

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

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ
КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ


Специальность: 06.03.01 – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

ВЛИЯНИЕ ДВОЙНОГО FEDF-МОТИВА В N-КОНЦЕВОМ ДОМЕНЕ
МАЛОГО БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА IBPA *ACHOLEPLASMA*
LAIDLAWII НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИИ БЕЛКА

Работа завершена:

« 4 » 06 2023 г.



(Е.В. Привалова)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

д.б.н., доцент

« 8 » 06 2023 г.



(А.Р. Каюмов)

Заведующий кафедрой

д.б.н., доцент

« 8 » 06 2023 г.



(А.Р. Каюмов)

Казань – 2023

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Малые белки теплового шока	7
1.2 Структура и свойства малых белков теплового шока	7
1.3 Механизм сборки олигомеров мБТШ	9
1.4 Механизм шаперонной активности мБТШ.....	13
1.5 мБТШ представителей класса <i>Mollicutes</i>	15
1.5.1 Роль мБТШ в устойчивости к стрессу фитопатогенных микоплазм ..	16
1.6 Малый белок теплового шока IbrA <i>Acholeplasma laidlawii</i>	17
1.7 Мутантные формы малого белка теплового шока IbrA.....	20
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	22
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	23
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	23
2.1 Штаммы и плазмиды.....	23
2.2 Питательные среды и условия культивирования.....	23
2.3 Выделение плазмидной ДНК	23
2.4 Электрофорез ДНК.....	24
2.5 Трансформация клеток <i>E. coli</i>	24
2.6 Гиперпродукция белков в клетках <i>E. coli</i> и получение клеточных экстрактов.....	25
2.7 Электрофорез белков в денатурирующих условиях.....	25
2.8 Окрашивание белковых гелей кумасси синим	26
2.9 Оценка антиагрегационной активности белковых шаперонов.....	26
2.10 Биоинформатика.....	27
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	30

3.1 Получение мутантных форм малого белка теплового шока IbrA <i>Acholeplasma laidlawii</i> в элетрофоретически-гомогенном состоянии.....	30
3.2 Оценка влияния усечения и мутаций N-концевых доменов малых белков теплового шока A/IbrA на их способность образовывать олигомеры и проявление шапероноподобной активности.....	34
3.3 Выявление функциональных мотивов FEDF белка IbrA у представителей микоплазм и определение корреляции их количества с эволюционным положением бактерии и условиями обитания.	39
ВЫВОДЫ	47
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	48

PBS	Фосфатный буфер
PFA	Параформальдегид
PSA	Полисульфат стирола
SCM	Сывороточная культуральная среда
SDS	Додансульфат натрия
hSP	Малые белки теплового шока
TEMED	Тетраметилендиамин
ATP	Аденозинтрифосфат
кДа	Килодактон
hSP1	Малые белки теплового шока
OH	Очищенная плазма
ПААГ	Полиакриламидный гель
ПЦР	Полимеразная цепная реакция

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AA	Акриламид
BIS-AA	Бис-акриламид
GA	Глутаровый альдегид
GS (ГС)	Глутаминсинтетаза
HSF	Фактор транскрипции теплового шока
IPTG	Изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид
LA	Питательная среда Лурия-Бертани агаризованная
LB	Питательная среда Лурия-Бертани
PBS	Фосфатный буфер
PFA	Параформальдегид
PSA	Персульфат аммония
SCM	Самокомплементарный мотив
SDS	Додецилсульфат натрия
sHSP	Малые белки теплового шока
TEMED	Тетраметилэтилендиамин
АТФ	Аденозинтрифосфат
кДа	Килодальтон
мБТШ	Малые белки теплового шока
ОП	Оптическая плотность
ПААГ	Полиакриламидный гель
ПЦР	Полимеразная цепная реакция

ВВЕДЕНИЕ

Малые белки теплового шока (мБТШ) являются АТФ-независимыми молекулярными шаперонами, выполняющие функцию защиты клетки в условиях стресса, вызванного факторами окружающей среды. Все мБТШ обладают общей структурой и имеют в своем составе α -кристаллиновый домен и N-, C-концевые мотивы, участвующие в предотвращении необратимой агрегации белка [Janowska *et al.*, 2019].

Особый интерес для научных исследований мБТШ представляет *Acholeplasma laidlawii* – единственная способная к самостоятельному существованию вне организма хозяина бактерия, относящаяся к классу *Mollicutes* и являющаяся фитопатогенной микоплазмой, которая вызывает фитоплазмозы и представляет серьезную угрозу сельскому хозяйству [Vishniakov, 2022]. *A. laidlawii* обладает высокой устойчивостью к воздействию внешних стрессовых факторов, при этом у нее обнаружен лишь один малый белок теплового шока - IbpA (A/IbpA), тогда как в клетках *Escherichia coli* он представлен двумя гомологичными белками IbpA и IbpB. При повышении температуры или изменении кислотно-щелочного баланса увеличивается количество IbpA от общего числа белков в клетке, этот факт доказывает, что именно этот белок позволяет *A. laidlawii* выживать в стрессовых условиях [Кауинов *et al.*, 2017].

Изменения в структуре функциональных мотивов FEDF N-концевого домена, вероятно, нарушают нормальное функционирование мБТШ A/IbpA, вызывая снижение его активности и полноценной защиты белков от денатурации. Данные исследования могут помочь в создании эффективных методов борьбы с фитоплазмозами [Chernova *et al.*, 2020].

Целью данной работы являлось изучение влияния двойного FEDF-мотива в N-концевом домене малого белка теплового шока IbpA *Acholeplasma laidlawii* на структуру и функции белка.

В работе решались следующие задачи:

- 1) Получить мутантные формы малого белка теплового шока IbrA *Acholeplasma laidlawii* в электрофоретически-гомогенном состоянии.
- 2) Исследовать влияния делеций и точечных мутаций N-концевого домена малого белка теплового шока A/IbrA на их способность образовывать олигомеры и проявлять шапероноподобную активность.
- 3) Выявить функциональные мотивы FEDF белка IbrA у представителей микоплазм и определить корреляцию их количества с эволюционным положением бактерии и условиями обитания.

Малый белок теплового шока является АТФ-зависимым молекулярным шапероном, защищающим белки от необратимой агрегации. Они способны связываться с частично денатурированными белками клетки организма и сокращать их в правильной конформации [Dzikevich *et al.*, 2012]. мБПШ способствуют поддержанию белкового гомеостаза, предотвращая потерю функций белков и его денатурации в случаях неблагоприятных воздействий. И поэтому шаперонные свойства мБПШ применяются в лечении заболеваний, возникающих при массовом разрушении белковых конформаций [Сапо *et al.*, 2017].

1.2 Структура и свойства малых белков теплового шока

Группа малых белков теплового шока обладает молекулярной массой в диапазоне от 12 до 43 кДа. Они существуют в виде мономера и димера и также способны образовывать крупные мультимерные комплексы [McDonald *et al.*, 2012].

Все малые белки теплового шока объединяет наличие 3 доменов, включая и само мономера. Консервативный с-терминальный домен, расположенный в N-конце структуры, который состоит из 80-100 аминокислот [Blalock *et al.*, 2007]. С помощью этого домена осуществляется взаимодействие

СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

Казанский (Приволжский) федеральный
университет

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.СТРУКТУРА

Автор работы: Привалова Евгения Вячеславовна
Самоцитирование
рассчитано для: Привалова Евгения Вячеславовна
Название работы: ВЛИЯНИЕ ДВОЙНОГО FEDF-МОТИВА В N-КОНЦЕВОМ ДОМЕНЕ МАЛОГО БЕЛКА ТЕПЛОГО ШОКА
ИВРА АСНОЛЕPLASMA LAIDLAWII НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИИ БЕЛКА
Тип работы: Выпускная квалификационная работа
Подразделение:

РЕЗУЛЬТАТЫ

■ ОТЧЕТ О ПРОВЕРКЕ КОРРЕКТИРОВАЛСЯ: НИЖЕ ПРЕДСТАВЛЕНЫ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ ДО КОРРЕКТИРОВКИ

СОВПАДЕНИЯ	9.64%	СОВПАДЕНИЯ	9.64%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	90.36%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	90.36%
ЦИТИРОВАНИЯ	0%	ЦИТИРОВАНИЯ	0%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 26.05.2023


ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 27.05.2023 19:28

Структура документа: Проверенные разделы: основная часть с.1-29

Модули поиска: ИПС Адилет; Библиография; Сводная коллекция ЭБС; Интернет Плюс*; Сводная коллекция РГБ; Цитирование; Переводные заимствования (RuEn); Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu); Переводные заимствования по Интернету (EnRu); Переводные заимствования издательства Wiley; eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ: аналитика; СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация; Модуль поиска "КПФУ"; Медицина; Диссертации НББ; Коллекция НБУ; Перефразирования по eLIBRARY.RU; Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика; Перефразирования по Интернету; Перефразирования по Интернету (EN); Перефразирования по коллекции издательства Wiley; Патенты СССР, РФ, СНГ, СМИ России и СНГ; Шаблонные фразы; Кольцо вузов; Издательство Wiley; Переводные заимствования

Работу проверил: Каюмов Айрат Рашитович
ФИО проверяющего

Дата подписи:


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.