

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

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление: 06.04.01 (ОКСО 020400.68) – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская диссертация

**Регуляция активности генов *macAB* *Serratia marcescens* SM6**

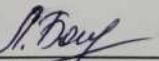
**Работа завершена:**

«06» 06 2019 г.  (М.Н. Аммар)

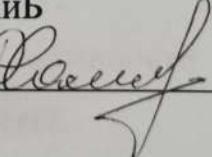
**Работа допущена к защите:**

Научные руководители

к.б.н., в.н.с. НИЛ Микробные биотехнологии

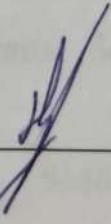
«06» 06 2019 г.  (Л.М. Богомольная)

к.б.н., доцент каф. генетики ИФМиБ

«06» 06 2019 г.  (Р.Г. Хамидуллина)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

«06» 06 2019 г.  (В.М. Чернов)

Казань – 2019

## **СОДЕРЖАНИЕ**

<b>СОДЕРЖАНИЕ</b>	2
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	5
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	8
1.1 Эффлюкс системы бактерий	8
1.1.1 Классификация эффлюкс систем	8
1.1.2 Механизмы экструзии антибиотиков эффлюкс системами	11
1.1.3 Физиологическая роль эффлюкс систем	12
1.2 Эффлюкс системы <i>Serratia marcescens</i> .	14
1.2.1 Характеристика бактерий рода <i>Serratia</i>	14
1.2.2 Эффлюкс системы в <i>S. marcescens</i>	17
1.3 Регуляция функционирования эффлюкс систем	17
1.4 Эффлюкс система MacAB	20
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	23
2.1 Используемые штаммы бактерий, плазиды	23
2.2 Питательные среды	23
2.3 Выделение геномной ДНК	24
2.4 Амплификация промоторной области <i>macAB</i>	24
2.5 Клонирование промоторной области <i>macAB</i> в плазмиду pNN387:	25
2.6 Приготовление электрокомпетентных клеток <i>S. marcescens</i> SM6 и проведение электропорации.	26
2.7 Измерение β-галактозидазной активности	27
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b>	29
3.1 Получение рекомбинантных штаммов <i>S. marcescens</i> SM6 несущих плазмиду pNN387, содержащую гены бета-галактозидазы под контролем промотора <i>PmacAB</i> .	29
3.2 Отбор клонов <i>S. marcescens</i> SM6 pNN387- <i>PmacAB</i> , обладающих наибольшей β-галактозидазной активностью.	31

3.3 Анализ активности промотора <i>PmacAB</i> при росте <i>S. marcescens</i> SM6 pNN387- <i>PmacAB</i> в разных условиях культивирования.	33
--	----

## **ВЫВОДЫ**

## **СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ**

33

36

37

## ВВЕДЕНИЕ

Инфекции, вызванные патогенными бактериями с мультирезистентностью, быстро распространяются по всему миру и грозят стать неизлечимыми [Poole, 2007]. В то же время отсутствуют новые эффективные антибиотики для их лечения, в связи с чем увеличивается ежегодное количество бактериальных инфекций со смертельным исходом. Очевидно, что назрела необходимость в понимании молекулярных механизмов возникновения бактериальной антибиотикоустойчивости.

Многие заболевания и инфекции человека и животных обусловливаются грамотрицательными бактериями семейства *Enterobacteriaceae*, такими как *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri* и другие. В отличие от них, бактерии вида *Serratia marcescens* долгое время считались безвредным, поскольку они обычно обитают вне человеческого организма. И лишь в последнее время накопленные данные показали, что *S. marcescens* является одним из опасных возбудителей внутрибольничных инфекций. *S. marcescens* может вызывать инфекции мочевыводящих, дыхательных путей, эндокардита, септицемию, инфекцию кровотока. *S. marcescens* оказывает специфическое влияние на центральную нервную систему, особенно у новорожденных с низкой массой тела при рождении, а также пациентов с ослабленной иммунной системой [Hejazi, Falkiner, 1997; Mahlen, 2011].

Активное удаление антибиотиков и других токсических метаболитов из грамотрицательных бактерий с помощью эффлюксных систем является одним из основных механизмов устойчивости бактерий к антибиотикам, эффлюкс системы могут быть самым быстрым действующим, и наиболее эффективным механизмом устойчивости в бактериальном адаптации к стрессовым условиям, они также играют ключевую роль в выживании бактерий в экосистемах, поддержки гомеостаза клетки, межклеточной трансдукции сигнала [Dietrich *et al.*, 2006; Martinez *et al.*, 2009]. Среди

энтеробактерий, эффлюкс системы были наиболее интенсивно изучены у *E. coli* и *Salmonella enterica*. Несколько эффлюкс систем, которые принадлежат к различным семействам, были также обнаружены в *S. marcescens*. [Mardanova et al., 2014]. Биоинформационический анализ генома *S. marcescens* позволил идентифицировать неизвестные эффлюксные системы на основе их гомологии с соответствующими генами *E. coli*. Таким образом была обнаружена, например система *macAB*. Идентификация эффлюксных систем в геноме *S. marcescens* будет способствовать нашему пониманию физиологии этих бактерий, выявлению новых молекулярных механизмов резистентности к антимикробиальным препаратам.

Клинические и лабораторные данные свидетельствуют о том, что эффлюкс системы принимают участие не только в процессе активной экскреции антибиотиков, но и в вирулентности и адаптации бактерий к стрессу. Было выявлено, что система *macAB* необходима для инактивации действия активных форм кислорода *in vitro* в *Salmonella enterica* ser. *Typhimurium*, где бактерии дикого типа или супернатант из бактериальной суспензии дикого типа, выращенных в присутствии пероксида, восстанавливают рост мутантных организмов с делецией системы *macAB* [Bogomolnaya et al., 2013].

Таким образом, актуальной задачей является понимание характеристики эффлюкс систем при разных условиях, их регуляции и роль при оксидативном стрессе, что поможет прояснить молекулярные механизмы, управляющие поведением бактерий, и обеспечат новую базу для разработки эффективной лекарственной терапии. В связи с чем, в нашей работе, были созданы штаммы бактерий, несущие гены *lacZY* под контролем промотора *macAB*, с последующей оценкой уровня экспрессии бета-галактозидазы при разных условиях культивирования, для изучения условий экспрессии и регуляции эффлюкс системы *macAB*. Задачи Работы являются:

- 1) Получить рекомбинантный штамм *S. marcescens* SM6 pNN387-Р*macAB*, несущий гены *lacZY* под контролем промотора генов *macAB*.

2) Отобрать штамм *S. marcescens* SM6 pNN387-PmacAB, обладающий наибольшей  $\beta$ -галактозидазной активностью.

3) Охарактеризовать активность промотора PmacAB при культивировании в питательном бульоне LB, а также в присутствии  $H_2O_2$ .

При культивировании в питательном бульоне LB промотор PmacAB не показывает активности, что связано с тем, что в геноме убийческого штамма *S. marcescens* SM6 отсутствует ген, кодирующий белок, необходимый для активации промотора PmacAB. Для решения данной проблемы можно использовать генетическую инженерию, включая трансформацию генома бактерии, введение гена, кодирующего белок, способный активировать промотор PmacAB.

Важно отметить, что увеличение концентрации свободных ионов фтора в среде приводит к активации промотора PmacAB, что связано с наличием геномных участков, чувствительных к фторидам. Установлено, что дыхание фтором способно вызвать активацию промотора PmacAB, что связано с тем, что фториды обладают способностью связывать ионные пары, что приводит к стабильности гипергидратированного состояния воды, что в свою очередь, способствует активации промотора PmacAB.

Использование методов геномной гипергидратации позволяет изучать различные механизмы действия антибиотиков и антибиотикорезистентности, а также изучать механизмы регуляции генов, ответственных за развитие различных стратегий адаптации к антибиотикам [Горбунова, 2016].

#### 4. Классификация бактерий

Бактерии, как и все живые организмы, классифицируются по различным признакам: морфологическим, физиологическим, генетическим и т.д. В основе классификации бактерий лежат генетические различия между видами, что позволяет выделить различные виды бактерий на основе генетических различий между ними. Генетическая классификация бактерий основана на изучении генетического материала, который передается от родителей к потомкам. Генетическая классификация бактерий основана на изучении генетического материала, который передается от родителей к потомкам. Генетическая классификация бактерий основана на изучении генетического материала, который передается от родителей к потомкам.

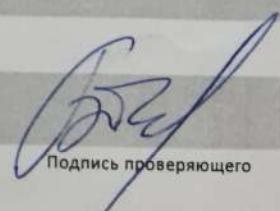


## СПРАВКА о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

Проверка выполнена в системе  
Антиплагиат.ВУЗ

Автор работы	Аммар Манаф Нур Алдин
Подразделение	
Тип работы	Магистерская диссертация
Название работы	Регуляция активности генов macAB Serratia marcescens SM6
Название файла	Аммар M..docx
Процент заимствования	5,34%
Процент цитирования	0,44%
Процент оригинальности	94,22%
Дата проверки	14:25:26 31 мая 2019г.
Модули поиска	Сводная коллекция ЭБС; Коллекция РГБ; Цитирование; Модуль поиска переводных заимствований; Коллекция eLIBRARY.RU; Коллекция ГАРАНТ; Модуль поиска Интернет; Модуль поиска "КПФУ"; Коллекция Медицина; Модуль поиска перефразирований eLIBRARY.RU; Модуль поиска перефразирований Интернет; Модуль поиска общеупотребительных выражений; Кольцо вузов

Работу проверил	Бабынин Эдуард Викторович
	ФИО проверяющего
Дата подписи	05.06.2019

  
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.  
Представленная информация не подлежит использованию  
в коммерческих целях.