

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 (магистерская программа): Микробиология и вирусология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ  
**ИНАКТИВАЦИЯ ГЕНА МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ *BACILLUS*  
*PUMILUS* МЕТОДОМ CRISPR/CAS9 РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА**

Обучающийся 2 курса  
группы 01-240-2



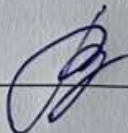
Хасанов Д.И.

Научный руководитель  
д-р биол. наук, профессор



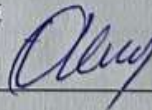
Шарипова М.Р.

Научный руководитель  
канд. биол. наук, с.н.с



Рудакова Н.Л.

Заведующий кафедрой микробиологии  
д-р биол. наук, профессор



Ильинская О.Н.

Казань – 2024

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>4</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>6</b>
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Протеолитические ферменты микроорганизмов.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2 Классификация металлопротеиназ.....</b>	<b>13</b>
<b>1.3 Металлопротеиназа <i>Bacillus pumilus</i>.....</b>	<b>20</b>
<b>1.4 Стратегии редактирования генома для представителей рода <i>Bacillus</i> с использованием CRISPR/Cas9 технологии.....</b>	<b>24</b>
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....</b>	<b>29</b>
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Штаммы и плазмиды.....</b>	<b>29</b>
<b>2.2 Питательные среды и культивирование.....</b>	<b>29</b>
<b>2.3 Выделение плазмидной ДНК.....</b>	<b>30</b>
<b>2.4 Выделение геномной ДНК.....</b>	<b>30</b>
<b>2.5 Полимеразная цепная реакция (ПЦР).....</b>	<b>31</b>
<b>2.6 Гель-электрофорез ДНК.....</b>	<b>32</b>
<b>2.7 Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля и очистка ПЦР-продуктов от реакционной смеси.....</b>	<b>32</b>
<b>2.8 Осаждение векторов этанолом.....</b>	<b>33</b>
<b>2.9 Конструирование плазмиды для инактивации гена металлопротеиназы <i>B. pumilus</i> 3-19.....</b>	<b>33</b>
<b>2.10 Трансформация <i>E. coli</i> DH5<math>\alpha</math>.....</b>	<b>36</b>
<b>2.11 Трансформация клеток <i>B. pumilus</i> 3-19.....</b>	<b>37</b>
<b>2.12 Целевая инактивация гена-мишени.....</b>	<b>38</b>
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Конструирование плазмиды rKDm06.23 для инактивации гена металлопротеиназы <i>B. pumilus</i> 3-19.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2 Трансформация <i>B. pumilus</i> 3-19 полученной векторной</b>	<b>45</b>

конструкцией pKDm06.23.....	
<b>3.3 Получение делеционного мутанта <i>B. pumilus</i> 3-19 <math>\Delta mprBp</math> и</b>	<b>48</b>
<b>подтверждение отсутствия функционального гена</b>	
<b>металлопротеиназы <i>mprBp</i> методом ПЦР.....</b>	
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>51</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....</b>	<b>52</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Многие представители вида *Bacillus pumilus* характеризуются способностью к синтезу самых разнообразных метаболитов, наиболее значимыми из которых являются различные внеклеточные белки и ферменты (в основном протеазы, липазы, амилазы, и др.). Используемый в настоящей работе штамм *B. pumilus* 3-19, представляющий собой производное природного изолята *B. pumilus* 7P проявляет повышенную активность в отношении секреции различных внеклеточных гидролаз, например, таких как протеазы.

Представители рода *Bacillus* секретируют протеазы во время стационарной фазы роста как часть процесса их адаптации, что позволяет клеткам оптимально использовать доступные ресурсы и тем самым обеспечивать выживание. Для обоих геномов *B. pumilus* (7P и 3-19) обнаружено 10 генов секретируемых протеолитических ферментов. Среди них подтверждены гены сериновых протеаз (субтилизиноподобной протеазы (*aprBp*) и глутамилэндопептидазы (*gseBp*)) и металлопротеиназ (*mprBp*) [Pudova *et al.*, 2022].

Металлопротеиназа *B. pumilus* 3-19 (MprBp) была впервые выделена и охарактеризована учеными Казанского федерального университета. Анализ аминокислотной последовательности белка позволил установить, что металлопротеиназа *B. pumilus* 3-19 представляет собой первый бактериальный фермент-гомолог эукариотических металлопротеиназ клана метцинкинов – астацинов и адамализинов среди внеклеточных протеиназ бацилл и не имеет гомологов среди других протеолитических ферментов прокариот [Rudakova *et al.*, 2010, Sabirova *et al.*, 2010, Балабан с соавт. 2012]. Эти семейства представлены в основном эукариотическими протеазами, играющими важную роль в жизни и здоровье человека. Представители данных семейств участвуют в процессах регенерации, развитии эпителиальных тканей, эмбриогенезе и т.д. Тем не менее, гиперпродукция

этих ферментов может являться маркерами различных патологий, а также приводить к таким заболеваниям, как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца и др. [Zhong, Khalil, 2019; Malemud *et al.*, 2019].

Определено, что все адамализины эукариот представлены мультидоменными белками. Тем не менее, каталитический домен является общим для всех представителей семейства. Структура активного центра металлопротеиназы *B. pumilus* 3-19 высококонсервативна и уникально сочетает в себе признаки семейств как адамализинов, так и астацинов. В связи с этим можно выдвинуть предположение о том, что металлопротеиназа *B. pumilus* 3-19 является эволюционно предковой формой для белков данных семейств, что в свою очередь формирует научный интерес к изучению функциональной роли исследуемого фермента у бацилл, а также к поиску потенциальных областей его применения.

В предварительных исследованиях с использованием регуляторных мутантов *B. subtilis* были описаны пути регуляции экспрессии гена металлопротеиназы. Было установлено, что экспрессия гена *mprBp* контролируется механизмами азотной катаболитной репрессии и контролируется системой транспорта аммония AmtB-GlnK, выполняющую регуляторную роль в условиях азотного голодания у бактерий [Рудакова с соавт., 2016]. Также была установлена роль двухкомпонентных сигнальных систем Deg и Sro в регуляции активности металлопротеиназы *B. pumilus* 3-19 [Rudakova *et al.*, 2024]. Кроме того, были получены штаммы-продуценты *B. subtilis*, несущие плазмидный вектор pGP382 с геном металлопротеиназы *mprBp*, находящимся под контролем сильного конститутивного промотора гена *degQ36* ( $P_{degQ36}$ ), и используемые для наработки исследуемого белка для проведения рентгеноструктурного анализа, что позволит охарактеризовать трехмерную структуру фермента [Khasanov *et al.*, 2022].

Для изучения функций металлопротеиназы *B. pumilus* в бактериальной клетке необходимо исследовать, как инактивация гена фермента скажется на физиологических характеристиках полученного делеционного мутанта в

сравнении с нативным штаммом. Сравнительный анализ полученных данных позволит установить роль фермента в клетках *B. pumilus* 3-19.

Целью настоящей работы явилось получение штамма *B. pumilus* 3-19 с редактированным геномом путем целевой инактивации гена внеклеточной металлопротеиназы *mprBp*.

В соответствии с поставленной целью, в работе решались следующие задачи:

1) Получить плазмидный вектор для инактивации гена металлопротеиназы *mprBp* на основе плазмиды pJOE9282.1, содержащей систему редактирования генома CRISPR/Cas9.

2) Трансформировать полученной векторной конструкцией штамм *B. pumilus* 3-19.

3) Провести индукцию системы редактирования генома CRISPR/Cas9 для инактивации гена металлопротеиназы *mprBp*.

4) Установить отсутствие функционального гена металлопротеиназы *mprBp* в геноме *B. pumilus* 3-19  $\Delta mprBp$  методом ПЦР.

## ВЫВОДЫ

1) Получен вектор pKDm06.23 для целевой инактивации гена металлопротеиназы *mprVp* с помощью технологии редактирования генома CRISPR/Cas9 на основе плазмиды pJOE9282.1. Целостность полученной конструкции подтверждена секвенированием и методом ПЦР.

2) Получены трансформанты *B. pumilus* 3-19 с векторной конструкцией pKDm06.23 методом электропорации бактериальных клеток.

3) Получен мутант *B. pumilus* 3-19  $\Delta mprVp$  путем индукции системы редактирования генома CRISPR/Cas9.

4) Установлено отсутствие функционального гена металлопротеиназы *mprVp* в геноме *B. pumilus* 3-19  $\Delta mprVp$  методом ПЦР.