

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра генетики

ОСИПИК
Карины Андреевны

СТРУКТУРНЫЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДАГФ-СИНТАЗ I
ТИПА БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* SUBSP.
AURANTIACA

Аннотация к дипломной работе

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
доцент Е.Г. Веремеенко

Минск, 2022

РЕФЕРАТ

Дипломная работа: 79 с., 24 рисунка, 11 табл., 107 источников.

Ключевые слова: 3-дезоксид-арабино-гептулозонат-7-фосфат-синтаза, феназины, ароматические аминокислоты, моделирование по гомологии, молекулярный докинг, *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*.

Объекты исследования: гены ДАГФ-синтаз I типа бактерий *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*.

Цель: структурный и функциональный анализ ДАГФ-синтаз I типа бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*

Методы исследования: микробиологические (культивирование микроорганизмов, трансформация, конъюгация), молекулярно-генетические (выделение ДНК, электрофоретический анализ, полимеразная цепная реакция, рестрикция и лигирование фрагментов ДНК, экстракция ароматических аминокислот и феназиновых соединений), биоинформатические (моделирование трехмерных структур белков по гомологии, молекулярный докинг).

Бактерии *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* характеризуется наличием 4 генов, продукты которых принадлежат семейству ферментов 3-дезоксид-арабино-гептулозонат-7-фосфат синтаз (катализируют первую реакцию шикиматного пути, активность регулируется посредством ретроингибирования), два из которых относятся к ДАГФ-синтазам I типа, два – к ДАГФ-синтазам II типа. В данной работе проводилось исследование двух изоформ, относящихся к ДАГФ-синтазам I типа.

Согласно полученным результатам, L-тирозин – является наиболее предпочтительным регулятором ДАГФс I α _2, а ингибиторами ДАГФс I α _1 выступают две молекулы – L-тирозин и L-фенилаланин.

В дополнение, созданная генетическая конструкция для нокаута гена ДАГФс I α _2 была успешно применена для нокаута. Было проведено сравнение уровней продукции феназинов и трех ароматических аминокислот у штамма дикого типа B-162 и полученного мутанта с инактивированной ДАГФ-синтазой I α _2. На основании полученных результатов был сделан вывод, что инактивированная ДАГФ-синтаза I типа (ДАГФс I α _2) ответственна за регуляцию синтеза фенилаланина и тирозина из предшественников, а оставшаяся активной ДАГФ-синтаза I типа (ДАГФс I α _1) способствует перенаправлению шикиматного пути на преимущественный синтез ряда вторичных метаболитов и триптофана.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа: 79 с., 24 мал., 11 табл., 107 крыніц.

Ключавыя словы: 3-дэзаксі-D-арабіна-гептулазанат-7-фасфат-сінтаза, феназіны, араматычныя амінакіслоты, мадэляванне па гамалогіі, малекулярны докінг, *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*.

Аб'екты даследавання: гены ДАГФ-сінтаз I тыпу бактэрыі *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*.

Мэта: структурны і функцыянальны аналіз ДАГФ-сінтаз I тыпу бактэрыі *P.chlororaphis* subsp. *aurantiaca*.

Метады даследавання: мікрабіялагічныя (культываванне мікраарганізмаў, трансфармацыя, кан'югацыя), малекулярна-генетычныя (вылучэнне ДНК, электрафарэтычны аналіз, палімеразнай ланцуговая рэакцыя, рэстрыкцыя і лігіравання фрагментаў ДНК, экстракцыя араматычных амінакіслот і феназінавых злучэнняў), біяінфарматычныя малекулярны докінг).

Бактэрыі *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* характарызуецца наяўнасцю 4 генаў, прадукты якіх належаць сямейства ферментаў 3-дэзокси-D-арабіна-гептулазанат-7-фасфат сінтаз (каталізуюць першую рэакцыю шыкіматнага шляху, актыўнасць рэгулюецца з дапамогай рэтраінгібіравання), два з якіх ставяцца да ДАГФ-сінтаз I тыпу, – да ДАГФ-сінтаз II тыпу. У дадзенай працы праводзілася даследаванне двух ізаформ, якія адносяцца да ДАГФ-сінтаз I тыпу.

Паводле атрыманых вынікаў, L-тыразін - з'яўляецца найбольш пераважным рэгулятарам ДАГФс Іα₂, а інгібітарамі ДАГФс Іα₁ выступаюць дзве малекулы – L-тыразін і L-фенілаланін.

У дадатак, створаная генетычная канструкцыя для накаўту гена ДАГФс Іα₂ была паспяхова прыменена для накаўту. Было праведзена параўнанне ўзроўняў прадукцыі феназінаў і трох араматычных амінакіслот у штаму дзікага тыпу В-162 і атрыманага мутанта з інактываванай ДАГФ-сінтазай Іα₂. На падставе атрыманых вынікаў была зроблена выснова, што інактывіраваная ДАГФ-сінтаза I тыпу (ДАГФс Іα₂) адказная за рэгуляцыю сінтэзу фенілаланіну і тыразіну з папярэднікаў, а астатнія актыўнай ДАГФ-сінтаза I тыпу (ДАГФс Іα₁) спрыяе перанакіраванню перавагі сінтэзу метабалітаў і трыптафану.

ABSTRACT

Diploma thesis: 79 pages, 24 figures, 11 tables, 107 sources.

Keywords: 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase, phenazines, aromatic amino acids, homology modeling, molecular docking, *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*.

Objects of study: DAHP-synthase genes of type I bacteria *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*.

Objective: Structural and functional analysis of type I DAHP-synthases in bacteria *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*.

Research methods: microbiological (cultivation of microorganisms, transformation, conjugation), molecular genetic (DNA extraction, electrophoretic analysis, polymerase chain reaction, restriction and ligation of DNA fragments, extraction of aromatic amino acids and phenazine compounds), bioinformatics (modeling of three-dimensional protein structures by homology, molecular docking).

The bacteria *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* is characterized by the presence of 4 genes, the products of which belong to the 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase family of enzymes (catalyze the first reaction of the shikimate pathway, activity is regulated by retroinhibition), two of which belong to type I DAHP-synthases, two – to type II DAHP-synthases. In this work, two isoforms related to type I DAHP-synthases were studied.

According to the results obtained, L-tyrosine is the most preferred regulator of DAHPs I α _2, and two molecules act as inhibitors of DAHPs I α _1 – L-tyrosine and L-phenylalanine.

In addition, the generated genetic construct for knockout of the DAHPs I α _2 gene was successfully applied for knockout. The production levels of phenazines and three aromatic amino acids in the wild-type B-162 strain and the resulting mutant with inactivated DAHP-synthase I α _2 were compared. Based on the obtained results, it was concluded that the inactivated type I DAHP-synthase (DAHPs I α _2) is responsible for the regulation of the synthesis of phenylalanine and tyrosine from precursors, and the remaining active type I DAHP-synthase (DAHPs I α _1) contributes to the redirection of the shikimate pathway to the predominant synthesis of a number of secondary metabolites and tryptophan.