

**Вклад каталитической активности рибонуклеазы *Bacillus pumilus* в  
цитотоксичность**

**Надырова Алсу Ильдаровна**

*Аспирант*

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной  
медицины и биологии, Кафедра микробиологии, Казань, Россия

*E-mail: alsu.nadyrova@yandex.ru*

Бактериальная рибонуклеаза *B. pumilus* (биназа) зарекомендовала себя как перспективный противоопухолевый агент, проявляющий избирательность действия по отношению к линиям опухолевых клеток, экспрессирующих специфические онкогены *KIT*, *ras*, *AML/ETO*, *FLT3* [1, 2], а также ингибирующий процессы метастазирования опухолей у животных [3]. Принципиальная роль каталитической активности в проявлении цитотоксических эффектов РНКаз вызывает немало дискуссий, в связи с этим целью данной работы стала оценка вклада каталитической активности биназы в цитотоксичность фермента.

Активный центр биназы представлен пятью аминокислотными остатками: Lys 26, Glu 72, Arg 82, Arg 86, His 101 [4]. За непосредственное связывание с субстратом отвечают Glu 72, His 101, Lys 26. Методом сайт-направленного мутагенеза мы внесли радикальные замены в активный центр фермента His101Glu и Lys26Ala, с использованием шаттл-вектора pGP380 в качестве матрицы. Мутации в гене биназы детектировали секвенированием по Сэнгеру.

Рекомбинантные белки выделяли из культуральной жидкости протеадефицитного штамма *B. subtilis* 2036. На первом этапе белки пропускали через ДЭАЭ-целлюлозу, затем сорбировали на фосфоцеллюлозе, а на третьем этапе белки очищали с помощью ВЭЖХ, элюцию проводили в линейном градиенте NaCl. Полученный хроматографический профиль образцов был представлен в виде одиночных симметричных пиков, что указывало на однородность белковых фракций (рис. 1). На ДСН-электрофорезе пиковых фракций были обнаружены только белки с молекулярной массой 12 кДа, которые также были детектированы антителами к биназе в ходе Вестерн-блот анализа (рис. 2). Каталитическая активность мутанта Lys26Ala на высокополимерном субстрате составила 11% от нативного фермента, а His101Glu - 0.02%.

Исследование цитотоксичности полученных ферментов проводили в МТТ-тесте на моделях опухолевых клеток человека линий А549, ВТ-20, НuTu80, а также на модели нормальных клеток эмбриона человека WI38. Было показано, что мутантные производные наряду с нативной биназой обладают избирательной цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам, не оказывая при этом существенного влияния на популяцию нормальных клеток. Биназа с мутацией Lys26Ala как и нативный фермент в концентрации 300 мкг/мл снижала жизнеспособность клеток А549 и ВТ-20 на 25%, при этом клетки НuTu80 оказались более чувствительными к действию биназы: их жизнеспособность снижалась на 75% (рис. 3). Мутант без каталитической активности не оказывал значительного влияния на жизнеспособность опухолевых клеток.

В ходе работы было показано, что остаточный уровень каталитической активности мутанта биназы Lys26Ala в размере 11% является достаточным для проявления цитотоксичности, присущей нативному ферменту. При этом утрата ферментом каталитической активности является критической, что лишает его цитотоксических свойств. Таким образом, наличие каталитической активности является ключевой составляющей цитотоксического действия биназы.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ №21-74-10036 и Министерства науки и высшего образования в рамках программы "Приоритет-2030".

### Источники и литература

- 1) Plinskaya, O. N. Bacillus intermedius ribonuclease as inhibitor of cell proliferation and membrane current [Text] / O. Plinskaya, K. Decker, A. Koschinski, F. Dreyer, H. Repp // Toxicology. – 2001. – V. 156. – P. 101-107.
- 2) Mitkevich, V. A. Sensitivity of acute myeloid leukemia Kasumi-1 cells to binase toxic action depends on the expression of KIT and AML1-ETO oncogenes / V. Mitkevich, I. Petrushanko, P. Spirin, T. Fedorova, O. Kretova, N. Tchurikov, V. Prassolov, O. Plinskaya, A. Makarov // Cell Cycle. – 2011. – Т. 10. – №. 23. – С. 4090-4097.
- 3) Mohamed, I. S. E. Antitumour Activity of the Ribonuclease Binase from Bacillus pumilus in the RLS40 Tumour Model Is Associated with the Reorganisation of the miRNA Network and Reversion of Cancer-Related Cascades to Normal Functioning [Text] / I. S. E. Mohamed, A. V. Sen'kova, A. I. Nadyrova, I. A. Savin, A. V. Markov, V. A. Mitkevich, M. A. Zenkova // Biomolecules. – 2020. – Т. 10. – №. 11. – С. 1509.
- 4) Sevcik, J. Comparison of active sites of some microbial ribonucleases: structural basis for guanylic specificity [Text] / J. Sevcik, R.G. Sanishvili, A.G. Pavlovsky, K. M. Polyakov // Trends Biochem. Sci. – 1990. – V. 15. – P. 158-162.

### Иллюстрации

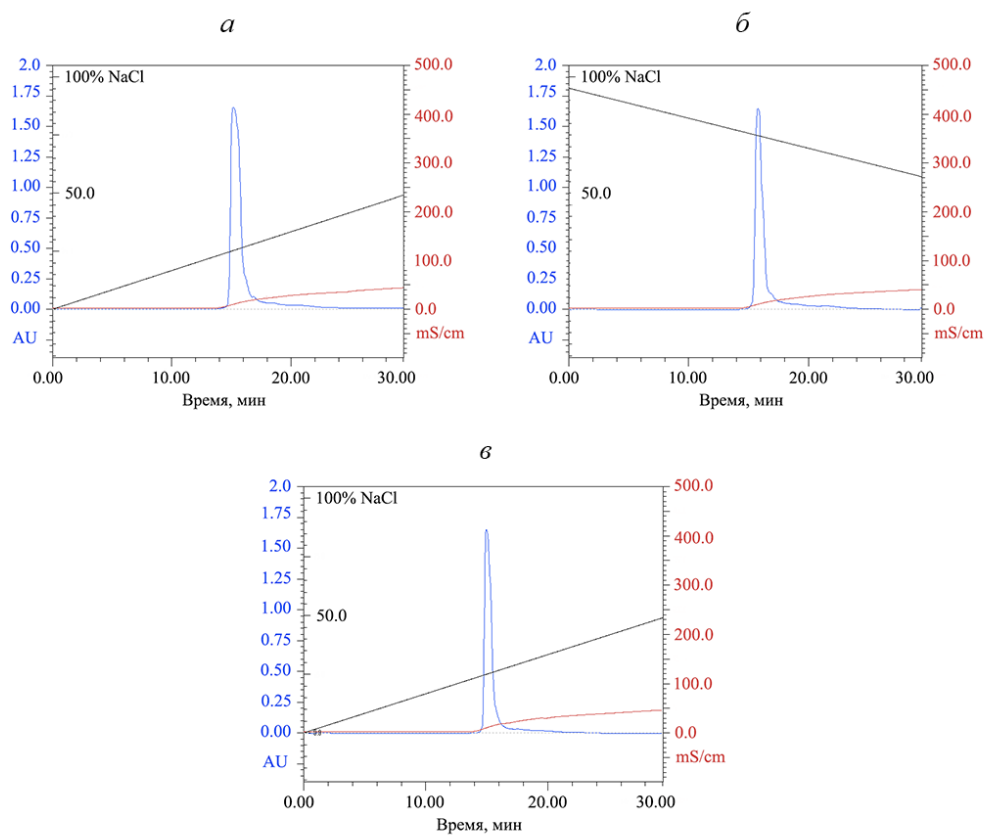


Рис. : Рисунок 1 – Хроматографический профиль элюции рекомбинантной биназы в линейном градиенте NaCl 0-1 М с использованием системы FPLC BioLogic Duo Flow. А – биназа; Б – His101Glu; В – Lys26Ala. AU: единицы поглощения,  $\text{mS} \times \text{cm}^{-1}$ : проводимость.

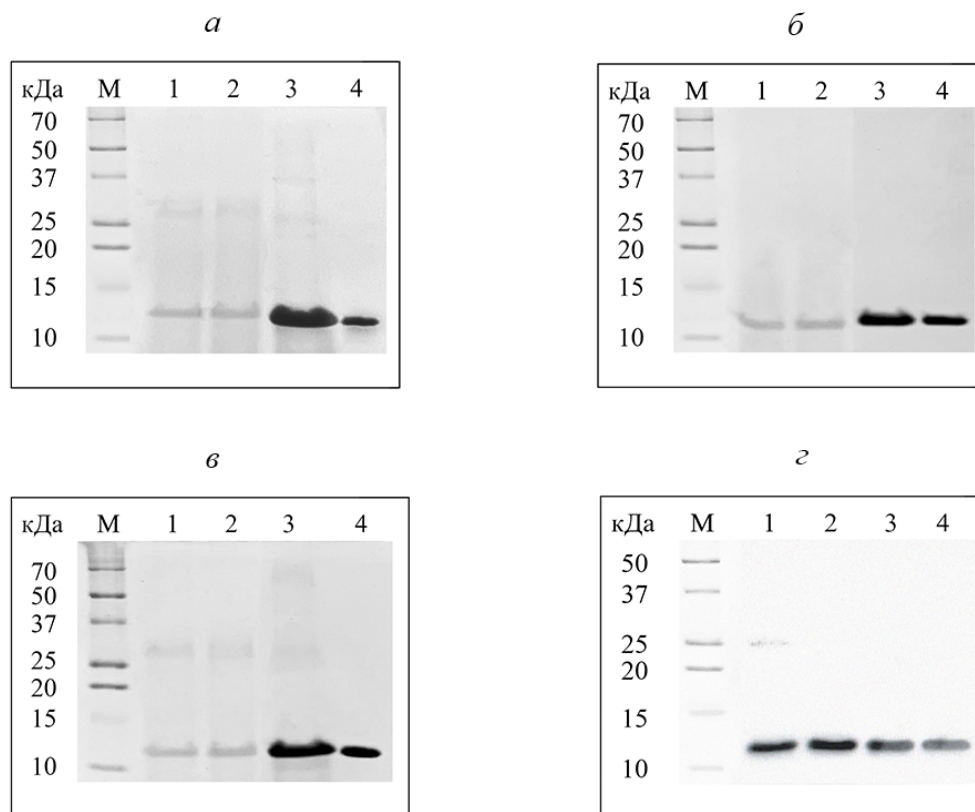


Рис. : Рисунок 2 – Электрофореграмма фракций рекомбинантной биназы (А), мутантов Lys26Ala (Б) и His101Glu (В) на различных этапах очистки: 1 – Культуральная жидкость до очистки; 2 – После сорбции на ДЭАЭ-целлюлозе; 3 – Пиковая фракция после элюции на фосфоцеллюлозе 4 – После ВЭЖХ (3 мкг на лунку); М – Precision Plus Protein Dual Xtra Prestained Protein Standards. Г – Вестерн-блот анализ пиковых фракций биназы после ВЭЖХ: 1 – Нативная биназа; 2 – Рекомбинантная биназа; 3 – Lys26Ala; 4 – His101Glu; М - Precision Plus Protein Dual Xtra Prestained Protein Standards.

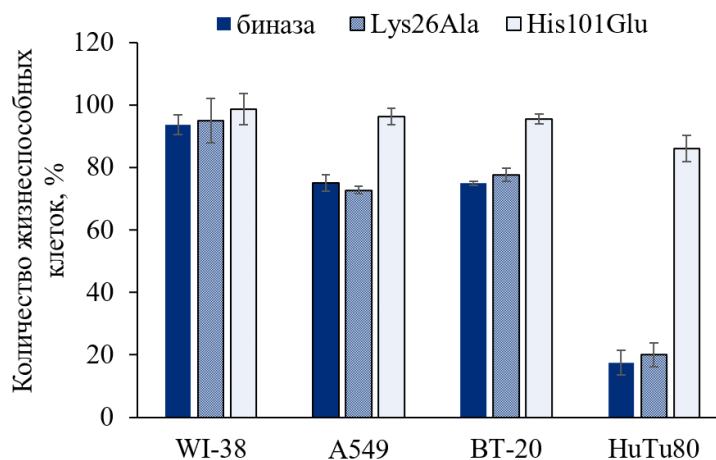


Рис. : Рисунок 3 – Оценка цитотоксичности нативной биназы и мутантов His101Glu и Lys26Ala по отношению к линиям опухолевых клеток А549, ВТ-20, НuТu80 и к нормальным клеткам WИ-38 через 48 часов.