

УДК 577.2.08

**НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ В ИЗУЧЕНИИ ЭТАПА ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ
МЕТОДАМИ МИКРОТЕРМОФЕРЕЗА И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ ФЛУОРИМЕТРИИ****Д.С. Виноградова^{1,4}, П.С. Касацкий¹, Е.М. Максимова^{1,2}, Victor Zegarra³, Е.В. Полесскова¹, Pohl Milón³,
А.Л. Коневега^{1,2}**

¹Петербургский институт ядерной физики НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия; ²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия; ³School of Medicine, Faculty of Health Sciences, Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas – UPC, Lima, Peru;

⁴Нанотемпер Техноладжис Рус, Санкт-Петербург, Россия

Процесс перевода генетической информации с матричной РНК (мРНК) в белки начинается с образования 30S инициаторного комплекса (30SIC). Специализированная транспортная РНК (fMet-tRNA^{fMet}) связывается с инициаторным кодоном мРНК в Р-сайте 30S субъединицы рибосомы. Точность и эффективность этого сложного процесса обеспечивают инициаторные факторы IF1, IF2, IF3.

Методом микротермофереза (МТФ) мы впервые изучили процесс образования инициаторного комплекса (30SIC) в зависимости от всех участвующих в этом процессе лигандов. Метод МТФ позволяет измерять аффинности между макромолекулами, используя изменения подвижности молекул в микроградиенте температуры. При образовании комплекса изменяется размер, заряд и степень гидратирования макромолекул. С помощью метода МТФ мы определили ключевую роль GTP в селекции fMet-tRNA^{fMet}. Аффинность IF2 к инициаторной тРНК в присутствии GTP и GDP, измеренная методом МТФ, составляла $K_D \approx 11 \mu\text{M}$ и $K_D \approx 16 \mu\text{M}$ соответственно. Методом дифференциальной сканирующей флуориметрии (ДСФ) мы изучили стабильность инициаторных факторов, уделяя особое внимание инициаторному фактору IF2, а также тройному комплексу IF2-GxP-fMet-tRNA^{fMet}. Наиболее стабильной формой тройного комплекса оказалась форма IF2-GDP-fMet-tRNA^{fMet}, температура плавления которой на 2^oC выше по сравнению с GTP-формой тройного комплекса IF2.

Мы рассматриваем новое применение метода МТФ для изучения молекулярного механизма биосинтеза белка. Кроме того, данная технология может быть использована для селекции новых ингибиторов инициации трансляции (потенциальных антибиотиков), действующих на образование 30SIC. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 17-14-01416.

Ключевые слова: 30S инициаторный комплекс, инициаторные факторы, микротермоферез, дифференциальная сканирующая флуориметрия.

Литература

1. Milon et al., Transient kinetics, fluorescence, and FRET in studies of initiation of translation in bacteria. Meth. Enzymol. 430, 1–30 (2007).
2. P. Milon et al., The ribosome-bound initiation factor 2 recruits initiator tRNA to the 30S initiation complex. EMBO Rep. 11, 312–316 (2010).
3. P. Milon, M. V. Rodnina, Kinetic control of translation initiation in bacteria. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 47, 334–348 (2012).