

Создание конструкции для делеции гена *Stm1* у *Candida albicans* с помощью технологии CRISPR/Cas9

Научный руководитель – Валидов Шамиль Завдатович

Хамитов Олег Рамилевич

Студент (бакалавр)

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра генетики, Казань, Россия

E-mail: olegkhamitov@icloud.com

Candida albicans – это одноклеточные грибы, инвазивный потенциал которых многократно увеличивается в условиях нарушения системы антимикробной резистентности хозяина. *Stm1* – это нерибосомный белок который связывается с головным доменом 40S субчастицы дрожжей и исключает связывание с мРНК, тем самым ингибируя синтез белка. Он также играет важную роль в восстановлении грибов после длительных периодов голодания [1]. Мы предполагаем, что делеционные мутанты по гену *Stm1* будут менее устойчивы к стрессовым условиям, что имеет значение при терапии кандидозов. Для проведения делеции методом CRISPR/Cas9 необходимо наличие конструкции с удаленным геном *Stm1*, которая в ходе гомологичной рекомбинации встроится в геном *C. albicans* [2].

Для создания конструкции осуществляющей делецию гена в геноме *C. albicans* был проведен ряд молекулярных клонирований. Для получения начальной конструкции в векторе pAL2-T были клонированы области фланкирующие ген *Stm1* из генома штамма GZY815 так, чтобы инициаторный и стоп кодоны гена *Stm1* не входили в конструктор. В полученной плазмиде, обозначенной как pAL2-T:FlΔ*stm1*, проводилось клонирование кассеты, продуцирующей молекулы направляющей РНК (sgRNA). Для ее конструирования были использованы две нуклеотидные последовательности длиной 20 п.о каждая, из области 3' и 5' гена *Stm1*. Стандартная последовательность sgRNA, необходимая для узнавания Cas9 следовала за каждой из этих последовательностей. Для экспрессии перед кассетой был размещен промотор SNR52, активный в *C. albicans*. Кассета с промотором была вставлена между фланкирующими областями вместо гена *Stm1* с получением плазмиды pAL2-T:FlΔ*Stm1*:sgRNA. Полученная кассета FlΔ*Stm1*:sgRNA была субклонирована в составе вектора pJK-caCas9-NatMX-Neut5L, с имеющимся локусом NEUT5L для эффективной интеграции плазмиды в геном *C. albicans*. Результирующая плаزمида pJK-caCas9-NatMX-Neut5L:FlΔ*Stm1*:sgRNA будет использована для трансформации гаплоидного штамма *C. albicans* GZY815 и получения штамма с делецированным геном *Stm1*.

С помощью созданной конструкции можно получить делеционные мутанты по гену *Stm1*, которые предположительно будут менее устойчивы к стрессовым условиям и позволят изучить значение белка для стрессоустойчивости кандиды, создать более удобные условия для изучения других белков ответственных за синтез белка в *C. albicans*, убрав помеху в виде белка *Stm1*, а также могут использоваться для выделения рибосом, так как комплексы фактора трансляции eIF5a и нетранслирующей рибосомы *C. albicans* могут быть образованы в отсутствие продукта гена *Stm1*.

Источники и литература

- 1) Yusupova, G. High-resolution structure of the eukaryotic 80S ribosome. Annual review of biochemistry, 2014. No 83. C467-486

- 2) Halder, V. Design, execution, and analysis of CRISPR–Cas9-based deletions and genetic interaction networks in the fungal pathogen *C. albicans*. Nature protocols, 2019. No 14(3). С. 955-975