

Министерство образования и науки РФ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление: 06.04.01 - Биология

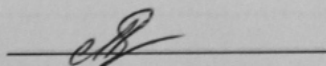
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская диссертация

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ
МАЛОГО БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА
IbpA из *Aholeplasma laidlawii***

Работа завершена:

«5» 06 2018 г.



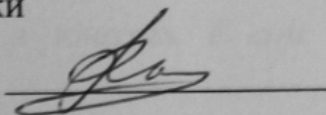
(Л.С. Чернова)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

к.б.н., доцент кафедры генетики

«5» 06 2018 г.

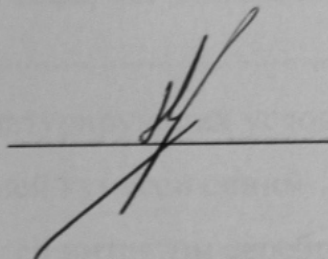


(А.Р. Каюмов)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

«7» 06 2018 г.



(В.М. Чернов)

Казань-2018

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1. Характеристика и молекулярные особенности малых белков теплового шока	8
2. Малые белки теплового шока у различных микроорганизмов	15
2.1 Малые белки теплового шока IbpA <i>Escherichia coli</i>	15
2.2 Малые белки теплового шока у микоплазм	17
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	22
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	22
2.1 Штаммы и плазмиды	22
2.2 Питательные среды и условия культивирования бактерий	22
2.3 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	23
2.4 Рестрикция ДНК	24
2.5 Реакция Гиббсона	24
2.6 Электрофорез ДНК	25
2.7 Очистка ДНК из агарозного геля	25
2.8 Выделение плазмидной ДНК	25
2.9 Трансформация клеток <i>E. coli</i>	26
2.10 Гиперпродукция белков в клетках <i>E. coli</i> и получение клеточных экстрактов	26
2.11 Очистка белков на Ni-NTA сефарозе	27
2.12 Диализ белков	27
2.13 Электрофорез белков в денатурирующих условиях	28
2.14 Окрашивание белковых гелей кумасси синим	28
2.15 Окрашивание белковых гелей нитратом серебра	28
2.16 Western Blot	29

2.17 Ко-элюция рекомбинантного белка IbrA-His6 с клеточным экстрактом <i>A. laidlawii</i>	30
2.18 Ко-иммунопреципитация IbrA из клеточных экстрактов <i>A. laidlawii</i>	30
2.19 Осаждение белков с помощью трихлоруксусной кислоты.....	31
2.20 Ковалентная поперечная сшивка глутаровым альдегидом очищенных белков.....	31
2.21 Оценка степени денатурации белков красителем SYPRO Orange	31
2.22 Биоинформатика.....	32
2.23 Статистический анализ	32
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	33
3.1 Оценка способности IbrA предотвращать денатурацию белков <i>in vitro</i> ...	33
3.2 Оценка степени олигомеризации IbrA в клетках <i>A. laidlawii</i> в зависимости от температуры культивирования.....	44
3.3 Получение рекомбинантных белков с делециями N- и C- концов белка IbrA из <i>A. laidlawii</i>	46
3.4 Влияние N- и C- концевых мотивов на степень олигомеризации	49
3.5 Влияние N- и C- концов IbrA на способность предотвращения денатурации белков.....	52
ВЫВОДЫ	54
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	55

ВВЕДЕНИЕ

В условиях температурного стресса клетки активно экспрессируют белки теплового шока (БТШ, HSP), которые выполняют функцию ре-фолдинга частично денатурированных белков и переводят денатурированные белки в нерастворимые комплексы для снижения их токсического действия на клетку [Stephanou *et al.*, 2011]. К БТШ относятся различные белки, которые принято классифицировать по их молекулярной массе, варьирующей от 10 до 100 кДа. Большинство БТШ функционируют, главным образом, как молекулярные шапероны, направляя фолдинг белка и / или осуществляя протеолитическое расщепление денатурированных белков [Jee *et al.*, 2016]. К настоящему времени детально изучены семейства шаперонов HSP70 и HSP60, их свойства и механизм действия [Chatterjee S *et al.*, 2017]. В последнее время все больше внимания уделяется исследованию малых БТШ (мБТШ, sHSPs), однако многие молекулярные аспекты их функционирования остаются плохо охарактеризованными. мБТШ широко распространены среди различных организмов, включая животных, растения и бактерии. Эти белки включают два высококонсервативных домена: N-концевой и α -кристаллиновый [Lindner *et al.*, 2000]. Молекулярная масса этих белков лежит в пределах от 17 до 26 кДа в растениях, 20-27 кДа у позвоночных, 20-24 кДа у дрозофилы, 24-43 кДа у дрожжей и 15-21 кДа у бактерий [Kitagawa *et al.*, 2002]. Свою функцию мБТШ проявляют, образуя большие олигомерные комплексы, молекулярные массы которых составляют 150 кДа для HSP16.3 *Mycobacterium tuberculosis* [Chang *et al.*, 1996], 550 кДа для HSP26 дрожжей [Haslbeck *et al.*, 1999], 200-300 кДа в растениях [Lee *et al.*, 1997] и 400-800 кДа в клетках млекопитающих [Ehrnsperger *et al.*, 1999]. Олигомерное состояние мБТШ зависит от различных факторов, таких как температура, наличие окислителя и ионной силы [Raman *et al.*, 1997; Kitagawa *et al.*, 2002].

Наличие мБТШ у микоплазм, характеризующихся значительно редуцированными геномами, указывает на фундаментальное значение мБТШ

для устойчивости бактериальной клетки к стрессам. На сегодняшний день охарактеризован лишь один микоплазменный мБТШ – IbrA (inclusion body associated proteins) из фитопатогенного микроорганизма *Aholeplasma laidlawii* [Вишняков и др., 2011; Vishnjakov *et al.*, 2012; Борхсениус и др., 2016]. Среди представителей класса *Mollicutes*, самых маленьких организмов, способных к самостоятельному воспроизведению, *A. laidlawii* является единственной микоплазмой, способной существовать вне организма-хозяина. При неблагоприятных условиях среды *A. laidlawii* обладает повышенной устойчивостью к биогенным и абиогенным стрессовым факторам, и фитопатогенностью. В условиях теплового шока количество белка IbrA в клетках *A. laidlawii* возрастает до 7 % от общего количества клеточных белков и, по всей видимости, является одним из ключевых факторов, определяющих адаптационные возможности этой бактерии [Вишняков и др., 2011].

IbrA относятся к семейству мБТШ α -кристаллинового типа (α -HSPs), характеризующихся низкой молекулярной массой (12-30 кДа) и консервативным С-концевым α -кристаллиновым доменом. На сегодняшний день малые белки теплового шока α -кристаллинового типа являются самыми эффективными из известных шаперонов. Они предотвращают необратимую денатурацию и агрегацию клеточных белков во время температурного стресса, и спонтанно образуют олигомеры, которые важны для их функции, как шаперонов [Борхсениус и др., 2016]. Однако механизмы распознавания белков-субстратов белками из этого семейства, в том числе IbrA из *A. laidlawii* остаются слабо изученными.

Целью работы явилось дать структурно-функциональную характеристику малого белка теплового шока IbrA из *Aholeplasma laidlawii*.

В работе решались следующие **задачи**:

- 1) Оценить способность мБТШ IbrA из *Aholeplasma laidlawii* предотвращать денатурацию белков *in vitro* и охарактеризовать

физико-химические свойства белков-субстратов для взаимодействия с белком IbrA.

- 2) Оценить степени олигомеризации IbrA в клетках *A. laidlawii* в зависимости от температуры культивирования.
- 3) Получить рекомбинантные белки IbrA с делециями N- и C- концевых мотивов.
- 4) Оценить влияние N- и C- концевых мотивов белка IbrA на степень олигомеризации и способность предотвращать денатурацию белков.

Впервые БТШ белок обнаружен у *Drosophila melanogaster*. Иммуноанализы тканей и клеток мухи подтвердили тепловую шок-гены, после чего в проточном профиле была обнаружена экспрессия шок-белка ранее в клетках бабочки. Кроме того, белок теплового шока значительно походил своим свойствам к другим специфическим белкам, которые ранее присутствовали в клетках *Drosophila melanogaster*. Обе эти категории белков были определены как белки теплового шока.

Синтез БТШ является универсальным механизмом, происходящим во всех изученных растительных и животных видах, включая людей. БТШ также экспрессируется в проэукариотических клетках, в частности бактериях и археях. Температура, при которой белки теплового шока индуцируются, зависит от нормальной температуры роста для организма. Например, у млекопитающих, обычно выращиваемых в лаборатории при температуре 37 °C, тепловой шок индуцируется при температуре 35-37 °C, тогда как у человека или мыши температура индуцирует экспрессию БТШ выше их нормальной температуры тела (37 °C) на несколько градусов, например, до 41-42 °C [Candito et al., 2001].

Средняя БТШ молекулярная масса варьирует в зависимости от организма в интервале от 17 до 76 кДа у растений, 20-27 кДа у насекомых, 20-24 кДа у дрожжей, 24-45 кДа у археях и 15-21 кДа у бактерий [Кларк и др., 2002]. Многие мБТШ проявляют универсальную активность предотвращения

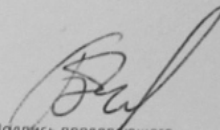


СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Чернова Лилия Сергеевна
Факультет, кафедра, номер группы	Институт фундаментальной медицины и биологии, кафедра генетики, группа 01-640-1
Тип работы	Не указано
Название работы	Чернова Лилия Сергеевна на антиплагиат.docx
Название файла	на антиплагиат.docx
Процент заимствования	12,26%
Процент цитирования	0,59%
Процент оригинальности	87,15%
Дата проверки	13:48:01 01 июня 2018г.
Модули поиска	Кольцо вузов; Модуль поиска "КПФУ"; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Модуль поиска перефразирований Интернет; Коллекция Медицина; Модуль поиска Интернет; Коллекция ГЭОТАР; Коллекция ГАРАНТ; Коллекция Библиотека МГМУ им. Сеченова; Коллекция eLIBRARY.RU; Модуль поиска переводных заимствований; Цитирование; Коллекция РГБ; Сводная коллекция ЭБС
Работу проверил	Бабынин Эдуард Викторович ФИО проверяющего
Дата подписи	1.06.18



Подпись проверяющего

Чтобы убедиться
в подлинности справки,
используйте QR-код, который
содержит ссылку на отчет.



Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.
Предоставленная информация не подлежит использованию
в коммерческих целях.