

Секция «Биоинженерия и биоинформатика»

Разработка нового метода поиска РНК-метилтрансфераз

Дзама Маргарита Михайловна

Студент

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Факультет
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: margo311@mail.ru

Основа жизнедеятельности клетки – синтез белков, который осуществляется на рибонуклеопротеидных частицах, называемых рибосомами. Рибосома – крупный РНК-белковый комплекс, состоящий из двух неравных частиц – малой и большой. У кишечной палочки, *Escherichia coli*, про рибосому которой пойдёт речь, они называются 50S и 30S. Основную структурную и функциональную роли в рибосоме выполняет рибосомная РНК. Большая субчастица содержит 23S и 5S рРНК, а малая – 16S рРНК. Нуклеотиды РНК зачастую претерпевают различные модификационные изменения. Функции многих таких модификаций до сих пор остаются загадкой, и порой это связано с отсутствием знаний о ферментах, ответственных за них. Инактивировав ген предполагаемой метилтрансферазы, можно проверить наличие или отсутствие исследуемой модификации в РНК.

Данная работа посвящена разработке нового метода обнаружения модификаций в рРНК и дальнейшему поиску неизвестной метилтрансферазы, отвечающей за метилирование нуклеотида A2030 в 23S рРНК. Метод основан на определении температуры плавления дуплекса, образованного рРНК и двумя олигонуклеотидами, один из которых (более длинный) содержит на своём 5'-конце донор флуоресценции – FAM, другой (более короткий) содержит на своём 3'-конце донор тушителя – BHQ1, причём нуклеотиды, содержащие FAM и BHQ1, находятся в непосредственной близости, в результате чего происходит тушение флуоресценции. Так как олигонуклеотид, содержащий BHQ1-модификацию, короче олигонуклеотида с FAM-модификацией, то плавление первого будет происходить быстрее и, соответственно, будет наблюдаться разгорание флуоресценции с ростом температуры. Данный метод был проверен нами на уже известных мишенях метилтрансфераз (нуклеотиды A1618, G2069 23S рРНК и G527 16S рРНК, за модификацию которых отвечают соответственные метилтрансферазы: YbiN, YcbY, GidB). Результаты показали, что при наличии метильной группы в нуклеотиде температура плавления дуплекса заметно изменяется. Разработанный метод мы применили к поиску метилтрансферазы, которая должна отвечать за метилирование A2030 23S рРНК. Мы обнаружили, что плавление рРНК из штамма, в котором ген *yhiR* отсутствует, происходит при 49°C в отличие от рРНК дикого типа ($T_{пл.} = 44^\circ\text{C}$). Путем *in vitro* метилирования в присутствии [³H]-SAM было показано, что белок YhiR метилирует преимущественно 23S рРНК, но не 50S субчастицы. Этот факт указывает на то, что метилирование 23S рРНК происходит на раннем этапе сборки рибосомы, когда 23S рРНК еще не связана с рибосомными белками.

Таким образом, был разработан метод обнаружения некоторых модификаций нуклеотидов. С его помощью была идентифицирована неизвестная метилтрансфераза YhiR и показана её субстратная специфичность.

Конференция «Ломоносов 2012»

Особая благодарность выражается Головиной А.Я., научному сотруднику НИИ ФХБ им. А.Н.Белозерского МГУ.

Работа поддержана грантом ФЦП ГК 16.512.11.2108 от 28 февраля 2011г.