

Министерство образования и науки РФ  
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

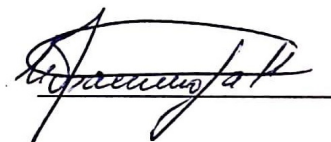
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская диссертация

**ПОЛУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ПРОДУКЦИИ  
МУТАНТНЫХ БАЦИЛЛЯРНЫХ РНКаз**

Работа завершена:

«30» 05 2017 г.



(Н.Р. Ибрагимова)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель

к.б.н., с.н.с. каф. микробиологии

«30» 05 2017 г.



(В.В. Ульянова)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

«1» июня 2017 г.



(О.Н. Ильинская)

Казань-2017

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в мире ведутся исследования противоопухолевого и противовирусного потенциала экзогенных рибонуклеаз. На сегодняшний день получен значительный объем экспериментальных и теоретических данных о широком спектре биологических эффектов РНКаз при воздействии на клетки. Наиболее известными ферментами, демонстрирующими высокий противоопухолевый потенциал, являются РНКазы из семенников быка (РНКазы BS) [Патутина с соавт., 2010] и РНКазы ооцитов леопардовой лягушки *Rana pipiens* (онконаза) [Rybak *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2000; Costanzi *et al.*, 2005]. Данные протеины относятся к семейству белков РНКазы А. Представители этого семейства обладают цитотоксическими и антибактериальными свойствами, которые позволяют им участвовать в разнообразных физиологических процессах, в том числе в регуляции ангиогенеза, клеточного апоптоза, неспецифической защите респираторного тракта. Несмотря на широкий спектр действия этих РНКаз, клиническое применение не всегда возможно. Клетки млекопитающих защищены от действия собственных РНКаз цитозольным ингибитором [Shapiro *et al.*, 2001]. В связи с этим, все большую перспективу приобретают бактериальные рибонуклеазы, которые не инактивируются этим ингибитором.

Современная биоинженерия предоставляет большие возможности по созданию терапевтических противоопухолевых и противовирусных средств на основе бактериальных РНКаз. Особый интерес представляют нативные бациллярные рибонуклеазы, которые проявляют ростостимулирующее, мембранотропное, противоопухолевое и цитотоксическое действие, противовирусные, мутагенные и антимутагенные свойства. Такими свойствами обладает РНКазы *Bacillus pumilus* – биназа [Алексеева с соавт., 1981; Макагов *et al.*, 2008]. Особый вклад в проявление биологических эффектов, механизмы которых остаются до конца не расшифрованными,

вносят катионность и каталитическая активность фермента. Вместе с тем, было показано, что иммуномодулирующие свойства биназы не зависят от каталитической активности фермента [Kalacheva, Kurinenko, 2005]. Более того, последние данные показывают, что биназа может непосредственно связываться с одним из онкогенов и блокировать путь сигнальной трансдукции, оказывая тем самым противоопухолевый эффект [Pinskaya et al., 2016].

Установление связей между биохимическими свойствами, структурными особенностями и биологическими эффектами РНКаз позволит целенаправленно создавать и эффективно применять биоинженерные конструкции на основе бактериальных рибонуклеаз в лечении вирусных заболеваний и злокачественных новообразований.

Целью настоящей работы явилось получение генетических конструкций для продукции бациллярных рибонуклеаз без каталитической активности. В связи с поставленной целью решали следующие задачи:

- 1) Внести мутации в ген рибонуклеазы *Bacillus pumilus* - биназы, приводящие к изменению каталитической активности фермента, методом сайт-направленного мутагенеза
- 2) Определить потенциал плазмид рML для экспрессии мутантных форм рибонуклеазы биназы
- 3) Клонировать мутированные нуклеотидные последовательности в экспрессионный вектор для индуцируемой экспрессии биназы в рекомбинантном штамме и выделения белка из внутриклеточного пространства
- 4) Оценить экспрессию мутантных форм биназы в рекомбинантных штаммах, несущих полученные генетические конструкции.

## ВЫВОДЫ

- 1) Были внесены изменения в ген рибонуклеазы *Bacillus pumilus* - биназы, приводящие к заменам His101Glu, Lys26Ala, Lys26Arg, которые отвечают за снижение каталитической активности биназы
- 2) Показано, что плазмиды pML не подходят для экспрессии мутантных форм рибонуклеазы с целью выделения белка.
- 3) На основе экспрессионного вектора pET15b получены генетические конструкции, позволяющие получать мутантные формы биназы с отщепляемой полигистидиновой меткой на N-конце.
- 4) Полученные плазмиды обеспечивали экспрессию мутантных форм биназы и могут быть использованы для выделения рекомбинантного белка из внутриклеточного пространства штамма-продуцента.