

Введение Рибонуклеазы – ферменты класса гидролаз, играющие ключевую роль в метаболизме РНК [1]. РНКазы осуществляют гидролиз мРНК, участвуют в превращении предшественников РНК в зрелые формы, а также обеспечивают продукцию малых регуляторных РНК [2]. Помимо своей основной функции, рибонуклеазы участвуют в контроле экспрессии генов, росте и дифференцировке клеток, иммунной защите и индукции апоптоза [3]. Особое внимание уделяется биологическим эффектам РНКаз, таким, как: контроль роста кровеносных сосудов, противовирусная и противоопухолевая активность. Одной из задач медицины является разработка щадящих методов лечения онкологических заболеваний, поскольку современные противоопухолевые агенты зачастую малоэффективны вследствие недостаточного избирательного действия по отношению к раковым клеткам [4]. Поскольку для ряда РНКаз показана селективная цитотоксичность, их рассматривают в качестве перспективных терапевтических средств в лечении злокачественных новообразований. На сегодняшний день наиболее известным ферментом для противоопухолевой терапии является РНКаза лягушки *Rana pipiens* – онконаза, которая проходит III стадию клинических испытаний против мезотелиомы легких [5]. Среди терапевтически значимых РНКаз у РНКаз животного происхождения отсутствуют нежелательные иммунных реакции, однако, их активность блокируется действием специфического цитозольного ингибитора, предохраняющего животные клетки от токсического действия собственных РНКаз [6]. В связи с этим перспективными в лечении опухолевых заболеваний являются РНКазы, филогенетически отдаленные от своих аналогов у млекопитающих, такие, как РНКазы амфибий, грибов и микроорганизмов, нечувствительные к действию ингибитора [7]. В частности, РНКаза *Bacillus intermedius* 7P - биназа (12 кДа, 109 аминокислотных остатков, pI 9,5) селективно ингибирует рост клеток аденокарциномы легких A549 [8] и лейкоза Касуми [9]. Естественный аналог биназы – секретлируемая РНКаза *Bacillus thuringiensis* var. *subtoxicus* B388 (RBT) – была впервые описана в начале 90-х годов, установлена ее аминокислотная последовательность и охарактеризованы каталитические свойства [10]. RBT отличается от биназы только заменой аминокислоты аланина (Ala106) на треонин (Thr106) [11]. Сравнительный анализ двух природных РНКаз внесет вклад в понимание роли определенных аминокислот, а именно неполярного гидрофобного аланина молекулы биназы в механизм ее противоопухолевой активности и позволит в дальнейшем сопоставить ее с предполагаемым противоопухолевым действием гомологичной РНКазы RBT, где Ala106 заменен на полярный незаряженный треонин. В связи с этим целью настоящей работы стало выделение RBT для последующего исследования ее молекулярных и биологических свойств. Материалы и методы исследования Штаммы, плазмиды и условия роста. В работе использовали штаммы бактерий *Escherichia coli* DH5 α , *Bacillus megaterium* PV370, *Bacillus subtilis* 168 (BGSC, The

Ohio State University, США) и *Bacillus thuringiensis* var. *subtoxicus* B388 (Центр Биотехнологии РАН, Москва). Ген РНКазы *B. thuringiensis* var. *subtoxicus* B388 (RBT) был получен из коллекции Центра Биотехнологии РАН (Москва) на плазмиде pLS1, несущей также ген ингибитора РНКазы – барстара. Для клонирования этого гена был выбран коммерческий вектор pDG148 с индуцируемым промотором P_{spac}. Транскрипция клонированного гена активируется добавлением в среду изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ). Культивирование бактерий проводили на жидком или агаризованном L-бульоне в шейкере-инкубаторе с интенсивностью качания 200 об/мин при температуре 37°C. При выращивании рекомбинантных штаммов в питательную среду добавляли антибиотики: для *Escherichia coli* DH5α - ампициллин (100 мкг/мл), время инкубации составляло 14-16 ч., для рекомбинантного штамма *Bacillus megaterium* PV370 канамицин (10 мкг/мл), бактерии выращивали 18-24 ч. Генетические конструкции Для создания плазмидной конструкции, содержащей RBT и барстар под контролем индуцируемого промотора P_{spac}, клонируемый фрагмент встроили в вектор pDG148. Исходный ген RBT с барстаром вначале амплифицировали с плазмиды pLS1, а затем с pMZ58, полученной на кафедре микробиологии КФУ [12] и модифицированной нами. ПЦР проводили с использованием в качестве праймеров следующих олигонуклеотидов, содержащих сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции HindIII и SphI: F-Hind: GGAAGTCAAGCTTCCTTAATAGGAGGATGAAGATG R-Sph: TAGTCGGCATGCGTTCCATATTGTTTCATCTCC Условия реакции: 94°C - 2 мин., 94°C - 1 мин., 53°C - 1 мин., 72°C - 1 мин., всего - 30 циклов, с заключительным синтезом при 72°C в течение 5 мин. Реакцию проводили с использованием термоциклера «MJ MINI» производства фирмы «Bio Rad». ПЦР-продукт, содержащий сайты рестрикции Hind III и Sph I, и ДНК вектор pDG148 гидролизовали рестриктазами HindIII и SphI фирмы «Сибэнзим» (Россия). Рестрикцию плазмидной ДНК проводили при температуре 37°C в течение 3 часов, амплифицированный фрагмент рестрицировали 1 час. Количество ДНК вектора в реакции составляло 4-6 мкг, ПЦР-продукта - 500 нг. Рестриктазы инактивировали при температуре 80°C в течение 20 минут. С целью очистки рестрицированного вектора и ПЦР-фрагмента от гидролизованных олигонуклеотидов и различных примесей, которые могут препятствовать работе Т4-лигазы, плазмидную ДНК наносили на агарозный гель и выделяли из геля с использованием набора «Gel Extraction kit» «Fermentas» (Литва). ПЦР продукт очищали при помощи «GeneJet PCR Purification Kit» «Fermentas» (Литва) в соответствии с инструкцией производителя. Продукт амплификации лигировали с вектором pDG148 с использованием Т4 - лигазы «Fermentas» (Литва). Лигирование проводили при температуре 22°C в течение 12-14 ч. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* DH 5α. Трансформация и анализ рекомбинантной плазмидной ДНК. Компетентные клетки *E. coli* DH 5α готовили с использованием CaCl₂ [13]. Ночную культуру *E. coli*

DH 5 α пересевали на свежую среду LB и выращивали до оптической плотности 0.5-0.8. Клетки центрифугировали, осадок промывали ледяным стерильным 0.1M MgCl₂ и инкубировали на льду в течение 10 мин. Далее бактериальную культуру снова центрифугировали, осадок ресуспендировали в ледяном стерильном 0.1 M CaCl₂. Процедуру повторяли дважды. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки E.coli DH5 α . К 100 мкл химически компетентных клеток добавляли 1/2 объема лигазной смеси. Клетки подвергали температурному шоку, выдерживая во льду в течение 30 мин, затем при 42 $^{\circ}$ C - 90 сек., и снова во льду в течение 2 мин. К клеткам добавляли 800 мкл среды SOC, инкубировали в течение 1 ч при 37 $^{\circ}$ C, высевали на чашки с L - агаром и ампициллином, инкубировали при 37 $^{\circ}$ C 14-16 часов. Для подтверждения встраивания клонируемого фрагмента в состав вектора pDG148, плазмиды выделяли из рекомбинантных клонов E.coli DH 5 α методом щелочного лизиса [14] и анализировали с помощью ПЦР и рестрикционного анализа, условия экспериментов описаны выше. Для выделения плазмид клетки 16-ти часовой культуры E.coli DH5 α осаждали. Осадок ресуспендировали в 350 мкл буфера 1 (100 мг/мл RNКазы A, 10 mM ЭДТА, 50 mM трис-HCl, pH 8.0). Затем добавляли 350 мкл буфера 2 (200 mM NaOH и 1% SDS), осторожно перемешивали и инкубировали на льду в течение 5 мин. Далее добавляли 350 мкл буфера 3 (3M CH₃COOK, pH 5.5) и перемешивали. Смесь центрифугировали, супернатант переносили в новую пробирку, добавляли 660 мкл изопропанола и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Затем осадок промывали 400 мкл 70% этанола. Этанол полностью удаляли, осадок высушивали в течение 10 - 15 мин и затем ресуспендировали в 30 мкл ультрачистой воды (MilliQ). После подтверждения успешно проведенного клонирования, рекомбинантной конструкцией трансформировали штамм *B.megaterium* PV370 [15]. Культуру *B. megaterium* PV370 инкубировали на вибростенде 12-14 часов в 3 мл компетентной среды Спицайзена (солевая основа- 10 мл, 20% глюкоза - 0.25 мл, триптофан (2 мг/мл) - 0.1 мл, 1M MgSO₄ - 0.06 мл, 20% казаминовая кислота - 0.01 мл) при 37 $^{\circ}$ C, 200 об/ мин. Солевая основа была получена путем разведения минимальных солей Спицайзена в 5 раз (г/л) - (NH₄)₂SO₄ - 1.0; K₂HPO₄ - 7.0; KH₂PO₄ - 3; цитрат Na - 0.5; MgSO₄*7H₂O - 0.1; pH - 7.4). 0.3 мл ночной культуры пересевали в 3 мл свежей среды MM, выращивали 3 часа. Затем добавляли 3.3 мл теплой голодной среды (SZ - 10 мл, 20% глюкоза - 0.25 мл, 1M MgSO₄ - 0.06 мл) и инкубировали 2 часа. К 300 мкл компетентных клеток добавляли 10 мкл ДНК, инкубировали 1 час. Трансформированные клетки высевали на чашки с агаризованной средой (L-агар) и канамицином (10 мкг/ мл), инкубировали при 37 $^{\circ}$ C в течение 24 часов. О результатах клонирования судили по наличию у клонов RNКазной активности, индуцируемой добавлением 0.5 mM ИПТГ. Активность RNКаз. RNКазную активность определяли по методу Джеффриса, клоны выращивали на чашках Петри со средой БФС (г/л) (трис

оксиметиламинометан – 6.05; хлорид калия – 5.0; хлорид натрия – 1.0; сульфат аммония – 2.0; цитрат натрия – 1.0; сульфат магния – 0.2, глюкоза – 5.0, pH среды 8.5), содержащей дрожжевую РНК (5 мг/мл) и канамицин (10 мкг/мл). Для индукции экспрессии гена рибонуклеазы в среду добавляли 0.5 мМ ИПТГ. О наличии РНКазной активности судили по зонам деполимеризации РНК вокруг колоний, выявляемые добавлением 1 N раствора соляной кислоты [16].

Хроматография Очистка белка на колонке Клетки *Bacillus* sp. выращивали 24 ч, культуральную жидкость отделяли центрифугированием при 4000 об/мин. в течение 30 мин. Надосадочную жидкость подкисляли до pH 2.8 и разбавляли в два раза водой. Белок наносили на колонку диаметром 15 мм, высотой 230 мм, уравновешенной 20 мМ натрий-ацетатным буфером, pH 5.2, колонку с фосфоцеллюлозой P-11 промывали тем же буфером до $A_{280} = 0.05$. Затем колонку уравновешивали 20 мМ натрий-фосфатным буфером, pH 7.2 до полного уравновешивания сорбента. Элюцию белка проводили 200 мМ натрий-фосфатным буфером, pH 7.2. Скорость элюции составляла 60 мл/час.

Жидкостная хроматография Жидкостную хроматографию быстрого разрешения проводили на колонке Mono S/1 (BioRad, США) с использованием системы FPLC BioLogic DuoFlow фирмы (BioRad, США). Белки хроматографировали в линейном градиенте концентрации NaCl от 0 до 1,0 М в 20 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7.2. Скорость элюции составила 1 мл/мин. Результаты и обсуждение В 1992 году Дементьевым с соавторами была выделена и предварительно охарактеризована внеклеточная щелочная рибонуклеаза, синтезируемая штаммом *Bacillus thuringiensis* var. *subtoxicus* B388 [17]. Важнейшими характеристиками цитотоксичности РНКаз являются каталитическая активность и катионность фермента [1]. Последнее свойство позволяет РНКазам связываться с поверхностью опухолевых клеток, имеющих более высокий отрицательный заряд по сравнению с нормальными [1]. Высокая степень сходства первичной последовательности RBT с биназой предполагает наличие у RBT схожих цитотоксических свойств, которые на сегодняшний день не изучены. Нами был проведен биоинформационный анализ, который выявил, что геном бактерий вида *Bacillus thuringiensis* не имеет в своем составе генов, гомологичных генам рибонуклеаз (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), хотя *Bacillus thuringiensis* var. *subtoxicus* B388 был выбран Дементьевым [17] в ходе внутривидового скрининга штаммов *B. thuringiensis* как штамм с максимальным уровнем секреции рибонуклеазы. По всей видимости, видовое название бактерии не соответствует современной классификации микроорганизмов, в связи с чем мы обозначаем данный микроорганизм как *Bacillus* sp. Для исследования биологических свойств новой рибонуклеазы фермент был выделен и очищен с использованием жидкостной хроматографии быстрого разрешения. В ходе разработки оптимального метода выделения исследуемого белка мы исключили ряд малоэффективных и трудоемких стадий препаративной очистки, описанные

ранее в работах Чепурновой и Дементьева [17]. Белок сорбировали «в объеме» с использованием фосфоцеллюлозы P-11 при кислых значениях pH. Элюцию проводили 200 мМ натрий-фосфатным буфером, pH 7.2, выход РНКазы по активности составил 75% (табл. 1). На заключительном этапе выделения исследуемого белка РНКазу очищали с использованием жидкостной хроматографии быстрого разрешения в линейном градиенте NaCl от 0 до 1 М. Выход фермента по активности на этой стадии составил 27%. РНКазы элюировалась при концентрации NaCl в 20 мМ натрий-фосфатном буфере около 0.3 М (рис. 1). Выделение и очистка новой рибонуклеазы показали неэффективность использования нативного штамма *Bacillus sp.* в качестве продуцента исследуемого фермента, поскольку время роста штамма, необходимое для синтеза RBT, было длительным (более 20 ч), а выход и активность фермента были низкими (табл.1). С целью получения рекомбинантного штамма с повышенным уровнем RBT, где синтез фермента находится под контролем индуцируемого промотора, была создана новая экспрессионная система на основе штамма *B. megaterium* PV370. Ген RBT был встроен в вектор pDG148 под контроль сильного индуцируемого промотора P_{spac}. Таблица 1 - Схема выделения RBT из культуральной жидкости нативного штамма *Bacillus sp.*

Стадия	Объем (V), мл	Общая акт-ть белков, A280	РНКазная акт-ть, А, ед./ мл	Выход по акт-ти, %
Фильтрат культуральной жидкости	50	83	25	600
Культуральная жидкость после обработки кислотой	100	17,9	12	500
Элюция 200мМ натрий-фосфатным буфером, pH 7.0	32	2	15	000
После рехроматографии на фосфоцел. в линейном градиенте NaCl	2	1	4	800
Рис. 1 - Рехроматография RBT на FPLC: 1 - A280, 2 - градиент NaCl (от 0 - 1.0 М) в 20 мМ натрий-фосфатном буфере, 3 - элюция RBT	3	1	2	

Транскрипция гена запускалась добавлением в среду ИПТГ. Клонирование гена РНКазы проводили в штамме *E. coli* Top 10, в качестве штамма - продуцента RBT был выбран *B. megaterium* PV370. Схема получения векторной конструкции представлена на рисунке 2. *B. megaterium* широко используется в промышленности, на его основе создано огромное количество коммерческих экспрессионных систем, обеспечивающих высокий уровень продукции рекомбинантных белков. Данный микроорганизм имеет ряд преимуществ, обуславливающих его использование в биотехнологии. Клеточная стенка *B. megaterium* не содержит эндотоксинов, микроорганизм не синтезирует в среду щелочных протеаз, трансформированные плазмиды высокостабильны и не элиминируются [18]. Перечисленные свойства облегчают выделение и очистку рекомбинантного белка, а также обеспечивают высокий уровень синтеза белкового продукта. Для получения рекомбинантного микроорганизма, синтезирующего RBT, штамм *B. megaterium* PV370 трансформировали векторной конструкцией, содержащей клонированный ген. Клоны анализировали по наличию индукции РНКазной активности на среде с ИПТГ. Положительным контролем служил исходный штамм *Bacillus sp.*,

отрицательным – бесплазмидный штамм *V. megaterium* PV370. Анализ клонов выявил наличие трансформантов *V. megaterium* PV370, у которых добавление ИПТГ в 3-4 раза увеличивало РНКазную активность относительно контроля, что говорит об успешно проведенном клонировании.

Б А Рис. 2 - Схема клонирования гена RBT и барстара в вектор pDG148. А - Амплифицированный ген RBT и барстара, а также вектор pDG148, рестрицировали по сайтам HindIII и SphI; Б - Продукты рестрикции лигировали, ген RBT и барстара клонировали в вектор pDG148 по сайтам HindIII и SphI Кроме того, индуцированный ИПТГ лизис РНК трансформантами начинался на 8ч культивирования; диаметр зон лизиса составил 15-18 мм, тогда как у нативного штамма к этому времени фермент вызывал образование лишь незначительных (4-5 мм) зон лизиса субстрата (рис. 3).

3 2 1 3 2 1 А В Рис. 3 - РНКазная активность клонов *V. megaterium* 7a35, трансформированных векторной конструкцией, на твердой среде БФС без ИПТГ

Левая чашка: 1 – бесплазмидный штамм *V. megaterium* PV370; 2,3 – трансформанты рекомбинантного штамма *V. megaterium* PV370; (Правая чашка) – на среде с добавлением 0,5 мМ ИПТГ

Создание экспрессионной системы на основе *V. megaterium* PV370, где ген РНКазы находится под контролем *Pspac*-промотора, индуцируемого ИПТГ, позволит нам сократить время синтеза фермента при последующем его выделении из жидкой среды и в несколько раз увеличить выход в сравнении с природным продуцентом. Таким образом, результаты проведенной работы могут служить основой для последующего выделения и очистки рекомбинантного белка RBT в препаративных количествах с целью исследования его биологических свойств