**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

Магистерская диссертация

**МЕХАНИЗМ .....**

**Работа завершена:**

« »\_\_\_\_\_\_\_\_\_2020 г. \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ (\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_)

**Работа допущена к защите:**

Научный руководитель:

к.б.н., доцент кафедры генетики

« »\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_2020 г. \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ (\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

« »\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2020 г. \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ (В.М. Чернов)

Казань – 2020

СОДЕРЖАНИЕ

[**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** 3](#_Toc3551488)

[**ВВЕДЕНИЕ** 4](#_Toc3551489)

[**1** **ОБЗОР** **ЛИТЕРАТУРЫ** 5](#_Toc3551490)

[1.1 Азотный обмен в клетках бактерий 5](#_Toc3551491)

[1.2 P-II подобные белки 5](#_Toc3551492)

[1.2.1 Подсемейства белков GlnB, GlnD и GlnK 6](#_Toc3551493)

[Заключение 7](#_Toc3551494)

[**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ** **ЧАСТЬ** 8](#_Toc3551495)

[**2** **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ** 8](#_Toc3551496)

[2.1 Штаммы и плазмиды 8](#_Toc3551497)

[2.2 Питательные среды и условия культивирования 8](#_Toc3551498)

[2.3 Полимеразная цепная реакция (ПЦР) 8](#_Toc3551499)

[**3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ** 9](#_Toc3551500)

[3.1 Получение двуплазмидных штаммов 9](#_Toc3551501)

[**ВЫВОДЫ** 11](#_Toc3551502)

[**СПИСОК** **ИСПОЛЬЗОВАННЫХ** **ИСТОЧНИКОВ** 12](#_Toc3551503)

# СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| АДФ | Аденозиндифосфат |
| АТФ | Аденозинтрифосфат |
| АМФ | Аденозинмонофосфат |

# ВВЕДЕНИЕ

В бактериях, археях и растениях P-II белки координируют метаболизм азота, регулируя активность ферментов, факторов транскрипции и мембранных транспортных белков [Radchenko, Merrick, 2011]. Восприятие сигнала P-II белками может происходить двумя способами. Первый способ восприятия сигнала почти универсальный и включает в себя связывание эффекторных молекул 2-оксоглутарата (2-OG) и АТФ/АДФ. Второй способ восприятия сигнала включает ковалентную модификацию Т-петли [Ninfa, Jiang, 2005; Forchhammer *et al.,* 2008].

**Целью** работы являлось установить ...

В работе решались следующие **задачи**:

1. Получить рекомбинантные штаммы *…*.
2. В бактериальной двугибридной системе установить возможность взаимодействия белка ….

# 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Азотный обмен в клетках бактерий

Аммоний является предпочтительным источником азота для бактерий по нескольким критериям. Во-первых, аммоний напрямую включается в метаболизм клетки. Во-вторых, синтез белков, необходимых для использования трудноусваиваемых азотсодержащих соединений репрессируется в клетках, растущих в присутствии аммония. Наконец, по сравнению с клетками, выращенными в присутствии других источников азота, клетки, выращенные в присутствии аммония, содержат самые низкие уровни глутаминсинтетазы (GS), критического фермента при ассимиляции аммония [Reitzer, 1996].

## 1.2 P-II подобные белки

P-II белки являются одним из наиболее распространенных семейств белков сигнальной трансдукции в природе, которые распространены в бактериях, археях и растениях. Во всех этих организмах P-II белки координируют метаболизм азота, регулируя активность ферментов, факторов транскрипции и мембранных транспортных белков [Radchenko, Merrick, 2011].

Рисунок 1 – (a) Вид сбоку тримера GlnB Escherichia coli (PDB: 2P-II) в отсутствие каких-либо лигандов. Стрелки указывают петли B, C, T и аминокислоту Tyr51, которая была описана как место обратимого уридилирования во многих Proteobacteria. (b) Вид со стороны T-петли тримера GlnK E. coli, связанного с ATФ (PDB2: GLNK). Стрелка указывает на сайт связывания АTP и АДФ [Ninfa, Jiang, 2005]

### 1.2.1 Подсемейства белков GlnB, GlnD и GlnK

# Заключение

Практически во всех клетках глутамат и глутамин служат в качестве ключевых доноров азота для биосинтетических реакций. Основной механизм в бактериях представляет собой GS/GOGAT путь [Merric, Edwards, 1995]. P-II белок играет ключевую роль в регуляции азотного метаболизма в *E. coli* путем контроля уровня активности глутаминсинтетазы, который катализирует АТФ-зависимую ассимиляцию аммиака с глутаматом с образованием глутамина [Magasanik, 1988; Parkinson, 1993]. …………

 В то время как PII-белки грамотрицательных бактерий хорошо изучены, белки этого семейства в грамположительных бактериях остаются малоисследованными.

# ****ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ****

# ****2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ****

## 2.1 Штаммы и плазмиды

В работе использованы штаммы *E.coli* XLI-Blue (*recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac*), («Stratagene», США);

Таблица 1 – Плазмиды, использованные в работе

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Плазмида | Генотип  | Источник  |
| pUT18-potN | *potN::T18, ampR* | [Kayumov et al., 2018 |
| pET15b |  | Stratagene |

## 2.2 Питательные среды и условия культивирования

Среда LB [Sambrook *et al*., 1989] (%): триптон – 1.0; дрожжевой экстракт – 0.5; NaCl – 0.5; pH 8.5. Агаризованная среда LBА включает дополнительно 2% агара.

## 2.3 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР проводили с помощью термоциклера C1000 Thermo Cycler (Bio-Rad, США) с использованием Taq-полимеразы в условиях, рекомендованных производителем. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 0.03-0.04 мкг матричной ДНК, 10 пМ каждого праймера (таблица 2), 200 мкМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 20 мM Tris-HCl (pH 8.8), 10 мM KCl, 10 мM (NH4)2SO4, 2 мM MgSO4, 0.1% Triton X-100 и 1.0 единицу полимеразы.

Режим ПЦР: …

# 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

## 3.1 Получение двуплазмидных штаммов

Ранее в нашей лаборатории были получены следующие генетические конструкции: pUT18С-Zip, pKT25-Zip,







Рисунок 7 – Электрофорез плазмид pUT18С-Zip, pKT25-Zip после выделения из рекомбинантных штаммов *E. coli* XLI-Blue

3.2 Оценка взаимодействия белка PotN с полноценным белком GlnR, а также с мутантными белками GlnR с делециями 15 и 42 аминокислот с С-конца белка

Оценку взаимодействия проводили с помощью бактериальной двугибридной системы. …

Также оценивали взаимодействие белков в условиях различной доступности питательных веществ.

# ВЫВОДЫ

1) Получены двуплазмидные штаммы*…*.

2) Белок PotN взаимодействует с белком GlnR….

# СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. **Arcondeguy, T.** PII signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control [Text] / T. Arcondeguy, R. Jack, M. Merrick // Microbiol Mol Biol. – 2001. – V.65. – P.80–105.
2. **Atkinson, M.** Characterization of the GlnK protein of *Escherichia coli* [Text] / M. Atkinson, A. J. Ninfa // Mol. Microbiol. – 1999. – V.32 – P.301–313.
3. **Atkinson, M. R.** Identification of genes and gene products whose expression is activated during nitrogen-limited growth in *Bacillus subtilis* [Text] / M. R. Atkinson, S. H. Fisher // J Bacteriol. – 1991. – V.173. – P.23 - 27.
4. **Battesti, A.** The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstruction in *Escherichia* *coli* [Text] / A. Battesti, E. Bouveret // Methods. – 2012. – V.58. – P.325–334.