

Разработка методики количественной оценки изоформ фактора инициации трансляции 4E в тканях листа картофеля с помощью тандемной масс-спектрометрии

Карлов В.Д.¹, Олег К.И.², Корчинская В.Ю.³

1 - Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия, *E-mail: v4slvk@yandex.ru*; 2 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биохимии, Москва, Россия, *E-mail: ollie.klychnikov@mail.ru*; 3 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биохимии, Москва, Россия, *E-mail: KorchinskayaV@yandex.ru*

Основной ролью фактора инициации трансляции 4E (далее - eIF4E) в клетке является участие в посттранскрипционной регуляции экспрессии: eIF4E связывает кэп-структуру мРНК и иницирует трансляцию последней [1]. Паслёновые содержат четыре изоформы eIF4E (eIF4E1, eIF4E2, eIF(iso)4E и nCBP), экспрессия которых меняется в процессе развития растения и варьируется в разных его органах [2-4]. Кроме того разные изоформы eIF4E задействуются растением в ответ на абиотические стрессы и используются большим числом РНК-вирусов для синтеза собственных белков [3-5]. Количественная детекция eIF4E на протеомном уровне позволит впервые получить данные о количестве изоформ и вовлечённости каждой из них в процесс инициации трансляции в нормальных и стрессовых условиях: в результате теплового шока, вирусной инфекции и др.

Для количественного определения eIF4E мы разработали масс-спектрометрический протокол детекции изоформ в тканях листа картофеля *S. tuberosum* методом мониторинга множественных реакций (MRM). Биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей eIF4E картофеля позволил выявить для каждой изоформы по несколько уникальных триптических пептидов, которые использовались в качестве стандартов при количественном анализе. Образцы цитоплазматической и полисомальной фракций были получены из картофеля *S. tuberosum* сорта Жуковский ранний с помощью дифференциального центрифугирования. Выделенные белки специфически расщепляли трипсином, полученные пептиды разделяли методом обратно-фазовой ВЭЖХ (Agilent 1290 Infinity HPLC), сопряжённой электрораспылением с масс-анализатором (Agilent 6495 Triple Quadrupole) Данные MRM переходов обрабатывались в программе Skyline (v.22.2.0.351).

С помощью разработанного метода мы количественно определили в цитоплазматической фракции все четыре изоформы eIF4E, среди которых преобладала eIF(iso)4E. А также смогли оценить количество и соотношение изоформ, находящихся в комплексе с рибосомами.

Исследование поддержано проектом РНФ № 21-76-10050.

Источники и литература

- 1) Browning K. S. The plant translational apparatus // Post-Transcriptional Control of Gene Expression in Plants. D- 1996. – С. 107-144.
- 2) Combe J. P. et al. Translation initiation factors eIF4E and eIFiso4E are required for polysome formation and regulate plant growth in tobacco // Plant molecular biology. – 2005. – Т. 57. – №. 5. – С. 749-760.
- 3) Gutierrez Sanchez P. A. et al. Overexpression of a modified eIF4E regulates potato virus Y resistance at the transcriptional level in potato // BMC genomics. – 2020. – Т. 21. – С. 1-16.

- 4) Rubio M. et al. Allele mining in the pepper gene pool provided new complementation effects between pvr2-eIF4E alleles and pvr6-eIF (iso) 4E for resistance to the Pepper veinal mottle virus //Journal of General Virology. – 2009. – Т. 90. – №. 11. – С. 2808-2814.
- 5) Salazar-Díaz K. et al. Arabidopsis thaliana eIF4E1 and eIF (iso) 4E Participate in Cold Response and Promote Translation of Some Stress-Related mRNAs //Frontiers in Plant Science. – 2021. – Т. 12. – С. 698585.