

УДК 577.15; 615.355

Кинетические характеристики и цитотоксическая активность рекомбинантных препаратов метионин- γ -лиазы *Clostridium tetani*, *Clostridium sporogenes*, *Porphyromonas gingivalis* и *Citrobacter freundii*

Е. А. Морозова¹, В. В. Куликова¹, Д. В. Яшин², Н. В. Ануфриева¹, Н. Ю. Анисимова³, С. В. Ревтович¹, М. И. Котлов⁴, Ю. Ф. Белый⁴, В. С. Покровский^{3*}, Т. В. Демидкина^{1*}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

²Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

³Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, 115478, Москва, Каширское ш., 24

⁴Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ Российской Федерации, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

*E-mail: vadimpokrovsky@yandex.ru, tvd@eimb.ru

Поступила в редакцию 04.03.2013

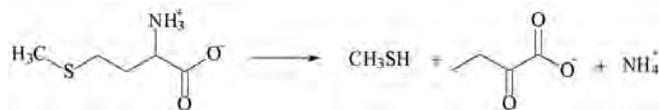
РЕФЕРАТ Определены параметры стационарной кинетики пиридоксаль-5'-фосфат-зависимой рекомбинантной метионин- γ -лиазы из трех патогенных бактерий – *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani* и *Porphyromonas gingivalis* в реакциях γ - и β -элиминирования. Наибольшую каталитическую эффективность в реакции γ -элиминирования L-метионина имеет фермент из *C. sporogenes*. Показано, что фермент из этих трех источников является тетрамером, а наличие полигистидинового фрагмента на N-концах полипептидных цепей рекомбинантных ферментов влияет на их каталитическую активность и в условиях денатурации способствует агрегации мономеров с образованием димерных форм. На культурах опухолевых клеток K562, РС-3, LnCap, MCF7, SKOV-3, L5178у оценена цитотоксичность метионин- γ -лиазы *C. sporogenes* и *C. tetani* в сравнении с ферментом из *Citrobacter freundii*. Наиболее чувствительными были культуры клеток – K562, РС-3 и MCF7 – IC₅₀ = 0.4–1.3, 0.1–0.4 и 0.04–3.2 ед./мл соответственно.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА кинетические параметры, метионин- γ -лиаза, патогенные микроорганизмы, олигомерная структура, цитотоксичность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ДТТ – дитиотреитол; МГЛ – метионин- γ -лиаза; ПЛФ – пиридоксаль-5'-фосфат; His-tag – полигистидиновый фрагмент.

ВВЕДЕНИЕ

Метионин- γ -лиаза (МГЛ) [КФ 4.4.1.11] – пиридоксаль-5'-фосфат-зависимый фермент, катализирующий реакцию γ -элиминирования L-метионина с образованием метилмеркаптана, α -кетомасляной кислоты и аммиака:



Помимо физиологической реакции, фермент катализирует реакцию β -элиминирования L-цистеина и его S-замещенных производных с образованием со-

ответствующих меркаптанов, пировиноградной кислоты и аммиака [1]. Фермент был выделен из ряда бактерий, эукариотических простейших и грибов [2]. Этого фермента нет в клетках млекопитающих, но он присутствует у таких патогенных бактерий, как *Aeromonas* ssp. [3], *Clostridium sporogenes* [4], *Porphyromonas gingivalis* [5] и у патогенных простейших *Entamoeba histolytica* [6], *Trichomonas vaginalis* [7], что позволяет рассматривать его в качестве мишени для новых антибактериальных средств. Фермент представляет интерес в качестве противоопухолевого средства, поскольку для роста злокачественных клеток различного происхождения, в отличие

от нормальных, абсолютно необходим метионин [8]. Перспективность разработки противоопухолевого средства на основе МГЛ из *Pseudomonas putida* показана *in vitro* и *in vivo* [9–12]. Противоопухолевую активность фермента из *A. flavipes* в отношении ряда опухолей человека наблюдали *in vitro* [13]. В представленной работе определены некоторые кинетические характеристики рекомбинантных препаратов МГЛ, полученных из патогенных микроорганизмов – *C. tetani* (возбудитель столбняка), *C. sporogenes* (возбудитель газовой гангрены и энтеритов), *P. gingivalis* (возбудитель пародонтитов), и данные о цитотоксической активности фермента из этих источников и из *C. freundii*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выращивание бактериальных масс и очистка фермента

Клетки *Escherichia coli* BL21(DE3), содержащие гены МГЛ из *C. sporogenes*, *C. tetani*, *P. gingivalis* в плазмиде рЕТ-28а [14], выращивали на «индуцирующей» среде [15] при 37°C с перемешиванием (180 об/мин) в течение 24 ч. Клетки собирали центрифугированием и хранили при –80°C. Разрушение клеток и освобождение от нуклеиновых кислот проводили согласно [16]. После отделения нуклеиновых кислот препараты переводили в 50 мМ калий-фосфатный буфер, рН 8,0, содержащий 0,05 мМ пиридоксаль-5'-фосфат (ПДФ), используя «Centricon-30 ultrafiltration unit» (Amicon, США). Полипептидные цепи фермента, выделенного из трех источников, содержали на N-концах полигистидиновые последовательности MGSSHHNNHHSSGLVPRGSH. Препараты очищали, используя аффинную хроматографию на колонке с сорбентом Ni²⁺ИМАС-сефароза (GE Healthcare, Швеция), для элюции МГЛ использовали градиент имидазола 10–500 мМ в 50 мМ калий-фосфатном буфере, рН 8,0, содержащем 0,05 мМ ПДФ. Фракции, имевшие характерные спектры пиридоксаль-5'-фосфат-зависимых ферментов с λ_{\max} в области 420 нм, выходили при 25–155 мМ имидазола. Выращивание биомассы клеток *E. coli* BL21(DE3), содержащих плазмиду с геном МГЛ из *C. freundii*, и очистку фермента проводили как описано в работе [17]. Концентрацию очищенных препаратов определяли, используя коэффициент $A_{1\%}^{278} = 0.8$ [17]. Чистоту препаратов проверяли при помощи электрофореза в денатурирующих условиях по методу Лэммли [18]. Полосы на электрофореграммах идентифицировали с использованием окрашивания Кумасси R-250 [19] и вестерн-блоттинга с реагентом на полигистидиновый фрагмент HisProbe-HRP (Thermo scientific, Rockford, IL, США) [20]. Активность препаратов в реакции

γ -элиминирования определяли по скорости образования α -кетомасляной кислоты в сопряженной реакции с D-2-гидроксиизокапроатдегидрогеназой в условиях, описанных в работе [17]. За единицу ферментативной активности принимали количество МГЛ, катализирующее образование 1,0 мкМ/мин α -кетобутирата при 30°C. Удельные активности фермента из *C. tetani*, *C. sporogenes*, *P. gingivalis* и *C. freundii* составили 16,6, 12,8, 5,0, 10,2 ед./мг соответственно.

Отщепление His-tag проводили в реакции с тромбином. Реакционную смесь (1 мл), содержащую 10 мг фермента в 50 мМ калий-фосфатном буфере, рН 8,0, 1 мМ ДТТ, 0,05 мМ ПДФ и 100 ед. тромбина, инкубировали в течение 24 ч при 4°C. Далее препарат очищали гель-фильтрацией на колонке с Superdex 200 (GE Healthcare, Швеция), уравновешенной 50 мМ калий-фосфатным буфером, рН 8,0, содержащим 1 мМ ДТТ и 0,05 мМ ПДФ. Гомогенность препарата определяли при помощи электрофореза в денатурирующих условиях.

Определение олигомерного состава МГЛ из *C. tetani*, *C. sporogenes*, *P. gingivalis*

Определяли молекулярные массы ферментов из *C. tetani*, *C. sporogenes*, *P. gingivalis* в препаратах, содержащих His-tag, и после отщепления фрагмента тромбином с последующей гель-фильтрацией на колонке Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, Швеция). Для элюции использовали 50 мМ калий-фосфатный буфер, рН 8,0, содержащий 0,05 мМ ПДФ и 1 мМ ДТТ.

Определение стационарных кинетических параметров реакций γ - и β -элиминирования

Стационарные параметры реакций γ - и β -элиминирования определяли по скорости образования α -кетомасляной и пировиноградной кислот в сопряженных реакциях с D-2-гидроксиизокапроатдегидрогеназой и лактатдегидрогеназой в условиях, приведенных в работе [17], варьируя концентрацию субстратов в реакционных смесях. Данные обрабатывали согласно уравнению Михаэлиса–Ментен в программе Enzfitter. В расчетах использовали величины молекулярных масс субъединиц фермента с учетом His-tag, которые составляли 44,04, 44,36, 44,08 кДа для МГЛ из *C. tetani*, *C. sporogenes*, *P. gingivalis* соответственно.

Оценка цитотоксичности *in vitro*

Цитотоксическую активность МГЛ различного происхождения тестировали на линиях клеток лимфоценоза Фишера мышей L5178у (коллекция опухолевых штаммов РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН), рака предстательной железы человека РС-3 и Ln-

Сар (АТСС, США), рака молочной железы человека МСF7 (АТСС, США), хронического эритробластного лейкоза человека К562 (АТСС, США), рака яичников человека SKOV-3 (коллекция опухолевых штаммов РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН). Клетки культивировали при 37°C и 5% CO₂ в среде RPMI 1640 («ПанЭко», Россия), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone Laboratories, Великобритания), 2 мМ L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина («ПанЭко», Россия). Достигшие логарифмической фазы роста клетки пассировали в плоскодонные 96-луночные микропланшеты (Costar, США) по (4–6) × 10⁴ клеток на лунку и преинкубировали в течение 24 ч перед добавлением тестируемых ферментов в указанных выше условиях. Световую микроскопию клеток проводили с помощью системы AxioVision 4 (Carl Zeiss, Германия). Жизнеспособность клеток определяли по исключению красителя трипанового синего («ПанЭко», Россия). Число клеток подсчитывали в камере Горяева.

Препараты МГЛ в среде RPMI 1640 в широком диапазоне прогрессивно уменьшающихся концентраций добавляли в лунки с клеточной культурой и коинкубировали в течение 72 ч. В дополнение к МГЛ среда культивирования содержала 5 × 10⁻⁴ М ПЛФ. Диапазон концентраций ферментов в среде культивирования соответствовал 0.000001–6.2 ед./мл. В контрольные лунки добавляли в том же объеме среду RPMI 1640 с ПЛФ. Уровень клеточного метаболизма по окончании периода инкубации определяли с помощью стандартного МТТ-колориметрического метода [21]. Оптическое поглощение окрашенных растворов диметилсульфоксида измеряли на планшетном фотометре Multiskan MS (Labsystems, Финляндия) при λ = 540 нм. Жизнеспособность клеточной культуры после коинкубации с тестируемыми субстанциями оценивали по формуле: (N_o/N_к) × 100%, где N_o – оптическое поглощение в опытных пробах, N_к – оптическое поглощение в контроле. Методом нелинейной регрессии рассчитывали ингибирующую концентрацию каждого фермента в среде, т.е. концентрацию, которая вызывала снижение количества живых клеток на 50% (IC₅₀).

Статистическая обработка данных

Данные обрабатывали с применением пакета SPSS 11.5. Взаимосвязи IC₅₀ и K_м изучали с помощью корреляционного анализа Пирсона. Рассчитывали коэффициенты корреляции как по сгруппированным данным о цитотоксичности в различных клеточных линиях, так и в несгруппированных данных. В первом случае в корреляционный анализ включали среднее геометрическое значение IC₅₀ для различных культур клеток. Во втором случае цитотоксичность на каждой клеточной линии рассматривали отдельно, данные

предварительно логарифмировали для симметризации закона распределения.

Для сравнения цитотоксичности полученных ферментов *C. freundii*, *C. sporogenes* и *C. tetani* использовали однофакторный дисперсионный анализ. Поскольку дисперсии IC₅₀ в группах значительно различались, проводили анализ логарифмированных данных. Рассчитывали значения Mean ± SD – среднее арифметическое и стандартное отклонение; среднее геометрическое (антилогарифм средних логарифмированных значений); p_{ANOVA} = 0.005 – статистическую значимость различий по данным дисперсионного анализа в целом. Статистическую значимость различий цитотоксической активности разных ферментов оценивали по методу Тьюки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетические параметры МГЛ из трех патогенных бактерий

Мы определили параметры стационарной кинетики МГЛ из трех источников в реакции γ-элиминирования для трех субстратов – L-метионина, L-метионинсульфоксида, S-этил-L-гомоцистеина, и в реакции β-элиминирования для двух субстратов – S-этил-L-цистеина и S-бензил-L-цистеина. Данные приведены в табл. 1 в сравнении с параметрами для МГЛ из *C. freundii*.

В целом кинетические параметры трех ферментов и МГЛ из *C. freundii* оказались сравнимыми. Фермент из *C. sporogenes* имеет наибольшую по сравнению с другими ферментами каталитическую эффективность (величина k_{кат}/K_м) в реакции с физиологическим субстратом, а фермент из *P. gingivalis* – наименьшую. Как упоминалось выше, ранее противоопухолевую активность определяли преимущественно для МГЛ из *P. putida* [22, 23]. Величины k_{кат}, K_м, k_{кат}/K_м реакции γ-элиминирования L-метионина у МГЛ из этого источника составляют 25.39 с⁻¹, 0.92 мМ, 2.76 × 10⁴ М⁻¹с⁻¹ соответственно [24]; т.е. фермент из *C. sporogenes* имеет лучшее сродство к L-метионину, чем МГЛ из *P. putida*, а их каталитические эффективности практически одинаковы.

Олигомерная структура рекомбинантных белков

Ранее было показано, что МГЛ из *P. putida* в растворе находится в виде тетрамера [25]. Данные рентгеноструктурного анализа рекомбинантной МГЛ *C. freundii* также свидетельствовали, что фермент представлен тетрамерной формой [26].

На электрофореграммах денатурированных препаратов из *C. sporogenes*, *C. tetani* и *P. gingivalis* выявлены две основные полосы – одна, соответствующая молекулярной массе субъединицы, и вторая, с мо-

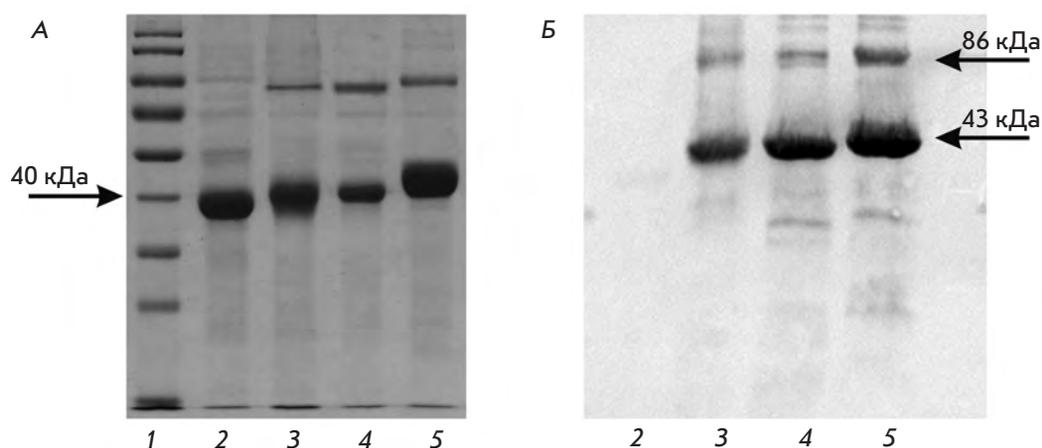


Рис. 1. Электрофорез (А) и вестерн-блот (Б) МГЛ из различных источников. 1 – Стандартные маркеры молекулярных масс, 2 – препарат МГЛ из *C. freundii*, 3 – препарат МГЛ из *P. gingivalis*, 4 – препарат МГЛ из *C. sporogenes*, 5 – препарат МГЛ из *C. tetani*

Таблица 1. Кинетические параметры МГЛ из различных источников*

Субстрат	МГЛ <i>P. gingivalis</i>			МГЛ <i>C. tetani</i>			МГЛ <i>C. sporogenes</i>			МГЛ <i>C. freundii</i> **		
	$k_{кат}$, с ⁻¹	K_M , мМ	$k_{кат}/K_M$, М ⁻¹ с ⁻¹	$k_{кат}$, с ⁻¹	K_M , мМ	$k_{кат}/K_M$, М ⁻¹ с ⁻¹	$k_{кат}$, с ⁻¹	K_M , мМ	$k_{кат}/K_M$, М ⁻¹ с ⁻¹	$k_{кат}$, с ⁻¹	K_M , мМ	$k_{кат}/K_M$, М ⁻¹ с ⁻¹
L-Met	3.9	1.77	2.2×10^3	12	0.947	1.27×10^4	9.86	0.432	2.28×10^4	6.2	0.7	8.85×10^3
S-Et-L-Hcy	3.84	0.93	4.13×10^3	5.89	0.545	1.08×10^4	7.05	0.278	2.54×10^4	6.78	0.54	1.26×10^4
L-Met(SO)	5.05	12.22	4.13×10^2	2.7	7.07	3.82×10^2	6.7	33.51	2.0×10^2	2.52	6.21	4.06×10^2
S-Et-L-Cys	8.05	2.17	3.71×10^3	7.08	0.72	9.83×10^3	6.3	0.358	1.76×10^4	5.03	0.17	2.96×10^4
S-Bz-L-Cys	5.8	1.47	3.94×10^3	8.5	0.766	1.11×10^4	10	0.348	2.87×10^4	8.16	0.18	4.53×10^4

*Средняя квадратичная ошибка эксперимента при определении кинетических параметров не превышала 10%.

**Данные работ [16, 17].

лекулярной массой, большей в 2 раза (рис. 1А). Обе эти полосы взаимодействовали с реагентом на His-tag (рис. 1Б). Полосы, соответствующие димерной форме МГЛ, могли образоваться либо при окислении сульфгидрильных групп МГЛ в условиях проведения электрофореза по Лэммли, либо за счет His-tag. Во многих случаях присутствие His-tag на N-или C-концевых участках рекомбинантных белков не влияет на их структуру и функцию [27], однако имеются данные и о влиянии His-tag на структуру и функцию белков. Так, показано [28], что наличие His-tag на C-конце восстанавливает способность к димеризации мутантной формы ДНК-связывающего белка $\lambda^{30.5}$, в отличие от белка дикого типа к димеризации не способного. Присутствие His-tag на N-конце галактитол-1-фосфат-5-дегидрогеназы снизило стабильность фермента и привело к агрегации димерных молекул [29].

Можно было предположить, что присутствие на N-концах полипептидных цепей МГЛ из *C. sporo-*

genes, *C. tetani* и *P. gingivalis* последовательности MGSSHHHHHSSGLVPRGSH влияет на олигомерную организацию фермента.

Молекулярную массу нативных препаратов МГЛ из трех упомянутых выше источников и из *C. freundii* определяли методом гель-фильтрации. Установлено, что фермент из всех источников представлен тетрамерной формой. На рис. 2 приведены данные гель-фильтрации МГЛ из *C. sporogenes*. Показано, что молекулярные массы препаратов из *C. sporogenes*, *C. tetani* и *P. gingivalis* после отщепления His-tag тромбином составляют примерно 170 кДа, что соответствует тетрамерным формам. Следует отметить, что в препарате МГЛ из *C. tetani* присутствовала олигомерная форма (обладающая физиологической активностью МГЛ) с молекулярной массой приблизительно 258 кДа. На электрофореграммах всех препаратов димерные формы отсутствовали (рис. 3), что исключает упомянутую выше возможность их образования при окислении сульфгидриль-

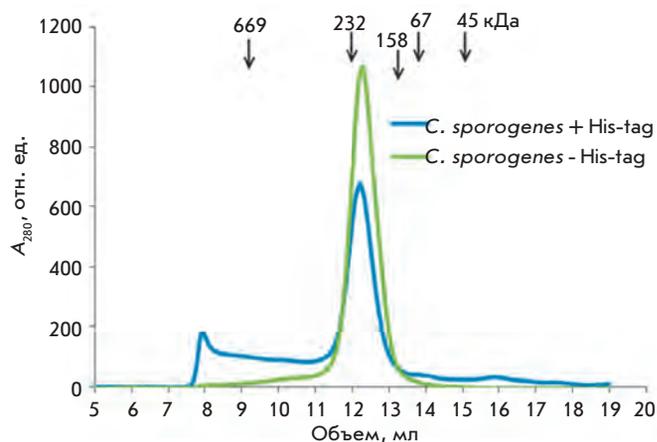


Рис. 2. Гель-фильтрация образцов МГЛ из *C. sporogenes*. Колонку калибровали с использованием стандартных маркеров, молекулярные массы которых указаны на рисунке

ных групп МГЛ в стандартных условиях электрофореза по Лэммли. Таким образом, димерная форма МГЛ наблюдается только при гель-электрофорезе денатурированных препаратов из трех источников, содержащих His-tag на N-концах полипептидных цепей.

Согласно данным рентгеноструктурного анализа тетрамерная молекула *C. freundii* МГЛ состоит из двух каталитических димеров, в каждом из которых два активных центра образованы остатками из двух субъединиц. N-Концевые домены каждой из субъединиц участвуют как в формировании димера, образуя множественные водородные связи с остатками C-концевого домена соседней субъединицы, так и в ассоциации двух каталитических димеров, контактируя с остатками двух C-концевых доменов второго каталитического димера (рис. 4) [26]. Возможно, что N-концевой His-tag, присутствующий в молекулах МГЛ из *C. sporogenes*, *C. tetani* и *P. gingivalis*, образует дополнительные контакты с остатками C-концевого домена как каталитического димера, так и с C-концевыми остатками двух субъединиц второго каталитического димера, и в денатурированных препаратах может происходить димеризация субъединиц.

Удельная активность препаратов МГЛ из *C. sporogenes*, *C. tetani* и *P. gingivalis*, определенная после отщепления His-tag тромбином в реакции γ -элиминирования L-метионина, оказалась в 1.5 раза выше. Увеличение удельной активности препаратов на 50% нельзя объяснить только их незначительной дополнительной очисткой после обработки тромбином. Вероятно, присутствие His-tag может влиять на активность МГЛ.

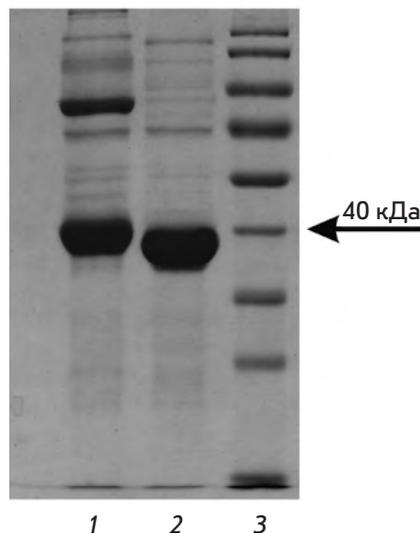


Рис. 3. Электрофорез образцов МГЛ из *C. sporogenes*. 1 – Препарат с His-tag, 2 – препарат после отщепления His-tag тромбином, 3 – стандартные маркеры молекулярных масс

Для объяснения разной каталитической эффективности ферментов и возможного влияния His-tag на N-концевых участках полипептидных цепей МГЛ из *C. sporogenes*, *C. tetani* и *P. gingivalis* на активность фермента требуются дальнейшие исследования с привлечением данных рентгеноструктурного анализа.

Цитотоксичность метионин- γ -лиазы *C. freundii*, *C. sporogenes* и *C. tetani*

Расчетные значения IC_{50} МГЛ различного происхождения на панели клеточных культур представлены в табл. 2. Наиболее чувствительными к действию ферментов оказались культуры клеток рака предстательной железы РС-3 и хронического эритробластного лейкоза человека К562, величины IC_{50} составили у них 0.1–0.4 и 0.4–1.3 ед./мл соответственно. Наименьшей чувствительностью характеризова-

Таблица 2. IC_{50} МГЛ для ряда культур опухолевых клеток

Культура клеток	IC_{50} МГЛ, ед./мл		
	<i>C. freundii</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. tetani</i>
К562	1.3	0.9	0.4
РС-3	0.1	0.4	–
LnCap	> 2.9	> 2.9	> 6.2
MCF7	0.5	0.04	3.2
L5178y	1.7	> 2.9	–
SCOV-3	–	–	5.3



Рис. 4. Тетрамер МГЛ из *S. freundii*. Субъединицы окрашены разными цветами, активные центры отмечены розовым, область контактов между каталитическими димерами выделена желтым

лись клетки рака предстательной железы LnCap – в изученных диапазонах концентраций ни для одного из ферментов величину IC_{50} определить не удалось. Чувствительность клеток K562 и MCF7 к МГЛ отличается значительной вариабельностью.

Полученные результаты свидетельствуют об относительно высокой чувствительности большинства изученных клеток к МГЛ. Так, цитотоксичность МГЛ сопоставима с цитотоксичностью известных ферментов, в частности, *L*-аспарагиназы *E. coli*: на культурах клеток K562 и MCF7 IC_{50} для *L*-аспарагиназы *E. coli* составляет 0.8 и 10.9 ед./мл соответственно [30]. Наиболее близкой по уровню цитотоксичности к МГЛ *P. putida* оказался фермент *S. sporogenes*.

Существует статистически обоснованная гипотеза о прямой зависимости противоопухолевого эффек-

та препаратов, действие которых основано на разрушении другой аминокислоты – *L*-аспарагина (*L*-аспарагиназ) [31, 32]. В этой связи представляет интерес вклад ферментативной активности в реализацию цитотоксического эффекта МГЛ. При статистическом анализе сгруппированных данных о зависимости цитотоксичности МГЛ от K_m в отношении разных субстратов взаимосвязи между этими параметрами не обнаружены. Однако установлена тенденция к положительной взаимосвязи между K_m по отношению к *L*-метионину и IC_{50} ($r = 0.549$, $p = 0.100$), что косвенно подтверждает существование зависимости между ферментативным уменьшением уровня метионина в среде и цитотоксической активностью.

Выявленная тенденция к повышению IC_{50} при увеличении K_m может позволить с осторожностью прогнозировать возможность увеличения цитотоксичности МГЛ по мере повышения сродства к *L*-метионину. Это не противоречит существующей концепции об используемых в онкологии ферментах как о препаратах, противоопухолевый эффект которых связан с повышенной чувствительностью злокачественных клеток к дефициту аминокислот.

ВЫВОДЫ

Определение кинетических параметров и цитотоксической активности МГЛ из трех бактериальных источников показало, что фермент из *S. sporogenes* представляет наибольший интерес для дальнейших исследований. Он обладает минимальной величиной K_m по сравнению с другими изученными ферментами и наиболее высокой цитотоксичностью, близкой к цитотоксичности МГЛ из *P. putida*.

Результаты, полученные на культурах клеток K562, MCF7 и РС-3, позволяют считать перспективным дальнейшее изучение антипролиферативной активности МГЛ *in vivo*, а также на расширенной панели культур клеток *in vitro* с возможностью создания на основе этого фермента нового противоопухолевого препарата. ●

Работа поддержана РФФИ (грант № 11-04-12104-офи-м-2012) и грантом Президента РФ по поддержке ведущих научных школ (№ 2046.2012.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tanaka H., Esaki N., Soda K. // Enzyme Microb. Technol. 1985. V. 7. P. 530–537.
2. El-Sayed A.S. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 86. P. 445–467.
3. Nakayama T., Esaki N., Lee W.-J., Tanaka I., Tanaka H., Soda K. // Agric. Biol. Chem. 1984. V. 48. P. 2367–2369.
4. Kreis W., Hession C. // Cancer Res. 1973. V. 33. P. 1862–1865.
5. Yoshimura M., Nakano Y., Yamashita Y., Oho T., Saito T., Koga T. // Infection Immunity. 2000. V. 68. P. 6912–6916.
6. Tokoro M., Asai T., Kobayashi S., Takeuchi T., Nozaki T. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 42717–42727.
7. Lockwood B., Coombs G. // Biochem. J. 1991. V. 279. P. 675–682.

8. Cellarier E., Durando X., Vasson M.P., Farges M.C., Demiden A., Maurizis J.C., Madelmont J.C., Chollet P. // *Cancer Treat Rev.* 2003. V. 29. P. 488–489.
9. Yoshioka T., Wada T., Uchida N., Maki H., Yoshida H., Ide N., Kasai H., Hojo K., Shono K., Maekawa R., et al. // *Cancer Res.* 1998. V. 58. P. 2583–2587.
10. Miki K., Xu M., An Z., Wang X., Yang M., Al-Refaie W., Sun X., Baranov E., Tan Y., Chishima T., et al. // *Cancer Gene Ther.* 2000. V. 7. P. 332–338.
11. Miki K., Al-Refaie W., Xu M., Jiang P., Tan Y., Bouvet M., Zhao M., Gupta A., Chishima T., Shimada H., et al. // *Cancer Res.* 2000. V. 60. P. 2696–2702.
12. Tan Y., Xu M., Hoffman R.M. // *Anticancer Res.* 2010. V. 30. P. 1041–1046.
13. El-Sayed A.S., Shouman S.A., Nassrat H.M. // *Enzyme Microb. Technol.* 2012. V. 51. P. 200–210.
14. Ревтович С.В., Морозова Е.А., Ануфриева Н.В., Котлов М.И., Белый Ю.Ф., Демидкина Т.В. // *ДАН.* 2012. Т. 445. С. 187–193.
15. Studier F.W. // *Protein Expr. Purif.* 2005. V. 41. P. 207–234.
16. Манухов И.В., Мамаева Д.В., Морозова Е.А., Расторгуев С.М., Фалеев Н.Г., Демидкина Т.В., Завильгельский Г.Б. // *Биохимия.* 2006. Т. 71. С. 454–463.
17. Морозова Е.А., Бажулина Н.П., Ануфриева Н.В., Мамаева Д.В., Ткачев Я.В., Стрельцов С.А., Тимофеев В.П., Фалеев Н.Г., Демидкина Т.В. // *Биохимия.* 2010. Т. 75. С. 1435–1445.
18. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
19. Meyer T.S., Lamberts B.L. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1965. V. 107. P. 144–145.
20. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979. V. 76. P. 4350–4354.
21. Mossman T. // *J. Immunol. Methods.* 1983. V. 65. P. 55–63.
22. Xu W., Zhang X., Qian H., Zhu W., Sun X., Hu J., Zhou H., Chen Y. // *Exp. Biol. Med.* 2004. V. 229. P. 623–631.
23. Tan Y., Xu M., Hoffman R.M. // *Anticancer Res.* 2010. V. 30. P. 1041–1046.
24. Kudou D., Misaki S., Yamashita M., Tamura T., Esaki N., Inagaki K. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008. V. 72. P. 1722–1730.
25. Nakayama T., Esaki N., Sugie K., Berezov T.T., Tanaka H., Soda K. // *Anal. Biochem.* 1984. V. 138. P. 421–424.
26. Mamaeva D.V., Morozova E.A., Nikulin A.D., Revtovich S.V., Nikonov S.V., Garber M.B., Demidkina T.V. // *Acta Cryst.* 2005. V. F61. P. 546–549.
27. Chant A., Kraemer-Pecore C.M., Watkin R., Kneale G.G. // *Protein Expr. Purif.* 2005. V. 39. P. 152–159.
28. Wu J., Filutowicz M. // *Acta Biochem. Pol.* 1999. V. 46. P. 591–599.
29. Esteban-Torres M., Alvarez Y., Acebrón I., de las Rivas B., Muñoz R., Kohring G.W., Roa A.M., Sobrino M., Mancheño J.M. // *FEBS Lett.* 2012. V. 586. P. 3127–3133.
30. Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Pokrovsky V.S., Omeljanjuk N.M., Borisova A.A., Anisimova N.Yu., Sokolov N.N. // *Protein Expr. Purif.* 2012. V. 82. P. 150–154.
31. Соколов Н.Н., Занин В.А., Александрова С.С. // *Вопр. мед. химии.* 2000. Т. 46. С. 531–548.
32. Красоткина Ю.В., Гладилина Ю.А., Борисова А.А., Гервазиев Ю.В., Абакумова О.Ю., Занин В.А., Соколов Н.Н. // *Вопр. биол. мед. фарм. химии.* 2008. № 3. С. 18–21.