

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра молекулярной биологии

Аннотация к дипломной работе

СИМОНОВ ВЛАДИСЛАВ СЕРГЕЕВИЧ

Шаперонин фага E1: структурные и функциональные свойства

Научный руководитель:
Марченко Наталья Юрьевна,
к. б. н., научный сотрудник
группы экспериментальных
исследований и инженерии
олигомерных структур
Института белка РАН

Минск, 2023

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 46 с., 11 рис., 0 табл., 106 источников.

ШАПЕРОНИН ФАГА EL: СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА

Объект исследования: шаперонин фEL фага EL

Цель: исследование структурных и функциональных свойств шаперонина фага EL.

Методы исследования: микробиологические (культивирование клеток *E. coli* bl21(DE3)), спектрофотометрические (флуоресценция, рассеяние), генетические (трансформация), хроматографические (ионообменная хроматография, гидрофобная хроматография, гель-фильтрация) электрофоретические (нативный и SDS-электрофорез).

Культура клеток *E. coli* штамма bl21(DE3) была трансформирована плазмидами, содержащими гены, кодирующие белки GroEL и фEL, а затем были выделены бактериальный шаперонин GroEL и фаговый шаперонин фEL.

В результате инкубации шаперонинов с FAM-мечеными денатурированными субстратными белками обнаружено, что из 5 исследованных белков взаимодействуют с фEL только пепсин и MDH, однако с очень низкой афинностью, хотя все пять испытанных субстратных белков связываются с бактериальным шаперонином GroEL.

По изменению собственной триптофановой флуоресценции фEL установлено, что разворачивание химическими денатурантами проходит с образованием промежуточного, частично олигомерного, состояния, причём денатурация мочевиной и гуанидин гидрохлоридом, судя по всему, по разному сказывается на стабильности промежуточного состояния, присутствие которого более выражено при денатурации мочевиной, чем гуанидин гидрохлоридом.

При совместной инкубации шаперонинов фEL и GroEL образуется олигомер, который по электрофоретической подвижности является промежуточным между фEL и GroEL. С помощью использования гибридного белкового комплекса GroEL-GFP было выяснено, что фEL и GroEL-GFP образуют гетероолигомер, который включает в себя субъединицы как GroEL, так и фEL. Гибридный олигомер в присутствии АТФ обладает пониженной термостабильностью и при 60°C полностью оказывается в агрегированном состоянии, в то время, как GroEL-GFP сохраняет свою нативную электрофоретическую подвижность. Этот гетероолигомер взаимодействует с FAM-мечеными денатурированными субстратными белками – лизоцимом и MDH. Таким образом, можно сделать вывод, что гибридный комплекс обладает свойствами как фEL, так и GroEL.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа 46 с., 11 мал., 0 табл., 106 крыніц.

ШАПЕРОНИН ФАГА EL: СТРУКТУРНЫЯ І ФУНКЦЫЯНАЛЬНЫЯ ЎЛАСЦІВАСЦІ

Аб'ект даследавання: шаперонін фEL фага EL

Мэта: даследаванне структурных і функцыянальных уласцівасцяў шапероніна фага EL.

Метады даследавання: мікрабіялагічныя (культываванне клетак E. coli b121 (DE3)), спектрафатаметрычныя (флуарэсцэнцыі, расейванне), генетычныя (трансфармацыя), храматаграфічныя (іонаабменных храматаграфія, гідрафобная храматаграфія, гель-фільтраванне) электрофоретическія (натыўны і SDS-электрофарэз).

Культура клетак E. coli штаму b121 (DE3) была трансфармавана плазмідамі, якія змяшчаюць гены, кадавальныя вавёркі GroEL і фEL, а затым былі вылучаны бактэрыяльны шаперонін GroEL і фагавы шаперонін фEL.

У выніку інкубацыі шаперонінов з FAM-пазначанымі дэнатураванага субстратнымі вавёркамі выяўлена, што з 5 даследаваных бялкоў ўзаемадзеянчаюць з фEL толькі пепсін і MDH, аднак з вельмі нізкай Афінамі, хоць усе пяць выпрабаваных субстратных бялкоў звязваюцца з бактэрыяльным шапероніном GroEL.

Па змене ўласнай трыптофановай флуарэсцэнцыі фEL ўстаноўлена, што разгортванне хімічнымі дэнатурантамі праходзіць з адукацыяй прамежкавага, часткова олигомерного, стану, прычым дэнатурацыя мачавінай і гуанидин гідрахларыд, мяркуючы па ўсім, па рознаму адбіваецца на стабільнасці прамежкавага стану, прысутнасць якога больш выяўлена пры дэнатурацыі мачавінай, чым гуанидин гідрахларыд.

Пры сумеснай інкубацыі шаперонінов фEL і GroEL утворацца олигомер, які па электрофоретической рухомасці з'яўляецца прамежковым паміж фEL і GroEL. З дапамогай выкарыстання гібрыднага бялковага комплексу GroEL-GFP было высветлена, што фEL і GroEL-GFP утвараюць гетероолигомер, які ўключае ў сябе субадзінкі як GroEL, так і фEL. Гібрыдны олигомер ў прысутнасці АТФ валодае паніжанай тэрmostабільнасцю і пры 60° з цалкам аказваецца ў аграгаваным стане, у той час, як GroEL-GFP захоўвае сваю натыўную электрофоретическую рухомасць. Гэты гетероолигомер спаганяе з FAM-пазначаных дэнатураванага субстратнай вавёркамі-лизоцимом і MDH. Такім чынам, можна зрабіць выснову, што гібрыдны комплекс валодае ўласцівасцямі як фEL, так і GroEL.

ABSTRACT

Diploma work 46 p., 11 fig., 0 tables, 106 sources.

CHAPERONIN OF THE PHAGE ϕ EL: STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES

Object of research: chaperonin ϕ EL of the phage EL

Objective: to study the structural and functional properties of chaperonin phage EL.

Research methods: microbiological (cultivation of *E. coli* bl21(DE3) cells), spectrophotometric (fluorescence, scattering), genetic (transformation), chromatographic (ion exchange chromatography, hydrophobic chromatography, gel filtration) electrophoretic (native and SDS electrophoresis).

E. coli cell culture of strain bl21(DE3) was transformed by plasmids containing genes encoding the GroEL and ϕ EL proteins, and then bacterial chaperonin GroEL and phage chaperonin ϕ EL were isolated.

As a result of incubation of chaperonins with FAM-labeled denatured substrate proteins, it was found that of the 5 studied proteins, only pepsin and MDH interact with ϕ EL, but with very low affinity, although all five tested substrate proteins bind to bacterial chaperonin GroEL.

By changing the intrinsic tryptophan fluorescence of ϕ EL, it was found that unfolding by chemical denaturants takes place with the formation of an intermediate, partially oligomeric state, and denaturation with urea and guanidine hydrochloride, apparently, affects the stability of the intermediate state differently, the presence of which is more pronounced during denaturation with urea than guanidine hydrochloride.

When the chaperonins ϕ EL and GroEL are incubated together, an oligomer is formed, which is intermediate between ϕ EL and GroEL in terms of electrophoretic mobility. Using the hybrid protein complex GroEL-GFP, it was found that ϕ EL and GroEL-GFP form a heterooligomer that includes both GroEL and ϕ EL subunits. The hybrid oligomer in the presence of ATP has reduced thermal stability and at 60 ° C is completely in the aggregated state, while GroEL-GFP retains its native electrophoretic mobility. This heterooligomer interacts with FAM-labeled denatured substrate proteins – lysozyme and MDH. Thus, it can be concluded that the hybrid complex has the properties of both ϕ EL and GroEL.