

Министерство образования и науки РФ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ

Специальность: 06.03.01 (ОКСО 020400.62) – биология

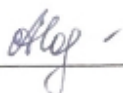
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Дипломная работа

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ГУАНИЛПРЕДПОЧИТАЮЩЕЙ
РИБОНУКЛЕАЗЫ ИЗ ПРИРОДНОГО ШТАММА *BACILLUS
LICHENIFORMIS***

Работа завершена:

" 1 " мая 2017 г.



(А.И. Надырова)

Работа допущена к защите:

Научные руководители

к.б.н., с.н.с.,

" 1 " мая 2017 г.



(В.В. Ульянова)

ассистент,

" 1 " мая 2017 г.



(Ю.В. Сокурэнко)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор,

" 7 " мая 2017 г.



(О.Н. Ильинская)

Казань–2017

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время проблема разработки новых противоопухолевых препаратов, отличающихся таргетным действием и низкой цитотоксичностью по отношению к здоровым клеткам, поставлена наиболее остро. Перспективным является такой класс ферментов, как рибонуклеазы (РНказы). РНказы – класс гидролитических ферментов нуклеинового обмена, играющих ключевую роль в метаболизме РНК. Они регулируют экспрессию генов, рост и дифференцировку клеток, принимают участие в иммунном ответе и активации путей физиологической гибели клеток [Arraiano *et al.*, 2010; Takahashi *et al.*, 1982; Chakrabarti *et al.*, 2011; Rosenberg *et al.*, 2008]. При изучении цитотоксичности РНказ млекопитающих по отношению к малигнизированным клеткам было показано, что они теряют свою ферментативную активность, подвергаясь действию цитозольного ингибитора РНказ (RI), в то время как РНказы микробного происхождения нечувствительны к его действию, что является их неоспоримым преимуществом [Leland *et al.*, 2001].

Бактериальные РНказы семейства N1/T1 (EC 3.1.27.3) проявляют как противоопухолевое, так и противовирусное действие [Makarov *et al.*, 2008; Shah Mahmud *et al.*, 2013]. Наиболее изученными представителями данного семейства являются биназа и барназа, синтезируемые *Bacillus pumilus* и *B. amyloliquefaciens*, соответственно. Это небольшие ферменты, расщепляющие РНК с предпочтением к гуаниловым остаткам и образованием циклических производных. Барназа и биназа сходны по первичной структуре, а также по физико-химическим и каталитическим свойствам [Ulyanova *et al.*, 2011].

Ранее было показано, что аминокислотная последовательность РНказы *B. licheniformis* (балифазы) гомологична таковой для биназы и барназы, причем основные различия не затрагивают функционально значимые области активного центра фермента. Кроме того, по основным

физико-химическим параметрам, рассчитанным для балифазы, фермент ближе к барназе [Sokurenko *et al.*, 2016]. Несомненно, поиск и изучение новых видов РНКаз позволит расширить спектр терапевтических препаратов, обладающих активностью в отношении различных онкологических и вирусных заболеваний.

В связи с изложенным выше цель данной работы заключается в получении гомогенного препарата гуанилпредпочитающей рибонуклеазы *Bacillus licheniformis* с использованием природного штамма-продуцента. В работе решали следующие задачи:

1. Выделить и очистить РНКазу *Bacillus licheniformis*;
2. Оценить чистоту полученного препарата белка;
3. Определить вероятность формирования олигомерных структур;

ВЫВОДЫ

1. В ходе работы впервые была выделена и очищена РНКаза *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 методом ионообменной хроматографии;
2. Масс-спектрометрический анализ подтвердил чистоту препарата: в полученной фракции содержалась исключительно РНКаза *Bacillus licheniformis*;
3. Была доказана способность балифазы формировать олигомерные структуры. Наиболее вероятные модели димера и тримера имеют единственный способ построения, который основывается на электростатическом взаимодействии субъединиц.