

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭКСПРЕССИОННЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ *Escherichia coli* И *Bacillus subtilis* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МУТАНТОВ РИБОНУКЛЕАЗЫ БИНАЗЫ

© 2023 г. А. И. Надырова^а, *, А. С. Коснырев^а, В. В. Ульянова^а, Е. В. Дудкина^а,
В. И. Вершинина^а, О. Н. Ильинская^а

^аИнститут фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет,
Казань, 420008 Россия

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

Поступила в редакцию 05.04.2023 г.

После доработки 24.04.2023 г.

Принята к публикации 24.04.2023 г.

Рибонуклеаза *Bacillus pumilus* (биназа) обладает выраженными цитотоксическими и онколитическими свойствами, а в высоких концентрациях может оказывать генотоксическое действие. Добиться снижения токсического действия фермента на организм позволит использование мутантов, обладающих пониженной каталитической активностью с сохранением противоопухолевых свойств нативного фермента. В представленной работе методом сайт-направленного мутагенеза получены мутантные формы биназы с единичными заменами: Lys26Ala и His101Glu. В результате проведенного сравнительного анализа систем экспрессии на основе *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* показана целесообразность использования гетерологичной системы на основе бацилл для продукции мутантов биназы. Методом ионообменной хроматографии выделены и очищены мутанты биназы со сниженной каталитической активностью в гомогенном состоянии с максимальным выходом 25 мг/л. Каталитическая активность мутанта Lys26Ala составила 11, а His101Glu – 0.02%. Установлено, что мутант Lys26Ala, как и нативная биназа, обладает цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам линий A549, BT-20 и HuTu 80, не оказывая при этом существенного влияния на популяцию нормальных клеток WI-38. Для мутанта His101Glu не выявлено цитотоксической активности.

Ключевые слова: рибонуклеаза, биназа, экспрессионная система, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, каталитическая активность, цитотоксичность

DOI: 10.31857/S0026898423050154, **EDN:** YXONYN

Рибонуклеаза (РНКаза) биназа – гидролитический фермент нуклеинового обмена, секретруемый *Bacillus pumilus* 7р. Зрелый белок с молекулярной массой 12 кДа состоит из 109 аминокислот и расщепляет РНК с образованием нуклеозид-3'-фосфатов через стадию 2',3'-циклопроизводных. Изучена структура, молекулярная организация, противовирусный и противоопухолевый потенциал биназы [1, 2]. Особое внимание привлекает противоопухолевая активность фермента – свойство, широко распространенное среди РНКаз различного происхождения [3–6]. Цитотоксичность РНКаз обуславливает ряд детерминант, среди которых особую роль играют положительный заряд фермента, некаталитическое взаимодействие с молекулярными мишенями, а также каталитическое связывание с природным субстратом. Гидролиз клеточной РНК не относится к определяющим факторам, так как некоторые РНКазы проявляют цитотоксические свойства независимо от ферментативной активности.

Так, денатурированные или мутантные формы РНКазы Т2 подавляют развитие опухолей за счет нарушения внутриклеточной организации активных структур [7]. Другим РНКазам для проявления цитотоксичности достаточно лишь минимального уровня каталитической активности, пороговое значение которой варьирует в зависимости от фермента [8].

Тем не менее способность гидролизовать внутриклеточную РНК вносит определенный вклад в токсичность РНКаз. Нативная биназа, в отличие от ее мутантной формы с остаточной активностью 0.07%, проявляла нефротоксичность по отношению к клеткам почечных канальцев [9]. В связи с этим для разработки противоопухолевого препарата на основе биназы актуально получение мутантов с пониженной каталитической активностью, но сохранным противоопухолевым действием. Ранее Г. Яковлев (Yakovlev) и др. [10] сообщали о выделении и очистке мутантов бина-

зы со сниженной каталитической активностью из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* JM107, несущего плазмиду pML164, но противоопухолевый потенциал этих мутантов авторы не исследовали. Штаммы *E. coli* считаются наиболее подходящими продуцентами рекомбинантных белков. Это обусловлено изученностью их генетики и физиологии, простоты культивирования, высокой скоростью роста, наличием большого числа генно-инженерных штаммов и экспрессионных векторов [11]. Вместе с тем существуют определенные ограничения, связанные с неполным отщеплением сигнальной последовательности у секретируемых белков, неправильным фолдингом внутриклеточных белков и контаминацией целевого продукта эндотоксинами [12].

Целью работы был подбор эффективной экспрессионной системы для получения препаративных количеств мутантов биназы с пониженной каталитической активностью, достаточной для проявления противоопухолевых свойств фермента.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные штаммы, плазмиды и условия культивирования. Характеристика бактериальных штаммов и плазмид, использованных в работе, представлена в табл. 1.

Бактерии растили на стандартной среде LB (пептон — 1.5%, NaCl — 0.5%, дрожжевой экстракт — 0.5%) при 37°C и режиме качания 160 об./мин. Для

трансформации бацилл использовали минимальные среды Спайзена ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ — 1.8%, KH_2PO_4 — 0.6%, $(NH_4)_2SO_4$ — 0.2%, цитрат натрия — 0.12%; глюкоза — 0.8%, казаминовые кислоты — 0.04%, $MgSO_4 \cdot 2H_2O$ — 0.02%, дрожжевой экстракт — 0.01%). Для наработки рекомбинантной биназы в клетках *E. coli* и *Bacillus subtilis* использовали среду LB и низкофосфатную пептонную среду (НФПС; “Семипалатинский мясокомбинат”, Россия) следующего состава: пептон с низким содержанием неорганического фосфата (1.5%), $CaCl_2 \cdot H_2O$ — 0.01%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0.03%, $MnSO_4$ — 0.01%, NaCl — 0.3%, глюкоза — 2%. В качестве селективных агентов в среды добавляли антибиотики ампициллин, канамицин или эритромицин в концентрации 100, 25 и 10 мкг/мл соответственно.

Клонирование гена биназы и сайт-направленный мутагенез. Геномную ДНК бацилл выделяли с использованием набора diaGene (“Диа-М”, Россия). Полноразмерный ген биназы амплифицировали с геномной ДНК *B. pumilus* 7p с использованием праймеров Bin_F (5'-catcgagaattcggtatttattcatcagaagggtatcag-3') и Bin_R (5'-cagattggaccggactctagagctctagag-3'). Ген ингибитора барстара вместе с промотором амплифицировали с геномной ДНК *B. amyloliquefaciens* с помощью праймеров Brst_F (5'-ctagagtccgggtccaatctgcagccgctcc-3') и Brst_R (5'-tagatcaagcttgccgggtgtgtgttccatattg-3'). Фрагменты нарабатывали с использованием PfuSE ДНК-полимеразы (“СибЭнзим”, Россия), а затем объединяли методом ПЦР с помощью праймеров Bin_F и Brst_R и набора Encyclo Plus PCR kit (“Евроген”,

Таблица 1. Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в работе

Штамм или плаزمид	Характеристики	Источник
<i>E. coli</i> NEB5α	<i>fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1</i>	“New England Biolabs”, США
<i>E. coli</i> BL21 (λDE3)	(F ⁻) <i>ompT gal dcm lon hsdSB (r_B⁻m_B⁻) λDE3(lacI lacUV5-T7 ind1sam7 nin5)</i>	“Novagen”, Германия
<i>B. subtilis</i> BRB08	<i>ΔtrpC2, ΔnprB, ΔaprE, Δepr, Δbpr, ΔnprE, Δmpr, Δvpr, ΔwprA</i>	[13]
<i>B. pumilus</i> 7p	Природный изолят	“ВКМ”, Россия
<i>B. amyloliquefaciens</i> H2	Природный изолят	[14]
pAL2T	Вектор для клонирования по 3'-концевым нуклеотидам А/Т; [Ap ^R]	“Евроген”, Россия
pET26b	Вектор для экспрессии рекомбинантных белков в <i>E. coli</i> , содержащий ИПТГ ^a -индуцибельный промотор T7; <i>pelB</i> ; [Km ^R]	“Novagen”, Германия
pET15b	Вектор для экспрессии рекомбинантных белков в клетках <i>E. coli</i> , содержащий ИПТГ-индуцибельный T7 промотор; [Ap ^R]	“Novagen”, Германия
pGP380	Шаттл-вектор на основе pBQ200, содержащий конститутивный промотор P _{degQ36} ; [Ap ^R , Erm ^R]	[15]

^aИПТГ — изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид.

Россия). Полученный продукт клонировали в вектор pAL-2T по выступающим нуклеотидам Т/А (рис. 1а). Методом сайт-направленного мутагенеза вносили замены ключевых аминокислот, входящих в активный центр фермента: His101→Glu, Lys26→Ala. Сайт-направленный мутагенез проводили с использованием смеси Q5 Hot Start High Fidelity 2X Master Mix (“New England Biolabs”, США). Замену His101Glu вносили с помощью прямого праймера H101E_F (5'-аасаа-сагасгagtatgсаacttс-3'), содержащего замену триплета САТ на GAG, и обратного праймера H101E_R (5'-ttgtaaatgagccagtcac-3') (рис. 1а). Для замены Lys26Ala использовали праймеры K26A_F (5'-сacacagcatcсacааgсаagtг-3') с заменой триплета ААА на GCA и K262_R (5'-ttatcaggcaatcggttgtagc-3') (рис. 1а). Наличие мутаций подтверждали секвенированием по Сэнгеру.

Создание экспрессионных конструкций. Для экспрессии белков в клетках *E. coli* ген биназы с мутацией His101Glu амплифицировали с вектора pAL-2T с использованием праймеров pETbin_F (5'-cagtcgccatgggссgсgtcattaatacgtttg-3') и pETbin_R (5'-tagattgctcagcttatcgaatacgtgtgaaag-3') и клонировали в векторы pET26b (рис. 1б) и pET15b (рис. 1в) под контроль ИПТГ-индуцируемого T7-промотора, по сайтам рестрикции NcoI и BspI, исключаяющим добавление гистидиновых повторов в состав рекомбинантного белка. Для экспрессии белков в клетках *B. subtilis* генетическую кассету, содержащую ген биназы с мутациями и без, а также ген ингибитора барстара переклонировали с вектора pAL-2T в плазмиду pGP380 по сайтам рестрикции EcoRI и HindIII. Химически компетентные клетки *E. coli* NEB5α трансформировали методом теплового шока полученными конструкциями [16] и отбирали клоны, несущие искомые плазмиды. Правильность сборки плазмид подтверждали рестрикционным анализом и секвенированием.

Экспрессия гена биназы в гетерологичных системах. Генетическими конструкциями трансформировали химически компетентные клетки

E. coli BL21 (λDE3) методом теплового шока [16]. Клетки растили на среде LB до достижения культурой экспоненциальной фазы роста (OD₅₉₀ 0.4–0.8) и добавляли ИПТГ в качестве индуктора. Подбор условий индукции экспрессии гена проводили, варьируя концентрацию ИПТГ (0.1–0.5 мМ), время (3–5 ч) и температуру (25, 37°C) инкубации (табл. 2).

Трансформацию *B. subtilis* BRB08 проводили модифицированным методом Спицайзена [17]. Для наработки биназы бактерии растили на НФПС в течение 20 ч до максимального накопления фермента в среде.

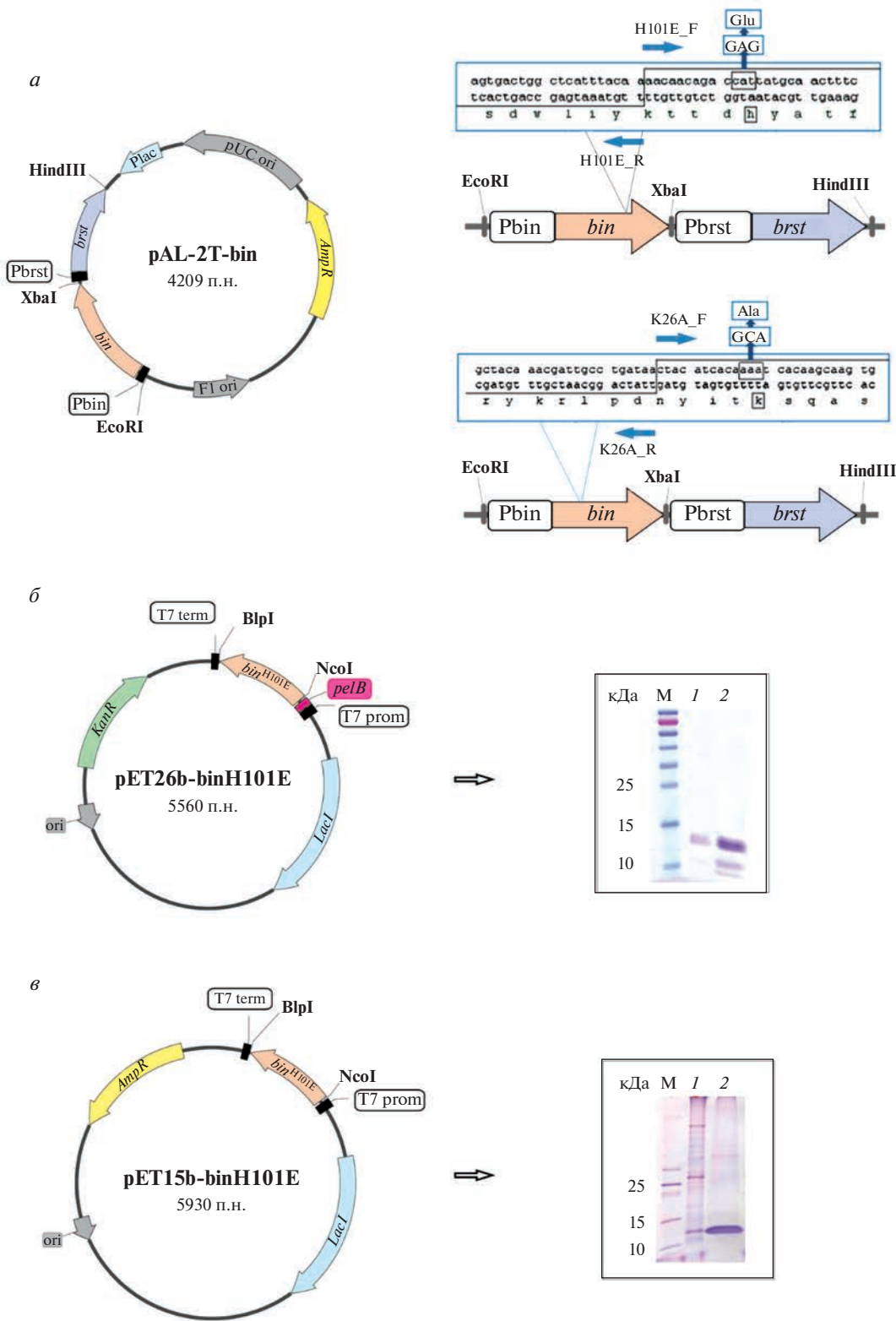
Получение периплазматической фракции *E. coli*. Клетки осаждали центрифугированием (10 мин при 8000 g) и ресуспендировали в буфере, содержащем 30 мМ Трис-НСl (pH 8.0), 20% сахарозы, 1 мМ ЭДТА. К суспензии добавляли лизоцим в концентрации 300 мкг/мл и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Периплазматическую фракцию отделяли центрифугированием при 12000 g в течение 30 мин.

Разрушение клеток *E. coli* ультразвуком. Осадок клеток ресуспендировали в 20 мМ Трис-НСl (pH 7.5) с добавлением 1 мМ PMSF. Суспензию обрабатывали ультразвуком при мощности 50% по схеме: 20 с озвучивание, 40 с пауза, — цикл повторяли 10 раз. Растворимую фракцию белков отделяли центрифугированием при 12000 g в течение 10 мин.

Очистка биназы из тельца включения. Клеточный осадок ресуспендировали в 10-кратном объеме буфера для промывки (WB), содержащего 20 мМ Трис-НСl (pH 7.5), 10 мМ ЭДТА, 1% Три-тон X-100, 1 мМ PMSF. Клетки разрушали ультразвуком с добавлением лизоцима в концентрации 100 мкг/мл, осаждали центрифугированием (10 мин при 10000 g). Осадок дважды промывали WB, тельца включения собирали центрифугированием. Отмытые тельца включения растворяли в 10-кратном объеме 10 мМ Na-фосфатного буфера (pH 7.0), содержащего 6 М гуанидин гидрохлорид. Рефолдинг проводили с использованием системы

Таблица 2. Схема многофакторного эксперимента по оптимизации экспрессии гена биназы в рекомбинантном штамме *E. coli* BL21 (λDE3)

Температура, °C	ИПТГ, мМ	Время, ч	Содержание белка, мкг
25	0.1	1	2.244
37	0.1	1	1.846
25	0.1	3	4.716
37	0.1	3	3.562
25	0.5	1	3.882
37	0.5	1	2.583
25	0.5	3	1.958
37	0.5	3	2.612



Biologic DuoFlow FPLC (“Bio-Rad”, США) на колонке UNOS6 (“Bio-Rad”), уравновешенной буфером I (10 mM Na-фосфатный буфер, pH 7.0, 2 M гуанидин гидрохлорид). Элюцию проводили буфером II (10 mM Na-фосфатный буфер, pH 7.0, 1 M NaCl, 0.75 M гуанидин гидрохлорид). Пиковые фракции обессоливали в центрифужных фильтрах Amicon Ultra-3K (“Merck Millipore”, США).

Электрофорез в денатурирующих условиях и иммуноблоттинг. Электрофоретическое разделение белков проводили в денатурирующем 16%-ном ПААГ (SDS-PAGE). После разделения белки переносили на PVDF-мембрану с использованием системы Mini Trans-Blot cell (“Bio-Rad”) при напряжении 100 В, в течение 1.5 ч. Свободные участки связывания на мембране блокировали в течение 1 ч с добавлением 5% обезжиренного молока, растворенного в буфере, содержащем 50 mM Трис-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20. Мембрану инкубировали с поликлональными кроличьими антителами против биназы в течение 24 ч при 4°C, затем с мечеными пероксидазой хрена мышиными антителами против IgG кролика (“Invitrogen”, США) в течение 1 ч при комнатной температуре. Белки детектировали с использованием хемилюминесцентного субстрата Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (“Thermo Fisher Scientific”, США) на гель-документаторе Chemi-Doc XRS + System (“Bio-Rad”).

Электрофорез в нативных условиях. Электрофорез белков проводили в 0.8%-ном агарозном геле в трис-глициновом буфере, pH 8.5, по методике R. Kim [18]. Лунки располагали по центру агарозного геля и детектировали разделение белков по заряду: белок с $pI > 8.5$ движется к катоду, а с $pI < 8.5$ — к аноду.

Ионообменная хроматография. Выделение рекомбинантного белка проводили из культуральной жидкости *B. subtilis* методом ионообменной хроматографии по методике, описанной ранее [19]. Полученные пиковые фракции обессоливали с помощью центрифужных фильтров Amicon Ultra-3K (“Merck Millipore”). Концентрацию очищенных белков определяли по Брэдфорду с помощью набора Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Reagent (“Thermo Fisher Scientific”).

Рибонуклеазная активность. РНКазную активность определяли по количеству кислоторастворимых продуктов гидролиза РНК-субстратов: высокополимерной дрожжевой РНК (впРНК), тРНК и дцРНК, — используя описанную ранее модифицированную методику Анфинсена [1]. За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывает увеличение оптической плотности раствора на единицу при 260 нм в опытных пробах по сравнению с контрольными за 1 ч инкубации в пересчете на 1 мл фермента. Удельную рибонуклеазную активность рассчитывали на 1 мг белка. Удельную рибонуклеазную активность нативного фермента принимали за 100%.

Клеточные линии. Исследование цитотоксичности полученных препаратов мутантной биназы проводили на клетках эпителия легких эмбриона человека WI38 и линиях опухолевых клеток: аденокарциномы легких A549, рака молочной железы BT-20, аденокарциномы двенадцатиперстной кишки HuTu 80. Клетки растили на среде DMEM (“ПанЭко”, Россия) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (FBS), пенициллина/стрептомицина (по 100 ед/мл) и 2 mM L-глутамина при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

МТТ-тест. Цитотоксичность препаратов биназы оценивали в МТТ-тесте. Культуры клеток засевали в 96-луночные плоскодонные планшеты плотностью 7×10^3 клеток на лунку для A549 и HuTu 80, 15×10^3 для BT-20 и 20×10^3 для WI-38. Клетки растили до образования 50–60%-ного монослоя, среду заменяли на свежую с добавлением исследуемого препарата биназы в концентрации 300 мкг/мл. Клетки растили 48 ч, среду заменяли на содержащую МТТ (5 мг/мл) и инкубировали до образования кристаллов формазана. Оптическую плотность раствора измеряли по разности поглощения на длинах волн $\Delta(A_{570}-A_{630})$ на спектрофотометре xMark (“Bio-Rad”). Жизнеспособность необработанных клеток принимали за 100%.

Статистический анализ. Содержание целевого белка в пробах при оптимизации условий экспрессии гена биназы в *E. coli* определяли в программе GelAnalyzer 19.1 (www.gelanalyzer.com). Основные физико-химические свойства белков

Рис. 1. Получение биназы со сниженной каталитической активностью с использованием *E. coli*. *a* — Схема плазмиды pAL-2T-bin, внесение мутаций His101Glu и Lys26Ala в ген биназы. *б* — Схема плазмиды pET26b-binH101E и электрофоретический анализ содержания биназы в периплазматической фракции *E. coli* BL21 (ΔDE3): 1 — неиндуцированная проба, 2 — индуцированная проба. *в* — Схема плазмиды pET15b-binH101E и электрофоретический анализ содержания биназы в различных клеточных фракциях *E. coli* BL21 (ΔDE3): 1 — фракция растворимых белков, 2 — фракция нерастворимых белков. Здесь и далее: M — маркер молекулярной массы белков PageRuler Prestained Protein Ladder (“Thermo Fisher Scientific”, США); bin — условное обозначение гена, кодирующего биназу; brst — условное обозначение гена, кодирующего барстар; Pbin — промотор гена биназы; Pbrst — промотор гена барстара; T7 term — терминатор T7; T7 prom — промотор T7; ori — точка начала репликации; Plac — промотор лактозного оперона; LacI — репрессор лактозного оперона; AmpR — ген устойчивости к ампициллину; KanR — ген устойчивости к канамицину; ErmR — ген устойчивости к эритромицину; RepA — инициатор репликации плазмиды; pelB — ген сигнальной последовательности pelB.

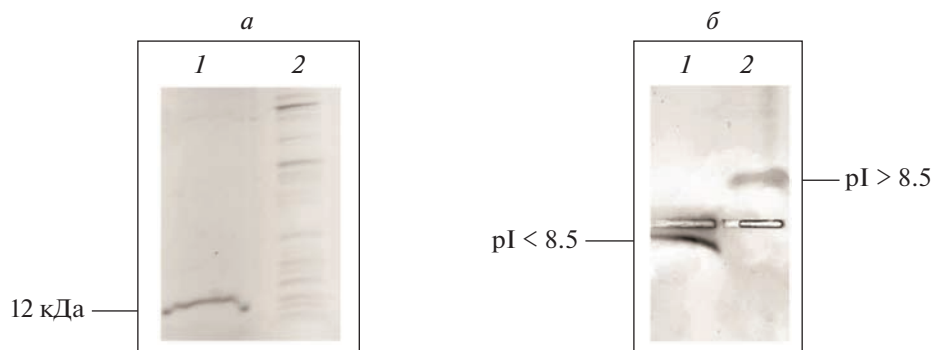


Рис. 2. Электрофоретический анализ биназы, полученной из телец включений. *a* — Электрофорез в денатурирующих условиях: 1 — мутант биназы после очистки из телец включения с помощью гуанидин гидрохлорида, 2 — растворимая клеточная фракция. *б* — Электрофорез в нативных условиях: 1 — мутант биназы после очистки из телец включения с помощью гуанидин гидрохлорида, 2 — нативная биназа.

рассчитывали при помощи программы ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>).

Эксперименты проводили в трех биологических повторах. Для статистической обработки результатов использовали программный пакет MS Excel 2020. Данные представляли в виде средних значений со стандартным отклонением (SD). Достоверность различий между двумя группами данных рассчитывали с помощью *t*-критерия Стьюдента ($p \leq 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение мутантов биназы в *E. coli*

С целью получения мутантов биназы со сниженной каталитической активностью в ген биназы, клонированный в плазмиде pAL-2T, методом сайт-направленного мутагенеза внесли замены ключевых аминокислот, входящих в активный центр фермента: гистидин в позиции 101 заменили на глутаминовую кислоту (His101→Glu), а лизин в позиции 26 — на аланин (Lys26→Ala). Мутации вносили с помощью неперекрывающихся праймеров, позволяющих амплифицировать плазмиду целиком. В результате были получены плазмиды pAL-2T-BinH101E и pAL-2T-BinK26A, несущие ген биназы с соответствующими заменами (рис. 1а).

Подбор эффективной системы экспрессии для наработки биназы со сниженной каталитической активностью в клетках *E. coli* проводили на основе вектора pET26b (рис. 1б), обеспечивающего секрецию целевого белка в периплазматическое пространство, и вектора pET15b (рис. 1в) — с конечной локализацией белка в цитоплазме. Плазмидой pET26b-BinH101E трансформировали химически компетентные клетки *E. coli* BL21 (λDE3) и проводили оптимизацию условий экспрессии мутантной биназы в T7/lac-системе с использованием многофакторного эксперимента.

Максимальный выход рекомбинантного белка регистрировали при индукции экспрессии 0.1 mM ИПТГ в течение 3 ч при температуре 25°C (табл. 2). При оценке содержания биназы в периплазме обнаружили белки различной молекулярной массы: 8, 10 и 12 кДа (рис. 1б).

Для анализа эффективности продукции биназы клетки *E. coli* BL21 (λDE3) трансформировали плазмидой pET15b-BinH101E. В результате анализа содержания внутриклеточных белков в растворимой и нерастворимой фракциях выявлено, что большое количество биназы агрегирует внутри клеток в виде нерастворимых телец включения (рис. 1в). Снижение экспрессии целевого гена за счет варьирования условий индукции не привело к увеличению количества растворимого белка. Несмотря на то, что в результате очистки целевого белка из телец включения с использованием гуанидин гидрохлорида была получена высокоочищенная фракция мутанта биназы в растворимой форме, проведенный рефолдинг не привел к восстановлению физико-химических свойств. Скорее всего, это связано с тем, что заряд молекулы биназы с мутацией H101E отличается от нативного фермента (рис. 2а, 2б). Для изучения каталитических и биологических свойств мутантов биназы необходимо их получение с нативными физико-химическими характеристиками, поэтому использование *E. coli* в качестве штамма-продуцента оказалось нецелесообразным.

Получение мутантов биназы в *B. subtilis*

Для получения биназы со сниженной каталитической активностью из культуральной жидкости *B. subtilis* ген биназы с внесенными мутациями клонировали в шаттл-вектор pGP380 совместно с геном внутриклеточного ингибитора барстара (рис. 3а). В связи с тем, что для бацилл характерен высокий уровень протеолитической активности во внеклеточной среде [20], мы использовали бес-

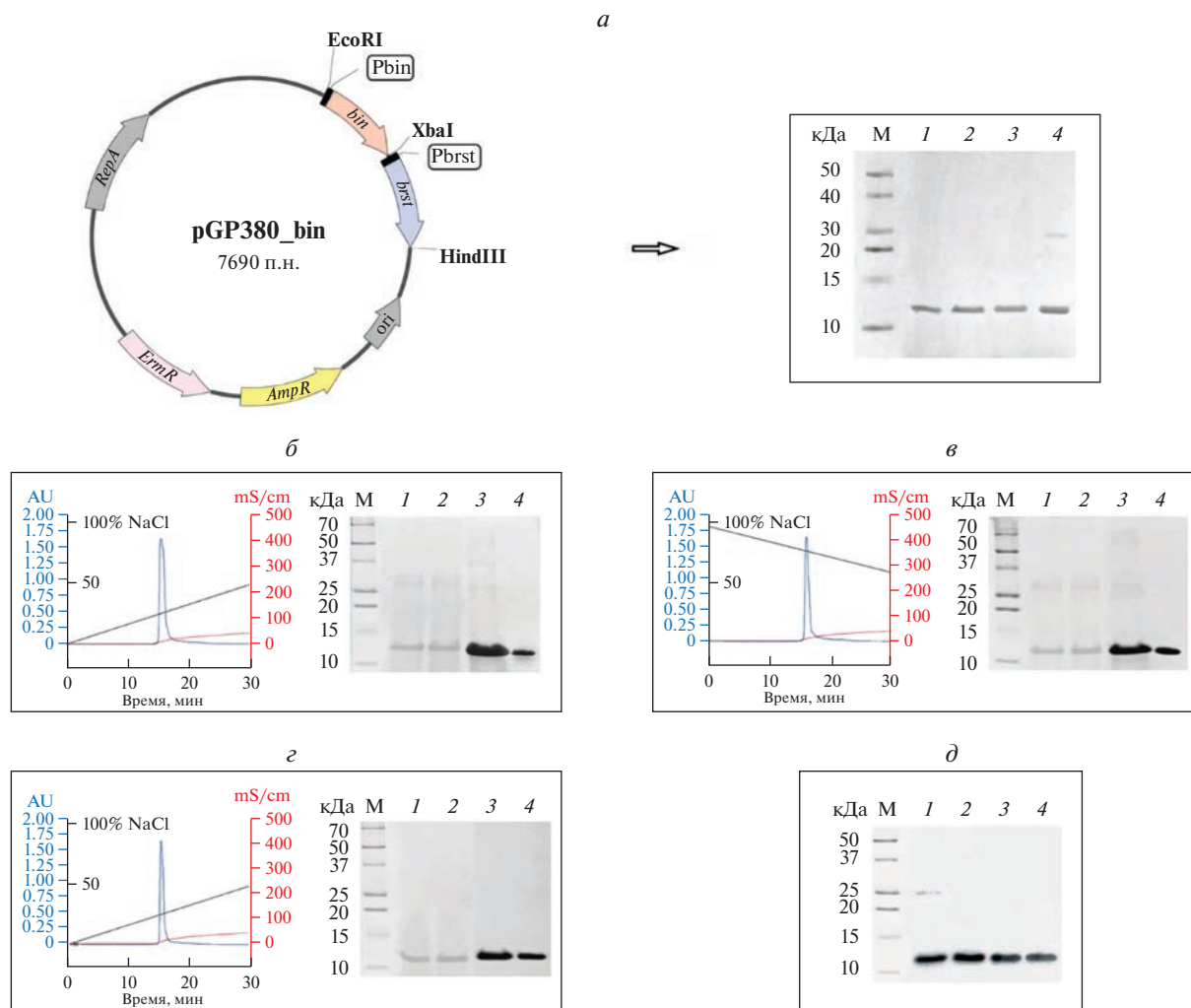


Рис. 3. Выделение и очистка мутантов биназы со сниженной каталитической активностью, синтезированных в клетках *B. subtilis*. *a* – Схема плазмиды pGP380-bin и анализ белков культуральной жидкости *B. subtilis* BRB08, несущих плазмиды с геном биназы или ее мутантов: 1 – pGP380-bin, 2 – pGP380_binH101E, 3 – pGP380-binK26A, 4 – биназа, M – маркер молекулярной массы белков. *б* – Профиль элюции биназы в градиенте 0–1 M NaCl с использованием системы FPLC BioLogic Duo Flow (“Bio-Rad”, США) и электрофоретический анализ фракций мутантов биназы 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/лунка). *в* – Мутант биназы His101Glu; *г* – мутант биназы Lys26Ala. AU – единицы оптического поглощения; mS/cm – проводимость. *д* – Иммуноблотинг пиковых фракций биназы и ее мутантов после ВЭЖХ: 1 – нативная биназа, 2 – рекомбинантная биназа, 3 – мутант Lys26Ala, 4 – мутант His101Glu. Расшифровку аббревиатур см. на рис. 1.

протеазный штамм *B. subtilis* BRB08 (с делециями генов 8 основных внеклеточных протеаз) в качестве продуцента рекомбинантной биназы. Известно, что синтез биназы регулируется двухкомпонентной системой PhoP-PhoR и индуцируется при недостатке неорганического фосфата [21], поэтому индукцию экспрессии гена биназы проводили на среде с низким содержанием неорганического фосфата. В результате анализа уровней экспрессии мутантов биназы выявлено высокое содержание целевых белков в культуральной жидкости *B. subtilis* (рис. 3а). Основные физико-химические параметры мутантов биназы, расчи-

танные с помощью сервиса ProtParam, оказались схожими по значениям с таковыми для аутентичного белка (табл. 3). Учитывая эти результаты, для выделения мутантов биназы мы использовали метод ионообменной хроматографии, разработанный нами ранее для очистки бациллярных РНКаз [19]. Хроматографический профиль полученных препаратов биназы был представлен в виде единичных симметричных пиков, гомогенность которых была подтверждена электрофорезом в денатурирующих условиях (рис 3б–3г). Как видно из результатов иммуноблотинга, представленных на рис. 3д, полученные белки с молеку-

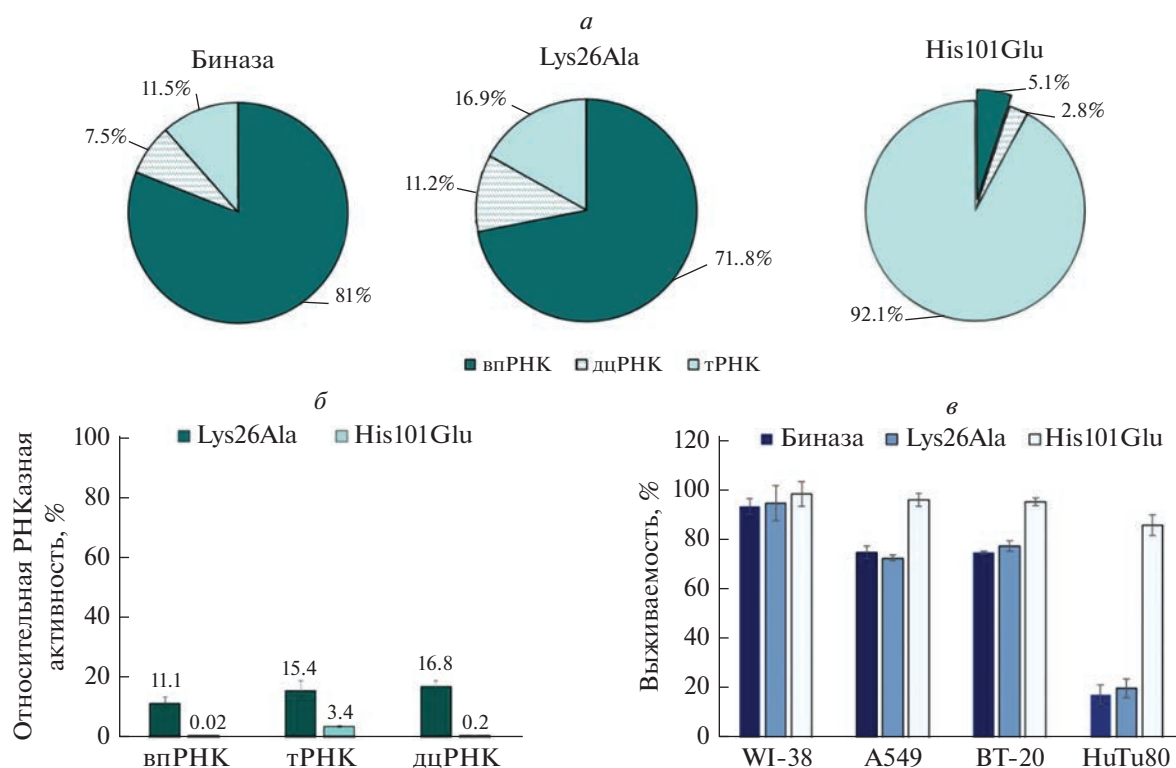


Рис. 4. Каталитические и цитотоксические свойства биназы и ее мутантов. *а* – Эффективность гидролиза природных РНК-субстратов. За 100% принята суммарная удельная активность каждого фермента на трех РНК-субстратах. *б* – Каталитическая активность мутантов биназы в отношении различных РНК-субстратов в сравнении с нативным ферментом. За 100% принята каталитическая активность нативной РНКазы. *в* – Жизнеспособность опухолевых клеток А549, BT-20, HuTu 80 и нормальных клеток WI-38 через 48 ч инкубации с биназой или ее мутантами. За 100% принята жизнеспособность клеток без обработки ферментом.

лярной массой 12 кДа связывались с антителами к биназе. Максимальный выход очищенных целевых белков составлял 25 мг/л.

Как видно из данных, представленных на рис. 4а, предпочтительным субстратом для мутанта Lys26Ala, как и для биназы, является vpРНК, а для мутанта His101Glu – trРНК. Каталитическая активность мутанта Lys26Ala в сравнении с биназой на vpРНК составила 11, на trРНК – 15.4, на dcРНК – 17%. Мутант His101Glu гидролизировал vpРНК на 0.02, trРНК – на 3.4, dcРНК – на 0.2% (рис. 4б).

В результате использования экспрессионной системы *B. subtilis* получены гомогенные препараты мутантов Lys26Ala и His101Glu биназы и исследованы их каталитические характеристики на природных субстратах.

Сравнительная характеристика цитотоксического потенциала мутантов биназы

Исследование цитотоксичности полученных мутантов биназы проведено на нормальных (WI-38) и опухолевых (A549, BT-20, Hutu 80) клетках чело-

Таблица 3. Основные физико-химические свойства нативной биназы, мутантов His101Glu и Lys26Ala

Параметр	Нативная биназа	Мутант His101Glu	Мутант Lys26Ala
Число аминокислот	109	109	109
Молекулярная масса, Да	12211.7	12203.6	12239.66
pI	9.52	9.3	9.57
Коэффициент экстинкции, М ⁻¹ см ⁻¹	2.2	2.2	2.2
Алифатический индекс	78.80	78.80	78.81
Индекс нестабильности	27.25	23.22	31.28

века. Показано, что мутант Lys26Ala с остаточной каталитической активностью 11% обладает избыточной цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам, уровень которой сходен с нативным ферментом. Так, мутант Lys26Ala и нативная биназа в концентрации 300 мкг/мл снижали жизнеспособность клеток A549 и BT-20 на 25, NuTu 80 — на 75% (рис. 4б). Мутант His101Glu биназы с остаточной активностью 0.02% не оказывал влияния на жизнеспособность клеток. Таким образом, каталитическая активность биназы — один из факторов, определяющих ее цитотоксичность.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Эффективность гетерологичных систем экспрессии для продукции рекомбинантной биназы

Детальное изучение структуры и функциональных характеристик мутантов биназы требует их наработки в препаративных количествах. Продуктивность природных штаммов, как правило, невысока. Так, выход биназы, полученной из нативного штамма-продуцента *B. pumilus* 7p, составляет не более 2 мг/л [22, 23]. Кроме того, внесение мутаций в геном природных изолятов часто сопряжено с методологическими трудностями. Эффективной наработки мутантного белка можно добиться при использовании гетерологичной системы экспрессии. Ранее препарат рекомбинантной биназы и мутантов со сниженной каталитической активностью был получен из культуральной жидкости *E. coli* [10, 24]. Однако такой способ имеет ряд недостатков, связанных с отсутствием специфической системы секреции, обеспечивающей транспорт целевого белка через цитоплазматическую и наружную мембраны в культуральную жидкость [25]. Бактерии рода *Bacillus* ранее не использовали в качестве продуцента рекомбинантной биназы.

Мы сравнили эффективность двух гетерологичных систем экспрессии: на основе *E. coli* и *B. subtilis* — для наработки мутантных форм биназы со сниженной каталитической активностью.

Бактерии *E. coli* широко используют при проведении генно-инженерных манипуляций и продуцирования гетерологичных белков. Для наработки биназы в клетках *E. coli* была получена экспрессионная плаزمид на основе вектора pET26b (рис. 1б), обеспечивающая секрецию целевого белка в периплазматическое пространство. К преимуществам получения рекомбинантных белков из периплазматического пространства относится низкое содержание протеаз и примесных белков, что повышает стабильность целевого продукта и облегчает его последующую очистку. Кроме того, наличие дисульфидизомераз благоприятно сказывается на формировании корректной трехмерной структуры белков, требующей

образования дисульфидных связей. При анализе накопления биназы в периплазме мы обнаружили нарушения в процессинге рекомбинантного белка. Именно этим можно объяснить наличие множественных форм биназы с различной молекулярной массой (рис. 1б). По-видимому, это связано с неполным отщеплением сигнальной последовательности при перегрузке системы секреции *E. coli*, вызванной наработкой чужеродного белка [26]. В связи с этим более целесообразным представлялось получение рекомбинантной биназы из цитоплазмы *E. coli*. Для этого ген биназы переклонировали в вектор pET15b (рис. 1в). При анализе полученных образцов оказалось, что рекомбинантная биназа находится внутри клетки в виде нерастворимых агрегатов — телец включения (рис. 1в, 2а). Для перевода фермента из телец включения в биологически активную форму необходимо проведение дополнительных трудоемких процедур, что существенно снижает суммарный выход целевого белка и может сказаться на его физико-химических свойствах. Так, обработка биназы денатурирующим агентом гуанидин гидрохлоридом с последующим рефолдингом не привела к корректному восстановлению нативного заряда белка (рис. 2б). Учитывая эти проблемы, в дальнейшем в качестве продуцента рекомбинантной биназы мы использовали *B. subtilis*.

Основное преимущество систем экспрессии на основе бацилл состоит в отсутствии эндотоксинов и секреции рекомбинантных белков непосредственно в среду, что облегчает получение целевого белка, пригодного для возможного применения в терапевтических целях. *B. subtilis* содержат шапероны, которые обеспечивают правильный фолдинг и препятствуют агрегации зрелого белка в клетке [27]. Использование эффективного штамма-продуцента и оптимизированных условий выделения и очистки фермента позволили получить гомогенные препараты мутантов биназы в количествах, соизмеримых с опубликованными показателями [24, 28, 29].

Таким образом, установлено, что для получения мутантов биназы со сниженной каталитической активностью подходит гетерологичная система на основе *B. subtilis*. По-видимому, для биназы крайне важны условия секреции, которые обеспечивают правильный процессинг и фолдинг белка, что возможно при использовании близкородственных видов бактерий в качестве продуцентов.

Мутационный анализ активного центра биназы

Изучению функциональной роли аминокислотных остатков каталитического домена биназы в кинетике гидролиза РНК посвящен ряд исследований [10, 29]. Так, Г. Яковлев (Yakovlev) и соавт. [10] рассчитали кинетические параметры гидро-

лиза синтетических субстратов GpC, poly(I) и poly(A) мутантами His101Glu и Lys26Ala: каталитическая активность ферментов составила 2.7 и 33% соответственно, для мутанта His101Glu зарегистрировано значительное снижение константы скорости реакции.

Природные РНК-субстраты, а именно вРНК, дцРНК, тРНК, представляют большой интерес в качестве возможных внутриклеточных мишеней цитотоксических рибонуклеаз. Нами показано, что каталитическая активность мутантов Lys26Ala и His101Glu в сравнении с нативным ферментом на высокополимерном субстрате составляет 11 и 0.02% соответственно (рис. 4б). При оценке эффективности гидролиза природных субстратов обнаружено, что мутант Lys26Ala, как и биназа, эффективнее расщепляет вРНК, при этом каталитическая активность мутанта His101Glu, напротив, характеризуется явным предпочтением к низкомолекулярному субстрату — тРНК (рис. 4а).

Оценивая функциональные различия мутантов биназы, необходимо учитывать роль и природу заменяемых аминокислот. Положительно заряженные остатки His101 и Lys26 вместе с Glu72, Arg82, Arg86 формируют активный центр биназы. His101 выступает в качестве донора протонов [30], а Lys26 отвечает за связывание с фосфатными группами РНК. Характер аминокислотных замен определяется консервативностью или радикальностью. Консервативные замены, в отличие от радикальных, не оказывают значительного влияния на функциональные свойства белков. Мы оценили взаимозаменяемость аминокислот в позициях 26 и 101 молекулы биназы, основываясь на коэффициенте функциональной близости (кФБА) Бачинского [31]. Замена считается консервативной при значении кФБА > 12.4, в обратном случае — радикальной. Так, кФБА для замен His→Glu и Lys→Ala составляет 4 и 13 соответственно. Анализируя характер замен методом Бачинского, можно заключить, что замена гистидина на глутаминовую кислоту относится к радикальным, а лизина на аланин — к консервативным. Анализ характера замен методом П. Снита (Sneath) [32] подтвердил консервативность замены Lys→Ala и радикальность замены His→Glu.

Цитотоксический эффект мутантов биназы

Противоопухолевые эффекты РНКаз обусловлены рядом детерминант, включающих катионные свойства белка, взаимодействия с клеточными компонентами, надмолекулярную структуру и каталитические свойства фермента [33–35]. Известно, что биназа дикого типа взаимодействует непосредственно с мутантным белком KRAS, что приводит к блокировке сигнального пути MAPK/ERK и индукции апоптоза [36]. Анализ профиля активированных онкогенов и протоон-

когенов, экспрессируемых эпителиоподобными опухолями, показал, что цитотоксическое действие биназы и мутанта Lys26Ala не всегда сопряжено с экспрессией мутантных вариантов белка RAS. Так, в клетках BT-20 и Hutu 80 содержится RAS дикого типа, а клетки A549 экспрессируют KRAS с мутацией G12S [37–39]. Вероятно, в клетках BT-20 и Hutu 80 биназа активирует иные механизмы цитотоксичности. Ранее показано, что снижение жизнеспособности клеток BT-20 под действием биназа-производного пептида B74-94 может быть обусловлено его прямым взаимодействием с рецептором эпидермального фактора роста человека (EGFR) [40]. Выраженное цитотоксическое действие биназы по отношению к клеткам Hutu 80, вероятно, опосредовано снижением способности опухолевых клеток к миграции [41].

Каталитическая активность считается одной из основных детерминант цитотоксичности РНКаз. Однако известны РНКазы, проявляющие противоопухолевую активность, но не обладающие способностью гидролизовать РНК. Например, мутант РНКазы *Aspergillus giganteus* (α -сарцин) без каталитической активности подавлял жизнеспособность клеток рака шейки матки HeLa [42]. Не обладающий РНКазной активностью мутант катионного белка эозинофилов человека проявлял цитотоксичность путем изменения проницаемости клеточной мембраны без интернализации [43]. Для некоторых РНКаз определен минимальный уровень каталитической активности, при котором сохраняются цитотоксические свойства фермента. Нами показано, что мутант биназы с остаточной активностью 11% обладает таким же уровнем противоопухолевой активности, что и нативный фермент. Мутагенная активность биназы и ее способность вызывать SOS-ответ напрямую зависят от уровня ее каталитической активности [44, 45]. Низкий уровень РНКазной активности позволит снизить токсическое воздействие биназы на организм.

Таким образом, в результате проведенного исследования нами подобрана экспрессионная система на основе *B. subtilis*, позволяющая получать высокоочищенные препараты мутантов биназы в препаративных количествах (25 мг/л). Экспериментально обоснована важность использования близкородственной системы экспрессии для получения рекомбинантной биназы с нативными физико-химическими свойствами. Оценен вклад РНКазной активности в цитотоксичность биназы и установлено, что остаточной активности 11% достаточно для цитотоксического действия биназы на опухолевые клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-10036) и Министерства науки и высшего образования

Российской Федерации в рамках программы “Приоритет-2030”.

В настоящем исследовании не использовали биологические материалы, полученные от людей и животных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ulyanova V., Nadyrova A., Dudkina E., Kuznetsova A., Ahmetgalieva A., Faizullin D., Surchenko Y., Novopashina D., Zuev Y., Kuznetsov N., Ilinskaya O. (2022) Structural and functional differences between homologous bacterial ribonucleases. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 1867.
2. Ильинская О.Н., Шах М.Р. (2014) Рибонуклеазы как противовирусные агенты. *Молекуляр. биология.* **48**, 707–717.
3. Makarov A.A., Ilinskaya O.N. (2003) Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets. *FEBS Lett.* **540**, 15–20.
4. Ardel T., Ardel W., Pozarowski P., Kunicki J., Shogen K., Darzynkiewicz Z. (2007) Cytostatic and cytotoxic properties of Amphinase: a novel cytotoxic ribonuclease from *Rana pipiens* oocytes. *Cell Cycle*. **6**, 3097–3102.
5. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. (2008) Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents. *BioEssays*. **30**, 781–790.
6. Митькевич В.А., Макаров А.А., Ильинская О.Н. (2014) Клеточные мишени противоопухолевых рибонуклеаз. *Молекуляр. биология.* **48**, 214–222.
7. Roiz L., Smirnov P., Bar-Eli M., Schwartz B., Shoseyov O. (2006) ACTIBIND, an actin-binding fungal T2-RNase with antiangiogenic and anticarcinogenic characteristics. *Cancer*. **106**, 2295–2308.
8. Leland P.A., Schultz L.W., Kim B.M., Raines R.T. (1998) Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 10407–10412.
9. Ilinskaya O.N., Vamvakas S. (1997) Nephrotoxic effects of bacterial ribonucleases in the isolated perfused rat kidney. *Toxicology*. **120**, 55–63.
10. Yakovlev G.I., Moiseyev G.P., Struminskaya N.K., Borzykh O.A., Kipenskaya L.V., Znamenskaya L.V., Leshchinskaya I.B., Chernokalskaya E.B., Hartley R.W. (1994) Mutational analysis of the active site of RNase of *Bacillus intermedius* (BINASE). *FEBS Lett.* **354**, 305–306.
11. Rosano, G.L., Ceccarelli E.A. (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front. Microbiol.* **5**, 172.
12. Yoon S.H., Kim S.K., Kim J.F. (2010) Secretory production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Recent Pat. Biotechnol.* **4**, 23–29.
13. Pohl S., Bhavsar G., Hulme J., Bloor A.E., Misirli G., Leckenby M.W., Radford D.S., Smith W., Wipat A., Williamson E.D., Harwood C.R., Cranenburgh R.M. (2013) Proteomic analysis of *Bacillus subtilis* strains engineered for improved production of heterologous proteins. *Proteomics*. **13**, 3298–3308.
14. Hartley R.W., Rogerson D.L. Jr., Smeaton J.R. (1972) Production and purification of the extracellular ribonuclease of *Bacillus amyloliquefaciens* (barnase) and its intracellular inhibitor (barstar). II. Barstar. *Prep. Biochem.* **2**, 243–250.
15. Herzberg C., Weidinger L.A.F., Dörrbecker B., Hübner S., Stülke J., Commichau F.M. (2007) SPINE: a method for the rapid detection and analysis of protein–protein interactions *in vivo*. *Proteomics*. **7**, 4032–4035.
16. Sambrook J., Russell D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Third Edition*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab. Press.
17. Harwood C.R., Cutting S.M. (1991) *Molecular Biological Methods for Bacillus*. Chichester: Wiley.
18. Kim R. (2011) Native agarose gel electrophoresis of multiprotein complexes. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2011**, 884–887.
19. Dudkina E., Ulyanova V., Shah Mahmud R., Khodzhaeva V., Dao L., Vershinina V., Kolpakov A., Ilinskaya O. (2016) Three-step procedure for preparation of pure *Bacillus altitudinis* ribonuclease. *FEBS Open Bio*. **6**, 24–32.
20. Li W., Zhou X., Lu P. (2004) Bottlenecks in the expression and secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. *Res. Microbiol.* **155**, 605–610.
21. Ульянова В.В., Ходжаева В.С., Дудкина Е.В., Лайков А.В., Вершинина В.И., Ильинская О.Н. (2015) Препараты секретируемой РНКазы *Bacillus pumilus*: один фермент или два? *Микробиология.* **84**, 425–425.
22. Makarov A.A., Protasevich I.I., Kuznetsova N.V., Fedorov B.B., Korolev S.V., Struminskaya N.K., Bazhulina N.P., Leshchinskaya I.B., Hartley R.W., Kirpichnikov M.P., Yakovlev G.I., Esipova N.G. (1993) Comparative study of thermostability and structure of close homologues – barnase and binase. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **10**, 1047–1065.
23. Голубенко И., Балабан Н., Лещинская И., Волкова Т., Клейнер Г., Чепурнова Н., Афанасенко Г., Дудкин С. (1979) Рибонуклеаза *Bacillus intermedius* 7P. Очистка хроматографией на фосфоцеллюлозе и некоторые характеристики гомогенного фермента. *Биохимия.* **44**(4), 640–648.
24. Шульга А.А., Окозов А.Л., Панов К.И., Курбанов Ф.Т., Чернов Б.К., Скрябин К.Г., Кирпичников М.П. (1994) Суперпродукция рибонуклеазы *Bacillus intermedius* 7P (биназы) в *E. coli*. *Молекуляр. биология.* **28**(2), 453–463.
25. Kaur J., Kumar A., Kaur J. (2018) Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: roadblocks and reinforcements. *Int. J. Biol. Macromol.* **106**, 803–822.
26. Bhatwa A., Wang W., Hassan Y.I., Abraham N., Li X.Z., Zhou T. (2021) Challenges associated with the formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli* and strategies to address them for industrial applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **9**, 630551.
27. Zhang K., Su L., Wu J. (2020) Recent advances in recombinant protein production by *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **11**, 295–318.
28. Okorokov A.L., Panov K.I., Kolbanovskaya E.Y., Karpeisky M.Y., Polyakov K.M., Wilkinson A.J., Dodson G.G. (1996) Site-directed mutagenesis of the base recogni-

- tion loop of ribonuclease from *Bacillus intermedius* (binase). *FEBS Lett.* **384**, 143–146.
29. Okorokov A.L., Panov K.I., Offen W.A., Mukhortov V.G., Antson A.A., Karpeisky M.Ya., Wilkinson A.J., Dodson G.G. (1997) RNA cleavage without hydrolysis. Splitting the catalytic activities of binase with Asn101 and Thr101 mutations. *Protein Eng.* **10**, 273–278.
 30. Yoshida H. (2001) The ribonuclease T1 family. *Methods Enzymol.* **341**, 28–41.
 31. Бачинский А.Г. (1976) Структура и помехоустойчивость генетического кода. *Журнал общей биологии.* **37**, 163–173.
 32. Sneath P.H. (1966) Relations between chemical structure and biological activity in peptides. *J. Theor. Biol.* **12**, 157–195.
 33. Castro J., Ribó M., Vilanova M., Benito A. (2021) Strengths and challenges of secretory ribonucleases as antitumor agents. *Pharmaceutics.* **13**, 82.
 34. Gotte G., Menegazzi M. (2019) Biological activities of secretory RNases: focus on their oligomerization to design antitumor drugs. *Front. Immunol.* **10**, 2626.
 35. Dudkina E.V., Ulyanova V.V., Ilinskaya O.N. (2020) Supramolecular organization as a factor of ribonuclease cytotoxicity. *Acta Naturae.* **12**, 24–33.
 36. Ilinskaya O., Singh I., Dudkina E., Ulyanova V., Kayumov A., Barreto G. (2016) Direct inhibition of oncogenic KRAS by *Bacillus pumilus* ribonuclease (binase). *Biochim. Biophys. Acta Mol.* **1863**, 1559–1567.
 37. Hollestelle A., Elstrodt F., Nagel J., Kallemeijn W., Schutte M. (2007) Phosphatidylinositol-3-OH kinase or RAS pathway mutations in human breast cancer cell lines. *Mol. Cancer Res.* **5**, 195–201.
 38. Medico E., Russo M., Picco G., Cancelliere C., Valtorta E., Corti G., Buscarino M., Isella M., Lamba S., Martinoglio B., Veronese S., Siena S., Sartore-Bianchi A., Beccuti M., Mottotese M., Linnebacher M., Cordero F., Di Nicolantonio F., Bardelli A. (2015) The molecular landscape of colorectal cancer cell lines unveils clinically actionable kinase targets. *Nat. Commun.* **6**, 7002.
 39. Chen Y. H., Lv H., Shen N., Wang X. M., Tang S., Xiong B., Ding J., Geng M., Huang, M. (2020) EPHA2 feedback activation limits the response to PDEδ inhibition in KRAS-dependent cancer cells. *Acta Pharmacol. Sin.* **41**, 270–277.
 40. Ulyanova V., Dudkina E., Nadyrova A., Kalashnikov V., Surchenko Y., Ilinskaya O. (2020) The cytotoxicity of RNase-derived peptides. *Biomolecules.* **11**, 16.
 41. Зеленихин П.В., Еад Мохамед И.С., Надырова А.И., Сироткина А.А., Ульянова В.В., Миронова Н.Л., Митькевич В.А., Макаров А.А., Зенкова М.А., Ильинская О.Н. (2020) Рибонуклеаза *Bacillus pumilus* ингибирует миграцию клеток аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80. *Молекуляр. биология.* **54**, 146–152.
 42. Alford S.C., Pearson J.D., Carette A., Ingham R.J., Howard P.L. (2009) Alpha-sarcin catalytic activity is not required for cytotoxicity. *BMC Biochem.* **10**, 9.
 43. Navarro S., Aleu J., Jiménez M., Boix E., Cuchillo C.M., Nogués M.V. (2008) The cytotoxicity of eosinophil cationic protein/ribonuclease 3 on eukaryotic cell lines takes place through its aggregation on the cell membrane. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 324–337.
 44. Ilinskaya O., Ivanchenko O.B., Karamova N.S. (1995) Bacterial ribonuclease: mutagenic effect in microbial test-systems. *Mutagenesis.* **10**, 165–170.
 45. Ilinskaya O.N., Karamova N.S., Ivanchenko O.B., Kipenskaya L.V. (1996) SOS-inducing ability of native and mutant microbial ribonucleases. *Mutat. Res.* **354**, 203–209.

Efficiency of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* Expression Systems for Production of Binase Mutants

A. I. Nadyrova^{1, *}, A. S. Kosnyrev¹, V. V. Ulyanova¹, E. V. Dudkina¹,
V. I. Vershinina¹, and O. N. Ilinskaya¹

¹*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*

^{*}*e-mail: alsu.nadyrova@yandex.ru*

Bacillus pumilus ribonuclease (binase) exhibits cytotoxic and oncolytic properties, while at high concentrations it causes genotoxic effects. The use of mutants with reduced catalytic activity preserving the antitumor properties of the native enzyme could reduce the toxic side effects of the enzyme. Here, mutant forms of binase with Lys26Ala and His101Glu single substitutions were obtained by site-directed mutagenesis. A comparative analysis of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*-based expression systems demonstrated the feasibility of using a bacilli-based heterologous system for production binase mutants. Binase mutants with reduced catalytic activity were isolated and purified with ion exchange chromatography in a homogeneous state with 25 mg/L yield. The catalytic properties of obtained mutants toward natural RNA-substrates in comparison with those for native binase were analyzed. The catalytic activity of the Lys26Ala and His101Glu mutants was 11 and 0.02%, respectively. It was found that the Lys26Ala mutant as well as the native binase exhibits selective cytotoxicity toward A549, BT-20 and HuTu 80 tumor cell lines, without causing toxic effects toward normal WI-38 cells. The mutant His101Glu did not exhibit cytotoxicity.

Keywords: ribonuclease, binase, expression system, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, catalytic activity, cytotoxicity