

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ

Направление подготовки: 06.03.01 (ОКСО 020400.62) – биология


ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Дипломная работа

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ТОЛС-ПОДОБНЫХ БЕЛКОВ
ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНОЙ БАКТЕРИИ

Работа завершена:

«25» мая 2020 г.



(Ш.Р. Низамов)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель
к.б.н., ст. преподаватель
«26» мая 2020 г.



(И.В. Хиляс)

Заведующий кафедрой
д.б.н., профессор

« 1 » июня 2020 г.



(О.Н. Ильинская)

Казань-2020

ВВЕДЕНИЕ

Множественная антибиотикорезистентность бактерий является актуальной проблемой для здравоохранения на протяжении последних десятилетий. На сегодняшний день активно ведутся исследования в области изучения механизмов бактериальной антибиотикоустойчивости в связи с быстрой адаптацией бактерий к существующим препаратам и низким темпом появления на фармацевтическом рынке новых антибиотических соединений.

В 2017 году Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) впервые опубликовала список клинически опасных патогенов, в котором *Serratia marcescens* была внесена в группу патогенов, для борьбы с которыми требуются неотлагательные мероприятия по созданию новых антибактериальных соединений [World Health Organization, 2017]. Известно, что представители рода *Serratia* обладают широким спектром устойчивости к различным классам антибиотиков, [Lambert, O'Grady, 1992, Aucken, Pitt, 1998]. Одной из основных причин резистентности является наличие в клеточной мембране эффлюкс-систем – белковых комплексов, способных выводить из клетки антимикробные препараты (АМП) путем активного транспорта. Кроме того, эффлюкс-системы участвуют в транспорте различных соединений: красителей, дезинфицирующих средств, тяжелых металлов, растворителей, адгезинов, сидерофоров и белков [Rosenberg *et al*, 2003].

Эффлюкс системы грамотрицательных бактерий состоят из трех компонентов – белка-транспортера, находящегося на внутренней мембране, белка-адаптера, находящегося в периплазматическом пространстве и белка внешней мембраны. Часто белком внешней мембраны является TolC, который вступает в белковые взаимодействия с компонентами различных эффлюкс систем. В связи с расположением на внешней мембране, TolC представляет собой удобную мишень для блокирования функций эффлюкс систем. Отсутствие данного белка приводит к повышенной чувствительности бактерий к воздействию детергентов, желчных солей и органических

растворителей [Rosenberg *et al*, 2003]. Более того, субстраты TolC включают в себя широкий спектр антибактериальных препаратов, что приводит к развитию множественной лекарственной устойчивости клинически значимых бактерий. Наряду с известными TolC белками, во внешней мембране бактерий располагаются гомологичные ему белки, которые способны выполнять как функции эффлюкса антибиотиков из клетки, так и отличные функции, изучение которых является важным для понимания механизмов антибиотикорезистентности.

В связи с этим целью работы явилось клонирование генов TolC-подобных белков *Serratia marcescens* SM6 в pBAD30 и pWSK29 для анализа их экспрессии в *E. coli* DH5- α .

В ходе работы ставились следующие задачи:

- 1) Клонирование генов TolC-подобных белков в плазмиды pBAD30 и pWSK29.
- 2) Определение экспрессии TolC-подобных белков в рекомбинантных штаммах *E. coli* DH5- α .

ВЫВОДЫ

- 1) Получены конструкции, несущие на плаزمидах pBAD30 и pWSK29 *tolC*-подобные гены *hasF* и *EG355_15900*.
- 2) Получены рекомбинантные штаммы *E. coli* DH5- α , содержащие плазмиды pBAD30-*hasF*, pBAD30-*EG355_15900* и pWSK29-*hasF*.
- 3) Подтверждена экспрессия *TolC*-подобных белков в полученных трансформантах *E. coli* DH5- α путем Вестерн-блоттинга.