРИЯСЫ**



СЕРИЯ

БИОЛОГИЧЕСКАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ



SERIES

OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

6 (318)

**ҚАРАША – ЖЕЛТОҚСАН 2016 ж.
НОЯБРЬ – ДЕКАБРЬ 2016 г.
NOVEMBER – DECEMBER 2016**

**1963 ЖЫЛДЫҢ ҚАҢТАР АЙЫНАН ШЫҒА БАСТАҒАН
ИЗДАЕТСЯ С ЯНВАРЯ 1963 ГОДА
PUBLISHED SINCE JANUARY 1963**

**ЖЫЛЫНА 6 РЕТ ШЫҒАДЫ
ВЫХОДИТ 6 РАЗ В ГОД
PUBLISHED 6 TIMES A YEAR**

**АЛМАТЫ, ҚР ҰҒА
АЛМАТЫ, НАН РК
ALMATY, NAS RK**

Б а с р е д а к т о р

ҚР ҰҒА академигі, м. ғ. д., проф.

Ж. А. Арзықұлов

Абжанов Архат проф. (Бостон, АҚШ),
Абелев С.К. проф. (Мәскеу, Ресей),
Айтқожина Н.А. проф., академик (Қазақстан)
Акшулаков С.К. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Алшынбаев М.К. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Березин В.Э., проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Бисенбаев А.К. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Бишимбаева Н.К. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Ботабекова Т.К. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Ellenbogen Adrian prof. (Tel-Aviv, Israel),
Жамбакин К.Ж. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан), бас ред. орынбасары
Ishchenko Alexander, prof. (Villejuif, France)
Қайдарова Д.Р. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Күзденбаева Р.С. проф., академик (Қазақстан)
Лось Д.А. prof. (Мәскеу, Ресей)
Lunefeld Bruno prof. (Израиль)
Миербеков Е.М. проф. (Қазақстан)
Муминов Т.А. проф., академик (Қазақстан)
Purton Saul prof. (London, UK)
Рахыпбеков Т.К. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Сапарбаев Мұрат проф. (Париж, Франция)
Сарбассов Дос проф. (Хьюстон, АҚШ)

«ҚР ҰҒА Хабарлары. Биология және медициналық сериясы».

ISSN 2518-1629 (Online),

ISSN 2224-5308 (Print)

Меншіктенуші: «Қазақстан Республикасының Ұлттық ғылым академиясы» РҚБ (Алматы қ.)

Қазақстан республикасының Мәдениет пен ақпарат министрлігінің Ақпарат және мұрағат комитетінде
01.06.2006 ж. берілген №5546-Ж мерзімдік басылым тіркеуіне қойылу туралы куәлік

Мерзімділігі: жылына 6 рет.

Тиражы: 300 дана.

Редакцияның мекенжайы: 050010, Алматы қ., Шевченко көш., 28, 219 бөл., 220, тел.: 272-13-19, 272-13-18,
www.nauka-nanrk.kz / biological-medical.kz

© Қазақстан Республикасының Ұлттық ғылым академиясы, 2016

Типографияның мекенжайы: «Аруна» ЖК, Алматы қ., Муратбаева көш., 75.

Г л а в н ы й р е д а к т о р
академик НАН РК, д.м.н., проф.

Ж. А. Арзыкулов

Абжанов Архат проф. (Бостон, США),
Абелев С.К. проф. (Москва, Россия),
Айтхожина Н.А. проф., академик (Казахстан)
Акшулаков С.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Алчинбаев М.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Березин В.Э., проф., чл.-корр. (Казахстан)
Бисенбаев А.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Бишимбаева Н.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Ботабекова Т.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Ellenbogen Adrian prof. (Tel-Aviv, Israel),
Жамбакин К.Ж. проф., чл.-корр. (Казахстан), зам. гл. ред.
Ishchenko Alexander prof. (Villejuif, France)
Кайдарова Д.Р. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Кузденбаева Р.С. проф., академик (Казахстан)
Лось Д.А. prof. (Москва, Россия)
Lunenfeld Bruno prof. (Израиль)
Миербеков Е.М. проф. (Казахстан)
Муминов Т.А. проф., академик (Казахстан)
Purton Saul prof. (London, UK)
Рахыпбеков Т.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Сапарбаев Мурат проф. (Париж, Франция)
Сарбассов Дос проф. (Хьюстон, США)

«Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская».

ISSN 2518-1629 (Online),

ISSN 2224-5308 (Print)

Собственник: РОО «Национальная академия наук Республики Казахстан» (г. Алматы)

Свидетельство о постановке на учет периодического печатного издания в Комитете информации и архивов
Министерства культуры и информации Республики Казахстан №5546-Ж, выданное 01.06.2006 г.

Периодичность: 6 раз в год

Тираж: 300 экземпляров

Адрес редакции: 050010, г. Алматы, ул. Шевченко, 28, ком. 219, 220, тел. 272-13-19, 272-13-18,
www.nauka-nanrk.kz/biological-medical.kz

© Национальная академия наук Республики Казахстан, 2016

Адрес типографии: ИП «Аруна», г. Алматы, ул. Муратбаева, 75

Editor in chief

academician of NAS RK, doctor of medical science, professor

Zh. A. Arzykulov

Abzhanov Arkhat prof. (Boston, USA),
Abelev S.K. prof. (Moscow, Russia),
Aitkhozhina N.A. prof., academician (Kazakhstan)
Akshulakov S.K. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Alchinbayev M.K. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Berezin V.Ye., prof., corr. member. (Kazakhstan)
Bisenbayev A.K. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Bishimbayeva N.K. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Botabekova T.K. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Ellenbogen Adrian prof. (Tel-Aviv, Israel),
Zhambakin K.Zh. prof., corr. member. (Kazakhstan), deputy editor in chief
Ishchenko Alexander, prof. (Villejuif, France)
Kaydarova D.R. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Kuzdenbayeva R.S. prof., academician (Kazakhstan)
Los D.A. prof. (Moscow, Russia)
Lunefeld Bruno prof. (Israel)
Miyerbekov Ye.M. prof. (Kazakhstan)
Muminov T.A. prof., academician (Kazakhstan)
Purton Saul prof. (London, UK)
Rakhypbekov T.K. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Saparbayev Murat prof. (Paris, France)
Sarbassov Dos, prof. (Houston, USA)

News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of biology and medicine.

ISSN 2518-1629 (Online),

ISSN 2224-5308 (Print)

Owner: RPA "National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan" (Almaty)

The certificate of registration of a periodic printed publication in the Committee of information and archives of the Ministry of culture and information of the Republic of Kazakhstan N 5546-Ж, issued 01.06.2006

Periodicity: 6 times a year

Circulation: 300 copies

Editorial address: 28, Shevchenko str., of. 219, 220, Almaty, 050010, tel. 272-13-19, 272-13-18,

<http://nauka-nanrk.kz/biological-medical.kz>

© National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, 2016

Address of printing house: ST "Aruna", 75, Muratbayev str, Almaty

NEWS

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. IskakovRSE «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 AteIF2 α (S56), AteIF2 α (S56D) and AteIF2 α (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 (peIF2 α) in regulation of protein biosynthesis remains unclear.

In the present work cDNA-gene of eIF2 α -subunit of *Arabidopsis thaliana* (*AteIF2 α (S56)*) was amplified and cloned. Using site-directed *in vitro*-mutagenesis two variants of this cDNA were obtained: *AteIF2 α (S56D)* and *AteIF2 α (S56A)*. The *AteIF2 α (S56D)* variant encodes AteIF2 α with aspartic acid substituting for serine-56, thus imitating the constitutively phosphorylated state of this subunit. Variant *AteIF2 α (S56A)*, with substitution of alanine codon instead of serine-56, encodes unphosphorylatable AteIF2 α -subunit. The intact and both mutated variants of *AteIF2 α* 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 AteIF2 α (S56), AteIF2 α (S56D) and AteIF2 α (S56A) were isolated by affinity chromatography, dialyzed and concentrated: all of them had correct size of approximately 40 kDa. The AteIF2 α (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 peIF2 α 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. ИскаковРГП «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 AteIF2 α (S56), AteIF2 α (S56D) и AteIF2 α (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 (peIF2 α) в регуляции биосинтеза белка остается невыясненной.

В настоящей работе амплифицирован и клонирован кДНК-ген α -субъединицы фактора eIF2 из *Arabidopsis thaliana* (AteIF2 α (S56)). С помощью сайт-направленного *in vitro*-мутагенеза получены два варианта этой кДНК: AteIF2 α (S56D) и AteIF2 α (S56A). Вариант AteIF2 α (S56D) кодирует субъединицу AteIF2 α с заменой остатка серина в положении 56 на аспарагиновую кислоту, что имитирует ее конститутивно фосфорилированное состояние. Вариант AteIF2 α (S56A) с заменой кодона серина-56 на триплет аланина кодирует нефосфорилируемую форму AteIF2 α . Нативный и оба мутированных варианта кДНК-гена AteIF2 α 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 AteIF2 α (S56), AteIF2 α (S56D) и AteIF2 α (S56A) выделяли методом аффинной хроматографии, диализовали и концентрировали: все они имели корректные размеры около 40 кДа. Субъединица AteIF2 α (S56) способна фосфорилироваться специфической киназой mPKR в присутствии двуспиральной РНК, что указывает на ее функциональную полноценность. Эти рекомбинантные субъединицы необходимы для исследования роли фосфорилирования peIF2 α 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-PC), 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-PC 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(α P), 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 циклического 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

повышенную чувствительность к некоторым стрессам и гербицидам, нарушающим синтез аминокислот и пуринов [9 - 11].

Экспериментальные данные свидетельствуют, что механизм ингибирования синтеза белка посредством фосфорилирования α -субъединицы фактора reIF2 не используется у растений, находящихся в нормальных, но физиологически различных состояниях (например, днем или ночью) [13]. Фосфорилирование reIF2 α не является универсальным ответом растений на все виды стрессовых воздействий. Так при солевом (250 мМ NaCl) и окислительном (1 мМ H₂O₂) стрессах [11], а также при вирусных инфекциях [10] и тепловом шоке (42° С, 2 ч) [9, 14] фосфорилирования reIF2 α не наблюдалось.

Вместе с тем имеются данные, что этот механизм регуляции может работать у растений при дефиците аминокислот и пуринов, хотя и не так выражено, как у животных [8, 10, 11]. Киназа pGCN2 может тормозить синтез белка у растений посредством фосфорилирования reIF2 α (как у других эукариот) в ответ на определенные, но не все стрессовые воздействия [8 - 11]. Детали этого регуляторного механизма еще не ясны, особенно учитывая отсутствие у растений reIF2B-подобного фактора. Требуется дополнительные экспериментальные исследования для их полного понимания.

С этой целью в данной работе нами получены рекомбинантные α -субъединицы фактора eIF2 из *Arabidopsis thaliana* в нативном варианте (AteIF2 α (S56)), а также с заменой серина-56 на аспарагиновую кислоту (AteIF2 α (S56D)) либо на аланин (AteIF2 α (S56A)). Вариант AteIF2 α (S56D) имитирует конститутивно фосфорилированное состояние α -субъединицы, тогда как AteIF2 α (S56A) не способна фосфорилироваться. Эти рекомбинантные субъединицы необходимы для исследования роли фосфорилирования reIF2 α в регуляции синтеза белков у растений.

Материалы и методы исследования

В работе использовались реагенты фирм «Sigma», «Serva», «Merck», «Fermentas», «Roche», «Promega», «Bio-Rad» и «BioLabs» и олигодезоксирибонуклеотиды (олигоДНК или праймеры), приведенные в таблице 1.

Таблица 1 – Последовательность праймеров, использованных в данной работе

Table 1 – Sequence of primers used in the work

Праймер	Нуклеотидная последовательность
«eIF2-NdeI-FW»	5'GAATCATATGACCATGGCGAATCCTGCTCCGAATCTAGAATGTCGTATGT
«eIF2-BamHI-Rev»	5'TGCGGATCCTTTTGTTCATTCAATTATCCCGCTACCTCCATCGATATC
«eIF2-D-FW»	5'CTCCGAGCTCGATCGCCGTCGGATTGGTAGTAT
«eIF2-D-Rev»	5'CCGACGGCGATCGAGCTCGGAGAACAGGATCATT
«eIF2-A-FW»	5'CTCCGAGCTCGCGCGCCGTCGGATTGGTAGTAT
«eIF2-A-Rev»	5'CCGACGGCGCGGAGCTCGGAGAACAGGATCATT

Компьютерный анализ. Анализ нуклеотидных последовательностей ДНК перед встраиванием их в плазмидные вектора, а также подбор праймеров для клонирования и мутагенеза проводили с использованием компьютерных программ GenRunner 3.00, Vector NTI 8.0, RNA-structure 3.5 и Blast (<http://www.blast.genome.jp>). Нуклеотидная последовательность гена *AteIF2 α* была взята из базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Денситометрический анализ проводили с использованием компьютерной программы ImageJ v.1.42q.

Выделение РНК. Препарат тотальной РНК выделяли из листьев *A. thaliana* с использованием набора PARISTM («Ambion») по методике производителя.

Обратная транскрипция. Реакцию обратной транскрипции (POT) проводили с использованием набора *QuantiTect® Reverse Transcription Kit* («Qiagen») по методике производителя. В качестве матрицы использовались препарат мРНК, выделенный из *A. thaliana*, а в качестве обратного праймера – «eIF2-BamHI-Rev».

Амплификация κДНК *AteIF2α*. После РОТ проводили ПЦР с использованием праймеров «eIF2-NdeI-FW» и «eIF2-BamHI-Rev» и высокоточной полимеразы Pwo («Roche») по методике производителя в следующем режиме: стадия 1 - 5 мин. при 94°C - 1 цикл; стадия 2 - 30 сек. при 94°C, 30 сек. при 54°C, 1 мин. 30 сек. при 72°C – 30 циклов; стадия 3 - 5 мин. при 72°C – 1 цикл. Продукты ПЦР анализировали в 1,5 % агарозном геле.

Сайт направленный мутагенез. Клонированный κДНК-ген *AteIF2α* мутировали методом ПЦР с использованием перекрывающихся праймеров «eIF2-NdeI-FW», «eIF2-BamHI-Rev», «eIF2-D-FW» и «eIF2-A-FW» в тех же условиях и в том же режиме, как при амплификации κДНК *AteIF2α*. Лигирование продуктов РОТ-ПЦР и сайт направленного мутагенеза проводили после их элюции из агарозного геля с использованием набора «DNA Gel extraction Kit» («Fermentas»). Очищенные фрагменты ДНК были обработаны рестриктазами *NdeI* и *BamHI* и лигированы в векторе pET19b по тем же сайтам рестрикции с использованием T4 ДНК-лигазы («Fermentas») по методике производителя. Общие методы молекулярной генетики и инженерии (трансформация клеток *E. coli*, выделение плазмидной ДНК, лигирование ДНК и др.) проводили согласно [15].

Секвенирование ДНК. Корректность всех конструкций проверялась их секвенированием с использованием набора «Big Dye® Terminator v.3.1» («Applied Biosystems») по методике производителя. Электрофорез проводили в капиллярах на генетическом анализаторе 310 «Applied Biosystems», а анализ полученных данных осуществляли с использованием программы «Sequencing Analysis 5.2».

Экспрессия рекомбинантных белков. Плазмидами *AteIF2α(S56)-pET19b*, *AteIF2α(S56D)-pET19b* и *AteIF2α(S56A)-pET19b* были трансформированы клетки экспрессионных штаммов *E. coli* BL21 и LysStar по стандартной методике. Клетки растили в 200 мл жидкой среды LB при 30 °C до оптической плотности $OD^{600}=0,5$, осаждали при 4000 g в течение 3 мин, ресуспендировали в 200 мл свежей среды LB, содержащей IPTG до конечной концентрации 1 mM, и культивировали при 30 °C в течение 4 часов.

Выделение и анализ рекомбинантных белков. Белки, содержащие 10His-tag, выделяли в нативных и денатурирующих условиях методом аффинной хроматографии IMAC (immobilized metal ion affinity chromatography) с использованием набора «PerfectPro Ni-NTA Agarose» («5-Prime») по методике производителя.

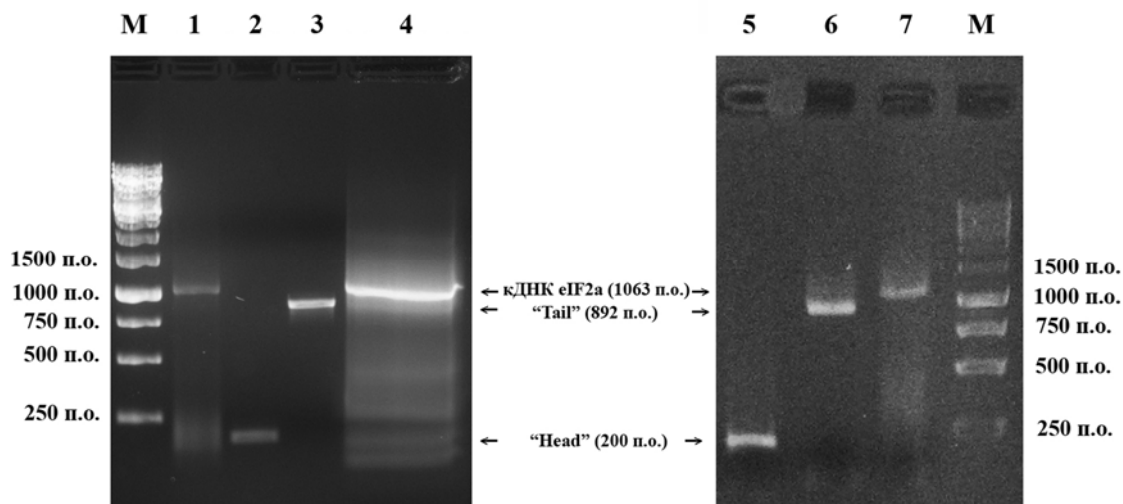
Электрофорез белков проводили в полиакриламидном (ПАА) геле (T = 12,5%, C = 0,5%) в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия (SDS) по стандартной методике [16]. Гели окрашивали 0,125% раствором Кумасси бриллиантового синего R-250 («Serva»).

Перенос белков из ПАА-геля на нитроцеллюлозную мембрану проводили в аппарате для полусухого блоттинга ("C.B.S. Scientific") в буфере для переноса (102 mM глицина, 25 mM Трис, 20% (o/o) этанола) при силе тока 0,8 mA cm² в течение 1 часа. Мембрана после переноса промывалась дважды по 10 мин в буфере TBS (20 mM ТрисHCl (pH=7,6), 140 mM NaCl), дважды по 10 мин – в буфере TBST (TBS + 0,05% Tween-20) и инкубировалась в блокирующем буфере (7% сухое молоко «Frima» на TBST) в течение ночи при 4°C. После этой обработки мембрану инкубировали с первыми антителами (Penta-His mouse antibodies («5-Prime») в разведении 1:2000 в блокирующем буфере) в течение 1 часа при комнатной температуре. После трехкратной промывки в TBST по 20 мин мембрану инкубировали со вторыми антителами (Anti-mouse HRP-conjugate («5-Prime») в разведении 1:2000 в блокирующем буфере) в течение 1 часа при комнатной температуре. После двукратной промывки мембраны по 20 мин в TBST и двукратной промывки по 10 мин в TBS, проводили реакцию с хемилюминесцентным субстратом для пероксидазы фирмы «Promega» по методике производителя.

Для удаления из раствора белков имидазола или мочевины проводили диализ с использованием диализных мешков («Sigma») против буфера (20 mM TrisAc pH7,6; 90 mM KAc; 2 mM Mg(OAc)₂) в течение ночи при температуре 4 °C. Концентрирование белков после диализа проводилось путём центрифугирования образцов в колонках с мембраной “10,000 MWCO NY” («Sartorius»). Концентрацию белков определяли по Бредфорду [17] в трех повторях с вычислением среднего арифметического значения (X_{cp}) и ошибки среднего арифметического (m).

Результаты и их обсуждение

Согласно нуклеотидной последовательности мРНК *AteIF2α* (GeneBank №: NM_120629.3) были подобраны соответствующие праймеры для амплификации, клонирования и мутагенеза этой кДНК. Посредством РОТ-ПЦР была получена и амплифицирована кДНК *AteIF2α* (см. дорожку 1 на рисунке 1), которую клонировали в векторе pET19b по сайтам рестрикции *NdeI* и *BamHI* с получением конструкции *AteIF2α(S56)-pET19b*.



М – ДНК-маркер; 1 – продукт РОТ-ПЦР кДНК *AteIF2α(S56)*; 2 – ПЦР-продукт “Head-D”; 3 – ПЦР-продукт “Tail-D”; 4 – ПЦР-продукт, соответствующий кДНК *AteIF2α(S56D)*; 5 – ПЦР-продукт “Head-A”; 6 – ПЦР-продукт “Tail-A”; 7 – ПЦР-продукт, соответствующий кДНК *AteIF2α(S56A)*.

Рисунок 1 – Электрофоретический анализ в 1,5% агарозном геле продуктов ПЦР, образующихся в ходе сайт-направленного мутагенеза кДНК *AteIF2α*

М – DNA marker; 1 – RT-PCR product of cDNA *AteIF2α (S56)*; 2 – PCR product “Head-D”; 3 – PCR product “Tail-D”; 4 – PCR product corresponding to cDNA *AteIF2α (S56D)*; 5 – PCR product “Head-A”; 6 – PCR product “Tail-A”; 7 – PCR product corresponding to cDNA *AteIF2α(S56A)*.

Figure 1 – Electrophoretic analysis in 1.5% agarose gel of PCR products generated during site-directed mutagenesis of *AteIF2α* cDNA

Известно, что один из механизмов торможения синтеза белков в клетках млекопитающих состоит в фосфорилировании серина-51 у α -субъединицы фактора *meIF2* (соответствует серину-56 у *peIF2α* из *A. thaliana*) специфическими протеинкиназами, что приводит к резкому ингибированию биосинтеза белка [3, 4, 8, 9].

Для детального исследования роли фосфорилирования α -субъединицы фактора *peIF2* из *A. thaliana* необходимо получить не только исходный вариант кДНК-гена *AteIF2α (AteIF2α(S56))*, но также еще две мутированные ее формы:

– *AteIF2α(S56D)*, кодирующую форму *AteIF2α*, которая имитирует постоянно фосфорилированное состояние;

– *AteIF2α(S56A)*; кодирующую нефосфорилируемую форму *AteIF2α*.

Для этого ТСТ-кодон, кодирующий серин в положении 56 *AteIF2α*, необходимо было заменить на GAT-кодон, кодирующий аспарагиновую кислоту (в случае *AteIF2α(S56D)*), либо на GCG-кодон, кодирующий аланин (в случае *AteIF2α(S56A)*). Сайт-направленный мутагенез проводили методом ПЦР с перекрывающимися праймерами, суть которого заключается в том, что для внесения мутации используются два праймера (прямой и обратный), перекрывающиеся в месте мутагенеза, и содержащие соответствующие нуклеотидные замены.

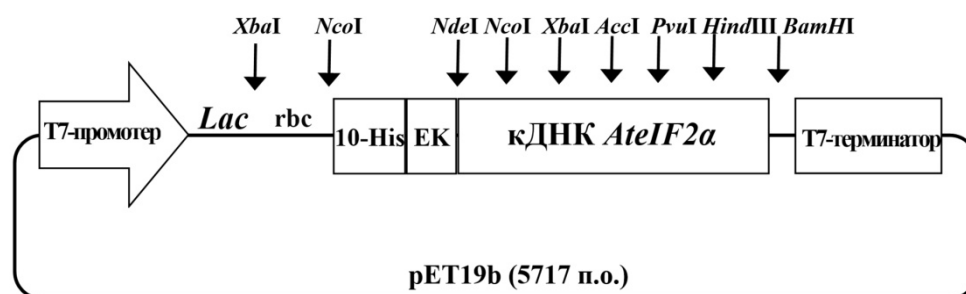
На первом этапе в качестве матрицы использовали кДНК *AteIF2α(S56)* с парой праймеров «eIF2-NdeI-FW»/«eIF2-D-Rev» (в случае кДНК *AteIF2α(S56D)*), либо парой праймеров «eIF2-NdeI-FW»/«eIF2-A-Rev» (в случае кДНК *AteIF2α(S56A)*). Продукты ПЦР размером 200 п.о.

(соответственно «eIF2-D-Head» и «eIF2-A-Head») элюировали из агарозного геля (дорожки 2 и 5 на рисунке 1).

На втором этапе в качестве матрицы использовали кДНК *AteIF2α(S56)* с парой праймеров «eIF2-D-FW»/«eIF2-BamHI-Rev» (в случае кДНК *AteIF2α(S56D)*), либо парой праймеров «eIF2-A-FW»/«eIF2-BamHI-Rev» (в случае кДНК *AteIF2α(S56A)*). Продукты ПЦР размером 892 п.о. (соответственно «eIF2-D-Tail» и «eIF2-A-Tail») элюировали из агарозного геля (дорожки 3 и 6 на рисунке 1).

Для третьего этапа ПЦР в качестве матриц использовали элюированные продукты ПЦР, полученные в ходе первых двух этапов, а в качестве праймеров в обоих случаях – «eIF2-NdeI-FW» и «eIF2-BamHI-Rev». ПЦР-продукты размером 1063 п.о. (дорожки 4 и 7 на рисунке 1), вырезали из геля, элюировали, обрабатывали рестриктазами *NdeI* и *BamHI* и клонировали в векторе pET19b, обработанном теми же рестриктазами. В итоге были получены ДНК-конструкции *AteIF2α(S56D)*-pET19b и *AteIF2α(S56A)*-pET19b.

Схематическое изображение полученных ДНК-конструкций с указанием сайтов рестрикции показано на рисунке 2.



Lac – lac-оператор; rbc – участок связывания прокариотических рибосом (последовательность Шайна-Дальгарно); 10-His – последовательность, кодирующая 10 остатков гистидина; EK – нуклеотидная последовательность, кодирующая сайт распознавания энтерокиназы для отрезания 10His-tag от рекомбинантного белка.

Рисунок 2 – Схематическое представление полученных ДНК-конструкций *AteIF2α(S56)*-pET19b, *AteIF2α(S56D)*-pET19b и *AteIF2α(S56A)*-pET19b

Lac – lac-operator; rbs – prokaryotic ribosome binding site (Shine-Dalgarno sequence); 10-His – sequence encoding 10 histidine residues; EK – nucleotide sequence that encodes enterokinase recognition site, which is required for removal of 10His-tag from recombinant protein.

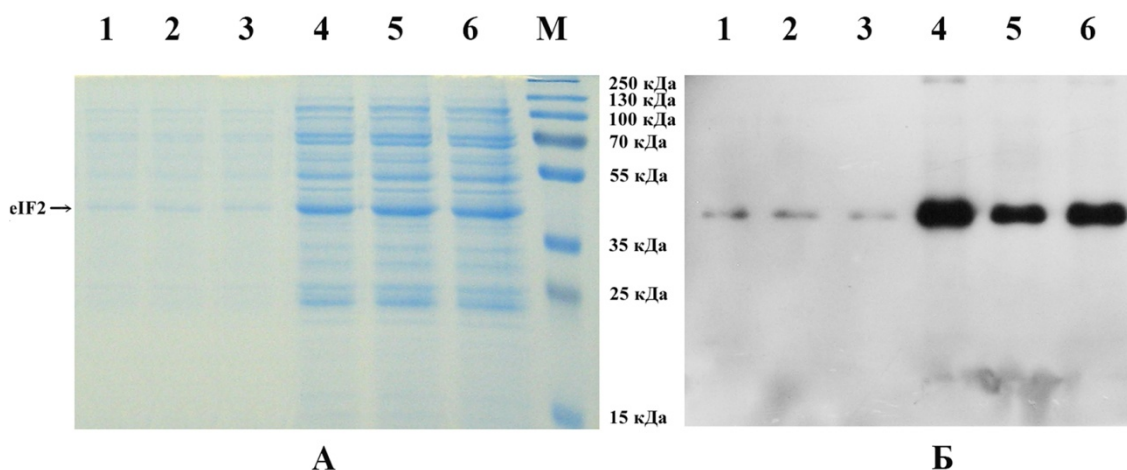
Figure 2 – Schematic presentation of obtained DNA constructs *AteIF2α(S56)*-pET19b, *AteIF2α(S56D)*-pET19b and *AteIF2α(S56A)*-pET19b

Чтобы удостовериться в корректности введенных мутаций, а также в том, что в ходе клонирования не произошло случайных изменений клонируемых кДНК, функциональные участки всех ДНК-конструкций были секвенированы.

ДНК-конструкциями *AteIF2α(S56)*-pET19b, *AteIF2α(S56D)*-pET19b и *AteIF2α(S56A)*-pET19b были трансформированы клетки экспрессионного штамма *E. coli* BL-21. После экспрессии рекомбинантных генов синтезированные белки выделяли за 10His-tag методом аффинной хроматографии ИМАС. Препараты рекомбинантных субъединиц очищали диализом, после чего их концентрировали методом центрифугирования в колонках “Sartorius” с мембраной, проницаемой лишь для молекул по массе меньше 10 кДа. Электрофоретический и вестерн-блот анализ препаратов рекомбинантных белков до и после концентрирования приведен на рисунке 3.

Концентрирование рекомбинантных белков в образцах происходило более чем в 3,5 раза. Результаты денсиметрического анализа геля и измерения концентрации белков, в препаратах, выделенных в нативных условиях после их концентрирования представлены в таблице 2.

Поскольку количество интактного белка, выделенного в нативных условиях было небольшим, то рекомбинантный белок *AteIF2α(S56)* выделяли также и в денатурирующих условиях. Такой препарат был использован для получения антител к этому белку. Выделенные препараты белков анализировали электрофорезом в 12,5% ПАА-геле, результаты которого приведены на рисунке 4.



А – 12,5% ПАА-гель, окрашенный Кумасси G250; Б – иммуноблоттинг нитроцеллюлозной мембраны с использованием в качестве первых антител Mouse Penta-His Antibodies (“5-Prime”).

Дорожки: 1 – AteIF2 α (S56) до концентрирования; 2 – AteIF2 α (S56D) до концентрирования; 3 – AteIF2 α (S56A) до концентрирования; 4 – AteIF2 α (S56) после концентрирования; 5 – AteIF2 α (S56D) после концентрирования; 6 – AteIF2 α (S56A) после концентрирования; М – белковый маркер Page Ruler Plus.

Рисунок 3 – Электрофореграмма (А) и вестерн-блот анализ (Б) препаратов рекомбинантных белков, выделенных в нативных условиях

А – 12.5% PAA-gel stained with Coomassie G250; B – immunoblotting of nitrocellulose membrane using Mouse Penta-His (“5-Prime”) as the first antibodies.

Tracks: 1 – AteIF2 α (S56) before the concentration; 2 – AteIF2 α (S56D) before the concentration; 3 – AteIF2 α (S56A) before the concentration; 4 – AteIF2 α (S56) after concentration; 5 – AteIF2 α (S56D) after concentration; 6 – AteIF2 α (S56A) after concentration; M – protein marker Page Ruler Plus.

Figure 3 – Electrophoregram (A) and western blot analysis (B) of recombinant protein preparations isolated under native conditions

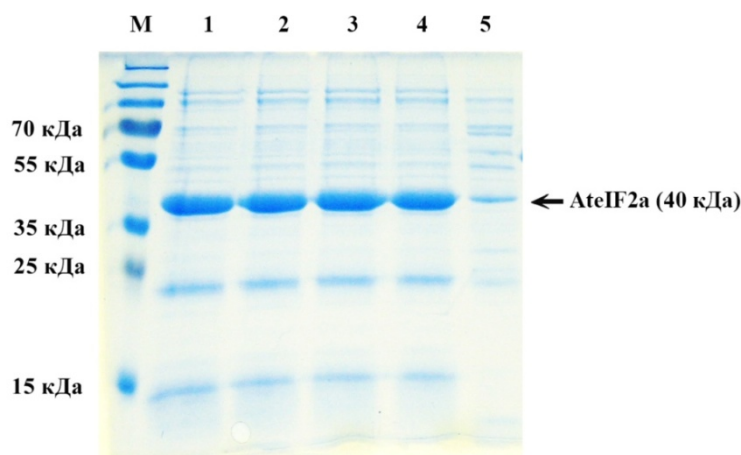
Таблица 2 – Концентрация рекомбинантных субъединиц AteIF2 α в препаратах белков, выделенных в нативных условиях

Table 2 – Concentration of AteIF2 α recombinant subunits in preparations of proteins extracted under native conditions

Белок <i>Protein</i>	Общая концентрация белка по Бредфорду (мкг/мл) <i>The total concentration of proteins by Bredford (mkg/ml)</i>	Доля интактного AteIF2 α в препарате, % <i>The part of intact AteIF2α in preparation, %</i>	Концентрация интактного AteIF2 α (мкг/мл) <i>The concentration of intact AteIF2α in preparation (mkg/ml)</i>	Общее количество интактного AteIF2 α (мкг) <i>The total amount of intact AteIF2α in preparation (mkg)</i>
AteIF2 α (S56)	548,2 ± 22,1	12,6	69,1	276,4
AteIF2 α (S56D)	552,3 ± 12,5	12,8	70,7	282,8
AteIF2 α (S56A)	554,9 ± 15,0	13,4	74,4	297,6

Из данных, представленных на рисунке 4 видно, что даже по сравнению с концентрированным препаратом AteIF2 α (S56), выделенным в нативных условиях (дорожка 5 на рисунке 4), неконцентрированные препараты AteIF2 α (S56), выделенные в денатурирующих условиях, имели значительно большую концентрацию (1150,3 мкг/мл против 548,2 мкг/мл) и более высокое содержания полноразмерного белка AteIF2 α (S56) (53% против 12,6%).

Чтобы проверить, способна ли рекомбинантная субъединица AteIF2 α (S56), выделенная в нативных условиях, фосфорилироваться специфической киназой по остатку серин-56 (Ser56), ее инкубировали с рекомбинантной киназой HsPKR человека в присутствии poly(I/C) – аналога двуспиральной (дс)РНК, которая является активатором киназы. Продукты реакции анализировали электрофорезом, после чего проводили иммуноблоттинг с использованием коммерческих антител против фосфорилированной формы HseIF2 α (P). Результаты анализа представлены на рисунке 5.



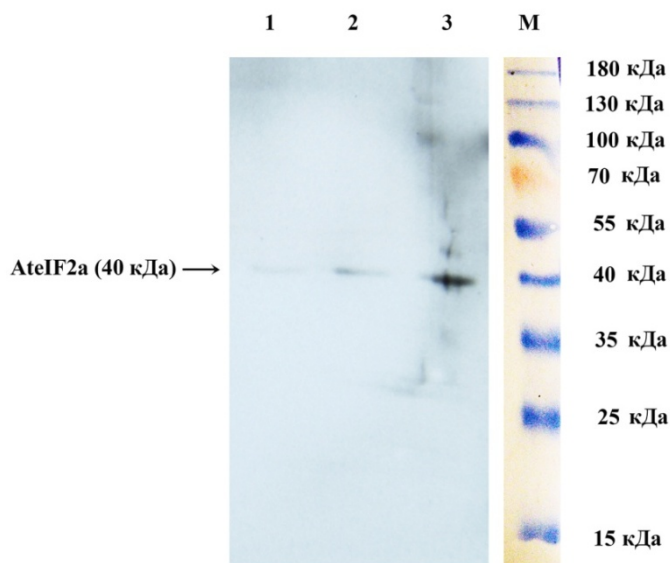
Дорожки: 1-4 – препараты AteIF2α(S56), выделенные в денатурирующих условиях без концентрирования; 5 – сконцентрированный препарат AteIF2α(S56), выделенный в нативных условиях.

М – маркерные белки PageRuler Plus, размеры которых указаны слева.

Рисунок 4 – Электрофоретический анализ в 12,5% ПАА-геле препаратов рекомбинантного белка AteIF2α(S56), выделенных в денатурирующих условиях

Lanes: 1-4 – preparations of AteIF2α(S56), isolated under denaturing conditions without concentration; 5 – concentrated AteIF2α(S56) isolated under native conditions. M - protein marker PageRuler Plus («Life science»).

Figure 4 – Electrophoretic analysis in 12.5% PAA gel of recombinant protein AteIF2α(S56) preparations isolated under denaturing conditions



М – белковый маркер PageRuler («Life science»). Дорожки: 1 – AteIF2α; 2 – AteIF2α + poly(I/C); 3 – AteIF2α + poly(I/C) + HsPKR.

Рисунок 5 – Фосфорилирование рекомбинантной субъединицы AteIF2α(S56) специфической PKR-киназой (HsPKR) в присутствии аналога dsРНК poly(I/C)

M – Protein ladder PageRuler («Life science»). Lines: 1 – AteIF2α; 2 – AteIF2α + poly(I/C); 3 – AteIF2α + poly(I/C) + HsPKR.

Figure 5 – Phosphorylation of recombinant AteIF2α(S56) subunit by specific HsPKR-kinase in the presence of dsRNA-analog poly(I/C)

Как видно из данных, представленных на рисунке 5, выделенная рекомбинантная субъединица AteIF2α(S56) в присутствии dsРНК специфически фосфорилировалась HsPKR-киназой очевидно по остатку Ser56, который соответствует остатку Ser52 в субъединице HseIF2α человека, что подтверждает физиологическую активность выделенного белка. Мутированные субъединицы AteIF2α(S56D) и AteIF2α(S56A) не могли служить субстратом для фосфорилирования киназой HseIF2α.

Имеющиеся в настоящее время данные о функционировании фактора инициации трансляции у эукариот и архей позволяют предположить, что кроме известного у животных и грибов блокирования фактора eIF2B в комплексе {Met-tRNA*eIF2*GTF*eIF2B} существует более древний механизм регуляции трансляции с участием фактора eIF2, функционирующий у архей и растений, а также, возможно, сохранившийся у животных и грибов. О существовании иного механизма регуляции может свидетельствовать эксперимент, подтверждающий фосфорилирование aIF2 α по остатку Ser48 животной PKR-киназой и её архейным гомологом Ph0512p [18], а также тот факт, что у архей, как и у растений, не обнаружены гомологи каталитического субкомплекса eIF2B $\gamma\epsilon$ и регуляторного субкомплекса eIF2B $\alpha\beta\delta$. Более того, у архей пока так и не обнаружены гомологи eIF5 [19], а β -субъединица aIF2 не имеет характерного для эукариот N-концевого домена, с которым связываются eIF5 и eIF2B ϵ . Было показано, что aIF2 имеет одинаковое сродство к GDP и GTP, и их обмен так же как у растений происходит без участия дополнительных факторов [20].

По нашему мнению, альтернативный механизм регуляции трансляции через фосфорилирование eIF2 α происходит путём образования стрессовых гранул. В экспериментах *in vivo* было показано, что в клетках растений и животных фосфорилирование eIF2 α является необходимым условием для сборки стрессовых гранул [21, 22]. Стрессовые гранулы представляют собой дискретные включения нетранслируемых мРНК и различных белков, обладающих мРНК связывающим свойством. К настоящему времени известно, что в состав стрессовых гранул входят факторы инициации трансляции eIF2, eIF3, eIF4E, поли(A)-связывающий белок, 40S рибосомная субчастица, TIA-1/R и другие белки [22].

В настоящей работе мы клонировали кДНК-ген *AteIF2 α* , получили варианты этой кДНК, кодирующие мутированные формы белка AteIF2 α (не фосфорилируемую и фосфомиметическую) с заменой Ser56 на Ala56 или Asp56 соответственно. Выделили рекомбинантные белки AteIF2 α (S56), AteIF2 α (S56D) и AteIF2 α (S56A) аффинной хроматографией. Препараты белков были очищены и сконцентрированы. Нативная и мутированные рекомбинантные субъединицы AteIF2 α необходимы для изучения роли фосфорилирования eIF2 α у растений. Согласно нашим предварительным данным, рекомбинантные субъединицы могут входить в состав фактора peIF2, что позволяет изучать влияние внесенных в них мутаций на активность peIF2 в системах *in vitro* и *in vivo*.

Финансирование. Работа выполнена в рамках грантовых проектов: 1920/ГФ4 «Исследование регуляции трансляции мРНК у растений посредством фосфорилирования альфа-субъединицы фактора инициации 2 (peIF2 α)» и 4538/ГФ4 «Разработка биотехнологии создания генетически модифицированных растений картофеля с повышенной устойчивостью к абиотическим стрессам на основе оптимизации экспрессии мутированных вариантов трансгена *AteIF2 α* ».

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Hinnebusch A.G., Lorsch J.R. The mechanism of eukaryotic translation initiation: New insights and challenges // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. – 2012. – Vol. 4.
- [2] Hinnebusch A.G. Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2011. – Vol. 75. – P. 434-467.
- [3] Baird Th.D., Wek R.C. Eukaryotic initiation factor 2 phosphorylation and translational control in metabolism // Advances in Nutrition. – 2012. – Vol. 3. – P. 307-321.
- [4] Wortham N.C., Proud Ch.G. eIF2B: recent structural and functional insights into a key regulator of translation // Biochemical Society Transactions. – 2015. – Vol. 43. – P. 1234-1240.
- [5] Shaikhin S.M., Smailov S.K., Lee A.V., Kozhanov E.V., Iskakov B.K. Interaction of wheat germ translation initiation factor 2 with GDP and GTP // Biochimie. – 1992. – Vol. 74. – P. 447-454.
- [6] Janaki N., Krishna V.M., Ramaiah K.V.A. Phosphorylation of wheat germ initiation factor 2 (eIF-2) by N-ethylmaleimide-treated wheat germ lysates and by purified casein kinase II does not affect the guanine nucleotide exchange on eIF-2 // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1995. – Vol. 324. – P. 1-8.
- [7] Krishna, V. M., Janaki, N., Ramaiah, K. V. A. Wheat germ initiation factor 2 (WG-eIF2) decreases the inhibition in protein synthesis and eIF2B activity of reticulocyte lysates mediated by eIF2 α phosphorylation // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1997. – Vol. 346. – P. 28-36.
- [8] Immanuel T.M., Greenwood D.R., MacDiarmid R.M. A critical review of translation initiation factor eIF2 α kinases in plants – regulating protein synthesis during stress // Functional Plant Biology. – 2012. – Vol. 39. – P. 717-735.
- [9] Browning K.S., Bailey-Serres J. Mechanism of cytoplasmic mRNA translation // The Arabidopsis Book. – 2015. – e0176 - P.1-39. – <http://dx.doi.org/10.1199/tab.0176>.
- [10] Zhang Y., Wang Y., Kanyuka K., Parry M.A.J., Powers S.J., Halford N.G. GCN2-dependent phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor-2 α in Arabidopsis // Journal of Experimental Botany. – 2008. – Vol. 59. – P. 3131-3141.

- [11] Lageix S., Lanet E., Pouch-Pelissier M.N., Espagnol M.C., Robaglia C., Deragon J.M., Pelissier T. Arabidopsis eIF2 α kinase GCN2 is essential for growth in stress conditions and is activated by wounding // *BMC Plant Biology*. – 2008. – Vol. 8. – <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-8-134>.
- [12] Boex-Fontvieille E., Daventure M., Jossier M., Zivy M., Hodges M., Tcherkez G. Photosynthetic control of Arabidopsis leaf cytoplasmic translation initiation by protein phosphorylation // *PLOS ONE*. – 2013. – Vol. 8, e70692. – Available at: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0070692>.
- [13] 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? // *Comparative and Functional Genomics*. – 2012. – Vol. 2012. – 8 p. – Available at: <http://www.hindawi.com/journals/ijg/2012/406357>.
- [14] Li M.W., AuYeung W.K., Lam H.M. The GCN2 homologue in Arabidopsis thaliana interacts with uncharged tRNA and uses Arabidopsis eIF2 α molecules as direct substrates // *Plant Biology*. – 2013. – Vol. 15. – P. 13-18.
- [15] Sambrook J., Russel D.W. Molecular cloning: A laboratory manual: 3 volumes. – Third edition. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. (CSHLP).
- [16] Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – Vol. 227. – P. 680-685.
- [17] Bradford M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.
- [18] Tahara M., Ohsawa A., Saito S. and Kimura M. In vitro phosphorylation of initiation factor 2 alpha (aIF2 alpha) from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3 // *J. Biochem. (Tokyo)*. – 2004. – Vol. 135. – P. 479-185.
- [19] Dev K, Santangelo T.J., Rothenburg S, Neculai D., Dey M., Sicheri F., Dever T.E., Reeve J.N. Hinnebusch A.G. Archaeal aIF2B interacts with eukaryotic translation initiation factors eIF2 α and eIF2 β : implications for aIF2B function and eIF2B regulation // *J Mol Biol*. – 2009. – Vol. 392. – P. 701-722.
- [20] Pedulla N., Palermo R., Hasenohrl D., Blasi U., Cammarano P., Londei P. The archaeal eIF2 homologue: functional properties of an ancient translation initiation factor // *Nucleic Acids Res*. – 2005. – Vol. 33. – P. 1804-1812.
- [21] Kimball S., Horetsky L., Ron D., Jefferson L., Harding H. Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes // *Cell Physiol*. – 2003. – Vol. 284. – P. 273-284.
- [22] Anderson P., Kedersha N. RNA granules // *The Journal of Cell Biology. Rev*. – 2006. – Vol. 172. – P. 803-808.

REFERENCES

- [1] Hinnebusch A.G., Lorsch J.R. The mechanism of eukaryotic translation initiation: New insights and challenges. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2012**, Vol. 4, P. 1-25.
- [2] Hinnebusch A.G. Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2011, Vol. 75, P. 434-467.
- [3] Baird Th.D., Wek R.C. Eukaryotic initiation factor 2 phosphorylation and translational control in metabolism. *Advances in Nutrition*, **2012**, Vol. 3, P. 307-321.
- [4] Wortham N.C., Proud Ch.G. eIF2B: recent structural and functional insights into a key regulator of translation. *Biochemical Society Transactions*, **2015**, Vol. 43, P. 1234-1240.
- [5] Shaikhin S.M., Smailov S.K., Lee A.V., Kozhanov E.V., Iskakov B.K. Interaction of wheat germ translation initiation factor 2 with GDP and GTP. *Biochimie*, **1992**, Vol. 74, P. 447-454.
- [6] Janaki N., Krishna V.M., Ramaiah K.V.A. Phosphorylation of wheat germ initiation factor 2 (eIF-2) by N-ethylmaleimide-treated wheat germ lysates and by purified casein kinase II does not affect the guanine nucleotide exchange on eIF-2. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1995**, Vol. 324, P. 1-8.
- [7] Krishna, V. M., Janaki, N., Ramaiah, K. V. A. Wheat germ initiation factor 2 (WG-eIF2) decreases the inhibition in protein synthesis and eIF2B activity of reticulocyte lysates mediated by eIF2 α phosphorylation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1997**, Vol. 346, P. 28-36.
- [8] Immanuel T.M., Greenwood D.R., MacDiarmid R.M. A critical review of translation initiation factor eIF2 α kinases in plants – regulating protein synthesis during stress. *Functional Plant Biology*, **2012**, Vol. 39, P. 717-735.
- [9] Browning K.S., Bailey-Serres J. Mechanism of cytoplasmic mRNA translation. *The Arabidopsis Book*, **2015**, e0176 - P.1-39. <http://dx.doi.org/10.1199/tab.0176>.
- [10] Zhang Y., Wang Y., Kanyuka K., Parry M.A.J., Powers S.J., Halford N.G. GCN2-dependent phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor-2 α in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, **2008**, Vol. 59, P. 3131-3141.
- [11] Lageix S., Lanet E., Pouch-Pelissier M.N., Espagnol M.C., Robaglia C., Deragon J.M., Pelissier T. Arabidopsis eIF2 α kinase GCN2 is essential for growth in stress conditions and is activated by wounding. *BMC Plant Biology*, **2008**, Vol. 8, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-8-134>.
- [12] Boex-Fontvieille E., Daventure M., Jossier M., Zivy M., Hodges M., Tcherkez G. Photosynthetic control of Arabidopsis leaf cytoplasmic translation initiation by protein phosphorylation. *PLOS ONE*, **2013**, Vol. 8, e70692.
- [13] 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? *Comparative and Functional Genomics*, **2012**, Vol. 2012, 8 pages.
- [14] Li M.W., AuYeung W.K., Lam H.M. The GCN2 homologue in Arabidopsis thaliana interacts with uncharged tRNA and uses Arabidopsis eIF2 α molecules as direct substrates. *Plant Biology*, **2013**, Vol. 15, P. 13-18.
- [15] Sambrook J., Russel D.W. Molecular cloning. *A laboratory manual: 3 volumes. Third edition*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **2001**.
- [16] Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, **1970**, Vol. 227, P. 680-685.

- [17] Bradford M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **1976**, Vol. 72, P. 248-254.
- [18] Tahara M., Ohsawa A., Saito S. and Kimura M. In vitro phosphorylation of initiation factor 2 alpha (eIF2 alpha) from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3. *J. Biochem. (Tokyo)*, **2004**, Vol. 135, P. 479-185.
- [19] Dev K, Santangelo T.J., Rothenburg S, Neculai D., Dey M., Sicheri F., Dever T.E., Reeve J.N. Hinnebusch A.G. Archaeal eIF2B interacts with eukaryotic translation initiation factors eIF2alpha and eIF2Balpha: implications for eIF2B function and eIF2B regulation. *J Mol. Biol.*, **2009**, Vol. 392, P. 701-722.
- [20] Pedulla N., Palermo R., Hasenohrl D., Blasi U., Cammarano P., Londei P. The archaeal eIF2 homologue: functional properties of an ancient translation initiation factor. *Nucleic Acids Research*, **2005**, Vol. 33, P. 1804-1812.
- [21] Kimball S., Horetsky L., Ron D., Jefferson L., Harding H. Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. *Cell Physiology*, **2003**, Vol. 284, P. 273-284.
- [22] Anderson P., Kedersha N. RNA granules. *The Journal of Cell Biology. Rev.*, **2006**, Vol. 172, P. 803-808.

В. Ю. Кислицин, А. В. Жигайлов, Н. С. Полимбетова, Б. Қ. Ысқақов

ҚР БҒМ ҒК РМҚ «М. А. Айтхожин атындағы молекулалық биология және биохимия институты»,
Алматы, Қазақстан

**ARABIDOPSIS THALIANA-НЫҢ ТРАНСЛЯЦИЯ БАСТАУ ФАКТОРЫ 2 КДНҚ ГЕНИНІҢ
α-СУББӨЛШЕГІН КЛОНДАУЫ, МУТАГЕНЕЗІ МЕН ЭКСПРЕССИЯ ЖӘНЕ
РЕКОМБИНАНТ БЕЛОҚТАРДЫ AteIF2α(S56), AteIF2α(S56D) МЕН AteIF2α(S56A) БӨЛІП АЛУ**

Аннотация. eIF2 α-суббөлшегінің фосфорильденуі жануарлар мен ашытқыштарда әртүрлі жағымсыз жағдайда трансляция басталуын толық тоқтатады. Өсімдіктерде осындай фактордың (peIF2α) белок биотүзілудегі реттелуі зерттелмей қалыпты.

Трансляция басталуының эукариоттық факторы 2 (eIF2) эукариоттық мРНК-дарының басым көпшілігіне трансляция басталу үшін қажет.

Жұмыста КТӨ-ПТӨ әдісімен eIF2 факторының *Arabidopsis thaliana*-дан алынған (AteIF2α(S56)) α-суббөлшегінің кДНК-гені көбейтілді. Сайтқа-бағ-ытталған *in vitro*-мутагенез көмегімен осы кДНК-ның екі варианты алынды: AteIF2α(S56D) мен AteIF2α(S56A). AteIF2α(S56D) AteIF2α суббөлшегін кодтай-ды, 56 орындағы серин қалдығын аспарагин қышқылына ауыстырғанда, бұл конститутив фосфорильденген жағдайды ұқсататын болады. AteIF2α(S56A) AteIF2α-ның фосфорильденбейтін түрін кодтайды, 56 орындағы серинді алан-инге ауыстырады. Табиғи және AteIF2α кДНК-генінің екі мутацияланған варианты pET19b векторында экспрессияланды да *Escherichia coli* жасушаларын-да клондалды. Осы кДНК-генімен кодталатын сәйкес келетін жиналған рек-омбинант AteIF2α(S56), AteIF2α(S56D) мен AteIF2α(S56A) суббөлшектер аффиндік хроматография әдісімен бөлініп алынды, диализбен тазаланды да тығыз-дау бағанасымен центрифугалау арқылы тығыздалды: олардың барлығы да әдепті мөлшері болды. AteIF2α(S56) суббөлшегі өзіндік мРНК киназасы мен қосспираль РНҚ бірге болғанда, фосфорильденуге қабілетті, осындай жағдай-да, ол өзінің әрекеттік жарамдылығын көрсетеді. Бұл рекомбинант суббөлшектер peIF2α фосфорильдену рөлін зерттеу үшін де, өсімдіктерде белоктар түзілуін реттеу үшін де керек.

Түйін сөздер: трансляция басталуының өсімдік факторы 2 (eIF2), рекомбинант α-суббөлшектер, клондау, мутагенез, экспрессия, фосфорильдену.

Publication Ethics and Publication Malpractice in the journals of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Submission of an article to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan implies that the described work has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. In particular, translations into English of papers already published in another language are not accepted.

No other forms of scientific misconduct are allowed, such as plagiarism, falsification, fraudulent data, incorrect interpretation of other works, incorrect citations, etc. The National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan follows the Code of Conduct of the Committee on Publication Ethics (COPE), and follows the COPE Flowcharts for Resolving Cases of Suspected Misconduct (http://publicationethics.org/files/u2/New_Code.pdf). To verify originality, your article may be checked by the Cross Check originality detection service <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

The authors are obliged to participate in peer review process and be ready to provide corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. All authors of a paper should have significantly contributed to the research.

The reviewers should provide objective judgments and should point out relevant published works which are not yet cited. Reviewed articles should be treated confidentially. The reviewers will be chosen in such a way that there is no conflict of interests with respect to the research, the authors and/or the research funders.

The editors have complete responsibility and authority to reject or accept a paper, and they will only accept a paper when reasonably certain. They will preserve anonymity of reviewers and promote publication of corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. The acceptance of a paper automatically implies the copyright transfer to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan.

The Editorial Board of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan will monitor and safeguard publishing ethics.

Правила оформления статьи для публикации в журнале смотреть на сайте:

www.nauka-nanrk.kz

ISSN 2518-1629 (Online), ISSN 2224-5308 (Print)

<http://www.biological-medical.kz/index.php/ru/>

Редактор *М. С. Ахметова*
Верстка на компьютере *Д. Н. Калкабековой*

Подписано в печать 13.12.2016.
Формат 60x881/8. Бумага офсетная. Печать – ризограф.
16,0 п.л. Тираж 300. Заказ 6.