

МРНТИ 34.15.25

<https://doi.org/10.26577/eb.2022.v91.i2.012>

Л.Т. Надирова^{1*}, Д.К. Бейсенов¹, Г.Э. Станбекова¹,
М.К. Сапарбаев², Б.К. Исаков¹

¹РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина», Казахстан, г. Алматы

² Институт рака Густава Русси, Франция, г. Париж

*e-mail: leila.nadirova@gmail.com

КЛОНИРОВАНИЕ КДНК-ГЕНА РИБОСОМНОГО БЕЛКА S6 ИЗ *ARABIDOPSIS THALIANA*, ЕГО ЭКСПРЕССИЯ В *ESCHERICHIA COLI* И ВЫДЕЛЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ATRPS6A1

Рибосомный белок S6 (RPS6) является неотъемлемым компонентом эукариотических 40S-рибосомных субъединиц (40S-RSu), который регулирует трансляцию определенных видов мРНК. Поскольку RPS6 – единственный белок 40S-RSu, способный к фосфорилированию, он и является одной из мишеней для регуляции биосинтеза белков у эукариот. Есть указание на то, что рибосомы с наиболее высоким уровнем фосфорилирования RPS6 создают селективные преимущества при трансляции мРНК, кодирующих большую часть белковых компонентов трансляционного аппарата клеток. Понимание механизма регуляции трансляции у растений посредством фосфорилирования RPS6 позволит повышать биомассу растений и их урожайность.

В настоящей работе кДНК-ген AtRPS6A1, кодирующий рибосомный белок S6 у *Arabidopsis thaliana*, клонирован в векторе pET19b. Этот ген был экспрессирован в клетках *Escherichia coli*, а кодируемый им рекомбинантный белок AtRPS6A1 выделен методами ионной и аффинной (IMAC) хроматографии, затем препарат очищен и сконцентрирован. Рекомбинантный белок AtRPS6A1 в дальнейшем будет использован в экспериментах *in vitro* для исследования молекулярных механизмов регуляции трансляции мРНК растений посредством его фосфорилирования и получения поликлональных антител к этому белку.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, клонирование кДНК-гена AtRPS6A1, рекомбинантный рибосомный белок S6 (AtRPS6A1).

L.T. Nadirova^{1*}, D.K. Beisenov¹, G.E. Stanbekova¹,
M.K. Saparbaev², B.K. Isakov¹

¹RSE “M.Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry”, Kazakhstan, Almaty

²Gustav Roussy Cancer Institute (IGR), France, Paris

*e-mail: leila.nadirova@gmail.com

Cloning of cDNA-gene of *Arabidopsis thaliana* ribosomal protein S6, its expression in *Escherichia coli* and isolation of AtRPS6A1 recombinant protein

Ribosomal protein S6 (RPS6) is a component of eukaryotic 40S ribosomal subunits (40S-RSu) that regulates the translation of certain types of mRNA. RPS6 is the unique 40S-RSu protein, which is able to phosphorylation; it is one of the targets for the regulation of protein biosynthesis in eukaryotes. There is evidence that ribosomes with the highest level of phosphorylation of RPS6 create selective advantages in translation of mRNAs encoding many of the protein components of the cell translational apparatus. Understanding the mechanism of regulation of plant biosynthesis through phosphorylation of pRPS6 will increase plant biomass and yield.

In this work, the AtRPS6A1 cDNA gene encoding the ribosomal protein S6 was cloned into the pET19b vector. This gene was expressed in *Escherichia coli* cells, and the recombinant PRS6 protein was isolated by ion-metall affinity (IMAC) chromatography, purified and concentrated. The recombinant RPS6 protein will be used in *in vitro* experiments to study the molecular mechanisms of regulation of plant mRNA translation through its phosphorylation and production of polyclonal antibodies to this protein.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, cloning AtRPS6A1 cDNA gene, recombinant ribosomal protein S6 (AtRPS6A1).

Л.Т. Надирова^{1*}, Д.К. Бейсенов¹, Г.Е. Станбекова¹,
М.К. Сапарбаев², Б.Қ. Ысқақов¹

¹РМК «М.А. Айтхожин атындағы молекулярлық биология
және биохимия ғылыми-зерттеу институты», Қазақстан, Алматы қ.
²Густав Русси атындағы канцерология институты, Франция, Париж қ.
*e-mail: leila.nadirova@gmail.com

***Arabidopsis thaliana*-дан S6 рибосомалық ақуызының қДНҚ генін клондау, оның *Escherichia coli*-сінде экспрессиясы және рекомбинантты AtRPS6A1 ақуызын оқшаулау**

Рибосомалық ақуыз S6 (RPS6) эукариоттық 40S рибосомалық суббірліктерінің (40S-RSu) маңызды құрамдас бөлігі болып табылады. Ол жасушада мРНК-ның белгілі кейбір түрлерінің трансляциясын реттеп істейді. RPS6 – фосфорлануға қабілетті 40S-RSu суббірлігінің жалғыз ақуызы. Сондықтан ол эукариоттардағы ақуыз биосинтезін реттеу процессын нысаналарының бірі болып табылады. Егер рибосомаларда RPS6 протеинінің фосфорлану деңгейі жоғары болса, онда жасушаның трансляциялық аппаратының ақуыздық компоненттерінің көпшілігін кодтайтын мРНК-ның трансляциясы кезінде бұл селективті артықшылық туғызатыны туралы көрсеткіш бар. RPS6 фосфорлануы арқылы өсімдіктердегі трансляцияны реттеу механизмін түсіну өсімдік биомассасы мен өнімділігін арттыруға көмектеседі.

Бұл ғылыми жұмыста *Arabidopsis thaliana*-дағы S6 рибосомалық ақуызын кодтайтын AtRPS6A1 қДНҚ гені рЕТ19b векторына клондалған. Бұл ген *Escherichia coli*-нің жасушаларында экспрессияланды және ол арқылы кодталған рекомбинантты AtRPS6A1 ақуызы металл-иондық аффиндік хроматография (МИАХ) әдістерімен бөлініп алынды, ал содан кейін препарат тазарттылып және концентраттандырылды. Рекомбинантты AtRPS6A1 протеині одан әрі *in vitro* эксперименттерінде өсімдік мРНК трансляциясының фосфорлануы және болашақта осы ақуызға поликлоналды антиденелерді өндіру арқылы реттелуінің молекулалық механизмдерін зерттеу үшін пайдаланылатын болады.

Түйін сөздер: *Arabidopsis thaliana*, AtRPS6A1 қДНҚ геннің клондау, рекомбинантты рибосомалық ақуыз S6 (AtRPS6A1).

Сокращения и обозначения

rRPS6 – S6 белок малой рибосомной субчастицы растений, РТ – реакция обратной транскрипции (реверс-транскрипция), ПЦР – полимеразная цепная реакция, 10xHis-tag – аминокислотная последовательность из десяти гистидинов, МИАХ – металл-ионная аффинная хроматография, ИПТГ – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид.

Введение

В настоящее время в мире все больше увеличивается спрос на все виды продукции сельскохозяйственного растениеводства, и главные надежды возлагаются на биотехнологические инновации в области растениеводства, которые имеют большой потенциал к существенному увеличению биомассы и урожайности растений, путем ускорения их роста, способности улавливать энергию света и преобразовать ее в полезные продукты [1].

Урожайность сельскохозяйственных растений – один из важнейших признаков в селекции, поэтому проводится большое количество генетических и физиологических исследований по ее

повышению. Вместе с тем, мало что известно о молекулярных и биохимических системах, определяющих продуктивность растений [2]. Их детальное изучение чаще всего проводится на модельном растении *Arabidopsis thaliana*, которое имеет много экспериментальных преимуществ по сравнению с другими видами [3] и является наиболее изученным с точки зрения молекулярных механизмов, регулирующих его рост и развитие. Новые знания, получаемые на *A. thaliana*, затем переносятся на другие экономически важные культуры для решения практических задач по повышению устойчивости к абиотическим и биотическим стрессам, а также продуктивности [4].

Рост, деление и дифференциация клеток – важнейшие процессы, лежащие в основе развития всех многоклеточных организмов. У всех эукариот имеются сходные регуляторные системы, которые согласовывают скорость роста и деления клеток в точном соответствии с наличием и доступностью питательных веществ (аминокислот, нуклеотидов) и энергетических ресурсов [5-13]. Эти системы, в свою очередь, находятся под влиянием многих регуляторных факторов внутри организма (гормоны и другие

сигнальные молекулы), а также под воздействием внешних биотических и экологических стрессов [7-14].

Рибосомный белок S6 (RPS6) является компонентом эукариотических 40S-рибосомных субъединиц (40S-RSu), который регулирует трансляцию определенных видов мРНК. Поскольку RPS6 – единственный белок 40S-RSu, способный к фосфорилированию, он и является одной из мишеней для регуляции биосинтеза белков у эукариот [15]. Растительный RPS6 может фосфорилироваться различными киназами по одному треонинovому и четырем сериновым остаткам, локализующимся на С-конце этого белка, но основной киназой, фосфорилирующей RPS6, является киназа RPS6K2 [16-20]. Есть указание на то, что рибосомы с наиболее высоким уровнем фосфорилирования RPS6 создают селективные преимущества при мобилизации определенных мРНК в полисомы, а именно при трансляции мРНК, содержащих 5'-концевую олигопиримидиновую последовательность (5'-terminal oligo pyrimidine, 5'TOP), которые кодируют большую часть белковых компонентов трансляционного аппарата клеток [21-22]. Понимание механизма регуляции биосинтеза у растений посредством фосфорилирования RPS6 позволит искусственно регулировать рост и размеры клеток, а через это – повышать биомассу растений и их урожайность.

Для проведения исследования активации процесса фосфорилирования растительного белка RPS6 необходимо иметь очищенный белок в достаточных количествах. Поэтому было решено провести клонирование и экспрессию гена *AtRPS6A1* с последующей очисткой рекомбинантного белка посредством аффинной хроматографии.

Также полученный нативный белок RPS6 можно будет использовать в дальнейшем для исследования его фосфорилирования различными киназами и последующего получения генетически модифицированных растений с повышенной продуктивностью, более ранним созреванием (скороспелостью) и высокой скоростью роста биомассы.

Новые фундаментальные знания в дальнейшем послужат основой для совершенствования биотехнологии получения генетически модифицированных растений с применением технологии CRISPR-Cas для придания им повышенной продуктивности и устойчивости к различным неблагоприятным факторам среды и патогенам.

Материалы и методы

Использованные в работе олигонуклеотиды RPS6-for-NdeI (5'GTCGCATATGAAGTTCAACGTTGCGAATCCAACACTACTGGA) и RPS6-rev-SalI (5'TCTCGTCTCGACTTTTAACTGTGTGACAGAGGGCTTGGCAGCAGCAGA) были синтезированы компанией «Eurogentec».

Компьютерный анализ последовательностей нуклеиновых кислот и белков проводили с использованием программ SnapGene Viewer 4.0.4, VNTI-Viewer 11.5.1 и DNAMAN 4.03. Нуклеотидная последовательность кДНК *AtRPS6A1* (GeneBank: AT4G31700.1) была взята из базы данных TAIR (<https://www.arabidopsis.org>).

Выделение тотального препарата РНК. Семена *Arabidopsis thaliana* экотипа Col-0 стерилизовали и высаживали на твердую питательную среду Мурасиге-Скуга без фитогормонов, проростки культивировали при 16-часовом световом дне и температуре +23±2°C. Препараты мРНК выделялись из 0,1 г сырой массы листьев *A. thaliana* с использованием реагента тризол (Sigma) по методике производителя.

Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводили с использованием набора Maxima Reverse Transcriptase (Thermo FS) со специфическими праймерами по методике производителя. Инкубацию проводили при 50°C в течение 1 часа. Реакцию останавливали прогреванием смеси при 85°C в течение 5 мин и охлаждали во льду.

Полимеразная реакция после реакции обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) проводилась с использованием полимеразы Phusion High-fidelity DNA-polymerase (Thermo FS) по методике производителя. Реакцию проводили в следующем температурном режиме: стадия 1 – 98°C 30 сек; стадия 2 – 98°C 10 сек, 58°C 30 сек, 72°C 30 сек – 30 циклов; стадия 3 – 72°C 7 мин, 4°C 5 мин.

Клонирование кДНК AtRPS6A1. Продукты амплификации анализировали в 1% агарозном геле; полосу, соответствующую по размеру кДНК *AtRPS6A1* (772 п.о.), элюировали из геля с использованием коммерческого набора Gel Extraction Kit (Thermo FS). Далее ДНК-фрагмент обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *NdeI* и *SalI* и клонировали в векторную ДНК pET19b, обработанную рестриктазами *NdeI* и *XhoI*.

Секвенирование клонированных участков плазмид pET19b-His-AtRPS6A1 осуществляли с использованием коммерческого набора BigDye® Terminator v.3.1 (Applied Biosystems) по методике фирмы-производителя. Амплификацию проводили на приборе GeneAmp® PCR

System 9700 (Applied Biosystems) при использовании следующего температурного режима: стадия 1 – 96°C 2 мин; стадия 2 – 96°C 20 сек, 50°C 10 сек, 60°C 4 мин – 30 циклов; стадия 3 – 4°C 5 мин. По окончании амплификации ДНК осаждали этанолом, осадок растворяли в 15 мкл формамида. Образцы ДНК денатурировали 96°C 3 мин и анализировали на генетическом анализаторе ABI Prism 310 (Applied Biosystems).

Экспрессия кДНК *AtRPS6A1* в клетках бактерий. Клетки *E. coli* штамма Rosetta BL-21(DE3) трансформировали методом теплового шока (42°C, 90 сек) плазмидой pET19b-His-*AtRPS6A1*. Трансформированные клоны растили ночь в 2 мл LB присутствии 0,1% глюкозы для ингибирования экспрессии лактозного оперона. На утро клетки разводили в 20 раз и растили при разных температурных режимах и концентрациях ИПТГ (изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид, англ. IPTG). Индукцию экспрессии проводили в течение 3 часов. Клетки осаждали и суспендировали в буфере А (20мМ Hepes, 20мМ NaCl), лизировали с помощью аппарата FRENCH® Press (Thermo electron corporation), после центрифугировали; супернатант и осадок анализировали посредством *одномерного электрофореза белков* по Лэммли [23] в 10%ПАА-геле в присутствии 0,1% SDS на приборе Mighti-small (Hoefer). Гели окрашивали 0,125% раствором Кумасси бриллиантового голубого G-250 (Serva).

Для выделения белка RPS6 бактериальную культуру растили в 100 мл жидкой среды LB при 23°C до оптической плотности $OD_{600} = 0,5$. После прибавления к среде ИПТГ до конечной концентрации 0,2 мМ, клетки растили еще в течение 3-х часов. Клетки осаждали и суспендировали в 20 мл буфера Б (0,5 М NaCl, 20 мМ Hepes, 10 мМ имидазол, 0,5% Nonidet P40, pH 8,0). Клетки разрушали с помощью прибора FRENCH® Press. Лизат центрифугировали при 40000g 25 мин при 4°C. Супернатант пропускали через колонку с Q-сефарозой для проведения анионно-обменной хроматографии. Белки, не связавшиеся с Q-сефарозой, пропускали через колонку с PerfectPro Ni-NTA агарозой (5-Prime), далее колонку промывали буфером Б, содержащим 20 мМ имидазола. Элюцию связавшихся с Ni-NTA агарозой белков проводили буфером Б, содержащим 250 мМ имидазола.

Концентрирование белка проводили центрифугированием образцов в пробирках с фильтрами Amicon Ultra 3K (Merck) согласно инструкции производителя.

Иммуноблоттинг. Перенос белков из ПАА-геля на нитроцеллюлозную мембрану проводили на аппарате Invitrogen iBlot Dry Blotting System при 23V в течение 10 мин. Мембрану после переноса промывали дважды по 10 мин в буфере TBS (20 мМ трис-HCl (pH 7,6), 140 мМ NaCl), дважды по 10 мин – в буфере TBST (TBS + 0,05% Tween-20). После этого мембрану инкубировали в блокирующем буфере (5% сухое обезжиренное молоко (Sigma) в TBST) в течение ночи при 4°C. После забивки мембрану инкубировали 1 час с I-ми антителами Penta-His mouse antibodies (5-Prime) в разведении 1:5000 в блокирующем буфере. После трехкратной промывки в TBST по 20 мин ее инкубировали 1 час со II-ми антителами Anti-mouse HRP-conjugate (Santa-Cruz) в разведении 1:4000 в блокирующем буфере. После двукратной промывки мембраны по 20 мин в TBST и двукратной промывки по 10 мин в TBS, детекцию связавшихся антител проводили хемилюминесцентным субстратом ECL Prime Western blotting Detection Reagent (Amersham).

Общие методы. Выделение плазмидных ДНК, спектрофотометрическое определение концентрации нуклеиновых кислот, приготовление и трансформацию компетентных клеток *E. coli* и другие процедуры выполняли по стандартным методикам [24]. Концентрацию общего белка определяли по Брэдфорду [25].

Статистические методы. Спектрофотометрическое определение концентрации белков и нуклеиновых кислот проводили в трех повторах с вычислением в пакете Microsoft Office Excel 2013 среднего арифметического значения (X_{cp}) и ошибки среднего арифметического (m) [24-25].

Результаты и обсуждение

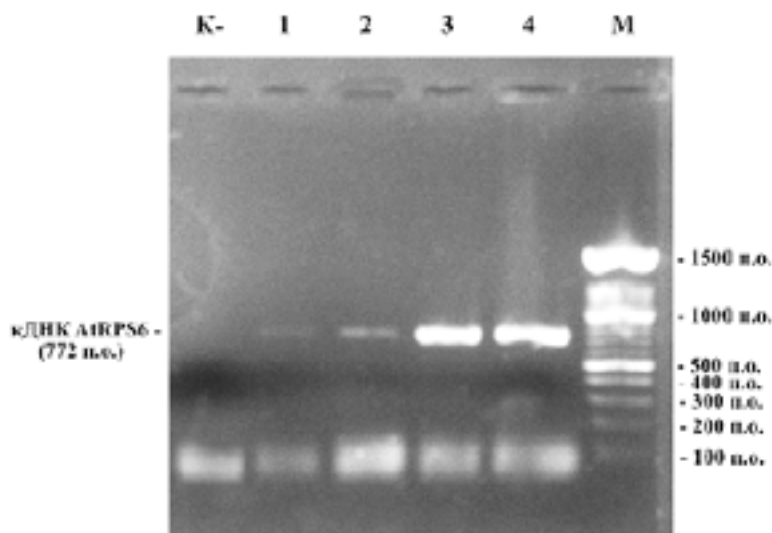
Клонирование кДНК гена *AtRPS6A1*

RPS6 белок в геноме *A. thaliana* кодируется двумя генами *AtRPS6A* и *AtRPS6B*. Кодированные ими белки по аминокислотной последовательности идентичны на 94% и одинаково функционально активны [17]. Существует четыре изоформы белка: *AtRPS6A1*, *AtRPS6B1*, *AtRPS6A2* и *AtRPS6B2*, последние две представляют собой укороченные формы первых. Целью настоящей работы было клонировать и экспрессировать кДНК *AtRPS6A1*. Исходя из нуклеотидной последовательности кДНК-гена *AtRPS6A1* (GeneBank #AT4G31700.1) посредством компьютерной программы SnapGene Viewer 4.0.4 и сервера Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) были подобраны праймеры для амплификации и кло-

нирования кДНК. С использованием программы DNAMAN 4.03 праймеры были проверены на отсутствие комплементарности друг с другом и самих на себя. Из листьев растений *A. thaliana* был выделен суммарный препарат РНК, проведена реакция обратной транскрипции. Для получения кДНК *AtRPS6A1* использовали праймер RPS6-rev-SalI, который комплементарен 3'-концевому участку кДНК-гена *AtRPS6A1*, но

не *AtRPS6B1*. Подобранный обратный праймер позволил нам амплифицировать именно ту открытую рамку считывания, которая кодирует интересующую нас *AtRPS6A1* изоформу целевого белка.

Амплификацию кДНК *AtRPS6A1* проводили, используя праймеры RPS6-for-NdeI и RPS6-rev-SalI. Результаты электрофоретического анализа продуктов ОТ-ПЦР представлены на рисунке 1.



М – ДНК-маркер. Дорожки: К – отрицательный контроль; 1 – 0,5 мкл смеси РТ в реакции; 2 – 1,0 мкл смеси РТ в реакции; 3 – 2,5 мкл смеси РТ в реакции; 4 – 5 мкл смеси РТ в реакции.

Рисунок 1 – Электрофоретический анализ в 1% агарозном геле продуктов ОТ-ПЦР для амплификации кДНК *AtRPS6A1*

Продукт амплификации размером около 772 п.о., соответствующий кДНК *AtRPS6A1* (см. Рис.1) элюировали из геля, обрабатывали рестриктазами *NdeI* и *SalI* и клонировали в вектор pET19b, обработанный *NdeI* и *XhoI* (рестриктазы *SalI* и *XhoI* после гидролиза образуют «липкие концы» ДНК, но после лигирования сайты узнавания не восстанавливаются). Скрининг ДНК-клонов проводили методом ПЦР-анализа с использованием ген-специфических праймеров и рестрикционного анализа с помощью эндонуклеаз *NdeI* и *BamHI*. Таким образом была получена плаزمида pET19b-His-*AtRPS6A1* (см. Рис. 2).

Нуклеотидная последовательность клонированного участка была выверена секвенированием ДНК.

Экспрессия кДНК в клетках *E. coli* и выделение белка

ДНК-конструкцией pET19b-His-*AtRPS6A1* трансформировали клетки штамма *E. coli*

Rosetta BL21(DE3), широко используемый для оптимальной экспрессии эукариотических кДНК-генов. Подбор условий для оптимальной экспрессии RPS6 белка представлен на рисунке 3. Как видно из рисунка, оптимальным режимом экспрессии является 23 °С при 0,2 мМ ИПТГ в течение 3-х часов. Белок содержался как в растворимой фракции (рисунок 3А), так и в осадке (рисунок 3Б).

Для очистки синтезированного белка RPS6, содержащего «10xHis-tag» на N-конце использовали металл-ионную аффинную хроматографию (МИАХ), которая позволяет быстро и достаточно чисто выделить из лизата бактерий рекомбинантные белки. Поскольку выделение белка в денатурирующих условиях не представлялось целесообразным в силу того, что для дальнейших исследований необходим белок RPS6, обладающий нативной конформацией, целевой белок был выделен в нативных условиях в дис-

социрующем буфере с добавлением этапа ионообменной хроматографии с целью удаления значительного количества бактериальных белков. Для лизиса использовали диссоциирующий буфер, содержащий неионный детергент Nonidet P40, позволяющий увеличить выход растворимых белков. На рисунке 4 представлены резуль-

таты этапа анионообменной хроматографии на колонке с Q-сефарозой. Как видно из рисунка 4, не связавшаяся фракция с Q-сефарозой содержала большее количество имеющего pI=10,7 RPS6 (дорожка 2), и меньшее количество бактериальных белков по сравнению с исходным лизатом (дорожка 1).

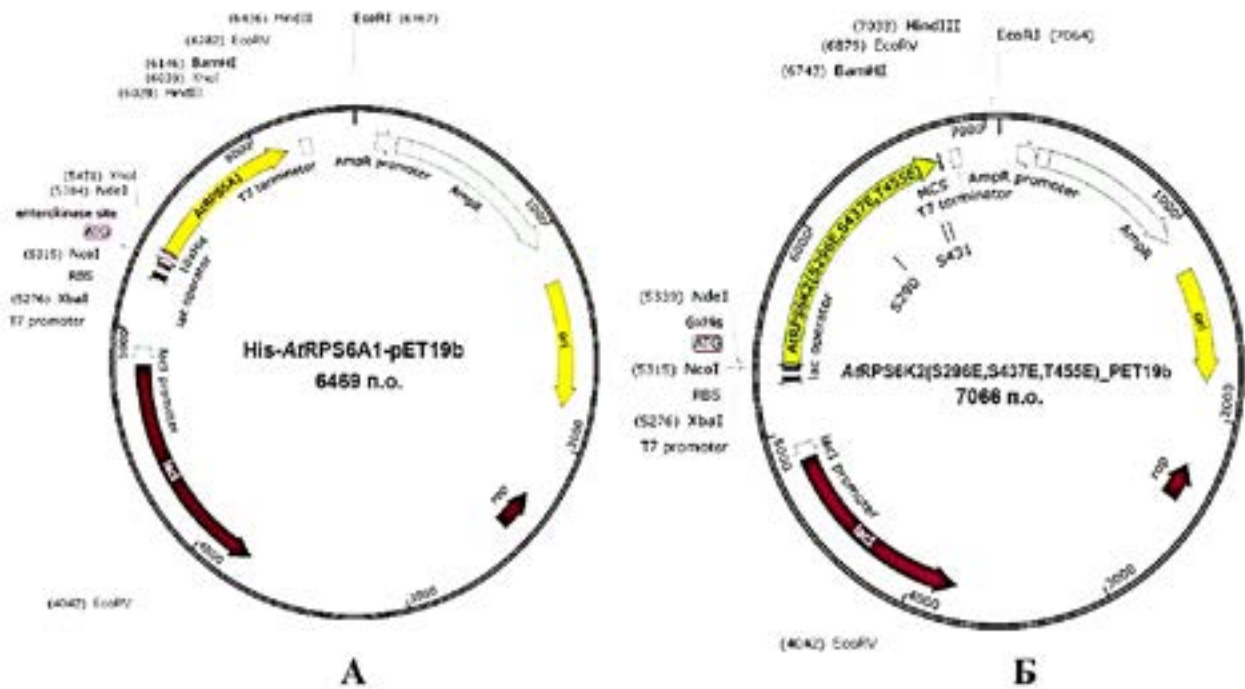
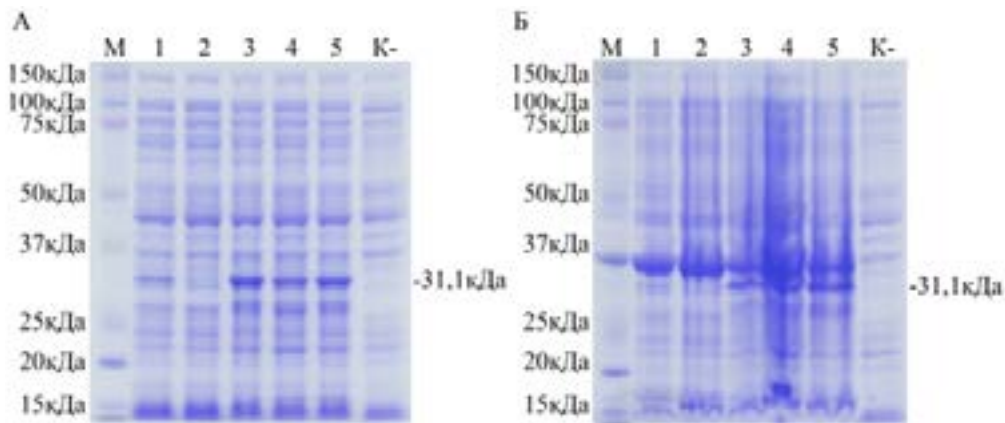
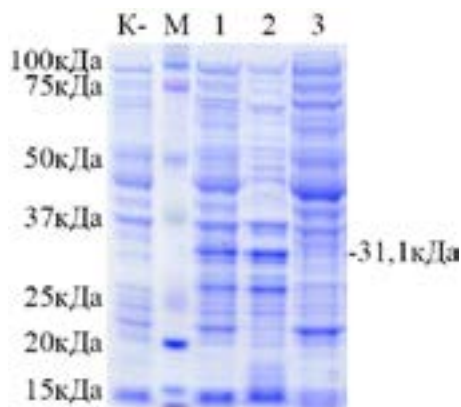


Рисунок 2 – Схематическое изображение ДНК-конструкции pET19b-His-AtRPS6A1



10% ПАА-гель, окрашенный Кумасси G-250. А и Б – супернатанты и осадки лизата после центрифугирования соответственно. М – белковый маркер Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (Bio-Rad). К- – нетрансформированные клетки *E. coli* Rosetta BL21(DE3). 1 – экспрессия при 16 °C и 0,2 мМ ИПТГ; 2 – экспрессия при 16 °C и 0,02 мМ ИПТГ; 3 – экспрессия при 23 °C и 0,2 мМ ИПТГ; 4 – экспрессия при 23 °C и 0,02 мМ ИПТГ; 5 – экспрессия при 30 °C и 0,2 мМ ИПТГ.

Рисунок 3 – Оптимизация условий экспрессии кДНК AtRPS6A1 в клетках бактерий



Окрашенный Кумасси G-250 10% ПАА-гель. К – нетрансформированные клетки *E. coli* Rosetta BL21(DE3), М – белковый маркер Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards; 1 – супернатант в диссоциирующем буфере после центрифугирования лизата; 2 – фракция белков, не связавшаяся с Q-сефарозой; 3 – фракция белков, смытых с Q-сефарозы раствором 50 мМ NaCl.

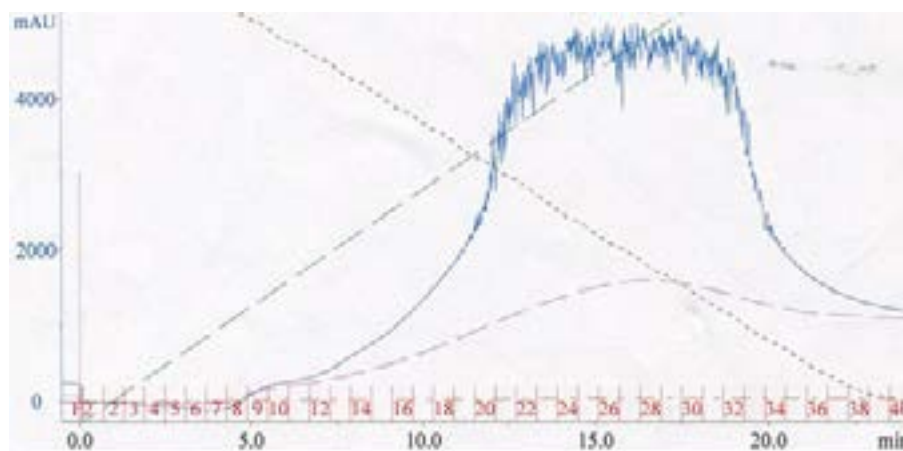
Рисунок 4 – Электрофоретический анализ фракций после анионообменной хроматографии на колонке с Q-сефарозой

Несвязавшиеся с Q-сефарозой белки были нанесены на колонку с Ni-NTA (никель –нитрилоацетат) агарозой, после чего была проведена промывка колонки и элюция связавшихся с агарозой белков. Далее препарат был сконцентрирован центрифугированием в пробирках Amicon Ultra 3K.

Хроматограмма и анализ выделенного белка RPS6 представлены на рисунках 5 и 6.

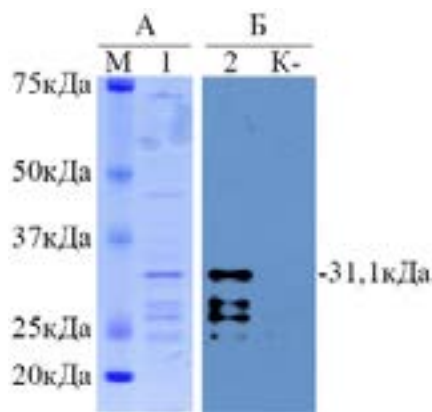
Иммуноблоттинг с антителами к пентагистидину выявил белок ожидаемого размера в 31 кДа, а также белки меньшего размера, которые представляют, по-видимому, продукты деградации исходного белка.

Выделенный в нативных условиях белковый препарат содержал некоторое количество примесных полипептидов. Содержание рекомбинантного белка в препарате оценивали с помощью денситометрического анализа (после измерения концентрации белков по методу Брэдфорда). Общая концентрация препарата белка до концентрирования составила $0,174 \pm 0,017$ мг/мл, а после концентрирования – $0,55 \pm 0,042$ мг/мл. Общее количество сконцентрированного рекомбинантного белка *AtRPS6A1* составило 27,5 мкг на 100 мл исходной клеточной суспензии клеток бактерий.



По оси ординат нанесены единицы оптической плотности в у.е., по оси абсцисс нанесены номера фракций, отбираемых по времени.

Рисунок 5 – Металл-ионная аффинная хроматография с использованием Ni-NTA агарозы.



А – Окрашенный Кумасси G-250 10% ПАА-гель с очищенным препаратом RPS6 (объединенные фракции 21-32). Б – Иммуноблот с антителами Mouse Penta-His Antibodies (5-Prime) и детекцией с помощью Goat-antimouse HRP-Conjugate (Santa-Cruz).

М – белковый маркер Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards, К- – нетрансформированные клетки *E. coli* Rosetta BL21(DE3).

Рисунок 6 – Электрофоретический и вестерн-блоттинг анализ очищенного рекомбинантного AtRPS6A1 белка.

Заключение

Таким образом, в данной работе методом ОТ-ПЦР был амплифицирован кДНК-ген *AtRPS6A1*, при этом в качестве матрицы был использован тотальный препарат РНК, выделенный из *A. thaliana*. Затем полученный ген *AtRPS6A1* был клонирован в экспрессионный бактериальный вектор pET19b.

Собранная ДНК-конструкция pET19b-His-AtRPS6A1 была экспрессирована в клетках *E. coli*. Рекомбинантный белок RPS6 был очищен с использованием методов анионнообменной и металл-хелатной аффинной хроматографии. Препарат белка был сконцентрирован. Методом иммуноблоттинга подтверждены характеристики выделенного белка.

Мы планируем разработать новый подход к регуляции биосинтеза белка в растительных системах, основанный на использовании киназы *AtRPS6K2* рибосомного белка S6, которая стимулирует фосфорилированное состояние данного белка. Для этих целей необходим нативный растительный белок RPS6, который был получен в настоящей работе.

Центральным звеном, регулирующим основные процессы анаболизма в клетках эукариот является протеинкиназа TOR. В клетках животных и дрожжей идентифицировано множество ее мишеней. В клетках растений отсутствуют некоторые ключевые мишени TOR-киназы, такие как

eIF4E-связывающие белки (4E-BP) и протеинкиназа фактора элонгации трансляции eEF2. Киназа рибосомного белка S6 становится в клетках растений главной эффекторной киназой, опосредующей передачу сигнала от TOR-киназы к трансляционному аппарату клетки.

Понимание механизма регуляции биосинтеза белка у растений посредством фосфорилирования pRPS6 позволит в дальнейшем искусственно регулировать рост и размеры клеток, а через это – повышать биомассу растений и их урожайность. Очищенный рекомбинантный белок RPS6 планируется в дальнейшем использовать для проверки активности различных видов киназ, а кодирующие их гены в свою очередь внедрить в геном экономически важных видов и сортов растений для повышения их продуктивности.

Конфликт интересов

Все авторы ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

Источник финансирования

Работа выполнена в рамках гранта AP08855746 «Разработка биотехнологии повышения продуктивности растений посредством активации процесса биогенеза рибосом», финансируемого Комитетом науки Министерства образования и науки РК.

Литература

- 1 Borlaug N. Feeding a hungry world // *Science*. – 2007. – Vol. 318. – P. 359-359.
- 2 Van Camp W. Yield enhancement genes: seeds for growth // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2005. – Vol. 16. – P. 147-153.
- 3 Meinke D.W., Cherry J.M., Dean C., Rounsley S.D., Koornneef M. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. // *Science*. – 1998. – Vol. 282. – P. 679–682.
- 4 Zhang J.Z., Creelman R.A., Zhu J.-K. From laboratory to field. Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops // *Plant Physiol.* – 2004. – Vol. 135. – P. 615-621.
- 5 Turck F., Kozma S.C., Thomas G., Nagy F. A heat-sensitive *Arabidopsis thaliana* kinase substitutes for human p70s6k function in vivo // *Mol. Cell. Biol.* – 1998. – Vol. 18. – P. 2038-2044.
- 6 Ryabova L.A., Robaglia Ch., Meyer Ch. Target of Rapamycin kinase: central regulatory hub for plant growth and metabolism // *J Exp. Bot.* – 2019. – Vol.70, No.8. – P. 2211–2216.
- 7 Ren M., Qiu S., Venglat P., Xiang D., Feng L., Selvaraj G., Datla R. Target of rapamycin regulates development and ribosomal RNA expression through kinase domain in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* – 2011. – Vol.155. – P. 1367-1382.
- 8 Roustan V., Jain A., Teige M., Ebersberger I., Weckwerth W. An evolutionary perspective of AMPK–TOR signaling in the three domains of life // *J Exp. Bot.* – 2016. – Vol. 67, No 13 – P. 3897-3907.
- 9 Nandagopal N., Roux P.P. Regulation of global and specific mRNA translation by the mTOR signaling pathway // *Translation*. – 2015. – Vol. 3, No. 1.
- 10 Henriques R., Bögre L., Horváth B., Magyar Z. Balancing act: matching growth with environment by the TOR signalling pathway // *J Exp. Bot.* – 2014. – Vol.65, No.10 – P. 2691-2701
- 11 Caldana C., Martins M.C.M., Mubeen U., Urrea-Castellanos R. The magic ‘hammer’ of TOR: the multiple faces of a single pathway in the metabolic regulation of plant growth and development // *J Exp. Bot.* – 2019. – Vol.70. – P. 2217-2225.
- 12 Menand B., Desnos T., Nussaume L., Berger F., Bouchez D., Meyer C., Robaglia C. Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2002. – Vol. 99. – P. 6422–6427.
- 13 Rexin D., Meyer Ch., Robaglia Ch., Veit B. TOR signalling in plants // *Biochem. J.* – 2015. – Vol. 470. – P. 1–14.
- 14 Wolters H., Jürgens G. Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development // *Nat. Rev. Genet.* – 2009. – Vol. 10. – P. 305-317.
- 15 Creff A., Sormani R., Desnos T. The two *Arabidopsis* RPS6 genes, encoding for cytoplasmic ribosomal proteins S6, are functionally equivalent // *Plant Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 73. – P. 533-546.
- 16 Ruvinsky, I., and Meyuhas, O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: From protein synthesis to cell size // *Trends Biochem. Sci.* – 2006. – Vol. 31. – P. 342–348.
- 17 Meyuhas O. Ribosomal Protein S6 Phosphorylation: Four Decades of Research // *Intl Review Cell & Mol. Biol.* – 2016. – Vol. 320. – P. 1-33.
- 18 Turck F., Zilbermann F., Kozma S.C., Thomas G., Nagy F. Phytohormones Participate in an S6 Kinase Signal Transduction Pathway in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* – 2004. – Vol. 134. – P. 1527-1535.
- 19 Otterhag L., Gustavsson N., Alsterfjord M., Pical C., Lehrach H., Gobom J., Sommarin M. *Arabidopsis* PDK1: identification of sites important for activity and downstream phosphorylation of S6 kinase // *Biochimie*. – 2006. – Vol. 88. – P. 11–21.
- 20 Williams A.J., Werner-Fraczek J. Chang I.-F., Bailey-Serres J. Regulated Phosphorylation of 40S Ribosomal Protein S6 in Root Tips of Maize // *Plant Physiol.* – 2003. – Vol. 132. – P. 2086–2097.
- 21 Yamashita R., Suzuki Y., Takeuchi N., Wakaguri H., Ueda T., Sugano S., Nakai K. Comprehensive detection of human terminal oligo-pyrimidine (TOP) genes and analysis of their characteristics // *Nucl. Acids Res.* – 2008. – Vol. 36, No. 11. – P. 3707–3715.
- 22 Meyuhas O., Kahan T. The race to decipher the top secrets of TOP mRNAs // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2015. – Vol. 1849. – P. 801-811.
- 23 Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – Vol. 227. – P. 680-685.
- 24 Sambrook J., Russel D.W. *Molecular cloning: A laboratory manual*: 3 volumes. – Third edition. – New-York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- 25 Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol.7, No.72. – P. 248-254.

References

- 1 Borlaug N. (2007) Feeding a hungry world. *Science*, vol. 318, pp. 359-359
- 2 Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, vol.7, pp. 248-254.
- 3 Caldana C., Martins M.C.M., Mubeen U., Urrea-Castellanos R. (2019) The magic ‘hammer’ of TOR: the multiple faces of a single pathway in the metabolic regulation of plant growth and development. *J Expl Bot*, vol.70, pp. 2217–2225.
- 4 Creff A., Sormani R., Desnos T. (2010) The two *Arabidopsis* RPS6 genes, encoding for cytoplasmic ribosomal proteins S6, are functionally equivalent. *Plant Mol Biol*, vol. 73, pp. 533-546.
- 5 Henriques R., Bögre L., Horváth B., Magyar Z. (2014) Balancing act: matching growth with environment by the TOR signalling pathway. *J Exp Bot*, vol.65, pp. 2691-2701.

- 6 Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, vol. 227, pp. 680-685.
- 7 Meinke D.W., Cherry J.M., Dean C., Rounsley S.D., Koornneef M. (1998) *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science*, vol. 282, pp. 679–682.
- 8 Menand B., Desnos T., Nussaume L., Berger F., Bouchez D., Meyer C., Robaglia C. (2002) Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 99, pp. 6422–6427.
- 9 Meyuhas O. (2016) Ribosomal Protein S6 Phosphorylation: Four Decades of Research. *Intl Review Cell & Mol. Biol*, vol. 320, pp. 1-33
- 10 Meyuhas O., Kahan T. (2015) The race to decipher the top secrets of TOP mRNAs. *Biochim Biophys Acta*, vol. 1849, pp. 801-811.
- 11 Nandagopal N., Roux P.P. (2015) Regulation of global and specific mRNA translation by the mTOR signaling pathway. *Translation*, vol. 3.
- 12 Otterhag L., Gustavsson N., Alsterfjord M., Pical C., Lehrach H., Gobom J., Sommarin M. (2006) *Arabidopsis* PDK1: identification of sites important for activity and downstream phosphorylation of S6 kinase. *Biochimie*, vol. 88, pp. 11–21.
- 13 Ren M., Qiu S., Venglat P., Xiang D., Feng L., Selvaraj G., Datla R. (2011) Target of rapamycin regulates development and ribosomal RNA expression through kinase domain in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, vol.155, pp. 1367-1382.
- 14 Rixin D., Meyer Ch., Robaglia Ch., Veit B. TOR signalling in plants. (2015) *Biochem J*, vol. 470, pp. 1–14.
- 15 Roustan V., Jain A, Teige M., Ebersberger I, Weckwerth W. (2016) An evolutionary perspective of AMPK–TOR signaling in the three domains of life. *J Exp Bot*, vol. 67, pp. 3897-3907.
- 16 Ruvinsky, I., and Meyuhas, O. (2006) Ribosomal protein S6 phosphorylation: From protein synthesis to cell size. *Trends Biochem. Sci*, vol. 31, pp. 342–348
- 17 Ryabova L.A., Robaglia Ch., Meyer Ch. (2019) Target of Rapamycin kinase: central regulatory hub for plant growth and metabolism. *J Exp Bot*, vol.70, pp. 2211–2216.
- 18 Sambrook J., Russel D.W. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*: 3 volumes. Third edition. New-York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 19 Turck F., Kozma S.C., Thomas G., Nagy F. (1998) A heat-sensitive *Arabidopsis thaliana* kinase substitutes for human p70s6k function in vivo. *Mol Cell Biol*, vol. 18, pp. 2038-2044.
- 20 Turck F., Zilbermann F., Kozma S.C., Thomas G., Nagy F. (2004) Phytohormones Participate in an S6 Kinase Signal Transduction Pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, vol. 134, pp. 1527–1535.
- 21 Van Camp W. (2005) Yield enhancement genes: seeds for growth. *Curr. Opin. Plant Biol*, vol. 16, pp. 147-153.
- 22 Williams A.J., Werner-Fraczek J. Chang I.-F., Bailey-Serres J. (2003) Regulated Phosphorylation of 40S Ribosomal Protein S6 in Root Tips of Maize. *Plant Physiol*, vol. 132, pp. 2086–2097.
- 23 Wolters H., Jürgens G. (2009) Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nat Rev: Genetics*, vol. 10, pp. 305-317.
- 24 Yamashita R., Suzuki Y., Takeuchi N., Wakaguri H., Ueda T., Sugano S., Nakai K. (2008) Comprehensive detection of human terminal oligo-pyrimidine (TOP) genes and analysis of their characteristics. *Nucl. Acids Res*. vol. 36, no. 11, pp. 3707–3715.
- 25 Zhang J.Z., Creelman R.A., Zhu J.-K. (2004) From laboratory to field. Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. *Plant Physiol*, vol. 135, pp. 615-621.