

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

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление: 06.04.01 (ОКСО 020400.68) – биология

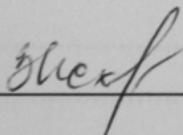
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская диссертация

**ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКА P0TN *LACTOBACILLUS*
BREVIS, ПЕРВОГО ПРЕДСТАВИТЕЛЯ НОВОГО
ПОДСЕМЕЙСТВА P11 БЕЛКОВ**

Работа завершена:

" 5 " 06 2018г.



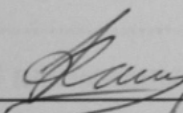
(З.И. Исхакова)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель

к.б.н., доцент кафедры генетики

" 5 " 06 2018г.

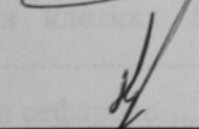


(А.Р. Каюмов)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

" 5 " 06 2018г.



(В.М. Чернов)

Казань – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Семейство РII белков.....	7
1.1.1 Структура РII белков.....	8
1.1.2 «Активный» сайт РII белков.....	11
1.2 Регуляция метаболизма азота в клетках <i>B. subtilis</i>	13
1.3 Транспортные системы полиаминов.....	17
1.3.1 Системы potABCD/potFGHI.....	18
1.3.2 Системы PotE/CadB/MdtJI/PuuP.....	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 геномной ДНК.....	24
2.4 Полимеразная цепная реакция (ПЦР).....	24
2.5 Рестрикция ДНК.....	26
2.6 Реакция Гибсона.....	26
2.7 Электрофорез ДНК.....	26
2.8 Очистка ДНК из агарозного геля.....	27
2.9 Выделение плазмидной ДНК.....	27
2.10 Трансформация клеток <i>E. coli</i> плазмидными ДНК.....	27
2.11 Гиперпродукция белков в клетках <i>E. coli</i> и получение клеточных экстрактов.....	28
2.12 Очистка белка на Strep-tactin сефарозе.....	29
2.13 Очистка белков на Ni-NTA сефарозе.....	29
2.14 Диализ белков.....	30
2.15 Электрофорез белков в денатурирующих условиях.....	30
2.16 Окрашивание белковых гелей Coomassie brilliant blue R250.....	30
2.17 Окрашивание белковых гелей нитратом серебра.....	31
2.18 Метод ко-элюции с клеточным экстрактом.....	31
2.19 Метод ко-элюции с очищенными белками.....	32

2.20 Осаждение белков с помощью трихлоруксусной кислоты	32
2.21 Иммуноблотинг	32
2.22 Иммунопреципитация	33
2.23 Определение активности β -галактозидазы	34
2.24 Биоинформатика	35
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	36
3.1 Биоинформационный анализ аминокислотной последовательности белка PotN из <i>Lactobacillus brevis subsp gravesensis</i> и генного окружения его гена	36
3.2 Идентификация потенциальных белков партнеров для взаимодействия с белком PotN в клетках <i>L. brevis</i> методом ко-элюции и иммунопреципитации.....	39
3.3 Клонирование и очистка полноценного и укороченных вариантов белка PotA методом аффинной хроматографии	42
3.4 Оценка влияния нуклеотидов на взаимодействие белка PotN с белками GlnR и PotAc <i>in vitro</i> методом ко-элюции	45
3.5 Оценка взаимодействия белка PotN с белками GlnR и PotAc <i>in vivo</i> в различных условиях с помощью бактериальной дигибридной системы	47
ВЫВОДЫ	52
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	53

LA	Питательная среда Лурье-Бертани с аризомицином
LB	Питательная среда Лурье-Бертани
MRS	Питательная среда Де Мана, Рогоза и Шарпа
NAD	Никотинамидадениндинуклеотид
PSA	Персульфат аммония
PBS	Фосфатный буфер
SB	Буфер для трансфера
SPB	Дополнительный буфер
TAMED	Тетрациклин-содержащая среда
Tm	2-амино-2-гидроксиметилпропан-1,3-диол

ВВЕДЕНИЕ

Канонические РII белки играют ключевую роль в качестве сенсоров энергетического состояния и доступности источника углерода/азота для клетки. Конкурентное связывание АТФ или АДФ и синергическое связывание 2-оксоглутарата (2-OG) с АТФ позволяет РII белкам модулировать различные клеточные функции в зависимости от текущего состояния энергетического и пластического гомеостаза клетки [Merrick, 2015]. РII белки координируют центральный метаболизм углерода/азота путем регулирования активности транскрипционных факторов, ключевых метаболических ферментов и транспортеров [Lapina *et al.*, 2018]. Взаимодействие с эффекторными молекулами вызывает различные конформационные изменения структуры РII белков, что, в свою очередь, позволяет им изменять сродство к белкам-партнерам и изменять их активность [Lüddecke, Forchhammer, 2015]. При высоком уровне 2-OG (недостаток азота), АТФ-зависимое связывание 2-OG с РII белком вызывает конформационное изменение в Т-петле белка, что, в свою очередь, нарушает его взаимодействие с различными мишенями [Forchhammer, 2016].

Среди представителей рода *Lactobacillus* только *Lactobacillus brevis*, *L. buchneri*, *L. farraginis*, *L. bif fermentans* имеют в геноме гены РII белков. В геноме этих бактерий, а также и у *Lactococcus lactis* ген РII белка расположен в опероне *potABCD*, кодирующий белки АВС-транспортера полиаминов спермидина/путресцина. Это позволяет предположить взаимодействие РII белка с белками PotABCD и участие в контроле транспорта полиаминов. На этом основании мы считаем, что этот белок можно обозначить как PotN и отнести к новому подсемейству РII белков, функция которых пока неизвестна.

Целью работы было дать структурно-функциональную характеристику белка PotN *L. brevis*, первого представителя нового подсемейства РII белков.

В работе решались следующие задачи:

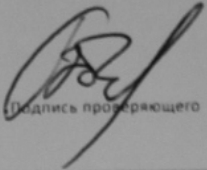
- 1) Провести биоинформационный анализ аминокислотной последовательности белка PotN из *Lactobacillus brevis subsp gravesensis* и генного окружения его гена.
- 2) Идентифицировать белки партнеры для взаимодействия с белком PotN в клетках *L. brevis* методом ко-элюции и иммунопреципитации.
- 3) Провести клонирование и очистку полноценного и укороченных вариантов белка PotA методом аффинной хроматографии.
- 4) Оценить влияние нуклеотидов на взаимодействие белка PotN с белками GlnR и PotAc *in vitro*.
- 5) Охарактеризовать закономерности взаимодействие белка PotN с белками GlnR и PotAc *in vivo* с помощью бактериальной дигибридной системы.



СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Исхакова Залина Ильгамовна
Факультет, кафедра, номер группы	ИФМиБ, кафедра генетики, 01-640-1
Тип работы	Магистерская диссертация
Название работы	Исхакова Залина Ильгамовна Залина МагДиплом антиплагиат.docx
Название файла	Залина МагДиплом антиплагиат.docx
Процент заимствования	17,41%
Процент цитирования	0,73%
Процент оригинальности	81,86%
Дата проверки	16:09:03 04 июня 2018г.
Модули поиска	Модуль поиска перефразирований Интернет; Коллекция РГБ; Сводная коллекция ЭБС; Модуль поиска Интернет; Коллекция ГАРАНТ; Кольцо вузов; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Коллекция Медицина; Модуль поиска "КПФУ"; Коллекция ГЭОТАР; Коллекция Библиотека МГМУ им. Сеченова; Коллекция eLIBRARY.RU; Модуль поиска переводных заимствований; Цитирование
Работу проверил	Бабынин Эдуард Викторович 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.