

**Мутанты рибонуклеазы *Bacillus pumilus* с полигистидиновой меткой образуют агрегаты**

**Научный руководитель – Ильинская Ольга Николаевна**

***Надырова Алсу Ильдаровна***

*Аспирант*

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

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

В настоящее время особый интерес в качестве терапевтического противоопухолевого препарата представляет низкомолекулярная гуанил-предпочитающая РНКаза *Bacillus pumilus* (биназа). Механизмы проявления биологической активности биназы до конца не изучены. В связи с этим необходимо установить связь между структурными особенностями, каталитической активностью и противоопухолевым действием РНКаз. Для идентификации молекулярных детерминант, вносящих вклад в биологическую активность биназы, необходимо получить не только нативный препарат белка, но и его мутантные производные. Для обеспечения эффективной очистки рекомбинантных белков использовали His-tag, состоящий из 6 остатков гистидина. Внесение аффинной метки не только облегчает очистку рекомбинантных белков и их детектирование, но и позволяет оценить степень влияния структурных элементов молекулы рекомбинантного белка на его свойства. Таким образом целью нашего исследования стало получение мутантных форм биназы с His-tag на N-конце молекулы с последующим оценкой модификационного вклада полигистидиновой метки в структурные свойства полученных белков.

В ходе работы были получены мутантные формы биназы с делециями аминокислот на N-конце (цифрой указано число элиминированных аминокислотных остатков): Vi-21, Vi-37, Vi-47 (далее 22N, 38N, 48N, соответственно) и с делецией 6 аминокислот на C-конце (Vi-102, указано оставшееся число аминокислот, далее 102C).

Диаметр частиц и дзета-потенциал (электрокинетический потенциал) в полученных препаратах белка измеряли с использованием двухуглового анализатора размеров частиц и молекул Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания). Нами были получены очищенные препараты мутантных форм биназы (22N, 38N, 48N, 102C). При анализе размеров белковых частиц в растворе было показано, что мутантные формы биназы находятся исключительно в виде крупных однородных агрегатов, о чем свидетельствуют высокие значения диаметра исследуемых частиц (рис. 1). Однако нативная биназа в растворе находится как в форме мономера, так и в форме неоднородных агрегатов. Вместе с тем мутанты 22N, 38N, 48N и биназа не стабильны во времени, о чем свидетельствуют значения дзета-потенциала в диапазоне от 0 до  $\pm 30$  (рис. 2). Образец 102C более стабилен и однороден в среде, на что указывают одинаковые показания при двух повторных измерениях диаметра частиц и дзета-потенциал ниже -30.

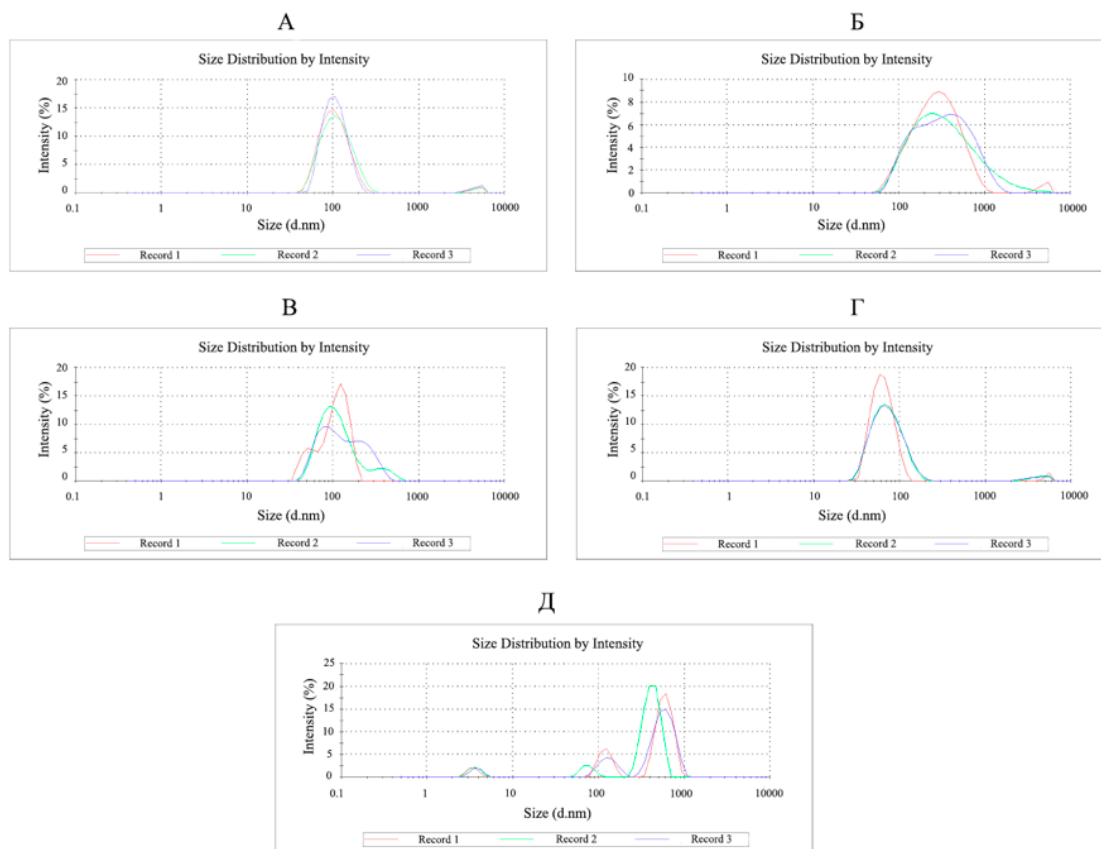
Добавление полигистидиновой метки к одному из концов рекомбинантного белка является одной из самых распространенных модификаций и широко используется исследователями. His-tag состоит из цепочки катионных аминокислот, которые могут потенциально оказывать влияние на белок-белковые взаимодействия. Показано, что His-tag понижает растворимость малых белков, каковыми и являются РНКазы [2]. В некоторых случаях значительно изменяется термостабильность и активность белков [3]. По-видимому, присоединение His-tag к молекуле белка может привести к некорректному фолдингу и к значительному изменению структурной организации, о чем свидетельствуют полученные нами результаты.

Таким образом, полученные экспериментальные данные подтверждают наличие модификационного вклада His-tag в структурную организацию молекул мутантов биназы. Поэтому в дальнейшем для получения белка с точными характеристиками планируется использование экспрессионных конструкций без полигистидиновой метки.

### Источники и литература

- 1) 1. E.A., Woestenenk, M. Hammarström, S. van den Berg, T. Härd, H. Berglund. His tag effect on solubility of human proteins produced in Escherichia coli: a comparison between four expression vectors. Journal of structural and functional genomics. 2004; 5: 217-229.
- 2) 2. V.P. Kutyshenko, G.V. Mikoulinskaia, S.V. Chernyshov, A.Y. Yegorov, D.A. Prokhorov, V.N. Uversky. Effect of C-terminal His-tag and purification routine on the activity and structure of the metalloenzyme, l-alanyl-d-glutamate peptidase of the bacteriophage T5. International journal of biological macromolecules. 2019; 124: 810-818.

### Иллюстрации



**Рис. 1.** Распределение диаметра белковых частиц по интенсивности. Мутанты: 22N (А), 38N (Б), 48N (В), 102С (Г); Биназа (Д).

	Наименование образца				
	22N	38N	48N	102C	Биназа
Дзета-потенциал	-26 мВ	-22 мВ	-26,5 мВ	-32,6 мВ	5,78 мВ
Диаметр частиц	104,7 нм	252 нм	245,6 нм	69 нм	6 нм, 150 и 940 нм

**Рис. 2.** Физико-химические параметры делеционных мутантов биназы 22N, 38N, 48N, 102C и нативной биназы, на основе данных, полученных с анализатора частиц Zetasizer Nano ZS.