

Поиск функций потенциальных митохондриальных метилтрансфераз Trmt2b и Mettl15

Научный руководитель – Лаптев Иван Георгиевич

Швецова Екатерина Тимуровна

Студент (специалист)

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

E-mail: katja.shvecova@gmail.com

Метилирование нуклеотидов рибосомной РНК происходит у всех организмов. Эта группа модификаций может играть роль в функционировании, поддержании структуры и сборке рибосомы. На данный момент для большинства модельных организмов произведено картирование всех метилированных нуклеотидов рибосомных РНК, а для *E. coli* и *S. cerevisiae* также найдены все белки, отвечающие за данные модификации. Однако, поиск белков, задействованных в метилировании рибосомных РНК большинства эукариот, а также изучение функциональной роли модифицированных нуклеотидов остаётся актуальной проблемой.

В 16S рибосомной РНК *E. coli* присутствует уникальная модификация m⁴C, за образование которой отвечает фермент RsmH. В цитоплазматических рибосомных РНК млекопитающих отсутствует такое метилирование, однако 12S рибосомная РНК митохондрий содержит подобный модифицированный нуклеотид в позиции, эквивалентной таковой в *E. coli*. Митохондриальный белок млекопитающих Mettl15 является гомологом белка RsmH *E. coli* и предположительно проводит модификацию 12S рРНК. Опираясь на известные данные о метилазах *E. coli* и *S. cerevisiae* и следуя аналогичным рассуждениям, мы также обнаружили вероятного кандидата на роль m⁵U метилтрансферазы 12S рРНК митохондрий млекопитающих - белок Trmt2b.

Для проверки этих предположений, с помощью системы CRISPR/Cas9 были получены нокаутные линии суспензионной культуры клеток NS0, лишённые функциональных Mettl15 и Trmt2b. С помощью биотинилированных олигонуклеотидов были выделены участки 12S рРНК, содержащие модификации m⁴C и m⁵U. Полученные фрагменты 12S рРНК дикого типа и нокаутов были проанализированы методом MALDI MS. Сравнительный анализ полученных масс-спектров доказал, что наши предположения были верны. В нокаутных линиях отсутствовали искомые модифицированные нуклеотиды, присутствующие в рРНК дикого типа.

В дальнейшем планируется проведение дополнительного контрольного эксперимента по внедрению последовательностей ORF функциональных Mettl15 и Trmt2b в геном нокаутных линий для восстановления свойств дикого типа. Это позволит подтвердить, что причиной исчезновения модификаций в нокаутах является отсутствие в них функциональных белков, а не возможные побочные изменения в геноме из-за наличия нецелевых сайтов отжига гидовых РНК. Также планируется проведение сравнительного анализа протеомов с помощью двумерного электрофореза, проведение тестов на эффективность работы дыхательной цепи и эффективность митохондриальной трансляции в нокаутных линиях по сравнению с диким типом.

Результаты данной работы помогут понять функциональную роль метилирования рРНК митохондрий.