

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 – Биология

Профиль подготовки: Микробиология и вирусология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
CRISPR/Cas9-РЕДАКТИРОВАННЫЙ ШТАММ *BACILLUS SUBTILIS*
КАК ПРОДУЦЕНТ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ *B.*
PUMILUS

Студент 4 курса
группы 01-802

" 1 " июня 2022 г.



(Хасанов Д.И.)

Научный руководитель
д.б.н., профессор

" 1 " июня 2022 г.



(Шарипова М.Р.)

Заведующий кафедрой
микробиологии
д.б.н., профессор

" 1 " июня 2022 г.



(Ильинская О.Н.)

Казань – 2022

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Протеолитические ферменты микроорганизмов	7
1.2 Классификация металлопротеиназ	10
1.3 Металлопротеиназа <i>Bacillus pumilus</i>	16
1.4 Применение металлопротеиназ	19
1.5 Экспрессионные системы на основе CRISPR/Cas9 – редактированных штаммов <i>Bacillus subtilis</i>	23
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	27
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	27
2.1 Штаммы и плазмиды	27
2.2 Питательные среды и условия культивирования	28
2.3 Изучение динамики роста культуры	28
2.4 Определение активности фермента по гидролизу азоказеина	29
2.5 Определение продуктивности культуры	29
2.6 Выделение плазмидной ДНК	30
2.7 Гель – электрофорез ДНК	30
2.8 Трансформация клеток <i>B. subtilis</i> Δ6	30
2.9 Отбор трансформантов методом ПЦР с колонии	31
2.10 Подсчет свободных спор	32
2.11 Статистическая обработка данных	32
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	33
ВЫВОДЫ	45
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	46

ВВЕДЕНИЕ

Ферментные препараты – неотъемлемые компоненты современной индустрии. Основными областями их применения являются медицина (ферменты, гормоны, антитела), пищевая промышленность (производство сыров), кожевенная промышленность (белки используются для размягчения кожи), сельское хозяйство (удобрения, кормовые добавки) и др. [Razzaq *et al.*, 2019]. Наиболее быстрый и дешевый способ для получения нужных человеку белков – биотехнологический метод с использованием рекомбинантных штаммов бактерий-продуцентов.

Использование бактерий для получения максимального количества белка сопряжено с различного рода генетическими модификациями – удалением части генов внеклеточных ферментов штаммов-продуцентов для облегчения и удешевления процесса очистки целевого белка, встраиванием генов целевых белков в соответствующие векторные конструкции, оптимизированные для максимальной экспрессии генов интереса. К генам целевых белков присоединяют сильные промоторы, сигнальные пептиды, «хвосты» для возможности проведения аффинной хроматографии и т.д. Все эти манипуляции позволяют в итоге создать из бактерий-продуцентов максимально эффективные «фабрики» для масштабного производства целевых белков.

Учеными Казанского федерального университета было обнаружено, что природным штаммом *B. pumilus* 3-19 секретируется в окружающую среду минорная протеиназа с неизвестными функциями, классифицированная в дальнейшем как цинкзависимая металлопротеиназа [Балабан с соавт., 2012]. Анализ первичной структуры белка показал, что новая внеклеточная протеиназа бацилл не имеет аналогов среди прокариотических ферментов и занимает промежуточное классификационное положение между двумя крупными семействами металлопротеиназ клана метцинкинов – адамализинами и астацинами [Rudakova *et al.*, 2010, Sabirova *et al.*, 2010].

Данные семейства представлены преимущественно эукариотическими ферментами, играющими важную роль в жизни и здоровье человека. Адамализины человека вовлечены в развитие эпителиальных тканей, пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток сосудов, ангиогенез, апоптоз сосудистых клеток, восстановление тканей, заживление ран. Гиперфункция этих белков может приводить к таким заболеваниям как атеросклероз, гипертония, аневризма, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда и сердечная недостаточность [Zhong, Khalil, 2019; Malemud *et al.*, 2019]. Все эукариотические адамализины – мультидоменные белки. Однако каталитический домен является общим для всех представителей семейства. Структурно металлопротеиназа *B. pumilus* представляет собой именно каталитический домен и, вероятно, эволюционно является предковой формой для белков семейств адамализинов и астацинов.

Для изучения функций данного фермента в бактериальной клетке и поиска потенциальных сфер его применения необходимо достаточное количество чистого белка. Например, это важно для получения и характеристики кристалла белка и проведения рентгеноструктурного анализа, что позволит охарактеризовать его трехмерную структуру: особенности организации активного центра фермента, конформационные изменения при связывании с субстратом, ингибиторами или кофакторами, возможности для изомеризации. Для этого нужна эффективная система экспрессии.

В работе для анализа экспрессии гена металлопротеиназы нами использованы беспротеазные штаммы-реципиенты *Bacillus subtilis* BG2036, *B. subtilis* BRB14 и *B. subtilis* BRB08 с делетированными генами внеклеточных протеаз для эффективной экспрессии целевого белка. Протеазодефицитные штаммы трансформированы генетической конструкцией на базе плазмидного вектора pGP382 с сильным конститутивным промотором гена *degQ36* (P_{degQ36}), несущего ген металлопротеиназы *B. pumilus*. Этот ген кодирует DegQ полипептид (46 а.о.),

который контролирует фосфорилирование двухкомпонентной системы DegS-DegU. Фосфорилированная форма DegU белка (DegU-P) стимулирует в клетках экспрессию генов протеолитических ферментов. Замена единственного нуклеотида в регионе «-10» позволила получить конститутивную активность промотора P_{degQ36} [Takesue *et al.*, 2009], который был использован при создании экспрессионного вектора для гена адамализиноподобной металлопротеиназы *B. pumilus*. Используемые в работе генетическая конструкция и рекомбинантные штаммы были сконструированы сотрудниками НИЛ «Микробные биотехнологии».

В коллекции лаборатории имеется штамм *B. subtilis* Δ6, который получен путем CRISPR/Cas9 редактирования генома штамма *B. subtilis* 168 с делетацией генов профагов [Altenbuchner, 2016]. Функциональная роль профаговых генов в геномах бацилл мало изучена. Возможно, что снятие профаговой нагрузки позволит увеличить экспрессию секретируемых ферментов. Это значит, что потенциально штамм *B. subtilis* Δ6 может являться эффективным продуцентом целевых белков.

Целью исследования явилось сравнительное изучение экспрессии металлопротеиназы *Bacillus pumilus* в CRISPR/Cas9-редактированном и протеазодефицитных штаммах *Bacillus subtilis*.

Задачи исследования:

1) Трансформировать генетической конструкцией, содержащей ген металлопротеиназы *B. pumilus* 3-19 под контролем сильного конститутивного промотора p_{DegQ36} , CRISPR/Cas9-редактированный штамм *B. subtilis* Δ6.

2) Изучить динамику роста и накопления активности металлопротеиназы *B.pumilus* 3-19 в культуральной жидкости рекомбинантных протеазодефицитных штаммов *B. subtilis* BG2036, *B. subtilis* BRB08, *B. subtilis* BRB14.

3) Изучить динамику роста и накопления протеолитической активности в культуральной жидкости CRISPR/Cas9-редактированного штамма *B. subtilis*, экспрессирующего ген металлопротеиназы *B.pumilus* 3-19.

ВЫВОДЫ

1) Получен рекомбинантный штамм *B. subtilis* Δ6 (pGP382+mprBp) на основе CRISPR/Cas9-редактированного штамма *B. subtilis* с удаленными профаговыми областями, который экспрессирует ген металлопротеиназы *B. pumilus* 3-19.

2) Установлено, что экспрессия гена металлопротеиназы *B. pumilus* 3-19 снижается в рекомбинантных протеазодефицитных штаммах *B. subtilis* в зависимости от количества делетированных в геноме генов внеклеточных протеиназ. Максимальная экспрессия (4,37 ед.) получена в штамме BG2036 с делецией двух генов внеклеточных протеиназ, в штамме BRB08 с делецией 9 генов – 3,37 ед., в штамме BRB14 с делецией 11 генов – 0,8 ед.

3) Штамм *B. subtilis* Δ6 (pGP382+mprBp), полученный на основе CRISPR/Cas9-редактированного штамма *B. subtilis* с удаленными областями профагов, экспрессирует металлопротеиназу в культуральную жидкость на протяжении всего периода роста с максимумом активности на 46 час, составившим 3.17 ед.