

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: 06.04.01 (ОКСО 020400.68) – биология

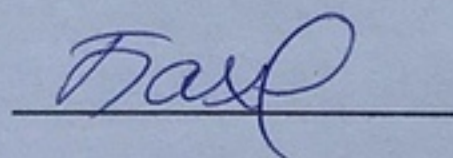
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская диссертация

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ МУТАЦИЙ, ВЫЗЫВАЮЩИХ
ГИПЕРЭКСПРЕССИЮ ГЕНА БИНАЗЫ**

Работа завершена:

«31» 05 2019 г.



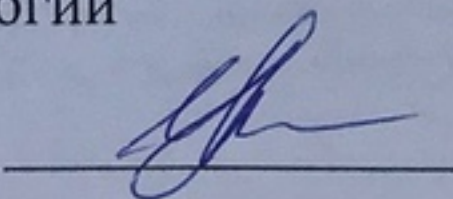
(А.И. Бахтиярова)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель

к.б.н., ст. преп. каф. микробиологии

«31» 05 2019 г.

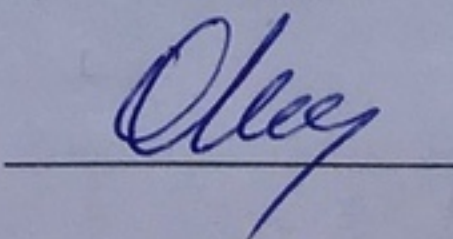


(В.В. Ульянова)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

«01» 05 2019 г.



(О.Н. Ильинская)

ВВЕДЕНИЕ

Важнейшим семейством ферментов нуклеинового обмена являются рибонуклеазы (РНКазы). РНКазы, катализирующие расщепление РНК, играют ключевую роль в регуляции жизнедеятельности любого организма, от вирусов до человека. Особое внимание уделяется микробным РНКазам ввиду их селективного цитотоксического действия на раковые клетки, а также нечувствительности к ингибитору РНКаз млекопитающих. Современные представления о роли и функциях микробных РНКаз позволяют рассматривать их как перспективные объекты для создания новых противоопухолевых препаратов, альтернативных традиционным химиотерапевтическим средствам, в шадящей терапии злокачественных новообразований [Ильинская с соавт., 2005, Зеленихин, 2006, Mitkevich *et al.*, 2015]. Механизм цитотоксического действия РНКаз является комплексным. Определенный вклад вносит каталитическая активность фермента, необходимая для регуляции транскрипции посредством гидролиза тРНК и предшественников мРНК [Mitkevich *et al.*, 2014].

Рибонуклеазы играют главную роль в метаболизме внутриклеточной РНК. Функции РНКаз определяются их способностью расщеплять мРНК, образовывать зрелые формы РНК из их предшественников, разрушать РНК [Ильинская с соавт., 2005]. В дополнение к этому РНКазы участвуют в контроле экспрессии генов, росте и дифференцировке клеток, иммунной защите и индукции апоптоза [Araiano, *et al.*, 2010, Tomecki *et al.*, 2010, Chakrabarti *et al.*, 2011, Rosenberg, 2008]. РНКазы обеспечивают продукцию малых регуляторных РНК [Deutscher, 2001]. Особое внимание уделяется биологическим эффектам РНКаз, таким, как контроль роста кровеносных сосудов, противовирусная и противоопухолевая активность [Зеленихин, 2012, Шах Махмуд с соавт., 2013]. Участие РНКаз в защите клеток и организма от вируса подтверждено многочисленными фактами [Алексеева с соавт., 1981, Грибенча с соавт., 2004, Грибенча с соавт., 2006, Shah Mahmud *et al.*, 2013]. Накоплен значительный массив данных, позволяющих

рассматривать РНКазы не только как компоненты иммунной защиты, но и как основу для разработки новых противовирусных препаратов.

Одним из наиболее изученных представителей бактериальных РНКаз является биназа, низкомолекулярная гуанилпредпочитающая рибонуклеаза, секретируемая *Bacillus pumilus*. Для получения белков в достаточном количестве с целью их последующего применения обычно используются различные методы генной инженерии. Штамм *Bacillus pumilus* 3-19, полученный из почвенного изолята *B. pumilus* 7P путем химического мутагенеза характеризуется устойчивостью к стрептомицину (до 500 мкг/мл) и способностью вырабатывать внеклеточные ферменты в количествах, до 10 раз превышающих родительский штамм. Эти особенности делают штамм 3-19 подходящим для промышленного производства биназы, которая известна противоопухолевыми и противовирусными свойствами и может быть использована как РНК-деградирующий инструмент в молекулярной биологии [Ульянова *et al.*, 2016].

В связи с вышеизложенным целью данной работы стала оценка вклада мутаций, приобретенных стрептомицин-устойчивым штаммом *Bacillus pumilus* 3-19, в гиперэкспрессию гена биназы.

В работе решали следующие задачи:

1. Выявить мутантные гены в геноме *B. pumilus* 3-19 путем сравнения его последовательности с нативным штаммом *B. pumilus* 7P.
2. Получить клоны *B. pumilus* 7P с точечными мутациями в генах-кандидатах.
3. Оценить влияние мутаций в генах-кандидатах на уровень продукции секретируемой рибонуклеазы.

ВЫВОДЫ

1. При сопоставлении последовательностей геномов штамма *B. pumilus* 7P и его стрептомицин-устойчивого мутанта *B. pumilus* 3-19 были выявлены гены *rpoB*, *spo0F*, *comA*, *rpsL*, мутации в которых потенциально способны оказать влияние на уровень экспрессии гена биназы.
2. Методом ПЦР были получены фрагменты генома мутантного штамма *B. pumilus* 3-19, содержащие гены-кандидаты; при трансформации ими штамма *B. pumilus* 7P были получены соответствующие мутантные клоны.
3. Было обнаружено, что мутации в генах *rpoB* и *spo0F* вызывают повышение уровня РНКазной активности, мутации в гене *comA* не влияют на биосинтез РНКазы, а мутации в гене *rpsL* приводит к уменьшению биосинтеза РНКазы. Мутация K56N в гене *rpsL* отвечает за устойчивость штамма *B. pumilus* 3-19 к стрептомицину.