

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

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ

Направление: 06.04.01 (ОКСО 020400.68) – биология

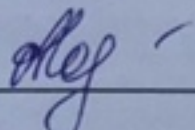
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Магистерская диссертация

**ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОЙ
РИБОНУКЛЕАЗЫ *VACILLUS LICHENIFORMIS***

Работа завершена:

" 31 " 05 2019г.



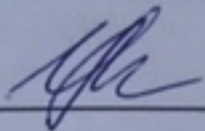
(А.И. Надырова)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель

к.б.н., с.н.с.,

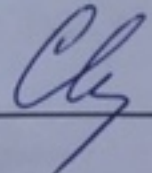
" 31 " 05 2019 г.



(В.В. Ульянова)

ассистент,

" 31 " 05 2019 г.

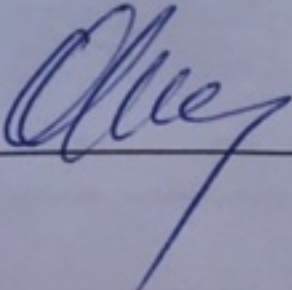


(Ю.В. Сурченко)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор,

" 31 " 05 2019 г.



(О.Н. Ильинская)

Казань–2019

ВВЕДЕНИЕ

Традиционные химиотерапевтические средства, применяемые сегодня в борьбе со злокачественными новообразованиями, обладают высокой цитотоксичностью по отношению к здоровым клеткам человека. В настоящее время идет активный поиск препаратов, отличающихся селективностью действия, поэтому внимание исследователей привлек такой класс микробных ферментов, как рибонуклеазы (РНказы). Было показано, что РНказы могут избирательно воздействовать исключительно на злокачественные клетки, вызывая их апоптическую гибель. Неоспоримым преимуществом РНказ бактерий также является их нечувствительность к действию цитозольного ингибитора, который защищает клетки млекопитающих от губительного воздействия собственных РНказ.

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 нуклеинового обмена, расщепляющие РНК с предпочтением к гуаниловым остаткам и образованием циклических производных. Барназа и биназа гомологичны по первичной структуре, а также по физико-химическим и каталитическим свойствам [Ulyanova *et al.*, 2011].

Ранее мы охарактеризовали физико-химические свойства новой РНказы *B. licheniformis*, ее генетическое окружение, структуру промотора, способ секреции. В ходе работы с помощью методов ионообменной хроматографии нами впервые был получен очищенный препарат исследуемой РНказы *B. licheniformis* с ферментативной активностью 1.5×10^6 опт. ед./A280 из нативного штамма-производителя [Sokurenko *et al.*, 2016]. В соответствии с видом производителя (*B. licheniformis*) новый фермент назван нами балифазой по аналогии с принятыми названиями бациллярных

РНКаз (биназа из штамма, ранее называвшегося *B. intermedius* 7P и переопределенного нами как *B. pumilus* 7P [Ульянова *et al.*, 2016]; барназа – из *B. amyloliquefaciens* H2). Была впервые показана способность балифазы формировать олигомерные структуры.

Для детального изучения структуры нового фермента и его свойств необходим очищенный препарат белка в достаточном количестве, однако процесс получения целевого продукта из нативного продуцента достаточно трудоемкий, с невысоким выходом по белку. Высокоэффективные экспрессионные конструкции, в которых ген целевого белка находится под контролем сильного промотора, позволяют получить исследуемый белок в большем объеме за меньший промежуток времени, а внесение полигистидиновой афинной метки не только облегчает очистку рекомбинантных белков и их детектирование, но и позволяет оценить степень влияния структурных элементов молекулы рекомбинантного белка на его свойства. В связи с этим, целью настоящей работы стала характеристика рекомбинантной РНКазы *B. licheniformis*. Для достижения поставленной цели следующие задачи:

- 1) Создать на основе рЕТ векторов генетические конструкции, содержащие ген РНКазы *B. licheniformis* с полигистидиновой меткой на N- или C-конце, для экспрессии в штамме *Escherichia coli* Lemo21 (DE3) и подобрать оптимальные условия экспрессии гена балифазы;
- 2) Провести очистку рекомбинантных РНКаз *B. licheniformis*, оценить влияние полигистидиновой метки на N- или C-конце молекулы на ее структуру и физико-химические свойства по сравнению с аутентичным белком;
- 3) Оценить цитотоксические свойства аутентичной и рекомбинантных РНКаз *B. licheniformis* по отношению к клеткам аденокарциномы легких и к нормальным клеткам легочного эпителия, выявить вклад структурных элементов молекулы в ее противоопухолевую активность.

ВЫВОДЫ

1) Для продукции рибонуклеазы *Bacillus licheniformis* с полигистидиновой меткой на N- или C-конце в клетках *Escherichia coli* были созданы две генетические конструкции – pet2615-HisBaliYrdF и pet26b-BaliHis соответственно.

2) Наиболее эффективные условия экспрессии гена балифазы в рекомбинантном штамме *E. coli* Lemo21 (DE3) включали индукцию синтеза рекомбинантного белка с помощью 1 mM ИПТГ в течение 5 часов при одновременной экспрессии гена внутриклеточного ингибитора YrdF.

3) Полученные рекомбинантные белки сохранили каталитическую активность и способность к димеризации по сравнению с аутентичным белком, при этом внесение полигистидиновой метки на N- или C-конец белка не привело к значительному изменению его физико-химических свойств.

4) Цитотоксические свойства балифазы с N-концевой полигистидиновой меткой по отношению к клеточным линиям A549 (аденокарцинома легких) и ЛЭК (нормальные клетки легочного эпителия) были сходны с таковыми аутентичного белка, в то время как балифаза с C-концевой полигистидиновой меткой оказалась цитотоксичнее их в 4.5-5 раз, но утратила селективность действия.