

Влияние делеционных мутантов полиаденин связывающего белка (PABP) на терминацию трансляции *in vitro*

Лаборатория биосинтеза белка

Лев Неганов, Лев Сидельников, Наталья Меньшикова

Руководители: Александр Иванов, к.б.н. Елена Алкалаева

Введение

Полиаденин связывающий белок (PABP) защищает поли-А хвосты эукариотических мРНК от деградации и обеспечивает формирование closed-loop структуры мРНК. Помимо этого установлено, что PABP специфично связывает фактор терминации трансляции эукариот eRF3. Однако функции этого взаимодействия остаются неизученными. PABP состоит из 2-х функциональных частей: N-концевого участка, связывающего поли-А хвост и С-концевого участка, взаимодействующего с eRF3. Эти два участка соединены неструктурированным линкером. В N-концевом домене присутствуют 4 мотива: RRM1,2 специфично связывают поли-А последовательность; RRM3,4 неспецифично связывают любую РНК (рис.1).

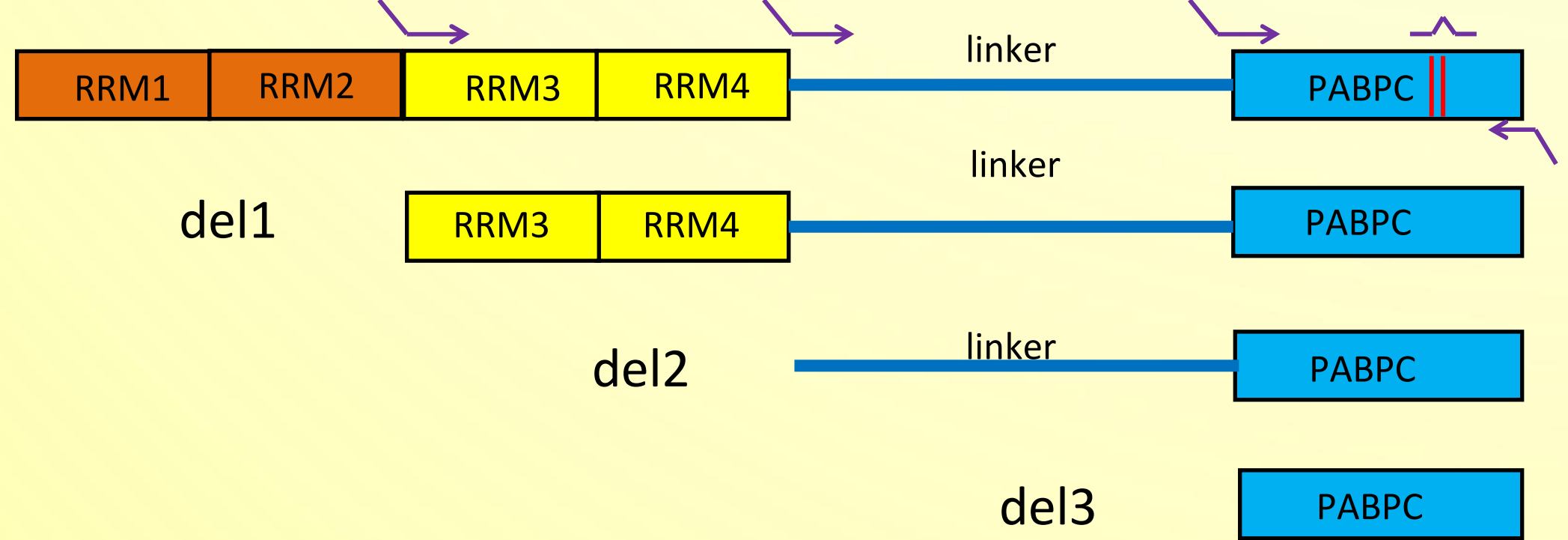


Рис. 1 Схемы структуры PABP и его делеционных мутантов

Цель

Установить вклад функциональных участков PABP в эукариотическую терминацию трансляции *in vitro*.

Ход работы

- Получение с помощью ПЦР мегапраймера, несущего точечные мутации для удаления внутренних рестриктных сайтов NdeI и XhoI. В качестве матрицы использовался ген человеческого PABP, заклонированный в вектор pET3b.
- Создание делеционных мутантов, используя полученный мегапраймер. Получение 3 делеционных мутанта: del1, del2, del3 (рис. 1).
- Клонирование полученных ПЦР-фрагментов в вектор pET15b по сайтам NdeI – XhoI (рис. 2).
- Трансформация полученными конструкциями штамма E.coli TOP10F и ПЦР-скрининг полученных колоний.

- Экспрессия мутантных белков в BL21 pUBS.
- Выделение белков из E.coli и их последующая очистка на Ni-NTA сефарозе. Анализ белковых фракций электрофорезом в ПААГ.
- Определение эффекта мутантных белков на терминацию трансляции в реконструированной системе трансляции эукариот (RETS) методом toe-print (рис. 3).

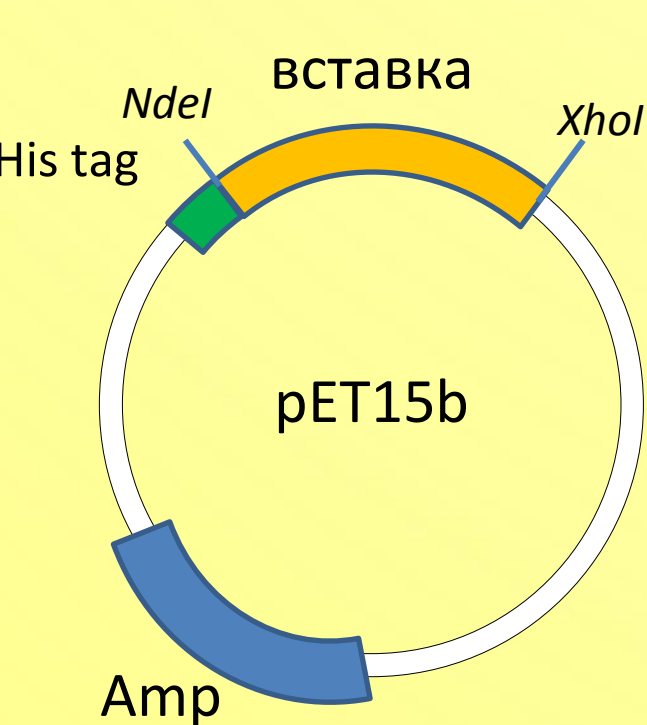


Рис. 2 Схема полученной конструкции

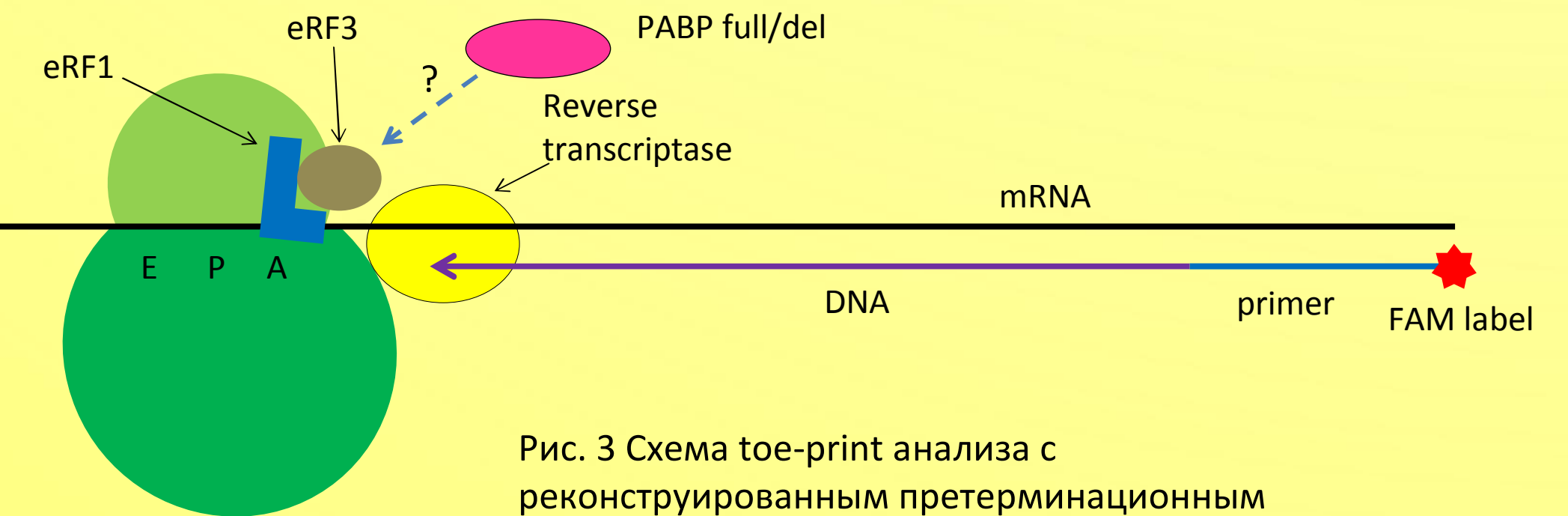


Рис. 3 Схема toe-print анализа с реконструированным претерминационным комплексом.

Результаты

Получение генных конструкций

Используя полученный мегапраймер, синтезировали ПЦР фрагменты с соответствующими делециями del1, del2, del3 (рис. 4).

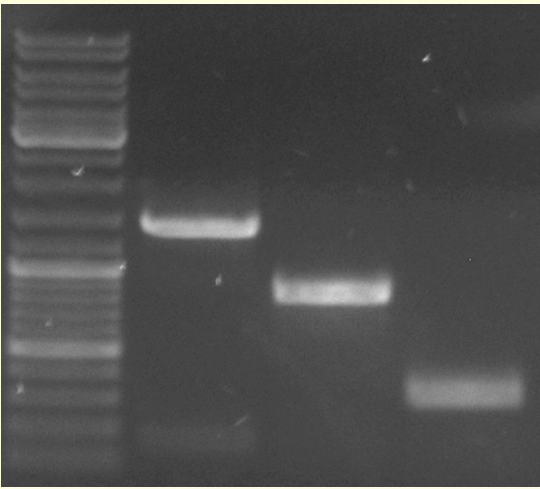


Рис.4 ПЦР фрагменты

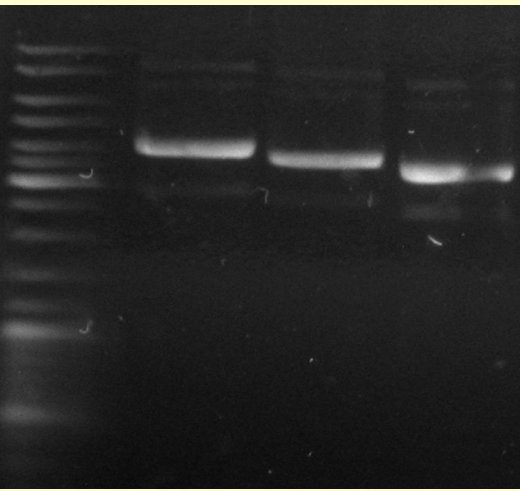


Рис.5 pET15b со вставками

ПЦР фрагменты заклонировали в pET15b. Провели ПЦР-скрининг выросших колоний, используя 2 набора праймеров. По результатам ПЦР обнаружили как минимум по 1 колонии со вставками правильного размера

Выделили плазмиды из положительных клонов и проверили их электрофорезом (рис. 5).

Экспрессия белка

Белок экспрессировали в штамме BL21 pUBS. Очистили на аффинной колонке (рис. 6).

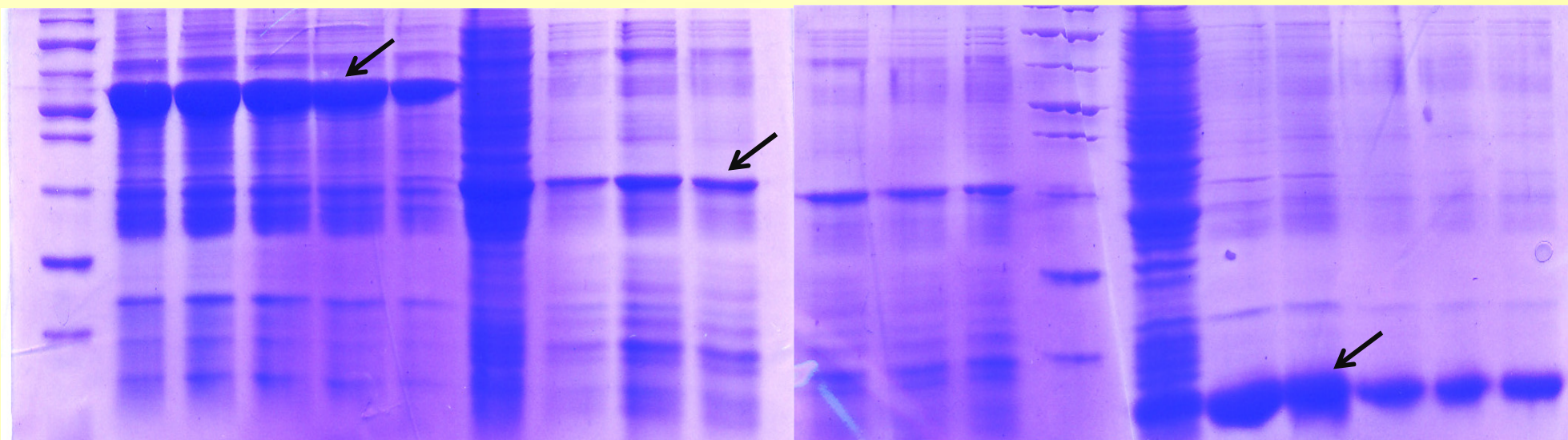


Рис. 6 Электрофорез в ПААГ выделенных мутантов.
1-5 – PABP del1, 6-12 – PABP del2, 13-18 – PABP del3

Toe-print в реконструированной системе трансляции

Проведя toe-print анализ мы онаружили что делеционные мутанты не влияют на терминацию трансляции, что позволяет сделать вывод, что для стимуляции терминации необходим полноразмерный PABP (рис. 7). В качестве контроля проводили терминацию с eRF3, неспособные связать PABP

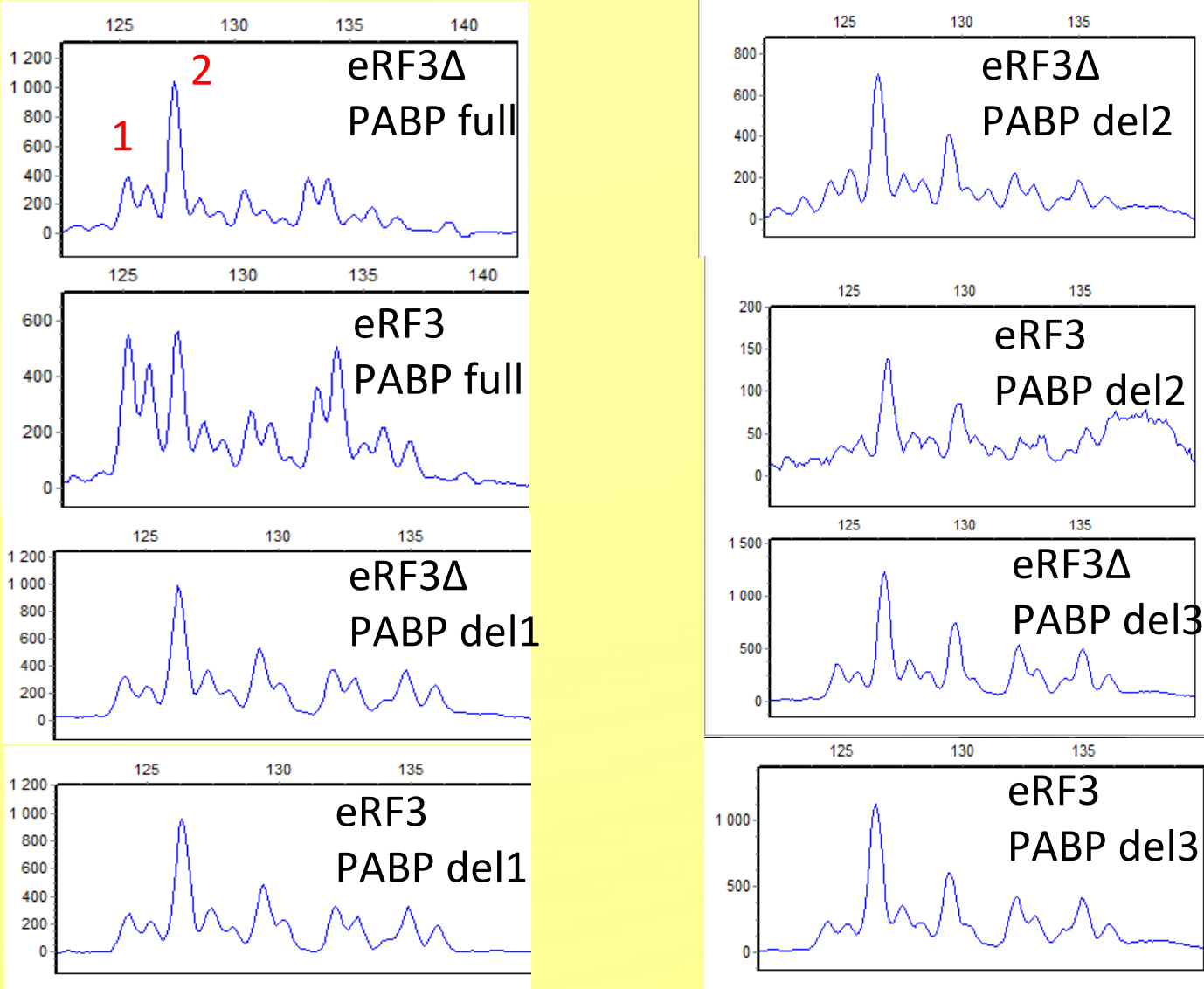


Рис. 7. Toe-print анализ терминации в присутствии PABP. Пики соответствуют положению рибосомы на мРНК. Пик 1 соответствует терминационному комплексу, пик 2 – претерминационному.

Выводы:

- Получены конструкции делетированных мутантов PABP
- Для эффекта PABP на терминацию необходима полная последовательность белка