

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

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление: 06.04.01 – биология

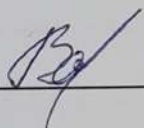
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская диссертация

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ И КОЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ  
*EIF5A, DHS И DONN C. ALBICANS В E. COLI*

Работа завершена:

« 6 » 06 2022 г.



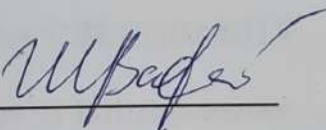
(Валиахметов Э. Э.)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

PhD, с.н.с.

« 6 » 06 2022 г.



(Валидов Ш. З.)

д.б.н., доцент

« 6 » 06 2022 г.



(Каюмов А. Р.)

И. о. зав. кафедрой

д.б.н., доцент

« 6 » 06 2022 г.



(Каюмов А. Р.)

Казань – 2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	7
1.1 Характеристика <i>Candida albicans</i> .....	7
1.2 Сложности при терапии инвазивных микозов.....	9
1.3 Описание трансляции эукариот .....	10
1.3.1 Инициация трансляции .....	10
1.3.2 Элонгация трансляции .....	11
1.3.3 Терминация трансляции.....	13
1.4 Характеристика факторов элонгации трансляции эукариот .....	13
1.4.1 eEF1 (A-B).....	13
1.4.2 eEF2 .....	14
1.4.3 eEF3 .....	14
1.4.4 eIF5A .....	15
1.5 Гипузинирование .....	17
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b> .....	21
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	21
2.1 Штаммы, векторы и условия культивирования .....	21
2.2 Буферные растворы для выделения и очистки белков.....	22
2.3 Рестрикция ДНК с получением липких концов.....	22
2.4 Электрофорез ДНК .....	23
2.5 Очистка фрагментов из агарозного геля и реакционных смесей.....	23
2.6 Лигирование вектора и вставки с помощью ДНК-лигазы .....	24

2.7 Трансформация клеток <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	24
2.8 ПЦР-скрининг и отбор клонов.....	25
2.9 Выделение плазмидной ДНК.....	26
2.10 Культивирование <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS и индукция экспрессии..	28
2.11 Получение осветленного клеточного лизата.....	28
2.12 Очистка белков методом металлохелатной хроматографии .....	29
2.13 Эксклюзионная хроматография.....	29
2.14 Концентрирование белка и замена буфера на центрифужных фильтрах.....	30
2.15 Электрофорез белков в ПААГ в денатурирующих условиях .....	30
2.16 Нативный электрофорез белков в ПААГ.....	31
2.17 Элюция образцов из ПААГ после нативного электрофореза .....	33
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....</b>	<b>34</b>
3.1 Клонирование генов <i>dhs</i> , <i>dohh</i> и <i>eif5a</i> <i>C. albicans</i> в вектор pACYCDuet-1.....	34
3.2 Выбор экспрессионной системы и коэкспрессия белков.....	36
3.3 Выделение и очистка eIF5A.....	37
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>43</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....</b>	<b>44</b>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГТФ	Гуанозинтрифосфат
ГДФ	Гуанозиндифосфат
LB	Лизогенная среда
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
OD	Оптическая плотность
ЭДТА	Этилендиаминтетрауксусная кислота
ИПТГ	Изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид
ПААГ	Полиакриламидный гель
SDS	Додецилсульфат натрия
ПСА	Персульфат аммония
ТЕМЕД	Тетраметилэтилендиамин
Ni-NTA	Нитрилтриацетат никеля
MWCO	Отсечение по молекулярной массе
МКС	Множественный клонирующий сайт

## ВВЕДЕНИЕ

*Candida albicans* – вид мицелиальных дрожжей, часто выступающий в роли симбионта млекопитающих (Basmacıyan, *et al.*, 2019). Штаммы *C. albicans* обнаруживаются более чем у половины населения, но у подавляющего большинства не вызывают заболеваний (Ward *et al.*, 2017). Однако, лечение методами химиотерапии или антибиотикотерапии, вызывающее подавление иммунитета и нарушение микрофлоры хозяина, позволяет *C. albicans* паразитировать на организме-хозяине, вызывая кандидоз (Costa-de-Oliveira, Rodrigues, 2020; Jawhara, 2022). Это делает *C. albicans* четвертой по распространенности инфекцией, связанной с оказанием медицинской помощи (ИСМП), и самым распространенным эукариотическим нозокомиальным агентом в мире (Diekema *et al.*, 2012).

Кандидозы являются одними из наиболее опасных заболеваний, так как их лечение требует применения дорогостоящих препаратов (Pappas *et al.*, 2018), которые, как правило, обладают большим количеством серьезных побочных эффектов (Perfect, 2017). Это связано с высокой гомологией, а иногда даже идентичностью мишеней препаратов у *C. albicans* и человека (Lee *et al.*, 2021). Это обуславливает необходимость изучения физиологических процессов *C. albicans* для поиска новых высокоселективных мишеней.

Одними из таких перспективных мишеней являются ферменты биосинтеза гипузина: DHS (deoxyhypusine synthase) и ДОНН (deoxyhypusine hydroxylase). Гипузинирование – уникальная посттрансляционная модификация, встречающаяся у высококонсервативного эукариотического фактора трансляции eIF5A (eukaryotic Initiation Factor 5A) в положении Lys50 у человека и Lys51 у дрожжей (Shin *et al.*, 2017), и является необходимой для проявления eIF5A своих функций, в частности способствовать корректному синтезу на рибосоме полипептидов, содержащих три или более последовательных остатка пролина (Abe *et al.*, 2020; Tauc *et al.*, 2021). Отсутствие данной модификации летально для дрожжей (Jansson *et al.*, 2000). Структурные исследования механизма гипузинирования

позволят выявить специфические мишени *C. albicans*, для разработки новых высокоселективных антимикробных препаратов.

Таким образом, целью данной работы является создание системы для гетерологичной коэкспрессии генов *EIF5A*, *dhs* и *dohh* в *E. coli*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Разработать плазмидную конструкцию для коэкспрессии генов *EIF5A*, *dhs* и *dohh* *C. albicans*
- 2) Провести коэкспрессию белков в *E. coli*
- 3) Подобрать условия для очистки eIF5A и проверить наличие модификации



## СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа  
на наличие заимствований

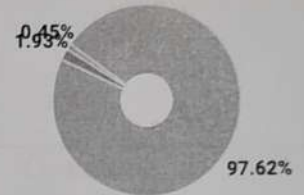
Казанский (Приволжский) федеральный  
университет

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.СТРУКТУРА

Автор работы: Валиахметов Эмиль Эльмирович  
Самоцитирование  
рассчитано для: Валиахметов Эмиль Эльмирович  
Название работы: АП Эмиль  
Тип работы: Не указано  
Подразделение:

### РЕЗУЛЬТАТЫ

ЗАИМСТВОВАНИЯ	1.93%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	97.62%
ЦИТИРОВАНИЯ	0.45%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%



ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 08.06.2022

Модули поиска: ИПС Адилет; Библиография; Сводная коллекция ЭБС; Интернет Плюс; Сводная коллекция РГБ; Цитирование; Переводные заимствования (RuEn); Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu); Переводные заимствования по Интернету (EnRu); Переводные заимствования издательства Wiley (RuEn); eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ; Модуль поиска "КПФУ"; Медицина; Диссертации НББ; Перефразирования по eLIBRARY.RU; Перефразирования по Интернету; Перефразирования по коллекции издательства Wiley; Патенты СССР, РФ, СНГ; СМИ России и СНГ; Шаблонные фразы; Кольцо вузов; Издательство Wiley; Переводные заимствования

Работу проверил: Бабынин Эдуард Викторович

ФИО проверяющего

Дата подписи:

Подпись проверяющего



Чтобы убедиться  
в подлинности справки, используйте QR-код,  
который содержит ссылку на отчет.

Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование  
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.  
Предоставленная информация не подлежит использованию  
в коммерческих целях.