

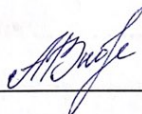
Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра микробиологии

Направление подготовки (специальность): 06.04.01 – Биология

Профиль (специализация, магистерская программа): Микробиология и вирусология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
БИНАЗЫ

Обучающийся 2 курса
группы 01-140-2



В.А. Асмандиярова

Научный руководитель
канд. биол. наук, доцент



Е.В. Дудкина

Заведующий кафедрой микробиологии
д-р биол. наук, профессор



О.Н. Ильинская

Казань – 2023

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ВЕДЕНИЕ	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 РНКазы и их биологические эффекты.....	6
1.2 Цитотоксичная РНКазы <i>B. pumilus</i> биназа.....	7
1.2.1 Противовирусная активность биназы	9
1.3 Молекулярные детерминанты цитотоксического действия биназы	10
1.4 Сигнальный путь MAPK и его роль в туморогенезе.....	12
1.5 Роль EGFR и RAS в онкогенезе.....	14
1.5.1 Таргетная анти-EGFR терапия.....	17
1.5.2 Таргетная анти-RAS терапия	18
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	21
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	21
2.1 Клеточные линии и условия их культивирования.....	21
2.2 Биназа и анти-биназные антитела.....	21
2.3 Иммунофлуоресцентный анализ.....	21
2.4 Электрофорез в полиакриламидном геле.....	22
2.5 Вестерн-блот анализ.....	23
2.6 Анализ пролиферации клеток	24
2.7 Статистическая обработка	25
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	26
3.1 Биназа ко-локализуется с белками EGFR и RAS.....	26
3.2 Биназа индуцирует деградацию EGFR и RAS белков	32
3.3 Интернализация биназы внутрь клеток происходит за счет связывания с EGFR.....	34
3.4 Биназа проявляет синергизм действия с таргетными анти-EGFR и анти-RAS препаратами	36
ВЫВОДЫ	41
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	42

ВЕДЕНИЕ

Рибонуклеазы (РНКазы) – важная группа гидролитических ферментов, катализирующих расщепление фосфодиэфирных связей в РНК-субстратах. Различные типы РНКаз были обнаружены во всех живых организмах от бактерий и архей до человека [Nameş *et al.*, 2015]. Особый интерес у ученых вызывают РНКазы бактерий, в особенности внеклеточные гуанилспецифичные РНКазы бацилл, в связи с их большим потенциалом практического применения в различных сферах деятельности человека. Так, например, РНКазы *Bacillus pumilus* биназа, обладает противовирусной [Shah Mahmud *et al.*, 2013] и противоопухолевой активностями [Burnysheva *et al.*, 2016].

Показано, что биназа избирательно ингибирует рост опухолевых клеток, экспрессирующих онкогены KIT, AML/ETO, FLT3, E6 и E7 [Mitkevich *et al.*, 2015; 2017], и подавляет миграцию раковых клеток. Противоопухолевый потенциал биназы опосредуется катионной природой фермента, позволяющей ему преимущественно взаимодействовать с мембранами раковых клеток, ее связыванием с онкогенами, а также способностью подавлять K_{Ca} -каналы и расщеплять внутриклеточную РНК [Mitkevich *et al.*, 2017]. Гидролиз РНК биназой приводит к снижению биосинтеза белков и образованию регуляторных РНК молекул, индуцирующих клеточный апоптоз [Mitkevich *et al.*, 2015]. Ранее было показано, что биназа напрямую взаимодействует с белком KRAS дикого типа в клетках MLE-12, что приводит к ингибированию пути MAPK/ERK и индукции апоптоза в опухолевых клетках [Ilinskaya *et al.*, 2016].

Каскад митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) является ключевым сигнальным путем, регулирующим широкий спектр жизненно важных клеточных процессов, включая пролиферацию, дифференцировку, миграцию, выживание клеток и апоптоз [Dhillon *et al.*, 2007]. Мутации компонентов МАРК пути приводят к нарушениям клеточной сигнализации.

В таких случаях MAPK-каскады могут функционировать даже в отсутствие соответствующих стимулов, конститутивно активируя нижележащие эффекторы. Дисрегуляция MAPK-каскада может привести к неконтролируемому делению клеток, потере контроля клеточного цикла и нечувствительности к индукции апоптоза, что приводит к образованию злокачественных опухолей, их метастазированию и устойчивости к противораковым препаратам [Lotfaliansaremia *et al.*, 2021].

Рецептор эпидермального фактора роста EGFR и трансдуктор KRAS являются основными компонентами MAPK-каскада, мутации в генах которых приводят к развитию различных типов рака [Lotfaliansaremia *et al.*, 2021]. Известно, что связывание биназы с белком KRAS дикого типа вызывает блокирование передачи сигнала MAPK/ERK, однако, взаимодействие биназы с рецептором EGFR MAPK пути до сих пор не изучалось.

В связи с этим, целью данной работы явилось оценить способность биназы к взаимодействию с основными компонентами MAPK пути – рецептором EGFR и RAS белком.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- 1) Оценить способность биназы взаимодействовать с рецептором эпидермального фактора роста EGFR и RAS белком в клетках трижды негативного рака груди BT-20 и аденокарциномы легких человека A549, соответственно, методом иммунофлуоресцентного анализа;
- 2) Охарактеризовать распределение биназы в клетках BT-20 и A549;
- 3) Проанализировать влияние биназы на деградацию EGFR и RAS белков;
- 4) Оценить цитотоксический потенциал биназы совместно с таргетными препаратами к EGFR и KRAS.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что биназа в первые минуты инкубации взаимодействует с рецептором эпидермального фактора роста EGFR и RAS белком на цитоплазматической мембране клеток BT-20 и A549, соответственно. Далее комплексы биназа-EGFR и биназа-RAS детектировались в околядерном пространстве. Обработка клеток биназой вызывала интернализацию рецептора EGFR внутрь клеток, без его рециркуляции на мембрану.
2. Обнаружено, что биназа эффективно проникает в опухолевые клетки BT-20 и A549, диффузно распределяясь в цитоплазме. В клетках BT-20 биназа накапливалась в ядре в первые 15 мин инкубации, далее фермент локализовался в околядерном пространстве. В клетках A549 биназа детектировалась в ядре на протяжении всего периода инкубации.
3. Показано, что биназа индуцирует деградацию рецептора EGFR и RAS белков в клетках BT-20 и A549, соответственно;
4. Обнаружено, что комбинированная обработка опухолевых клеток биназой и таргетными препаратами к EGFR и RAS усиливает их цитотоксический эффект. В то время, как предварительная обработка клеток BT-20 и A549 цетуксимабом и золедроновой кислотой, соответственно, приводит к снижению цитотоксичности биназы, что указывает на то, что рецептор EGFR и RAS белок являются молекулярными мишенями цитотоксического действия биназы.