

Совместное влияние гидроксирования и метилирования эукариотического фактора терминации трансляции eRF1 на его активность *in vitro*

Научный руководитель – Бизяев Никита Сергеевич

Криштопа Елизавета Дмитриевна

Студент (бакалавр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия

E-mail: kbp2004@mail.ru

Фактор eRF1 – ключевой белок терминации трансляции, который в комплексе с фактором eRF3 распознает стоп-кодон в А-сайте рибосомы и стимулирует гидролиз пептидил-тРНК. Ранее было обнаружено, что у человека фактор может подвергаться двум пост-трансляционным модификациям: гидроксированию по 63 остатку лизина и метилированию по 185 остатку глутамина. В клетке большая часть молекул eRF1 имеет эти модификации. Ранее при участии нашей лаборатории было показано, что обе модификации по-отдельности стимулируют различные этапы терминации трансляции [1, 2]. Однако, их совместное влияние оставалось не исследованным.

Для решения этой задачи мы разработали систему для получения рекомбинантного eRF1 с одновременным эффективным внесением обеих модификаций. Для этого вначале мы коэкспрессировали eRF1 с метилтрансферазой NEMK2 α и необходимыми партнерами в клетках *Escherichia coli*. Для внесения гидроксирования мы отдельно экспрессировали гидроксилазу JMJD4, а затем смешивали оба лизата клеток, насыщая смесь ко субстратом α -кетоглутаратом и кофактором Fe²⁺. Далее белок очищали с помощью аффинной и ионообменной хроматографий. В результате нам удалось получить высокоочищенные препараты eRF1 с обеими модификациями, с каждой по-отдельности и без модификаций. Присутствие модификаций в препаратах подтвердили с помощью MALDI-масс спектрометрии. Стоит отметить, что нам впервые удалось получить полностью гидроксированный препарат рекомбинантного eRF1.

Активность каждого из препаратов в терминации трансляции мы определили с помощью Termini-Luc анализа. Для этого мы выделяли претерминационные рибосомные комплексы, кодирующие нанолуциферазу, и очищали их на градиенте сахарозы. Далее, к таким комплексам добавляли препарат eRF1 и измеряли кинетику люминесценции. Нанолуцифераза, связанная с тРНК в рибосоме, не способна светиться, т.е. свечение возможно лишь после её высвобождения в раствор в ходе терминации трансляции, что позволяет измерять скорость этого процесса. Мы обнаружили, что обе модификации стимулируют терминацию в этой системе, однако препарат eRF1 с обеими модификациями делает это эффективнее. Такой результат указывает на функциональную важность обеих этих модификаций в терминации трансляции эукариот. Кроме того, мы определили влияние модификаций eRF1 на ГТФазную активность eRF3 в рибосоме. Оказалось, что обе этих модификации также стимулируют этот процесс, а их совместное присутствие максимизирует эффект.

Благодарности: Выражаем благодарность И. Ю. Торопыгину за проведение масс-спектрометрического анализа.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 25-74-10096, <http://rscf.ru/project/25-74-10096/>

Источники и литература

- 1) Бизяев Н.С. Влияние метилирования на эффективность функционирования eRF1 и некоторых его мутантов. Выпускная квалификационная работа бакалавра. МГУ. Москва. 2018
- 2) Feng T. et al. Optimal translational termination requires C4 lysyl hydroxylation of eRF1 //Molecular cell. – 2014. – V. 53. – No. 4. – P. 645-654.