

**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 (специальность): 06.04.01 – Биология

Профиль (специализация, магистерская программа): Микробиология и вирусология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ


**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ СЕКРЕТИРУЕМЫХ
ГУАНИЛПРЕДПОЧИТАЮЩИХ РИБОНУКЛЕАЗ В
РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММАХ БАЦИЛЛ**

Обучающийся 2 курса
группы 01-040-2




А.Ю. Басенко

Научный руководитель
канд. биол. наук, доцент



В.В. Ульянова

Заведующий кафедрой микробиологии
д-р биол. наук, профессор



О.Н. Ильинская

Казань – 2022

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
ВВЕДЕНИЕ	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Характеристика секретируемых рибонуклеаз бацилл	6
1.1.1 Общая характеристика рибонуклеаз	6
1.1.2 Сравнительная характеристика рибонуклеаз <i>B. subtilis</i> и <i>B. amyloliquefaciens</i>	8
1.1.3 Функции рибонуклеаз	9
1.1.4 Биологические эффекты гуанилпредпочитающих рибонуклеаз бацилл	11
1.2 Регуляция экспрессии генов у бацилл	11
1.2.1 Фенотипическая гетерогенность бацилл	12
1.2.2 Двухкомпонентные регуляторные системы	12
1.2.3 Двухкомпонентная система трансдукции сигнала ResD-ResE	13
1.2.4 Система Spo0A-фосфопередачи	14
1.2.5 Двухкомпонентная система трансдукции сигнала PhoP-PhoR	17
1.2.6 Двухкомпонентная система трансдукции сигнала DegS-DegU	19
1.2.7 Экспрессия генов бацилл в период постэкспоненциального роста	20
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	23
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	23
2.1 Материалы	23
2.1.1 Бактериальные штаммы	23
2.1.2 Плазмиды	23
2.1.2 Питательные среды	24
2.1.3 Антибиотики	26
2.2 Методы исследования	27
2.2.1 Условия культивирования	27
2.2.2 Трансформация <i>Bacillus subtilis</i>	27
2.2.3 Определение РНКазной активности	27
2.2.4 Определение амилолитической активности	28

2.2.5 Микроскопия	28
2.2.6 Методы статистического анализа	28
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	29
3.1 Получение штаммов <i>Bacillus subtilis</i> , несущих репортерные конструкции на основе промоторов генов рибонуклеаз и гена зеленого флуоресцентного белка	29
3.2 Анализ активности промоторов генов рибонуклеаз в рекомбинантных штаммах <i>Bacillus subtilis</i>	33
3.3 Оценка активности внеклеточных рибонуклеаз в мутантных штаммах <i>Bacillus subtilis</i>	39
ВЫВОДЫ	45
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	46

ВВЕДЕНИЕ

Исследование рибонуклеаз (РНКаз) является актуальным направлением современной науки из-за их значимости в жизнедеятельности организмов и перспективности практического применения. Живые организмы образуют несколько видов внутриклеточных и внеклеточных РНКаз, которые участвуют во всех этапах метаболизма РНК в клетках и за их пределами. РНКазы обладают противоопухолевой и противовирусной активностью [Заболоцкая, 2020; Müller *et al.*, 2017; Shilova *et al.*, 2021], что позволяет рассматривать их в качестве потенциальных терапевтиков. РНКазы успешно применяются в разнообразных научных направлениях, среди которых молекулярная биология, микробиология и геновая инженерия. С помощью рибонуклеаз возможно получение трансгенных растений [Maksimov *et al.*, 2019], разрабатываются биотехнологии для удаления РНК из биологического материала, а также векторов для создания рекомбинантных штаммов бактерий. Проводятся исследования функциональных возможностей нуклеотидов и их связей с белками. Для понимания особенностей функционирования РНКаз в живых организмах необходимы сведения об условиях их образования.

Секретируемые гуанилпредпочитающие рибонуклеазы *Bacillus amyloliquefaciens* (барназа) и *Bacillus pumilus* (биназа) являются структурными гомологами со сходными физико-химическими и каталитическими свойствами. Однако различное строение промоторов генов биназы и барназы указывает на их активность в неодинаковых условиях. Биосинтез биназы индуцируется в условиях дефицита неорганического фосфата и контролируется системой трансдукции сигнала PhoP–PhoR в то время как биосинтез барназы осуществляется независимо от содержания фосфата в окружающей среде и контролируется многофункциональным регулятором транскрипции Spo0A [Ulyanova *et al.*, 2015].

Основной целью работы являлась сравнительная оценка активности секретируемых гуанилпредпочитающих рибонуклеаз – биназы и барназы – в рекомбинантных штаммах *Bacillus subtilis*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Получить штаммы *Bacillus subtilis*, несущие репортерные конструкции на основе промоторов генов рибонуклеаз *Bacillus amyloliquefaciens* (барназы) и *Bacillus pumilus* (биназы) и гена зеленого флуоресцентного белка GFP.
- 2) Проанализировать активность промоторов генов РНКаз в полученных рекомбинантных штаммах при их культивировании на питательных средах различного состава.
- 3) Внести в геном репортерных штаммов *Bacillus subtilis* ген барназы и биназы совместно с геном внутриклеточного ингибитора барстара.
- 4) Оценить активность внеклеточных рибонуклеаз в полученных рекомбинантных штаммах и сравнить ее с активностью в штаммах *Bacillus subtilis* с делециями оперонов *skf* и *sdp*.

ВЫВОДЫ

1) Были получены штаммы *Bacillus subtilis*, несущие репортерные конструкции на основе промоторов генов рибонуклеаз *Bacillus amyloliquefaciens* (барназы), *Bacillus pumilus* (биназы), ингибитора рибонуклеаз барстара и гена зеленого флуоресцентного белка GFP.

2) Было показано, что промотор гена рибонуклеазы биназы активируется в стадию замедления роста бактериальной популяции на среде ВМ, при этом его активность при выращивании бактерий на средах LB, ВФМ и БФС практически не детектируется.

3) Были созданы штаммы *Bacillus subtilis*, несущие полные гены барназы и биназы совместно с геном внутриклеточного ингибитора барстара, а также репортерные конструкции на основе промоторов генов рибонуклеаз и гена зеленого флуоресцентного белка GFP.

4) Было установлено, что в рекомбинантных штаммах *Bacillus subtilis*, содержащих гены барназы и биназы продукция внеклеточных ферментов повышается в 2 раза по сравнению с исходным штаммом, а в штамме с делецией оперонов *skf* и *sdp* дополнительно увеличивается в 1.5 раза.