

Секция «Биоинженерия и биоинформатика»

По следам дигидроуридин синтазы *E.coli*

Дзама М.М.¹, Головина А.Я.²

1 - Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, 2 - Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

E-mail: margo311@mail.ru

Рибосома – крупный РНК-белковый комплекс, обеспечивающий синтез всех белков в клетке. Она состоит из малой и большой субъединицы. У *Escherichia coli* малая субъединица носит название 30S, а большая - 50S. Основную структурную и функциональную роли в рибосоме выполняет рРНК. Малая субъединица содержит 16S рРНК, а большая – 23S и 5S рРНК. Нуклеотиды рРНК часто подвергаются различным модификациям, но, к сожалению, функциональное значение для большинства таких модификаций все еще остается загадкой. Порой для установления функции модификации не хватает данных о том ферменте, что производит саму модификацию. Используя разные методы можно попытаться установить, какой конкретно фермент из списка кандидатов ответственен за определенную модификацию.

Данная работа посвящена идентификации дигидроуридин синтазы, ответственной за формирование дигидроуридина (D2449) в последовательности 23S рРНК *E.coli*. Все дигидроуридин синтазы из различных организмов весьма консервативны. На данный момент для кишечной палочки известны только 3 фермента, обеспечивающие подобную модификацию, и все модифицируют тРНК - DusA, DusB, DusC. Среди других аннотированных и гипотетических белков *E.coli* не было обнаружено гомологов дигидроуридин синтаз. Таким образом, мы предположили, что один из 3 уже известных ферментов может проводить превращение уридина в дигидроуридин не только в тРНК, но и в 23S рРНК. Для идентификации дигидроуридин синтазы мы использовали разработанный нами метод, который основывается на определении температуры плавления дуплекса рРНК-ДНК, образованного исследуемой рРНК (из штаммов дикого типа и нокауты $\Delta dusA$, $\Delta dusB$ и $\Delta dusC$) и двумя ДНК-олигонуклеотидами в области модификации. Присутствие модификации должно изменять стабильность дуплекса, что, по нашему предположению, отразится на характере кривой плавления. Помимо этого мы использовали другой метод выявления дигидроуридина с помощью реакции обратной транскрипции участка 23S рРНК, содержащего D2449, после гидролиза КОН. Однако оба метода выявили наличие 2449 дигидроуридина в 23S рРНК каждого из штаммов. Причиной тому может быть следующее: 1) В штаммах, которые мы использовали, отсутствует нокаут по интересующим нас генам; 2) За данную модификацию ответственен не один, а два или сразу три фермента из представленных выше, и они могут компенсировать отсутствие друг друга; 3) Ни один из этих белков не является дигидроуридин синтазой для D2449. Мы проверили первую гипотезу, используя метод ПЦР, и обнаружили, что нокаут присутствует только в штамме $\Delta dusB$. В настоящее время мы работаем над получением штаммов с нокаутами генов *dusA* и *dusC* и планируем возобновить поиски дигидроуридин синтазы, ответственной за модификацию D2449.

Описанный метод плавления проходит стадию патентования в Роспатенте (заявка подана в октябре 2012 года).

Работа поддержана грантами:

Федеральная целевая программа «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы»
ГК 16.512.11.2108 от 28 февраля 2011 2011-2012,

12-04-31363 мол_а "Идентификация новых ферментов, модифицирующих рибосомную РНК *Escherichia coli*

12-04-33026 мол_а_вед "Функциональная роль модификации компонентов аппарата трансляции"

Слова благодарности

Благодарим Сергиева Петра Владимировича за потрясающую научную интуицию, отеческое покровительство и выдающееся чувство юмора! И в заключение мы хотели бы сказать: *Feci quod potui, faciant meliora potentes!*