

УДК 579.258:577.15

## ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ МЕТАЛЛОЭНДОПЕПТИДАЗЫ *BACILLUS PUMILUS* 3-19

© 2025 г. Н. Л. Рудакова\*, Д. И. Хасанов, М. Р. Шарипова

Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет,  
420008, Казань, Россия

\*e-mail: natalialrudakova@mail.ru

Поступила в редакцию 15.10.2024 г.

После обработки 22.11.2024 г.

Принята к публикации 25.11.2024 г.

Минорная цинк-зависимая металлоэндопептидаза, секретируемая почвенным штаммом *Bacillus pumilus* 3-19, занимает уникальное промежуточное классификационное положение между двумя семействами клана метцинкинов: адамализинами и астацинами. Для возможности более детального изучения функциональной роли металлоэндопептидазы необходимо получить чистый препарат белка в достаточном количестве. Так как собственная секреция фермента штаммом *B. pumilus* 3-19 крайне низкая, были сконструированы рекомбинантные штаммы-продуценты металлоэндопептидазы MprBp на основе беспротеазных штаммов *Bacillus subtilis*, а также метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*. Полученные штаммы были оценены по эффективности продукции металлоэндопептидазы. Наибольшей продукцией целевого белка обладал штамм *B. subtilis* BG2036+*mprBp*.

**Ключевые слова:** металлоэндопептидаза, продукция белка, рекомбинантный штамм, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Pichia pastoris*

DOI: 10.31857/S0026365625020062

Природный штамм *Bacillus pumilus* 3-19 секретирует в окружающую среду минорную протеиназу с неизвестными функциями. Фермент был впервые выделен в высокоочищенном состоянии, что позволило с использованием масс-спектрометрических методов установить его аминокислотную последовательность (Sabirova et al., 2010). Анализ первичной структуры белка выявил консервативные последовательности, имеющие классификационное значение. На основании совокупности полученных данных протеиназа *B. pumilus* классифицирована нами как цинк-зависимая металлоэндопептидаза, сочетающая в себе признаки двух семейств клана метцинкинов — астацинов (M12A по базе данных MEROPS) и адамализинов/репролизинов (M12B) (MEROPS Database). Семейство астацинов включает эукариотические и прокариотические белки. Представители данного семейства (преимущественно меприны и костный морфогенетический белок) принимают участие в процессах развития зародыша и морфогенезе, ремоделировании и дифференцировке тканей, содействуют образованию хрящей и костей, а также биосинтезу

коллагена (Bond, 2019). Семейство адамализинов/репролизинов включает только ферменты эукариотического происхождения, они все имеют мультидоменную структуру. Ферменты группы адамализинов активно участвуют в процессах деления клеток, роста и деградации тканей, а значит во многом определяют такие процессы, как органогенез эмбриона и метастазирование (Zhong et al., 2019; Huang et al., 2020; Serrano-Garrido et al., 2020). Филогенетически металлопротеиназа *B. pumilus* представляет собой эволюционно более древнюю форму эукариотических гомологов. При этом функциональная роль фермента не ясна (Rudakova et al., 2024). Для проведения структурного анализа белка необходимо получить чистый препарат фермента в количествах, достаточных для исследования. Так как для исходного штамма металлопротеиназа MprBp является минорным белком, то для наработки белка в препаративных количествах были получены рекомбинантные штаммы-продуценты.

Целью исследования явилась оценка эффективности рекомбинантных штаммов-продуцентов

металлопротеиназы *B. pumilus*, сконструированных на основе беспротеазных штаммов *B. subtilis* и мелиотрофных дрожжей *Pichia pastoris*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ  
ИССЛЕДОВАНИЯ

**Штаммы и плазмиды.** Все штаммы-продуценты, приведенные в данной работе (табл. 1), содержали в конструкции векторов аффинную метку – Strep-tag для бацилярного вектора pGP382 и His-tag для дрожжевых векторов.

**Среды и условия культивирования.** В качестве питательной среды для культивирования штаммов бацилл использовали LB-агар и LB-бульон. Антибиотики эритромицин и стрептомицин вносили в конечной концентрации 10 и 50 мкг/мл соответственно. Для трансформации *B. subtilis* BRB11 методом электропорации использовали среду восстановления SOC1 и электропорационный буфер АЕВ (Shen et al., 2013).

Культивирование дрожжей проводили на среде, обогащенной глицерином (ВМГУ), и среде, обогащенной метанолом (ВММУ), приготовленными на основе руководства Invitrogen PichiaPink™

Таблица 1. Штаммы и плазмиды, использованные в работе

Штамм	Характеристика вектора	Характеристика штамма-реципиента	Штамм-продуцент MprBp
<i>B. pumilus</i> 3-19	—	<i>str<sup>R</sup></i>	Коллекция НИЛ “Агробиоинженерия” ИФМиБ КФУ (Pudova et al. 2022)
<i>B. subtilis</i> BG2036 (pGP382 <i>mprBp</i> )	Вектор pGP382 содержит модифицированный сильный конститутивный промотор гена <i>degQ</i> . <i>Erm<sup>R</sup></i>	Δ <i>nprE</i> , Δ <i>arg</i> предоставлен проф. Е. Феррари, “Genencor Int. Inc.”, США	Коллекция НИЛ “Агробиоинженерия” ИФМиБ КФУ (Toymentseva et al. 2016)
<i>B. subtilis</i> BRB08 (pGP382 <i>mprBp</i> )		Δ <i>trpC2</i> , Δ <i>nprB</i> , Δ <i>aprE</i> , Δ <i>epg</i> , Δ <i>bpr</i> , Δ <i>nprE</i> , Δ <i>mpr</i> , Δ <i>vpr</i> , Δ <i>wprA</i> “Cobra Biologics”, Великобритания	Коллекция НИЛ “Агробиоинженерия” ИФМиБ КФУ (Khasanov et al. 2022)
<i>B. subtilis</i> BRB11 (pGP382 <i>mprBp</i> )		Δ <i>trpC2</i> , Δ <i>nprB</i> , Δ <i>aprE</i> , Δ <i>epg</i> , Δ <i>bpr</i> , Δ <i>nprE</i> , Δ <i>mpr</i> , Δ <i>vpr</i> , Δ <i>wprA</i> , Δ <i>htrA</i> “Cobra Biologics”, Великобритания	Данное исследование
<i>B. subtilis</i> BRB14 (pGP382 <i>mprBp</i> )		Δ <i>trpC2</i> , Δ <i>nprB</i> , Δ <i>aprE</i> , Δ <i>epg</i> , Δ <i>bpr</i> , Δ <i>nprE</i> , Δ <i>mpr</i> , Δ <i>vpr</i> , Δ <i>wprA</i> , Δ <i>htrA</i> , Δ <i>htrB</i> “Cobra Biologics”, Великобритания	Коллекция НИЛ “Агробиоинженерия” ИФМиБ КФУ (Khasanov et al. 2022)
<i>B. subtilis</i> Δ6 (pGP382 <i>mprBp</i> )		Δ <i>SPβ</i> , Δ <i>skin</i> , Δ <i>PBSX</i> , Δ <i>proΦ1</i> , Δ <i>proΦ2</i> , Δ <i>proΦ3</i> Проф. Д. Альтенбухнер, Германия (Altenbuchner, 2016)	Коллекция НИЛ “Агробиоинженерия” ИФМиБ КФУ (Khasanov et al. 2022)
<i>P. pastoris</i> HC- <i>mprBpP5</i>	Высококопийный вектор pPINK-HC с последовательностью сигнального пептида альфа-фактора <i>Saccharomyces cerevisiae</i> и геном <i>mprBp</i>	PichiaPink™ Expression System (“Invitrogen”) (Δ <i>ade2</i> , Δ <i>pep4</i> , Δ <i>prb1</i> )	Данное исследование
<i>P. pastoris</i> LC- <i>mprBpP9</i>	Низкокопийный вектор pPINK-LC с последовательностью сигнального пептида альфа-фактора <i>Saccharomyces cerevisiae</i> и геном <i>mprBp</i>		Данное исследование

Expression System (“Invitrogen”, США) (PichiaPink™ manual).

**Конструирование рекомбинантного штамма *B. subtilis* BRB11 (pGP382mprBp).** Протеазодефицитный штамм-реципиент *B. subtilis* BRB11 трансформировали конструкцией pGP382mprBp, предварительно выделенной из штамма *B. subtilis* BG2036 (pGP382mprBp) набором для выделения плазмидной ДНК Plasmid-250-mini (“Биолабмикс”, Россия). Трансформацию проводили методом электропорации бактериальных клеток по методике Shen, оптимизированной по Danilova et al., (Shen et al., 2013; Danilova et al., 2022).

**Конструирование штаммов-продуцентов *P. pastoris*.** Кодон-оптимизированная последовательность гена *mprBp* (синтезирована “Евроген”, Россия) по сайтам рестрикции MlyI (5'-конец гена) и KpnI (3'-конец гена) была клонирована в рабочие векторы pPINK-НС и pPINK-LC.

Полученные векторные конструкции были трансформированы в беспротеазный штамм *P. pastoris* PichiaPink4 (ade2, pep4, prb1) методом электропорации с помощью Gene Pulser Xcell™ Electroporator system (“BioRad”, США) (Madden et al., 2015).

Все манипуляции с дрожжами были проведены на основе руководства Invitrogen PichiaPink™ Expression System (“Invitrogen”, США) (PichiaPink™ manual).

**Динамика роста культуры.** Рост бактерий оценивали по изменению оптической плотности культуры на спектрофотометре xMark (“BioRad”, США) при длине волны излучения  $\lambda=600$  нм с интервалом в 4 ч.

**Определение протеолитической активности.** Протеолитическую активность определяли по расщеплению азоказеина. За единицу активности принимали количество фермента, гидролизующее в условиях эксперимента 1 мкг субстрата за 1 мин (Demidyuk et al., 2004). Специфический ингибитор металлопротеаз 1,10-фенантролин (“Sigma-Aldrich”, США) вносили в пробу культуральной жидкости за 5 мин до постановки активности в конечной концентрации 5 мМ. Для расчета показателя уровня активности (ед. акт./мл среды) для штаммов бацилл брали максимальное значение уровня протеолитической активности в культуральной жидкости (24–48 ч роста), для дрожжей — через 24 ч после индукции метанолом.

**Статистическая обработка результатов.** Эксперименты по анализу роста культуры и оценке протеолитической активности проводились в четырех повторностях. Данные обрабатывали с помощью статистического программного обеспечения Statgraphics Plus 5.0 и GraphPad Prism 7.05 для среднего  $\pm$  SD. Для определения уровня дисперсии данных использовали *t*-тест Стьюдента,

дисперсионный анализ (ANOVA) и тест Тьюки (Steel et al., 1997). Значение  $P < 0.05$  (\*) указывало на статистически значимые различия.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исходный штамм *B. pumilus* 3-19 продуцирует минорную цинк-зависимую металлоэндопептидазу (MprBp) в крайне низких количествах (рисунок). Так как металлопротеиназа MprBp не имеет специфического субстрата, оценить уровень ее активности напрямую не представляется возможным. В связи с чем оценку уровня протеолитической активности MprBp проводили на основании разницы между общим уровнем активности протеаз и уровнем активности в присутствии специфического ингибитора металлопротеиназ 1,10-фенантролина. Для всех использованных в работе штаммов-реципиентов собственный уровень протеолитической активности в присутствии 1,10-фенантролина статистически не отличался от уровня активности без ингибитора.

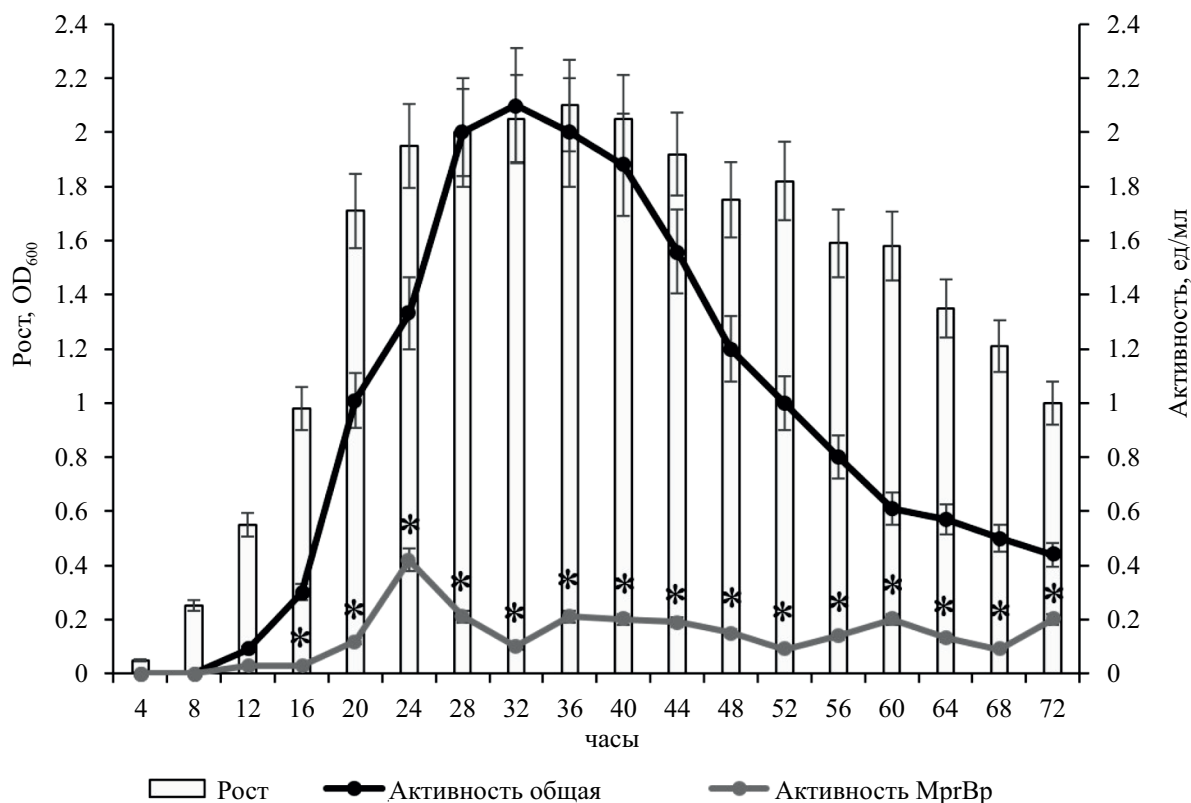
Для исследуемых рекомбинантных штаммов в каждой точке измерения с 20 по 50-й час роста культуры уровень активности в присутствии ингибитора всегда был ниже общего в среднем на 90% (рисунок).

Так как полный спектр секретируемых *B. pumilus* 3-19 протеиназ не известен, заявленный уровень активности MprBp в реальности может включать в себя и другие секретируемые металлопротеиназы, также подвергшиеся ингибированию. Это означает, что истинная доля MprBp в общем пуле протеолитической активности может оказаться даже ниже 10%.

Для возможности наработки целевого белка в препаративных количествах и дальнейшего исследования данного фермента были сконструированы рекомбинантные штаммы-продуценты на основе беспротеазных штаммов *B. subtilis* и митотрофных дрожжей *P. pastoris*.

Бациллярный экспрессионный вектор pGP382 содержит сильный конститутивный промотор гена *degQ* *B. subtilis*. Продукт гена *degQ* участвует в поддержании фосфорилированной формы белка DegU. DegU~P стимулирует в клетках экспрессию генов протеолитических ферментов. За 3'-концом промотора PdegQ36 следует Strep-tag пептидная последовательность (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) для возможности проведения аффинной хроматографии.

В качестве штаммов-реципиентов были выбраны беспротеазные штаммы *B. subtilis* BG2036, *B. subtilis* BRB08, *B. subtilis* BRB11 и *B. subtilis* BRB14, а также штамм *B. subtilis*  $\Delta 6$ , сконструированный на основе штамма *B. subtilis* 168 путем CRISPR/Cas9 удаления профаговых регионов



**Рисунок.** Динамика роста и накопления протеолитической активности штаммом *B. pumilus* 3-19. Значение дисперсии для показателя роста культуры (OD<sub>600</sub>) не превышает 8%, для уровня протеолитической активности дисперсия не превышает 10%. Статистически значимые отличия в уровне активности MprBp от общего уровня протеолитической активности отмечены \* ( $P < 0.05$ ).

(Altenbuchner, 2016). Несмотря на то, что штамм *B. subtilis* Δ6 сохранил все секретируемые белки и не является беспротеазным, удаленный участок его генома включает обширные профаговые области (~250000 п.о.) с генами неустановленного функционала. Было интересно оценить потенциал данного штамма в качестве продуцента целевого белка.

Также в качестве продуцентов MprBp были использованы метилотрофные дрожжи *P. pastoris* коммерческой экспрессионной системы PichiaPink™ Expression System (“Invitrogen”), характеризующейся высоким уровнем выхода целевого белка (PichiaPink™ manual). В рамках данной системы были сконструированы два вектора — высококопийный pPINK-NC-*mprBp* и низкокопийный pPINK-LC-*mprBp*, содержащие ген металлопротеиназы *mprBp* под сильным индуцибельным промотором алкогольоксидазы AOX1, с высокоэффективным сигнальным пептидом гена альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae* и His-tag последовательностью.

Полученными конструкциями методом электропорации трансформировали клетки дрожжей *P. pastoris* (PichiaPink™ manual).

Сравнительные данные по эффективности продукции металлопротеиназы штаммами-продуцентами представлены в табл. 2.

В результате было установлено, что наиболее эффективными продуцентами металлоэндопептидазы *B. pumilus* 3-19 является дрожжевой штамм с мультикопийным вектором *P. pastoris* NC-*mprBp*P5 и бациллярный штамм *B. subtilis* BG2036+*mprBp*.

Полученные в результате работы штаммы-продуценты металлопротеиназы *B. pumilus* 3-19 — дрожжевой штамм *P. pastoris* NC-*mprBp*P5 и бациллярный штамм *B. subtilis* BG2036+*mprBp* демонстрируют сопоставимый уровень активности целевого белка — 5.6 ед. акт./мл среды и 4.5 ед. акт./мл соответственно. Культивирование дрожжевого штамма имеет перспективы масштабирования с возможностью значительного увеличения продукции белка. Однако сам процесс культивирования более сложен и длителен, чем для бациллярного штамма. Кроме того, очистка металлопротеиназы методом аффинной хроматографии из культуральной жидкости дрожжевого штамма должна будет происходить по связи с His-tag меткой на никелевом сорбенте.

**Таблица 2.** Сравнительная оценка эффективности продукции металлоэндопептидазы *B. pumilus* 3-19 рекомбинантными штаммами-продуцентами

Штамм	Активность МргВр, ед. акт./мл
Исходный штамм	
<i>B. pumilus</i> 3-19	0.42 ± 0.02
Штаммы-продуценты	
<b><i>B. subtilis</i> BG2036+<i>mprBp</i></b>	4.5 ± 0.2
<i>B. subtilis</i> Δ6+ <i>mprBp</i>	3.1 ± 0.15
<i>B. subtilis</i> BRB08+ <i>mprBp</i>	3 ± 0.12
<i>B. subtilis</i> BRB11+ <i>mprBp</i>	2.1 ± 0.1
<i>B. subtilis</i> BRB14+ <i>mprBp</i>	1.4 ± 0.06
<b><i>P. pastoris</i> HC-<i>mprBpP5</i></b>	5.6 ± 0.25
<i>P. pastoris</i> LC- <i>mprBpP9</i>	4.2 ± 0.2

Примечание. Жирным шрифтом выделены штаммы с наибольшим уровнем активности металлопротеиназы, отобранные для проведения дальнейших исследований.

Металл-хелатирующая аффинная хроматография может нарушить связи атома цинка в активном сайте металлопротеиназы, чем инактивирует фермент. Дальнейший отбор продуцента будет производиться на основании результатов аффинной хроматографии на соответствующих сорбентах.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ и Кабинета министров Республики Татарстан в рамках научного проекта № 23-24-10059.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данная статья не содержит результатов исследований с участием людей и животных, проведенных кем-либо из авторов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Altenbuchner J. Editing of the *Bacillus subtilis* genome by the CRISPR-Cas9 system // Appl. Environ. Microbiol. 2016. V. 82. P. 5421–5427.

Bond J. S. Proteases: history, discovery, and roles in health and disease // J. Biol. Chem. 2019. V. 294. P. 1643–1651.

Danilova Y. V., Rudakova N. L., Vasilyeva Y. A., Gilmutdinova A. I., Diadkina I. V., Khasanov D. I., Sharipova M. R. Optimization of electroporation conditions for *Bacillus pumilus* 3-19 strain // BioNanoSci. 2022. V. 12. P. 752–756.

Demidyuk I. V., Romanova D. V., Nosovskaya E. A., Ches-tukhina G. G., Kuranova I. P., Kostrov S. V. Modification of substrate-binding site of glutamyl endopeptidase from *Bacillus intermedius* // Prot. Eng. Des. Sel. 2004. V. 17. P. 411–416.

Huang J., Pan Y., Hu G., Sun W., Jiang L., Wang P., Ding X. SRC fine-tunes ADAM10 shedding activity to promote pituitary adenoma cell progression // FEBS J. 2020. V. 287. P. 190–204.

Khasanov D. I., Rudakova N. L., Koryagina A. O., Sharipova M. R. CRISPR/Cas9-redacted *Bacillus subtilis* strain as the producer of extracellular metalloproteinase of *B. pumilus* // Opera Medica et Physiologica. 2022. V. 9. № 3. P. 121–127.

Madden K., Tolstorukov I., Cregg J. Electroporation of *Pichia pastoris* // Genetic transformation systems in fungi. V. 1. Fungal Biology / Eds. van den Berg M., Maruthachalam K. Cham: Springer, 2015. P. 87–91. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-10142-2\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-10142-2_8)

MEROPS the Peptidase Database. Release 12.5. <https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/famsum?family=M12>. Проверено 15.10.2024.

*PichiaPink*<sup>TM</sup> Expression System (“Invitrogen”) manual. [http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pichiapink\\_expression\\_system\\_man.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pichiapink_expression_system_man.pdf). Проверено 13.10.2024.

Pudova D. S., Toymentseva A. A., Gogoleva N. E., Shagimardanova E. I., Mardanova A. M., Sharipova M. R. Comparative genome analysis of two *Bacillus pumilus* strains producing high level of extracellular hydrolases // Genes. 2022. V. 13. Art. 409.

Rudakova N. L., Sabirova A. R., Khasanov D. I., Danilova I. V., Sharipova M. R. Regulating pathways of *Bacillus pumilus* adamalysin-like metalloendopeptidase expression // Int. J. Mol. Sci. 2024. V. 25. P. 1–9.

Sabirova A. R., Rudakova N. L., Balaban N. P., Ilyinskaya O. N., Demidyuk I. V., Kostrov S. V., Rudenskaya G. N., Sharipova M. R. A novel secreted metzincin metalloproteinase from *Bacillus intermedius* // FEBS Letters. 2010. V. 584. P. 4419–4425.

Serrano-Garrido O., Peris-Torres C., Redondo-García S., Asenjo H. G., Plaza-Calonge M. D. C., Fernandez-Luna J. L., Rodriguez-Manzanique J. C. ADAMTS1 supports endothelial plasticity of glioblastoma cells with relevance for glioma progression // Biomolecules. 2020. V. 11. Art. 44.

Shen X., Chen Y., Liu T., Hu X., Gu Z. Development of a high-efficient transformation system of *Bacillus pumilus* strain DX01 to facilitate gene isolation via gfp-tagged insertional mutagenesis and visualize bacterial

- colonization of rice roots // *Folia Microbiol. (Praha)*. 2013. V. 58. P. 409–417.
- Steel R.G.D., Torrie J.H., Dicky D.A. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. New York: McGraw Hill, Inc. Book Co., 1997. 666 p. 3<sup>rd</sup> ed.
- Toymentseva A.A., Danilova I.V., Tihonova A.O., Sharipova M.R., Balaban N.P. Purification of recombinant extracellular proteases from *Bacillus pumilus* for  $\beta$ -amyloid peptide cleavage // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2016. V. 42. P. 62–68.
- Zhong S., Khalil R.A. A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) and ADAM with thrombospondin motifs (ADAMTS) family in vascular biology and disease // *Biochem. Pharmacol.* 2019. V. 164. P. 188–204.

## Assessment of the Efficiency of Recombinant Strains-Producers of *Bacillus pumilus* 3-19 Metalloendopeptidase

N. L. Rudakova\*, D. I. Khasanov, M. R. Sharipova

*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University 420008, Kazan, Russia*

*\*e-mail: natalialrudakova@mail.ru*

**Abstract.** Minor zinc-dependent metalloendopeptidase secreted by the soil strain *Bacillus pumilus* 3-19 occupies a unique intermediate classification position between two families of the metzincin clan: adamalizins and astacins. To be able to study the functional role of metalloendopeptidase in more detail, it is necessary to obtain a pure protein preparation in sufficient quantity. Since the enzyme secretion by the *B. pumilus* 3-19 strain is extremely low, recombinant strains producing metalloendopeptidase MprBp were constructed based on protease-free strains of *Bacillus subtilis*, as well as methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. The obtained strains were evaluated for the efficiency of metalloendopeptidase production. The *B. subtilis* strain BG2036+mprBp had the highest production of the target protein.

**Keywords:** metalloendopeptidase, protein production, recombinant strain, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Pichia pastoris*