

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра биохимии**

**КАЧАН
ВАЛЕРИЯ СЕРГЕЕВНА**

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СРОДСТВА γ -БОКС СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА 1 К
ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫМ И ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫМ ФРАГМЕНТАМ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ МЕТОДОМ ИЗМЕРЕНИЯ АНИЗОТРОПИИ
ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ**

Дипломная работа

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
Шолух Михаил Васильевич

Научный консультант:
доктор биологических наук,
Лябин Дмитрий Николаевич.

Допущен к защите
«__»_____2024 г.
Зав. кафедрой биохимии
кандидат биологических наук, доцент И. В. Семак

Минск, 2024

РЕФЕРАТ

Дипломная работа, 59 страниц, 27 рисунков, 1 таблица, 63 источника, 4 приложения

У–БОКС СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК 1, УВ–1, ДОМЕН ХОЛОДОВОГО ШОКА, С–КОНЦЕВОЙ ДОМЕН, СПЕЦИФИЧНОСТЬ, МЕТИЛИРОВАНИЕ, МЕЧЕНИЕ РНК, АНИЗОТРОПИЯ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ

Цель работы: изучение связывания белка УВ–1 и его доменов с различными фрагментами РНК и ДНК.

Методы исследования: электрофорез нуклеиновых кислот, выделение РНК из полиакриламидного геля, рестрикция, транскрипция, мечение РНК по 3'–концу, измерение анизотропии флюоресценции.

В ходе данной работы были получены константы диссоциации различных комплексов фрагментов и полноразмерного УВ–1 с РНК и ДНК и сделаны следующие выводы:

1. Сродство УВ–1 к РНК и ДНК зависит от длины олигонуклеотидов. При длине 15 и 30 нуклеотидов достоверной разницы в связывании РНК и ДНК нет. 8–нуклеотидные РНК и ДНК связываются с УВ–1 в 5 и 23 раз соответственно хуже, чем 15– и 30–нуклеотидные. Сродство УВ–1 к 8–нуклеотидным РНК приблизительно в 3,5 раза выше, чем к ДНК той же длины.

2. Высокое сродство УВ–1 к РНК определяет С–концевой домен. Константы диссоциации полноразмерного белка и CTD приблизительно равны (10–20 нМ), в то время как константа диссоциации для CSD на 2–3 порядка выше (1–6 мкМ). Добавление небольшой части С–концевого домена (129–180 а. о.) к домену холодового шока снижает константу диссоциации до таковой для полноразмерного белка как для 30–нуклеотидных, так и для 8–нуклеотидных РНК специфической последовательности.

3. Специфичность УВ–1 к последовательности РНК определяет домен холодового шока. Однако, добавление к домену холодового шока части С–концевого домена (129–180 а.о.) нивелирует различия в константах диссоциации, а при использовании полноразмерного УВ–1 специфическое связывание методом измерения анизотропии флюоресценции не детектируется.

4. При связывании РНК с мотивом CAUC УВ–1 отдает предпочтение метилированной по цитозину РНК, однако, на других исследованных последовательностях константы связывания неметилированной и m5C–РНК практически не отличаются. Вероятно, повышенное сродство УВ–1 к m5C является последовательность–специфическим.

Область применения результатов исследования: биохимия, молекулярная биология, медицина, фармакология.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа, 59 старонак, 27 малюнкаў, 1 табліца, 63 крыніцы,
У–БОКС ЗВЯЗНЫ БЯЛОК 1, YB-1, ДАМЕН ХАЛАДАВОГУ ШОКУ, С–
КАНЦАВЫ ДАМЕН, СПЕЦЫФІЧНАСЦЬ, МЕТЫЛЯВАННЕ, МЕЧАННЕ РНК,
АНІЗАТРОПІЯ ФЛЮАРЭСЦЭНЦЫІ

Мэта працы: вывучэнне звязвання бялку YB-1 і яго даменаў рознымі
фрагментамі РНК і ДНК.

Метады даследавання: электрофарэз нуклеінавых кіслот, вылучэнне
РНК з поліакрыламіднага геля, рэстрыкцыя, транскрыпцыя, мечанне РНК па 3'-
канцы, вымярэнне анізатрапіі флюарэсцэнцыі.

У дадзенай працы былі атрыманы канстанты дысацыяцыі розных
комплексаў фрагментаў і поўнапамернага YB-1 з РНК і ДНК і зроблены
наступныя высновы:

1. Роднасць YB-1 да РНК і ДНК залежыць ад даўжыні алігануклеатыдаў.
Пры даўжыні 15 і 30 нуклеатыдаў дакладнай розніцы ў звязванні РНК і ДНК
няма. 8-нуклеатыдныя РНК і ДНК звязваюцца з YB-1 ў 5 і 23 разоў адпаведна
горш, чым 15- і 30-нуклеатыдныя. Падабенства YB-1 да 8-нуклеатыдным РНК
прыблізна ў 3,5 разы вышэй, чым да ДНК той жа даўжыні.

2. Высокая роднасць YB-1 да РНК вызначае С-канцавы дамен. Канстанты
дысацыяцыі поўнапамернага бялку і CTD прыблізна роўныя (10-20 нМ), у той
час як канстанта дысацыяцыі для CSD на 2-3 парадку вышэй (1-6 мкМ).
Даданне невялікай часткі 3-канцавага дамена (129-180 а. о.) да дамена
халадовага шоку зніжае канстанту дысацыяцыі да такой для поўнапамернага
бялку як для 30-нуклеатыдных, так і для 8-нуклеатыдных РНК спецыфічнай
паслядоўнасці.

3. Спецыфічнасць YB-1 да паслядоўнасці РНК вызначае дамен халадовага
шоку. Аднак, даданне да дамена халадовага шоку часткі С-канцавага дамену
(129-180 а. а.) нівелюе адрозненні ў канстантах дысацыяцыі, а пры
выкарыстанні поўнапамернага YB-1 спецыфічнае звязванне метадам вымярэння
анізатрапіі флюарэсцэнцыі не дэтэктуюцца.

4. Пры звязванні РНК з матывам CAUC YB-1 аддае перавагу метылаванай
па цытазіну РНК, аднак, на іншых даследаваных паслядоўнасцях канстанты
звязвання неметылаванай і m5C-РНК практычна не адрозніваюцца. Верагодна,
падвышанае падабенства YB-1 да m5C з'яўляецца паслядоўнасць-спецыфічным.

Вобласць ужывання вынікаў даследавання: біяхімія, малекулярная
біялогія, медыцына, фармакалогія

ABSTRACT

Graduate work, 59 pages, 27 figure, 1 tables, 63 sources, 4 supplements
Y-BOX BINDING PROTEIN 1, YB-1, COLD SHOCK DOMAIL, C-
TERMINAL DOMAIN, METHYLATION, RNA LABELLING, FLUORESCENCE
ANISOTROPY

The aim of the work was to to study the affinity of the YB-1 protein to various fragments of RNA and DNA.

Research methods: nucleic acid electrophoresis, polyacrylamide gel RNA elution, restriction, transcription, 3'-labelling of RNA, fluorescence anisotropy.

In this study we have observed the binding of full YB-1 and it's fragments with different nucleic acids.

1. The affinity of YB-1 for RNA and DNA depends on the length of the oligonucleotides. At lengths of 15 and 30 nucleotides, there is no significant difference in the binding of RNA nor DNA. 8-nucleotide RNA and DNA bind to YB-1 5 and 23 times, respectively, worse than 15- and 30-nucleotide ones. YB-1 affinity for 8-nucleotide RNA is approximately 3.5 times higher than for same length DNA.

2. The high affinity of YB-1 for RNA determines the C-terminal domain. The dissociation constants for the full-length protein and the CTD are approximately equal (10–20 nM), while the dissociation constant for the CSD is 2–3 orders of magnitude higher (1–6 μ M). The addition of a small part of the C-terminal domain (129–180 amino acids) to the cold shock domain reduces the dissociation constant to that of the full-length protein for both 30-nucleotide and 8-nucleotide sequence-specific RNAs.

3. CSD determines RNA sequence specificity of YB-1. However, adding part of the C-terminal domain (129–180 amino acids) to the cold shock domain eliminates the differences in dissociation constants, and when using full-length YB-1, specific binding is not detected by measuring fluorescence anisotropy.

4. When binding RNA to the CAUC motif, YB-1 shows higher affinity to one with 5-methylcytosine; however, on other sequences studied, the binding constants of unmethylated and m5C-RNA are basically the same. It is likely that the increased affinity of YB-1 for m5C is sequence-specific.

Field of application of the research results: biochemistry, molecular biology, medicine, pharmacology.