МИКРОБИОЛОГИЯ, 2015, том 84, № 4, с. 425–432

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.152.314

ПРЕПАРАТЫ СЕКРЕТИРУЕМОЙ РНКазы *BACILLUS PUMILUS*: ОДИН ФЕРМЕНТ ИЛИ ДВА?

© 2015 г. В. В. Ульянова[1], В. С. Ходжаева, Е. В. Дудкина, А. В. Лайков, В. И. Вершинина, О. Н. Ильинская

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, кафедра микробиологии

Поступила в редакцию 13.08.2014 г.

Проведен иммунохимический анализ очищенных препаратов РНКазы *Bacillus pumilus* (биназы), представленных ферментом заводского производства (Институт органического синтеза, Рига, Латвия), ферментами, выделенными из культуральной жидкости нативного штамма-продуцента *B. pumilus* и рекомбинантного штамма *Escherichia coli* BL21, несущего плазмиду pGEMGX1/ent/Bi. Установлено, что при электрофорезе всех трех образцов очищенной биназы обнаруживаются две белковые фракции, обладающие рибонуклеазной активностью. Определена молекулярная масса фракций – соответственно, около 12 и 25 кДа. Исключена возможность присутствия в препаратах второй секретируемой РНКазы *B. pumilus* – биназы II. Как низкомолекулярный, так и высокомолекулярный белки взаимодействовали со специфическими антителами к биназе в реакции иммуноблоттинга, что указывает на их антигенную идентичность. Различие в молекулярной массе исследуемых белков свидетельствует о том, что биназа в растворе может быть представлена двумя формами – мономером и димером.

Ключевые слова: Bacillus pumilus, РНКаза, биназа, биназа II, иммунная диффузия, иммуноблоттинг.

DOI: 10.7868/S0026365615040175

Микробные рибонуклеазы (РНКазы) находят широкое применение в генной инженерии, биохимии и медицине. Особое внимание уделяется биологическим свойствам РНКаз, связанным с регуляцией экспрессии генов, ростом и дифференцировкой клеток, защитой от патогенов, индукцией апоптоза. Цитотоксические эффекты микробных РНКаз по отношению к раковым клеткам, а именно биназы – секретируемой РНКазы *Bacillus pumilus* (ранее вид *B. intermedius* [1]), барназы из *B. amyloliquefaciens* [2], РНКазы Sa3 из *Streptomyces aureofaciens* CCM 3239 [3], риботоксина α-сарцина из грибов рода *Aspergillus* [4], позволяют считать РНКазы микроорганизмов перспективными объектами для создания новых противоопухолевых препаратов [5–9]. В настоящее время также показано, что биназа обладает противовирусным эффектом [10], мутагенными [11, 12] и антимутагенными свойствами [13]. Для разработки препаратов на ее основе, прежде всего, необходим гомогенный высокоочищенный белок.

Изучены особенности регуляции биосинтеза биназы как в нативных, так и в рекомбинантных штаммах [14–17]. Показано, что фермент секретируется в окружающую среду в стадию замедления роста культуры. Экспрессия его гена усиливается при недостатке в среде неорганического фосфата путем взаимодействия регулятора транскрипции PhoP, контролирующего специфический ответ клеток бацилл на фосфатное голодание, с промотором гена РНКазы [14]. На основе этих данных разработаны методы выделения фермента [18]. Однако известно, что *B. pumilus* обладает еще одной РНКазой, которая может секретироваться в среду. Это менее изученная рибонуклеаза – биназа II с молекулярной массой 29638 Да (Mr биназы 12212 Да), активируемая Mg^{2+}, однако также представляющая собой щелочной белок с оптимумом действия при pH 8.5 [19]. В связи с этим встает вопрос, насколько гомогенны получаемые препараты биназы.

Целью настоящей работы стала оценка гомогенности препаратов РНКазы, выделенных из культуральной жидкости *B. pumilus* и рекомбинантного штамма *Escherichia coli* BL21, несущего плазмиду pGEMGX1/ent/Bi, в сравнении с препаратом биназы, полученной в производственных условиях в Институте органического синтеза (Латвия).

[1] Автор для корреспонденции (e-mail: ulyanova_vera@mail.ru).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы бактерий. Использовали штаммы бактерий из музея кафедры микробиологии Казанского федерального университета. Для получения биназы выращивали штамм *B. pumilus* 7P на среде, содержащей (%): 2.0 – пептона, 1.0 – глюкозу, 0.01 – $CaCl_2$, 0.03 – $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.3 – NaCl, 0.01 – $MnSO_4$; pH 8.5, при 37°C до поздней логарифмической фазы [20]. Для получения биназы II в тех же условиях выращивали штамм *B. subtilis* 3922 с плазмидой pJF28, несущей ген рибонуклеазы под собственным промотором [21]. Рекомбинантный штамм *E. coli* BL21 pGEMGX1/ent/Bi культивировали, как описано ранее [22]. В данном штамме структурный ген биназы расположен на плазмиде pGEMGX1/ent/Bi, его экспрессия контролируется T7 промотором, синтезируемый белок направляется в окружающую среду с помощью сигнального пептида щелочной фосфатазы PhoA.

Препараты РНКаз. Для исследования были взяты три образца биназы: (1), полученный ранее в Институте органического синтеза (Рига, Латвия); (2), выделенный нами из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *E. coli* BL21 pGEMGX1/ent/Bi; и (3) – из культуральной жидкости *B. pumilus* 7P. Выделение и очистку РНКаз проводили согласно процедуре, описанной Макаровым с соавт. [23]. Каталитическая активность препаратов была подтверждена по отношению к высокополимерной дрожжевой РНК (“Вектор”, Бердск) [12]. За единицу активности принято возрастание на 1 единицу оптической плотности (260 нм) кислоторастворимых продуктов гидролиза РНК при 37°C за 1 мин.

Химический димер биназы, полученный в результате ковалентной сшивки белка с помощью диметилсуберимидата [24], был любезно предоставлен к.х.н. Н.В. Калачевой (Казанский федеральный университет).

Биназа II была получена из культуральной жидкости *B. subtilis* 3922 pJF28 согласно методике, описанной ранее [21].

Электрофоретический анализ. Электрофорез белков в ПААГ в присутствии 0.1% додецилсульфата натрия проводили по стандартной методике Лэммли [25]. Рибонуклеазную активность выявляли методом зимографии, с этой целью в разделяющий гель для электрофореза добавляли в качестве субстрата высокополимерную РНК дрожжей *Torula* в концентрации 7 мг/мл (“Sigma”, США). После электрофореза для удаления додецилсульфата натрия гель промывали буфером, содержащим 10 мМ *трис*-HCl, 20% изопропанол, pH 7.5. Ренатурацию белков проводили, последовательно инкубируя гель в течение 10 мин в 10 мМ *трис*-HCl, pH 7.5 и 100 мМ *трис*-HCl, pH 7.5. Зоны гидролиза РНК выявляли после окрашивания геля в течение 10 мин 0.2% толуидиновым синим (“Sigma”, США).

Получение поликлональной сыворотки. В работе использовали поликлональную сыворотку к биназе, полученную иммунизацией кроликов коммерческим препаратом фермента. Курс иммунизации состоял из 4 подкожных инъекций с интервалом 10–12 дней смесью возрастающих концентраций белка (1, 2, 4, 8 мг) в комплексе с полным (первая и вторая инъекции) и неполным (третья и четвертая инъекции) адъювантом Фрейнда. Через 30 дней для проведения ревакцинации подкожно вводили 10 мг растворимого белка. Сыворотку получали через 10–12 дней после ревакцинациии и использовали для выделения специфических антител.

Иммунохимический анализ качества полученной сыворотки проводили с помощью реакции преципитации в агаровом геле [26]. Для постановки реакции использовали 1% агар Дифко в физиологическом растворе. О наличии антител в сыворотке судили по появлению линий преципитации.

Получение специфических антител. Для выделения из поликлональной сыворотки специфических антител к биназе использовали CNBr-активированную сефарозу 4B (“Sigma”, США). Сорбент предварительно промывали на стеклянном фильтре 0.1 н раствором HCl, затем 0.1 М $NaHCO_3$ буфером (pH 8.3) и 0.5 М раствором NaCl. Отмытую сефарозу смешивали с раствором биназы (1) в концентрации 2 мг/мл и инкубировали 2 ч при комнатной температуре. Не связавшийся фермент отмывали на стеклянном фильтре 0.5 М раствором NaCl под контролем оптической плотности. Иммунную сыворотку кролика, содержащую антитела к биназе, смешивали с равным объемом 0.2 М *трис*-HCl буфера (pH 7.5) и инкубировали с аффинным сорбентом в течение 3 ч при комнатной температуре. Связавшиеся специфические антитела элюировали 0.05 М глицин-HCl буфером (pH 2.8), элюат нейтрализовали NaOH. Фракции, содержащие антитела, анализировали в реакции двумерной иммунодиффузии. Иммунологически активные фракции объединяли и использовали для постановки иммуноблоттинга.

Иммуноблоттинг. Проводили электроперенос белков, фракционированных в 15%-ПААГ, на нитроцеллюлозную мембрану. Оставшиеся центры связывания блокировали раствором 1% обезжиренного молока (в *трис*-солевом буфере, pH 7.4), и вносили специфические первичные антитела к биназе. Отмывали мембрану от не связавшихся антител и инкубировали 1.5 ч в растворе вторичных антител. Использовали антикроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (“Sigma”, США). Детекцию образованных иммунных комплексов проводили хемилюминес-

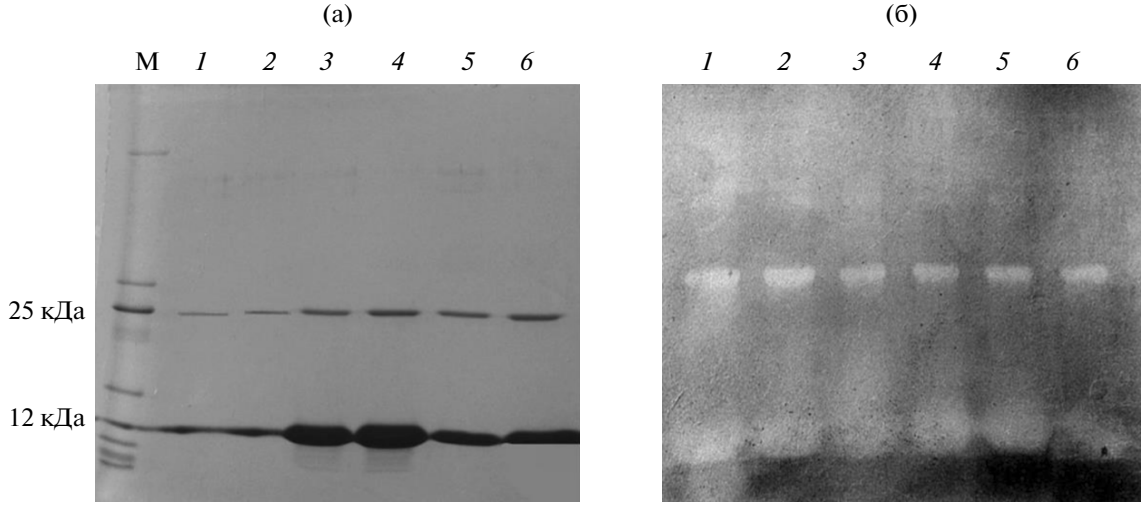

Рис. 1. Электрофореграмма (а) и зимограмма (б) очищенной биназы. М – маркерные белки; *1*, *2* – биназа из рекомбинантного штамма *E. coli* (2), количество белка в образце 5 мкг; *3*, *4* – коммерческий препарат биназы (1), количество белка в образце 15 мкг; *5*, *6* – биназа из культуральной жидкости исходного продуцента *B. pumilus* (3), количество белка в образце 10 мкг. Количество белка на зимограмме (б) 10 мкг.

центным способом. Проявление мембраны осуществляли с помощью системы гель–документации ChemiDoc (“Bio-Rad”, США).

Высокоэффективная жидкостная хроматография и масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС). Белки, соответствующие двум фракциям, вырезали из полиакриламидного геля, окрашенного Кумасси R250. Для удаления красителя фрагменты промывали ацетонитрилом и 200 мМ NH_4HCO_3, смешанными в соотношении 1 : 1. Белки расщепляли трипсином (“Promega”, США) в течение ночи при 37°С. Полученные пептиды экстрагировали с помощью 0.1% трифторуксусной кислоты и высушивали в вакуумном концентраторе. Идентификацию пептидов проводили с использованием системы ВЭЖХ-МС (“Bruker”, ФРГ).

Моделирование и сопоставление структур. Сравнение первичных структур биназы I (GenBank P00649.3) и биназы II (GenBank CAA66713.1) проводили с помощью алгоритма “Muscle” (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/). Полученные последовательности обрабатывали в программе “BoxShade” (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Трехмерную модель биназы II строили на сервере “I-Tasser” [27]. Визуализацию модели осуществляли с помощью программы “Jmol” (http://www.jmol.org/). Пространственные структуры биназы I (PDB 1buj) и биназы II (полученная модель) сопоставляли с использованием программы “FATCAT” [28].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Электрофорез в денатурирующих условиях показал, что все три исследуемых образца биназы, а именно: препарат, полученный в производственных условиях (1), а также выделенные из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *E. coli* BL21 с плазмидой pGEMGX1/ent/Bi (2) и исходного штамма-продуцента *B. pumilus* 7P (3), представлены двумя полосами (рис. 1а). Одна фракция белка имела молекулярную массу около 12000 Да (что соответствует известной Mr биназы = 12213 Да), Mr второй фракции составляла 25000 Да. Методом зимографии в обеих фракциях было подтверждено наличие рибонуклеазной активности: две фракции, низко- и высокомолекулярная, во всех трех образцах биназы обнаружили зоны гидролиза РНК в виде отчетливых прозрачных полос (рис. 1б). Это позволяет предположить наличие в препаратах двух белков, обладающих РНКазной активностью.

Известно, что бактерии *B. pumilus* образуют два типа внеклеточных рибонуклеаз – биназу I, состоящую из 109 аминокислотных остатков [1], и биназу II, представленную 263 аминокислотными остатками [25]. Гуанил-предпочитающая биназа I расщепляет РНК до 3'-фосфат моно- и олигонуклеотидов в два этапа с образованием промежуточного 2'-3'-циклического производного, неспецифичная биназа II гидролизует субстрат в одну стадию до 5'-фосфат производных. Оба фермента проявляют наибольшую активность при 37°С и pH 8.5, за исключением активации биназы II ионами Mg^{2+}, оба синтезируются в стадию замед-

ления роста культуры в ответ на фосфатное голодание [1, 25]. По-видимому, биназа II синтезируется клетками на низком уровне: величины ее активности в культуральной жидкости почти в 20 раз ниже, чем у биназы I. Кроме того, процесс секреции биназы II по сравнению с биназой I, вероятно, происходит менее эффективно, хотя вторичные структуры их сигнальных пептидов, определяющие успешность процесса транслокации, схожи. Сигнальные последовательности обеих РНКаз состоят из 29 аминокислотных остатков и направляют белки во внешнюю среду через Sec-путь, как было установлено с помощью алгоритма "PRED-TAT" (http://www.compgen.org/tools/PRED-TAT/submit). В связи с этим присутствие биназы II в препарате очищенной биназы I теоретически возможно.

Чтобы выяснить, является ли высокомолекулярная фракция биназой II, был проведен иммунохимический анализ. О наличии специфических антител к биназе I в поливалентной сыворотке свидетельствуют линии преципитации в реакции двумерной иммунодиффузии (рис. 3а). Однако, поскольку поливалентная сыворотка была получена иммунизацией кроликов коммерческим препаратом биназы (1), содержащим как низкомолекулярную, так и высокомолекулярную фракции белка, необходимо было исключить возможность взаимодействия антител с биназой II.

Первичные последовательности биназы I и биназы II имеют небольшое сходство: идентичность аминокислотного состава – чуть более 10% (рис. 2в). Однако для функционирования ферментов важна пространственная структура. Для биназы I она экспериментально определена как в кристалле (PDB 1gou), так и в растворе (PDB 1buj). Трехмерная организация биназы II не известна и была смоделирована нами в данной работе (рис. 2б), используя в качестве шаблона пространственные структуры внеклеточных эндонуклеаз вибрионов (PDB 2pu3, 1oup, 2g7f), с которыми биназа II имеет наиболее сходную вторичную структуру. Сопоставление трехмерных структур биназы I и биназы II показало наличие 32 эквивалентных позиций со среднеквадратическим отклонением позиций атомов Cα равном 3.75 Å. Однако, в целом, структуры не схожи (*P*-значение >0.05 и равно 0.88).

Биназа II была выделена из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B. subtilis* 3922 pJF28 и проанализирована в реакции двумерной иммунодиффузии. Анализ трех образцов биназы I и биназы II в реакции двумерной иммунодиффузии показал, что иммунная реакция между биназой II и АТ к биназе I отсутствует, в то время как все три препарата биназы I обладали серологической активностью (рис. 3в). Таким образом, биназа II не является антигенно-родственным белком для биназы I.

Анализ высокомолекулярной фракции исследуемых препаратов биназы был проведен с помощью иммуноблотинга. Для этого из поливалентной сыворотки к биназе I нами были выделены специфические антитела с использованием аффинного сорбента "CNBr-активированная сефароза 4B – биназа" путем объединения элюированных иммунологически активных фракций. Как видно из рис. 3б, фракции 1 и 2 были наиболее активными и использовались нами далее как объединенный препарат специфических антител к биназе. Для иммуноблотинга были взяты 3 серии очищенной биназы и ее химический димер, полученный в результате ковалентной сшивки белка с помощью диметилсуберимидата. Результаты реакции представлены на рис. 4. Оказалось, что иммуноблот химического димера аналогичен иммуноблотам всех трех образцов биназы, что подтверждает возможность димеризации исходной молекулы биназы. Характер иммунологической реакции позволяет сделать вывод о том, что обе белковые фракции (белок с Mr = 12000 Да и белок с Mr = 25000 Да) взаимодействуют со специфическими антителами к биназе, т.е. являются антигенно идентичными белками. Для дополнительного подтверждения идентичности двух фракций мы провели их масс-спектрометрический анализ с помощью системы ВЭЖХ-МС. Было установлено, что обе фракции содержат пептиды, соответствующие зрелой форме рибонуклеазы *B. pumilus* (рис. 5). Расчетная молекулярная масса двух белков одинакова и составляет 12204 Да, pI 9.52. Различие в молекулярной массе фракций на электрофореграммах свидетельствует о том, что биназа в растворе может быть представлена двумя формами – мономером и димером.

Показано, что некоторые рибонуклеазы, такие как РНКаза L и BS-РНКаза, являются природными димерами [29, 30], и димеризация необходима для выполнения их функций. Так, РНКаза L – компонент ответной реакции клеток на вирусную инфекцию, активируется с помощью димеризации [29, 31]. BS-РНКаза, не подверженная действию цитозольного ингибитора РНКаз [30], образует два типа димеров, которые встречаются в соотношении 2 : 1 [32]. Преобладающий нековалентно связанный димер образован путем обмена N-концевыми доменами между мономерами, в то время как второй тип димера образован из двух мономеров, связанных двумя внутримолекулярными дисульфидными связями. Нековалентно связанный димер более стабилен и именно с ним связаны цитотоксические свойства BS-РНКазы [33].

На наличие двух молекулярных форм у биназы – мономерной и димерной, указывали Поляков

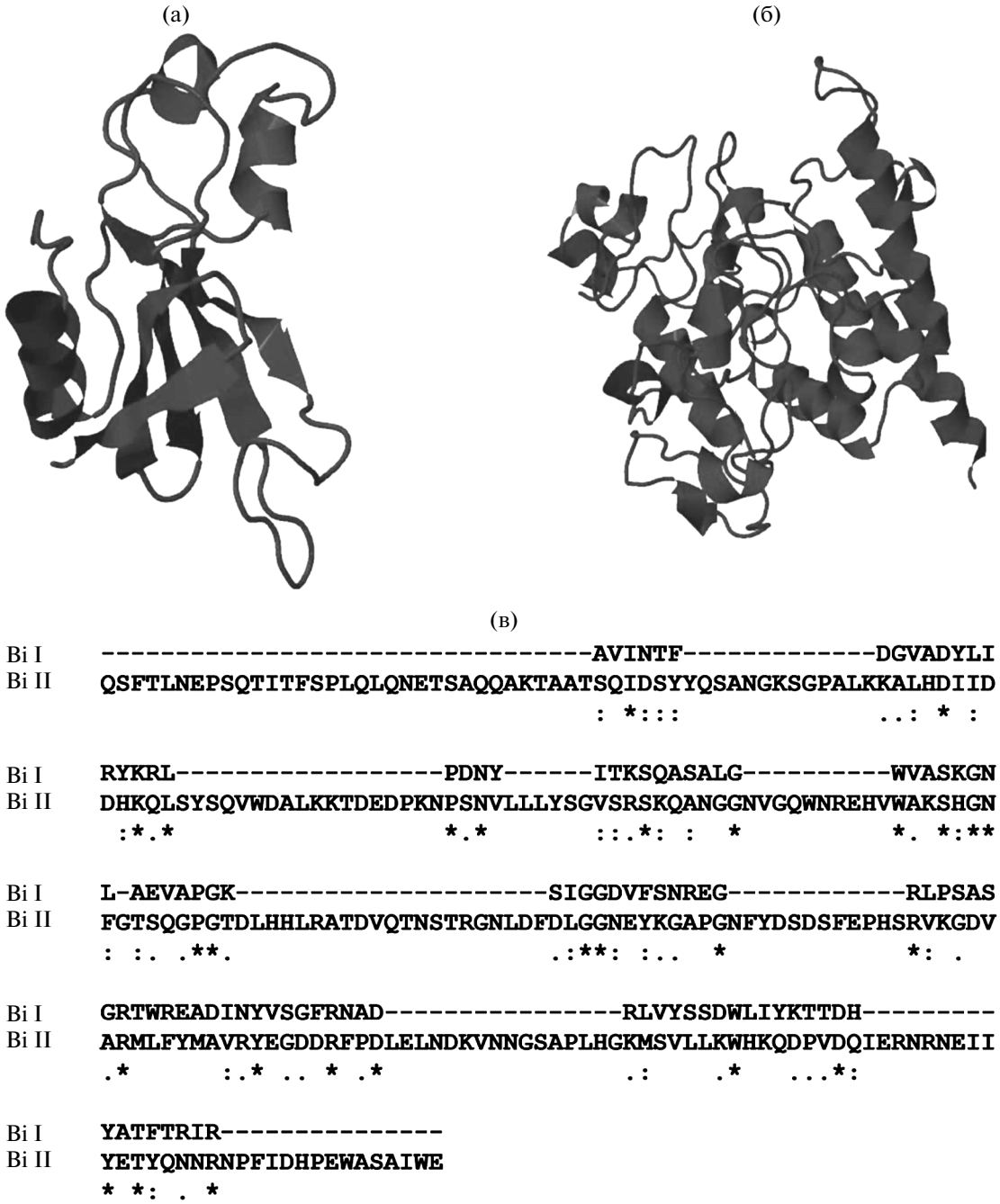

Рис. 2. Секретируемые рибонуклеазы *B. pumilus*: а – пространственная структура биназы I (PDB 1buj); б – трехмерная модель биназы II (C-score = –1.56, TM-Score = 0.52 ± 0.15, RMSD = 9.4 ± 4.6); в – выравнивание первичных последовательностей рибонуклеаз. Идентичные аминокислоты отмечены звездочками, консервативные замены – двоеточием и точками.

и соавт. [34], Коновалова и соавт. [35], Ширшиков и соавт. [36] и Ермакова [37]. Однако в перечисленных работах наличие димерных структур, образующихся за счет водородных связей и гидрофобных взаимодействий, предполагается в кристаллах биназы теоретически, а возможность их образования в растворе рассматривается как гипотетическая [34, 36]. Вероятным также представляется формирование димерных и агрегированных форм биназы на поверхности мембраны, что может усиливать проникновение фермента в клетку [35]. Результаты наших экспериментов свидетельству-

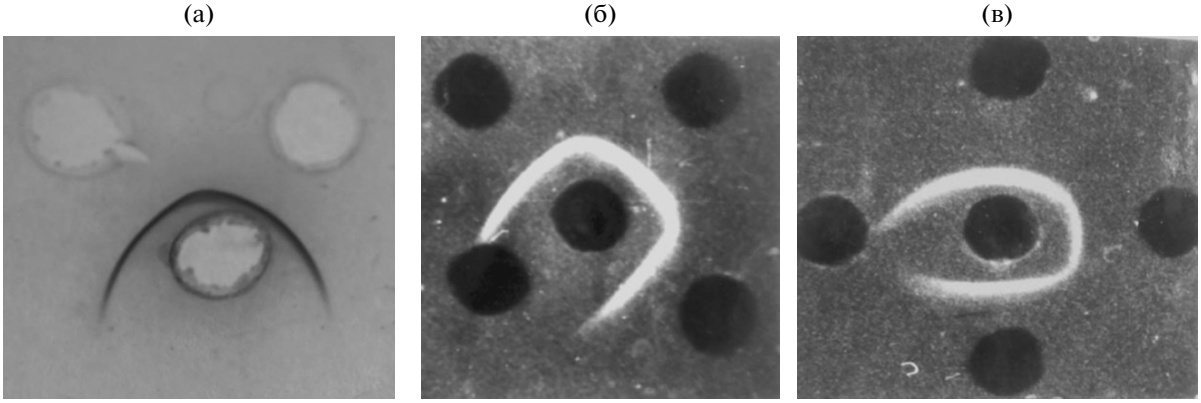

Рис. 3. Реакция двумерной иммунодиффузии: а – биназы I и поливалентной сыворотки (ПС) к биназе (в лунках верхнего ряда – биназа (1), нижнего ряда – ПС); б – биназы I и биназы II с ПС (в центральной лунке – ПС, в лунках верхнего ряда – препараты биназа (1), биназа (2); нижнего ряда – биназа II, биназа (3)); в – биназы I и фракций элюата со специфическими антителами к биназе (в центральной лунке – биназа (1), в периферических лунках сверху по часовой стрелке: ПС, фракция 1, фракция 2, фракция 3).

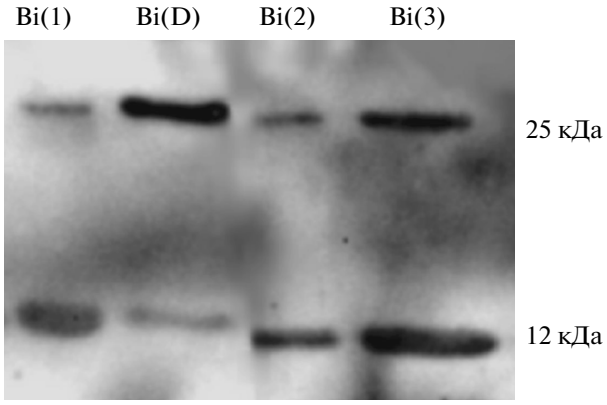

Рис. 4. Иммуноблоттинг исследуемых препаратов биназы (Bi 1–3) и ее химического димера (Bi D). Количество белка в образцах 10 мкг.

(а)

AVINTFDGVA DYLIR**YK**RLP DNYITKSQAS ALGWVASKGN LAEVAPGKSI
GGDVFSNREG R**LPSASGR**TW READINYVSG FRNADRLVYS SDWLIYKTTD
HYATFTR**IR**

(б)

AVINTFDGVA DYLIR**YKR**LP DNYITKSQAS ALGWVASKGN LAEVAPGKSI
GGDVFSNR**EG** **RLPSASGR**TW READINYVSG FRNADRLVYS SDWLIYKTTD
HYATFTR**IR**

Рис. 5. Пептидные фрагменты, полученные при трипсинолизе белковых фракций с молекулярной массой 12 кДа (а) и 24 кДа (б), проанализированные в ВЭЖХ-МС системе и наложенные на аминокислотную последовательность рибонуклеазы *B. pumilus*. Жирным шрифтом выделены не совпавшие аминокислоты.

ют о том, что в препаратах очищенной биназы отсутствует высокомолекулярная РНКаза биназа II, а сама биназа представлена в двух формах – мономерной и димерной. Тем не менее для подтверждения того факта, что биназа секретируется бактериями *B. pumilus* как нативный димер, требуются дополнительные исследования.

Авторы благодарят к.х.н., с.н.с. Калачеву Наталью Васильевну за любезно предоставленный для работы химический димер биназы. Работа

выполнена в рамках Программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета с использованием оборудования Междисциплинарного центра коллективного пользования КФУ (ID RFMEFI59414X0003) и поддержана РНФ (контракт № 14-14-00522).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O.* Barnase and binase: twins with distinct fates // FEBS J. 2011. V. 278. № 19. P. 3633–3643.
2. *Edelweiss E., Balandin T.G., Ivanova J.L., Lutsenko G.V., Leonova O.G., Popenko V.I., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M.* Barnase as a new therapeutic agent triggering apoptosis in human cancer cells // PLoS One. 2008. V. 3. № 6. P. e2434.
3. *Sevcik J., Urbanikova L., Leland P.A., Raines R.T.* X-ray structure of two crystalline forms of a streptomycete ribonuclease with cytotoxic activity // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. № 49. P. 47325–47330.
4. *Olmo N., Turnay J., González de Buitrago G., López de Silanes I., Gavilanes J.G., Lizarbe M.A.* Cytotoxic mechanism of the ribotoxin alpha-sarcin. Induction of cell death via apoptosis // Eur. J. Biochem. 2001. V. 268. № 7. P. 2113–2123.
5. *Makarov A.A., Ilinskaya O.N.* Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets // FEBS Lett. 2003. V. 540. № 1–3. P. 15–20.
6. *Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N.* Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents // BioEssays. 2008. V. 30. № 8. P. 781–790.
7. *Mitkevich V.A., Makarov A.A., Ilinskaya O.N.* Cell targets of antitumor ribonucleases // Mol. Biol. 2014. V. 48. № 2. P. 181–188.
8. *Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Kretova O.V., Zelenikhin P.V., Prassolov V.S., Tchurikov N.A., Ilinskaya O.N., Makarov A.A.* Oncogenic c-kit transcript is a target for binase // Cell Cycle. 2010. V. 9. № 13. P. 2674–2678.
9. *Mitkevich V.A., Kretova O.V., Petrushanko I.Y., Burnysheva K.M., Sosin D.V., Simonenko O.V., Ilinskaya O.N., Tchurikov N.A., Makarov A.A.* Ribonuclease binase apoptotic signature in leukemic Kasumi-1 cells // Biochimie. 2013. V. 95. № 6. P. 1344–1349.
10. *Shah Mahmud R., Ilinskaya O.N.* Antiviral activity of binase against pandemic influenza A(H1N1) virus // Acta Naturae. 2013. V. 5. № 4. P. 44–51.
11. *Ilinskaya O.N., Ivanchenko O.B., Karamova N.S.* Bacterial ribonuclease: mutagenic effect in microbial test-systems // Mutagenesis. 1995. V. 10. № 3. P. 165–170.
12. *Ilinskaya O.N., Ivanchenko O.B., Karamova N.S., Kipenskaya L.V.* SOS-inducing ability of native and mutant microbial ribonucleases // Mutat. Res. 1996. V. 354. № 2. P. 203–209.
13. *Иванченко О.Б., Ильинская О.Н., Карамова Н.С.* Антимутагенная активность ферментного препарата “биназа” в микробных тест-системах // Микробиология. 1995. Т. 64. № 2. С. 234–238.
Ivanchenko, O.B., Il'inskaia, O.N., Karamova, N.S. Antimutagenic activity of the enzyme preparation “binase” in microbial test systems // Microbiology. 1995. V. 64. № 2. P. 234–238.
14. *Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O., Harwood C.R.* Binase-like guanyl-preferring ribonucleases are new members of *Bacillus* PhoP regulon // Microbiol. Res. 2015. V. 170. P. 131–138.
15. *Ульянова В.В., Золотова М.А., Харитонова А.А., Ильинская О.Н., Вершинина В.И.* Роль двухкомпонентной системы ResD–ResE в регуляции экспрессии генов гуанилспецифичных рибонуклеаз бацилл // Мол. генетика, микробиология и вирусология. 2008. № 3. С. 23–28.
Ulyanova V.V., Zolotova M.A., Kharitonova M.A., Ilyinskaya O.N., Vershinina V.I. Role of a two-component ResD–ResE system in regulating the expression of guanyl-specific ribonuclease genes in bacilli // Mol. Gen. Microbiol. Virol. 2008. V. 23. № 3. P. 126–131.
16. *Ульянова В.В., Вершинина В.И.* Системы, контролирующие специфический ответ бацилл на фосфатное голодание // Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. 2008. Т. 150. № 2. С. 231–244.
17. *Ульянова В.В., Вершинина В.И., Харитонова М.А., Шарипова М.Р.* Влияние Spo0A и AbrB белков на экспрессию генов гуанилспецифичных рибонуклеаз *Bacillus intermedius* и *Bacillus pumilus* в рекомбинантных штаммах *Bacillus subtilis* // Микробиология. 2007. Т. 76. № 5. С. 639–644.
Ul'yanova V.V., Vershinina V.I., Kharitonova M.A., Sharipova M.R. The effect of Spo0A and AbrB proteins on expression of the genes of guanyl-specific ribonucleases from *Bacillus intermedius* and *Bacillus pumilus* in *Bacillus subtilis* recombinant strains // Microbiology. 2007. V. 76. № 5. P. 563–568.
18. *Дудкина Е.В., Ульянова В.В., Шах Махмуд Р., Гальцова А.К., Никитина Е.В., Вершинина В.И., Ильинская О.Н.* Получение новой секретируемой рибонуклеазы *Bacillus* sp. на основе рекомбинантного штамма *Bacillus megaterium* // Вестник Казанского технологич. ун-та. 2013. Т. 16. № 10. С. 186–190.
19. *Hahnen E., Znamenskaya L., Koczan D., Leshchinskaya I., Hobom G.* A novel secreted ribonuclease from *Bacillus intermedius*: gene structure and regulatory control // Mol. Gen. Genet. 2000. V. 263. № 4. P. 571–80.
20. *Znamenskaya L.V., Gabdrakhmanova L.A., Chernokalskaya E.B., Leshchinskaya I.B., Hartley R.W.* Phosphate regulation of biosynthesis of extracellular RNases of endospore-forming bacteria // FEBS Lett. 1995. V. 357. № 1. P. 16–18.
21. *Скворцова М.А., Бочаров А.Л., Яковлев Г.И., Знаменская Л.В.* Новая внеклеточная рибонуклеаза из *Bacillus intermedius* биназа II. Выделение и некоторые свойства фермента // Биохимия. 2002. Т. 67. № 7. С. 967–972.
Skvortsova M.A., Bocharov A.L., Yakovlev G.I., Znamenskaya L.V. Novel extracellular ribonuclease from *Bacillus intermedius* – binase II: purification and some properties of the enzyme // Biochemistry (Moscow). 2002. V. 67. № 7. P. 802–806.
22. *Schulga A., Kurbanov F., Kirpichnikov M., Protasevich I., Lobachov V., Ranjbar B., Chekhov V., Polyakov K., Engelborghs Y., Makarov A.* Comparative study of binase

and barnase: experience in chimeric ribonucleases // Protein Eng. 1998. V. 11. № 9. P. 775–782.

23. *Makarov A.A., Protasevich I.I., Kuznetsova N.V., Fedorov B.B., Korolev S.V., Struminskaya N.K., Bashulina N.P., Leschinskaya I.B., Hartley R.W., Yakovlev G.I., Esipova N.G.* Comparative study of thermostability and structure of close homologues – barnase and binase // J. Biomol. Struct. Dyn. 1993. V. 10. № 6. P. 1047–1065.
24. *Калачева Н.В., Коновалова О.А., Налимов Д.С., Салахов М.Х., Ильинская О.Н., Куриненко Б.М.* Ингибирование фагоцитарной функции макрофагов *in vitro* димерной формой рибонуклеазы *Bacillus intermedius* // Цитология. 2008. Т. 50. № 6. С. 487–491.
25. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
26. *McClurkin A.W.* Use of the agar diffusion precipitation test in the diagnosis of hog cholera // Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 1963. V. 27. № 11. P. 275–279.
27. *Roy A., Kucukural A., Zhang Y.* I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction // Nat. Protoc. 2010. V. 5. № 4. P. 725–738.
28. *Ye Y., Godzik A.* Flexible structure alignment by chaining aligned fragment pairs allowing twists // Bioinformatics. 2003. V. 19. Suppl. 2. P. II246–II255.
29. *Garvie C.W., Vasanthavada K., Xiang Q.* Mechanistic insights into RNase L through use of an MDMX-derived multi-functional protein domain // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1834. P. 1562–1571.
30. *Lee J.E., Raines R.T.* Cytotoxicity of bovine seminal ribonuclease: monomer versus dimer // Biochemistry. 2005. V. 44. P. 15760–15767.
31. *Malathi K., Dong B., Gale M.Jr., Silverman R.H.* Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity // Nature Lett. 2007. V. 448. P. 816–819.
32. *Piccoli R., Tamburrini M., Piccialli G., Di Donato A., Parente A., D'Alessio G.* The dual-mode quaternary structure of seminal RNase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. I. 5. P. 1870–1874.
33. *Cafaro V., De Lorenzo C., Piccoli R., Bracale A., Mastronicola M.R., Di Donato A., D'Alessio G.* The antitumor action of seminal ribonuclease and its quaternary conformations // FEBS Lett. 1995. V. 359. P. 31–34.
34. *Поляков К.М., Гончарук Д.А., Трофимов А.А., Сафонова Т.Н., Митькевич В.А., Ткач Е.Н., Макаров А.А., Шульга А.А.* Рентгеноструктурные и биохимические исследования мутантной формы W34F рибонуклеазы биназы // Мол. Биол. 2010. Т. 44. № 5. С. 922–928.
Poliakov K.M., Goncharuk D.A., Trofimov A.A., Safonova T.N., Mit'kevich V.A., Tkach E.N., Makarov A.A., Shul'ga A.A. X-ray diffraction and biochemical studies of W34F mutant ribonuclease binase // Mol. Biol. 2010. V. 44. № 5. P. 917–922.
35. *Коновалова О.А., Калачева Н.В., Ширшиков Ф.В., Салахов М.Х.* Изучение особенностей электростатического взаимодействия РНКаз с поверхностью слюды методом атомно-силовой микроскопии // Российские нанотехнологии. 2011. Т. 6. № 7–8. С. 122–125.
Konovalova O.A., Kalacheva N.V., Shirshikov F.V., Salakhov M.K. Study of characteristics of electrostatic interaction between RNases and mica surface using atomic force microscopy // Nanotechnologies in Russia. 2011. V. 6. № 7. P. 510–515.
36. *Shirshikov F.V., Cherepnev G.V., Ilinskaya O.N., Kalacheva N.V.* A hydrophobic segment of some cytotoxic ribonucleases // Med. Hypotheses. 2013. V. 81. № 2. P. 328–334.
37. *Ermakova E.* Brownian dynamics simulation of the competitive reactions: Binase dimerization and the association of binase and barstar // Biophys. Chem. 2007. V. 130. № 1–2. P. 26–31.

Preparations of *Bacillus pumilus* Secreted RNase: One Enzyme or Two?

V. V. Ulyanova[1], V. S. Khodzhaeva, E. V. Dudkina, A. V. Laikov, V. I. Vershinina, and O. N. Ilinskaya

Department of Microbiology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Received August 13, 2014

Abstract—Immunochemical analysis of the following purified preparations of *Bacillus pumilus* RNase (binase) was carried out: industrially manufactured enzyme (Institute of Organic Synthesis, Riga, Latvia) and the enzymes isolated from the culture liquid of the native *B. pumilus* producer strain and from the *Escherichia coli* BL21 recombinant strain bearing the pGEMGX1/ent/Bi plasmid. Electrophoresis of all three samples of purified binase revealed two protein fractions with ribonuclease activity possessing molecular masses of ~12 and 25 kDa. The possible presence of binase II, a second secreted RNase, was ruled out. Both high- and low-molecular mass proteins interacted with binase-specific antibodies in the immunoblotting reaction, which indicated their antigenic identity. The difference in molecular mass between these proteins indicated the possible presence of two forms of binase in solution, a monomer and a dimer.

Keywords: Bacillus pumilus, RNase, binase, binase II, immunodiffusion, immunoblotting

[1] Corresponding author: e-mail: ulyanova_vera@mail.ru