

УДК 577.152.314:577.112.7:615.277.3

Надмолекулярная организация как фактор цитотоксичности рибонуклеаз

Е. В. Дудкина*, В. В. Ульянова, О. Н. Ильинская

Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, Казань, 420008 Россия

*E-mail: lenatimonina@rambler.ru

Поступила в редакцию 11.05.2020

Принята к печати 29.06.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11000

РЕФЕРАТ Одним из подходов к элиминации опухолевых клеток является направленная деструкция/модификация молекул их РНК, поэтому считается, что рибонуклеазы (РНКазы) обладают терапевтическим потенциалом, во многом еще не изученным. Предполагается, что биологические эффекты секретируемых РНКаз, а именно их противоопухолевые и противовирусные свойства, обусловлены каталитической активностью. Однако ряд современных данных опровергает исключительную роль ферментативной активности РНКаз в проявлении их селективной цитотоксичности по отношению к раковым клеткам. В настоящем обзоре мы анализируем современные данные о цитотоксических эффектах секретируемых РНКаз, проявляющихся без участия каталитической активности, и приводим доказательства того, что важнейшим фактором селективного апоптозотриггирующего действия РНКаз является структурная организация ферментов, обуславливающая их взаимодействие с компонентами клетки. Приведенные доказательства в пользу приоритетной роли некаталитических взаимодействий РНКаз с раковыми клетками в проявлении избирательной цитотоксичности вносят вклад в разработку противоопухолевых препаратов на базе РНКаз.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА рибонуклеаза, димер, олигомеризация, каталитическая активность, цитотоксичность, противоопухолевая активность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ дцРНК – двухцепочечная РНК; ИР – ингибитор рибонуклеаз млекопитающих; BS-РНКаз – рибонуклеаза семенников быка.

ВВЕДЕНИЕ

Рибонуклеазы (РНКазы) катализируют расщепление фосфодиэфирных связей в различных РНК-субстратах, играя ключевую роль в деградации и процессинге клеточной РНК [1]. Большинство известных РНКаз являются белками, однако обнаружены и нетипичные формы РНКаз, каталитическая часть которых представлена молекулой РНК. Таким образом, РНКазы – одни из немногих ферментов, которые, по-видимому, до сих пор сохраняют связь с первичным миром РНК, древней системой репликаторов и катализаторов РНК [1].

РНКазы классифицируют на экзо- и эндорибонуклеазы. Экзорибонуклеазы осуществляют гидролиз фосфодиэфирной связи между нуклеотидами, находящимися на концах полинуклеотидной цепи, в направлении $3' \rightarrow 5'$. Эндонуклеазы расщепляют фосфодиэфирные связи внутри одноцепочечных или двухцепочечных молекул РНК.

Клетки живых организмов содержат различные виды экзо- и эндорибонуклеаз, основная функция которых заключается в контроле экспрессии генов путем изменения стабильности различных видов РНК и элиминации ненужных внутриклеточных РНК [2]. Кроме того, расщепляя проникшие в клетки чужеродные РНК [3] и участвуя в клеточном суициде, РНКазы играют защитную роль [4].

Секретируемые РНКазы микроорганизмов выполняют пищеварительную, защитную и регуляторную функции. Они необходимы для гидролиза РНК во внеклеточном пространстве. Считается, что у микроорганизмов расщепление внеклеточной РНК происходит в основном с целью извлечения питательных веществ. Лишь отдельные сообщения указывают на вовлечение секретируемых РНКаз микроорганизмов в конкурентную борьбу за экологическую нишу [5], в реализацию патогенного потенциала [6–8], в защиту своей популяции, а также

ассоциированных организмов от вирусной инфекции [9, 10].

У высших организмов секретируемые РНКазы, наоборот, в меньшей степени участвуют в переваривании пищи и представляют собой компоненты врожденной системы защиты и поддержания физиологического гомеостаза. У растений они обуславливают самонесовместимость [11]. У позвоночных животных секретируемые РНКазы гидролизуют внеклеточную РНК, которая высвобождается из поврежденных, стресс-индуцированных или малигнизированных клеток, оказывая противовоспалительное и антикоагулянтное действие; обладают противомикробной и противовирусной активностями, а также иммуномодулирующими и регенеративными свойствами [12].

Отдельные виды секретируемых РНКаз животных вовлечены в туморогенез [13], в то время как другие подавляют пролиферацию раковых клеток и индуцируют в них апоптоз [14–19], что позволяет рассматривать РНКазы в качестве потенциальных противоопухолевых агентов в щадящей терапии злокачественных новообразований. Селективной цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам обладают и микробные РНКазы [18–22], нечувствительные к ингибитору РНКаз млекопитающих (ИР), что открывает широкие возможности для биоинженерии [23]. РНКазы могут быть интернализированы клетками путем рецептор-зависимого эндоцитоза для регуляции сигнальных путей и внутриклеточных РНК [13]. При этом рибонуклеолитическая активность как таковая не всегда имеет первостепенное значение, вероятно, ключевая роль принадлежит физико-химическим и структурным свойствам белков.

СЕКРЕТИРУЕМЫЕ РИБОНУКЛЕАЗЫ БАЦИЛЛ

Среди внеклеточных РНКаз бактерий, проявляющих противоопухолевую активность, подробно охарактеризованы секретируемые РНКазы бацилл [19, 20, 22, 24, 25]. Бациллярные РНКазы представлены двумя типами эндонуклеолитических ферментов: низкомолекулярными гуанилпредпочитающими РНКазами [24] и высокомолекулярными неспецифичными РНКазами [26, 27]. Высокомолекулярные РНКазы бацилл (биназа II, РНКазы Bsn), представляющие семейство HNH эндонуклеаз (IPR003615), состоят примерно из 240 аминокислотных остатков (30 кДа). Эти белки, стабильные в диапазоне pH 6.5–9.5, имеют изоэлектрическую точку, равную примерно 5, и расщепляют РНК без видимой специфичности с образованием 5'-фосфорилированных олигонуклеотидов. Для проявления каталитической активности необходимы ионы Mg^{2+} . Оптимум pH для гидролиза РНК составляет 8.5, оптимум температуры – 37°C.

Низкомолекулярные гуанилпредпочитающие РНКазы бацилл (биназа, барназа), относящиеся к семейству N1/T1/U2 (IPR000026), представляют собой малые внеклеточные белки, состоящие примерно из 110 аминокислотных остатков (12 кДа). Ферменты стабильны в широком диапазоне pH (3–10). Гуанилспецифичные РНКазы относятся к катионным белкам с изоэлектрической точкой около 9. Они катализируют расщепление РНК предпочтительно у остатков гуанозина в две последовательные реакции, в ходе которых трансэтерификация 5'-фосфоэфирной связи приводит к образованию циклических 2',3'-фосфодиэфиров как промежуточных продуктов гидролиза с их последующим расщеплением до нуклеозид-3'-фосфатов [28]. Для проявления каталитической активности ферменты не нуждаются в ионах металлов и кофакторах [29]. Оптимальные условия для гидролиза РНК – pH 8.5 и 37°C.

Синтез внеклеточных РНКаз у бацилл индуцируется, за редким исключением, в условиях фосфатного голодания [30, 31], а низкомолекулярных РНКаз – еще и в условиях азотного голодания [32], что указывает на значимость этих ферментов для обеспечения клеток питательными веществами. Стоит отметить, что уровень РНКазной активности низкомолекулярных РНКаз на 1–2 порядка выше, чем у высокомолекулярных. Низкомолекулярные РНКазы также отличают особенности механизма рибонуклеолитической реакции – предпочтительность к гуаниловым остаткам, образование циклических 2',3'-рибонуклеотидов, которые сохраняются в реакционной среде не менее 1 ч [33], и фосфатная группа на 3'-конце образуемых нуклеотидов. В настоящее время 2',3'-циклопроизводные нуклеотидов, обнаруживаемые как у про-, так и у эукариот, рассматриваются у эукариот в качестве компонентов пути, защищающего ткани от инфекций и повреждений [34]. Нуклеотиды с 5'-концевым фосфатом могут быть лигированы с подобными нуклеотидами с образованием полимерных структур, в то время как встраивание нуклеотида с 3'-концевым фосфатом требует дополнительных реакций по переносу фосфатной группы на 5'-конец. Эти особенности, наряду с тем, что высокомолекулярные РНКазы широко представлены в мире бактерий, а низкомолекулярные имеются лишь у ограниченного числа видов бактерий [35], позволяют считать низкомолекулярные РНКазы бацилл уникальными белками и предполагают наличие у них особых функций и биологических свойств.

Так, имеются данные, косвенно указывающие на антагонистические свойства низкомолекулярных РНКаз [5, 24] и их участие в защите бактериальных клеток от фаговой инфекции [9]. У патогенных

бацилл группы *Bacillus cereus* низкомолекулярные РНКазы входят в состав поверхностных токсинов [35]. На сегодняшний день показаны разнообразные биологические эффекты низкомолекулярных РНКаз бацилл – от ростостимулирующих до антипролиферативных [19, 20, 22, 36, 37], что делает их перспективными для практического применения. Потенциал же высокомолекулярных РНКаз бацилл еще не изучен.

Низкомолекулярные РНКазы бацилл обладают высокой степенью сходства по первичной структуре (более 73%), основные различия сосредоточены в регуляторных областях генов, что опосредует разный уровень продукции этих белков, а также в сигнальных пептидах, влияющих на их секрецию [35]. Ферменты имеют практически идентичную третичную структуру, обладают общими физико-химическими и каталитическими свойствами. Аминокислотные остатки His и Glu в активном центре ферментов действуют как общие кислотно-основные группы во время катализа, а Arg и Lys важны для связывания фосфата.

Первые работы по выделению и очистке низкомолекулярных РНКаз появились в 70-х годах прошлого столетия: были выделены и охарактеризованы РНКазы *B. amyloliquefaciens* (барназа) и РНКазы *B. pumilus* 7P (биназа) [38, 39]. Нами усовершенствован метод выделения бациллярных РНКаз, позволяющий в три этапа получать гомогенный препарат белка. С помощью этого метода выделены, хроматографически очищены и охарактеризованы гуанилпредпочитающие РНКазы *B. pumilus* 7P (биназа), *B. altitudinis* В-388 (бальназа) и *B. licheniformis* (балифаза) [30, 40, 41]. Среди представленных видов наиболее активным продуцентом РНКазы является вид *B. pumilus*, секретирующий биназу. Близким гомологом биназы долгое время считалась рибонуклеаза *B. amyloliquefaciens* – барназа. Сходство первичной структуры биназы и барназы составляет 85%, однако синтез барназы не подвержен фосфатной регуляции и зависит от многофункционального белка Spo0A [24].

Исследование новой РНКазы бальназы, секретируемой штаммом *B. altitudinis* В-388, показало, что именно она представляет собой наиболее близкий естественный гомолог биназы. Первичные структуры белков отличаются лишь одной аминокислотной заменой: треонин в положении 106 в молекуле биназы заменен на аланин у бальназы [29], что не сказывается на изоэлектрической точке белка, но несколько снижает термостабильность [29, 42].

РНКазы *B. licheniformis* – балифаза – сходна по первичной структуре с биназой (73%) и барназой (74%). Синтез балифазы индуцируется в условиях фосфатного голодания, что сближает фермент с би-

назой и бальназой, но по физико-химическим свойствам балифаза ближе к барназе [41].

Несмотря на то что секретируемые РНКазы бацилл близки по физико-химическим и каталитическим свойствам, они различаются по способу димеризации и стабильности димерных форм, что отражается и на цитотоксических свойствах этих РНКаз.

Олигомеризация РНКаз

Олигомеризация – один из наиболее распространенных феноменов, является ключевым фактором регуляции ферментов, ионных каналов, рецепторов и факторов транскрипции. Димеры и олигомеры обуславливают стабильность белков, активируют передачу сигналов через мембрану, увеличивают ферментативную активность, расширяют возможности для регуляции, обеспечивая комбинаторную специфичность, аллостерические свойства, активацию и ингибирование каталитической активности ферментов [43].

При изучении структурной организации выделенных нами РНКаз – биназы, бальназы и балифазы – впервые было установлено, что все они димеризуются в естественных условиях среды и представляют собой природные димеры [41, 44, 45]. Вероятно, образование димеров у РНКаз – это один из важнейших процессов, необходимых ферментам для выполнения их функций и проявления биологических свойств. Несмотря на высокую степень структурного сходства, способ димеризации и стабильность димерных структур у гомологичных РНКаз сильно различаются [22].

Мы впервые обнаружили природные димерные структуры биназы, на протяжении длительного времени известной как мономер, не способный к олигомеризации [44]. Ранее димеры биназы находили только в условиях белкового кристалла [46]. Теоретическая возможность димеризации фермента в растворе рассматривалась как артефакт, который может возникать только при высокой концентрации белка [47]. Мы показали, что биназа в естественных условиях представлена димерами двух типов, различающихся механизмом образования и стабильностью. Одни димеры биназы высокостабильны, по-видимому, за счет обмена N- или C-концевыми участками и не диссоциируют в денатурирующих условиях, другие не способны к обмену доменами между мономерами (swapping-взаимодействиям), в связи с чем димеры такого типа при электрофорезе в денатурирующих условиях распадаются на мономеры [44]. У бальназы и балифазы образуются димеры только второго типа [22, 41, 45].

Молекулярное моделирование димерных структур биназы, бальназы и балифазы выявило разно-

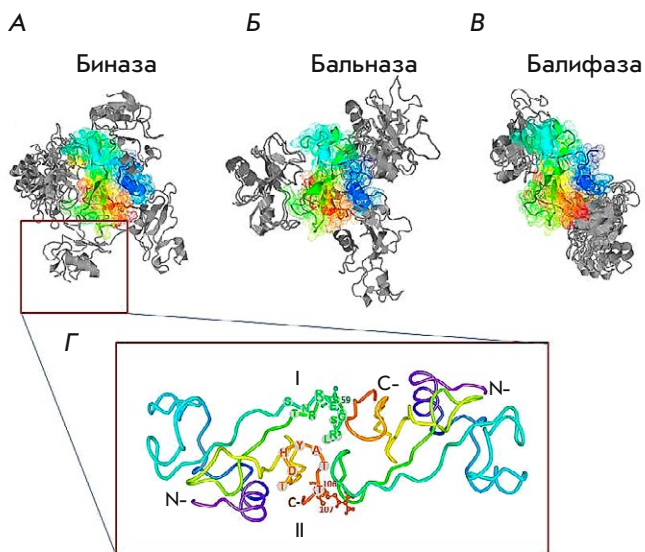


Рисунок. Модели димеров бациллярных РНКаз. Моделирование белок-белкового взаимодействия мономеров РНКаз было выполнено прямым методом путем поиска структур, обладающих минимальной свободной энергией Гиббса. Модели поделены на группы на основе сил, принимающих участие в образовании белкового комплекса (электростатических, ван-дер-ваальсовых и электростатических, гидрофобных или их баланса) и из каждой группы отобрано по две структуры с наименьшей свободной энергией. Один из мономеров биназы (А), бальназы (Б) или балифазы (В) представлен в виде молекулы с элементами вторичной структуры, окрашенной в цвета радуги от N-конца (синий) до С-конца (красный). Возможные позиции второго мономера в димерах РНКаз показаны серым цветом. (Г) Уникальный димер биназы, отсутствующий у бальназы и балифазы. Контактная поверхность в димере образована двумя гибкими петлями I (аминокислотные остатки 56–69) и II (аминокислотные остатки 99–104) [57], позволяющими мономерам обмениваться С-концевыми участками

образии их димеров (рисунок). Необходимо отметить, что димеры бациллярных РНКаз стабилизируются нековалентными связями, поскольку в первичных структурах белков отсутствуют серосодержащие аминокислоты [48]. С учетом сил, принимающих участие в образовании белкового комплекса (электростатических, гидрофобных, ван-дер-ваальсовых и электростатических или их баланса), были отобраны по две модели в каждой группе (рисунок). Обнаружено, что биназа способна к образованию димеров четырех видов (рис. А), тогда как бальназа (рис. Б) и балифаза (рис. В) – трех и двух видов соответственно, причем один из видов – это вариант с заблокированным активным центром фермента.

Анализ механизмов димеризации бациллярных РНКаз ставит вопрос о доступности активных центров для гидролиза субстрата в молекулах димеров. Изучение кристаллической формы биназы позволило сделать заключение, что связывание РНК в димере может осуществлять только одна из двух молекул мономеров, поскольку в димерной структуре блокирован каталитический центр второй субъединицы [21]. Мутантная биназа Glu43Ala/Phe81Ala обладает более высокой каталитической активностью и более выраженными цитотоксическими свойствами в отношении клеток лейкоза Касуми-1 по сравнению с ферментом дикого типа, что связывают с неспособностью мутантной формы создавать самоингибирующие димерные структуры [49].

С использованием расчетных методов броуновской динамики показано, что с учетом доступности активного центра биназа образует димеры трех типов [50]. Димерные структуры первого типа имеют два открытых каталитических центра, принимающих участие в гидролизе РНК. У димеров второго и третьего типов заблокированы один или оба активных центра. Изучение скорости ассоциации мономеров при димеризации биназы показало, что константа скорости реакции образования димеров первого типа намного выше, чем у моделей второго и третьего типов, и ее значение сопоставимо со скоростью формирования комплекса биназы и ингибитора барстара [50]. Учитывая схожий уровень каталитической активности биназы, бальназы и балифазы, а также результаты анализа интенсивности эмиссии белковых полос и площади зон гидролиза, мы можем утверждать, что в молекулах димеров исследуемых РНКаз в катализе принимают участие оба активных центра [22], а димеры с частично или полностью закрытыми активными центрами, по-видимому, являются минорными.

Стоит отметить, что большинство димеров в природе образуются именно за счет нековалентных связей между внеклеточными доменами, трансмембранными регионами и/или N,С-концами белков [51]. Последний механизм может осуществляться двумя способами. Первый – это контактная димеризация, когда петля одного из мономеров создает стабилизирующие контакты с другой молекулой, а второй способ – это обмен концевыми доменами или domain swapping [51]. Обмен доменами характерен для таких белков, как цитохром с [52] и, особенно, для некоторых амилоидогенных белков, таких, как прионный белок человека, цистатин С или β_2 -микроглобулин [53, 54].

Феномен обмена доменами частично нарушает догму Anfinsenа о том, что аминокислотная последовательность определяет уникальность третичной

структуры белка [55]. На самом деле гибкие петли белка могут принимать переменные конформации, занимая более одного доступного минимума энергии [56]. Это позволяет доменам, связанным с гибкими частями белков, принимать различные ориентации и подвергаться взаимному обмену с эквивалентным доменом соседней субъединицы. Следовательно, при наличии более одной гибкой петли могут образоваться нековалентные димеры или более крупные олигомеры, что дает ферментам новые возможности для аллостерических взаимодействий и макромолекулярной передачи сигналов [57, 58]. В биназе две гибкие петли располагаются вокруг активного центра: первая петля образована аминокислотными остатками 56–69, а вторая – остатками 99–104 [59]. Обе петли находятся в непосредственной близости в разновидности димера биназы, которого нет у других РНКаз (рис. Г). В его стабилизации принимают участие Phe105, Thr106, Arg107, Glu59, Gly60. Именно Thr106 является единственным аминокислотным остатком, измененным в молекуле бальназы по сравнению с биназой. Замена полярного треонина на гидрофобный аланин отразилась на стабильности бальназы [22, 29, 42]. Предполагается возможность обмена именно С-концевыми участками при образовании стабильного димера биназы. Отсутствие такой возможности у бальназы и балифазы привело не только к существенным различиям в способах их димеризации по сравнению с биназой, но и к снижению стабильности димеров и противоопухолевого потенциала гомологичных РНКаз [22].

На сегодняшний день известно несколько представителей РНКаз, функциональность которых зависит от структурной организации их молекул. Так, например, противовирусный потенциал РНКазы L и хемоаттрактантного белка-1 моноцитов (MCP1) инициируется образованием димерных структур [60, 61]. Среди РНКаз животного происхождения наиболее полно охарактеризована РНКаз семяночков быка (BS-РНКаз), представляющая собой природный димер [62]. Обнаружена корреляция между эффективностью катализа и димеризацией микробной РНКазы T из *Escherichia coli* [63]. РНКазы *J. B. subtilis* функционирует в клетке в форме димера или олигомеров более высокого порядка [64].

Долгое время среди всего разнообразия РНКаз был известен лишь один природный димер, способный к обмену доменами – BS-РНКаз, представляющая собой смесь димеров двух типов [65]. Одни димерные структуры образуются за счет ковалентных дисульфидных мостиков между аминокислотными остатками Cys31 и Cys32, димеры второго типа дополнительно стабилизированы за счет обмена N-концами α -спиралей фермента [66]. Как оказалось, противо-

опухолевую активность проявляют только димеры второго типа. Возможность обмена доменами приводит к образованию высокостабильных димерных структур, которые не разрушаются при проникновении фермента внутрь клетки и остаются нечувствительными к действию ИР, проявляя свою цитотоксичность путем гидролиза внутриклеточной РНК [65].

Еще один представитель РНКаз, димер которого способен к обмену участками, – панкреатическая РНКазы А [67]. Фермент способен нековалентно самоассоциироваться при взаимодействии с субстратом, а также олигомеризоваться при лиофилизации в 40% уксусной кислоте [68, 69]. Образование димеров и олигомеров более высокого порядка происходит путем обмена доменами, включающим N- и/или С-концевые участки белка [70]. Swapping-олигомеры РНКазы А увеличивают свою ферментативную активность в отношении субстратов двухцепочечной РНК (дцРНК) или ДНК:РНК-гибридов по сравнению с нативным мономером [71]. Увеличение каталитической активности прямо пропорционально размеру олигомеров, более того, наибольшей ферментативной активностью обладают виды, содержащие больше С-swapping олигомерных структур, чем N-swapping, ввиду большей основности заряда С-олигомеров [72]. Противоречивые результаты получены при изучении противоопухолевого потенциала олигомеров РНКазы А, что требует проведения дальнейших исследований.

Способностью к swapping-димеризации обладает и онконаза – РНКазы леопардовой лягушки *Rana pipiens*. Фермент образует димерные структуры за счет обмена N-концевыми фрагментами при лиофилизации в 40% уксусной кислоте [73]. При этом С-конец фермента не способен принимать участие в обмене, поскольку заблокирован дисульфидной связью между Cys87 и Cys104 [58]. Димеризация онконазы усиливает ее биологическую активность, как и у других РНКаз [17, 74, 75]. Так, димер онконазы оказался более цитотоксичным для клеток рака поджелудочной железы, чем нативный мономер [73]. Усиление цитотоксичности при димеризации связывают с увеличением основности молекулы онконазы, что усиливает сродство фермента с отрицательно заряженными мембранами раковых клеток и/или их внутриклеточными мишенями [75, 76].

Олигомеризация РНКаз позволяет избежать действия ИР и усиливает заряд молекулы, улучшая интернализацию фермента в опухолевые клетки; увеличивает ферментативную активность РНКаз и их сродство к дцРНК [62, 70]; а также придает им новые биологические свойства [65, 70] или усиливает уже существующие. Таким образом, способность

к образованию олигомерных структур, причем именно за счет механизма обмена доменами, необходима РНКазам для проявления их цитотоксичности.

Противоопухолевая активность РНКаз

РНКазы обладают избирательной цитотоксичностью по отношению к определенным раковым клеткам, не оказывая при этом значимого влияния на нормальные клетки организма, что позволяет рассматривать эти ферменты в качестве потенциальной альтернативы современным противоопухолевым средствам [20, 24, 25].

Наиболее яркий представитель бактериальных РНКаз – биназа оказывает противовирусное действие в отношении вирусов гриппа типа А (H1N1), бешенства, ящура и ряда вирусов растений [77]. Биназа проявляет селективную цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам, экспрессирующим определенные онкогены: *ras*, *KIT*, *AML/ETO*, *FLT3*, *E6* и *E7* [18, 19, 21]. Несмотря на активное изучение природы селективности РНКаз, механизм их избирательного действия до сих пор остается неясным.

Биологические эффекты РНКаз определяются молекулярными детерминантами, которые вносят вклад в апоптоз-индуцирующее действие ферментов, такими, как каталитическая активность, структура и заряд молекулы, ее стабильность [25]. Однако вкладу надмолекулярной организации в цитотоксичность РНКаз до сих пор уделено мало внимания.

Долгое время считалось, что определяющую роль в проявлении цитотоксичности РНКаз играет их ферментативная активность [78]. Однако появляется все больше данных, согласно которым ферменты без каталитической активности также обладают способностью индуцировать гибель опухолевых клеток. Показано, что мутантные формы α -сарцина и катионного белка эозинофилов человека, не способные к гидролизу РНК, сохраняют свою токсичность и запускают апоптоз в раковых клетках [79, 80]. Противоопухолевая активность катионного белка эозинофилов человека обусловлена его взаимодействием с поверхностными структурами клетки, что приводит к изменению проницаемости плазматической мембраны и нарушению ионного равновесия без интернализации фермента и гидролиза внутриклеточной РНК [81]. Обнаружено, что РНКазы А и ее гомологи способны связываться с дцРНК без проявления каталитической активности, вероятно, влияя таким образом на регуляторные функции этих молекул [20]. Высокая аффинность РНКазы А к дцРНК обусловлена положительно заряженными аминокислотами, расположенными вблизи активного центра [82]. Бактериальная РНКазы III содержит два отдельных домена, один из которых предназначен для связы-

вания с дцРНК, а второй – для ее деструкции [83]. Согласно представленным данным, фермент регулирует экспрессию генов либо расщепляя дцРНК, либо связываясь с ней, что приводит к функциональным изменениям в молекуле дцРНК [83].

Хотя обработка клеток биназой приводит к снижению уровня внутриклеточной РНК, этот процесс не связан непосредственно с индукцией апоптоза [84]. На фоне снижения количества суммарной РНК увеличивается экспрессия проапоптотических генов *p53* и *hSK4* – в 1.5 и 4.3 раза соответственно, тогда как уровень мРНК антиапоптотического гена *bcl-2* снижается в 2 раза. Вероятно, гидролиз РНК-субстратов биназой приводит к запуску каскада реакций, регулирующих гены, контролирующие апоптоз [84]. Не обнаружено также прямой корреляции между снижением уровня РНК и токсическим эффектом РНКаз. Так, в клетках острого миелоидного лейкоза Касуми-1, чрезвычайно чувствительных к действию биназы, уровень суммарной РНК не изменялся даже при снижении жизнеспособности на 95% [85]. Онконаза вызывает апоптоз стимулированных митогеном лимфоцитов, не влияя на уровень внутриклеточной РНК [86].

На сегодняшний день первичное взаимодействие РНКаз с поверхностными клеточными структурами рассматривается как один из наиболее значимых процессов, играющих важную роль в запуске каскада реакций, приводящих к гибели опухолевых клеток. Интернализация РНКаз происходит либо за счет специфического взаимодействия с клеточными рецепторами [87], либо путем их прямого взаимодействия с мембраной клетки [76]. РНКазы взаимодействуют с поверхностью клетки-мишени с участием мембранных липидов, ионных каналов, рецепторов, а также посредством неспецифического электростатического связывания [88]. Показано, что нативные и мутантные димерные РНКазы сильно влияют на агрегацию, текучесть и слияние клеточных мембран [75]. Обнаружено, что РНКазы А и ее аналог – рибонуклеаза поджелудочной железы человека (РНКазы 1) – специфически взаимодействуют с нейтральным гексасахаридным гликофинголипидом Globo H [88], расположенным на внешней стороне мембраны эпителиальных клеток и в большом количестве представленным в некоторых опухолевых клетках [89]. Онконаза и BS-РНКазы взаимодействуют со специфическими небелковыми рецептороподобными молекулами на плазматической мембране, что нехарактерно для других РНКаз [90].

Одним из механизмов, обуславливающих избирательную цитотоксичность биназы и других катионных РНКаз, является способность РНКаз взаимодействовать с анионными группами на поверхности

раковых клеток [25]. Как известно, опухолевые клетки более электроотрицательны, чем нормальные, за счет большого содержания кислых фосфолипидов [91]. Димеризация ферментов приводит к увеличению катионности белка, а значит и к усилению их противоопухолевых свойств. Так, замена отрицательно заряженных аминокислотных остатков на поверхности РНКазы *Streptomyces aureofaciens* (РНКазы Sa) на положительно заряженные приводила к усилению цитотоксического потенциала фермента [92, 93]. Апоптоз индуцирующее действие РНКазы Sa по отношению к клеткам острого миелоидного лейкоза Касуми-1 достоверно коррелировало с увеличением катионности фермента [18]. Введение положительно заряженных остатков в аминокислотную последовательность белка усиливало цитотоксичность онконазы [94].

Однако оказалось, что одного повышения заряда недостаточно для успешной интернализации РНКаз в клетку. Показана исключительно важная роль специфической ориентации молекулы РНКазы (онконазы, BS-РНКазы, РНКазы 1 и РНКазы А) относительно клеточной мембраны [76]. Так, нативная димерная BS-РНКазы принимает наиболее выгодную для своей интернализации ориентацию, когда она обращена обоими N-концами к клеточной мембране [75]. Мутант Gly38Lys BS-РНКазы, наделенный дополнительным катионным остатком, ориентированным в направлении N-конца, взаимодействовал с мембраной сильнее и был более цитотоксичным, чем BS-РНКазы дикого типа [17]. Представленные данные в очередной раз показали важность трехмерной структуры РНКаз, особенно ориентации основных зарядов, которые влияют на цитотоксический потенциал этих ферментов.

Биназа вызывает гибель трансформированных клеток MLE-12 легочного эпителия мыши, не влияя при этом существенно на нормальные клетки АТ-II [95]. При этом спустя 24 ч инкубации биназа достигает ядра клеток АТ-II, не проявляя при этом цитотоксичности, и вызывает гибель клеток MLE-12 без проникновения в них [95]. Каким образом РНКазы опосредует свой цитотоксический потенциал без интернализации фермента? Этот вопрос долгое время оставался открытым.

Недавно мы обнаружили, что селективность биназы в отношении опухолевых клеток, экспрессирующих онкоген *ras* обусловлена прямым взаимодействием РНКазы с эндогенным белком KRAS [96]. Исследование активированного KRAS с использованием негидролизуемого аналога GTP (GTP γ S) показало, что биназа препятствует обмену GDP на GTP, а также снижает взаимодействие RAS с белковыми факторами GEF, SOS1. Анализ фосфорилирования

эффекторов RAS – белков AKT и ERK1/2 – подтвердил ингибирование сигнального пути MAPK/ERK [96]. Таким образом, доказано, что селективность биназы в отношении опухолевых клеток, экспрессирующих онкоген *ras*, связана с взаимодействием биназы и KRAS, которое приводит к блокированию сигнального пути MAPK/ERK и запуску апоптоза в опухолевых клетках. Связанная с KRAS биназа находится не только в димерной форме, но и в форме тримера, что подтверждает значимость агрегации фермента в олигомеры более высокого порядка для блокирования пролиферативных сигналов [96].

РНКазы А способна также влиять на клеточные сигналы, однако ее действие противоположно противоопухолевому эффекту биназы. Фермент взаимодействует с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR), активируя сигнальный путь MAPK/ERK, что приводит к индукции клеточной пролиферации и росту опухоли [13]. Данная особенность РНКазы А, обнаруженная относительно недавно, ставит под сомнение возможность использования этого фермента в качестве потенциального противоопухолевого средства.

Некоторые РНКазы для проявления их цитотоксического потенциала должны проникнуть в клетку. Опубликованы противоречивые данные, касающиеся механизма интернализации РНКаз. Так, онконазы и РНКазы А интернализируются в ранние эндосомы клеток HeLa и K562 с использованием клатрин- и кавеолиннезависимых путей [87], тогда как в клетках Jurkat эндоцитоз онконазы происходит динаминзависимым путем [97]. Эти противоречивые данные предполагают, что для проникновения в клетки РНКазы могут использовать различные пути, и многие аспекты интернализации РНКаз до сих пор остаются неизвестными. BS-РНКазы интернализируются в эндосомах как нормальных, так и злокачественных клеток, но только в последних, где фермент цитотоксичен, он достигает комплекса Гольджи, обеспечивающего его цитозольную доставку [90]. Вариант BS-РНКазы, C-конец которого сконструирован для локализации в эндоплазматическом ретикулуме, не обладает цитотоксичностью, поскольку он не может высвободиться в цитозоле, чтобы проявить свою противоопухолевую активность [90].

При достижении цитозольного компартмента РНКазы встречаются с еще одним препятствием – внутриклеточным ингибитором РНКаз млекопитающих. ИР – белок с молекулярной массой 50 кДа, присутствующий в цитоплазме, митохондриях и ядре клеток животных и человека [98]. Биологические функции ИР до сих пор выяснены не до конца, рассматривается его потенциальное участие в окисли-

тельно-восстановительном гомеостазе клетки [99]. ИР блокирует действие РНКаз млекопитающих, образуя с ними плотные комплексы, ингибирующие каталитическую активность. Филогенетическая отдаленность бактериальных РНКаз и РНКаз амфибий делает их нечувствительными к действию ИР и позволяет рассматривать в качестве потенциальных противоопухолевых средств. BS-РНКазы избегают действия ИР за счет природной димеризации, образуя трехмерные структуры, недоступные для блокирования ингибитором. Причем, как указывалось ранее, лишь димеры, стабилизированные за счет обмена доменами, не подвергаются действию ИР и проявляют свою цитотоксичность [65], что еще раз подчеркивает важность олигомеризации РНКаз.

Использование гомологичных РНКаз для изучения механизма образования димеров позволило нам выявить вклад стабильности димерных структур в проявление противоопухолевого потенциала этих ферментов. Исследование цитотоксического действия бальназы и балифазы на клетки аденокарциномы легкого человека А549 показало, что наиболее выраженным апоптогенным эффектом обладает биназа, цитотоксический потенциал которой возрастает при увеличении продолжительности инкубации с клетками, тогда как активность бальназы и балифазы начинает снижаться после 48 ч инкубации [22]. Эти данные указывают на ключевую роль стабильности димерных структур в проявлении цитотоксичности ферментов. Димеры бальназы и балифазы, в отличие от биназы, имеют пониженную стабильность вследствие неспособности к обмену доменами; вероятно, через 48 ч они диссоциируют на мономеры, что приводит к снижению их токсических свойств. Димерные структуры биназы отличаются высокой

стабильностью и способны индуцировать гибель опухолевых клеток на протяжении длительного времени [22].

Представленные аргументы указывают на то, что противоопухолевая активность РНКаз является результатом сложного взаимодействия структурных и функциональных особенностей ферментов, а олигомеры РНКаз наделены большим цитотоксическим потенциалом, нежели мономеры [62, 70].

Известно, что цитотоксическое действие РНКаз обусловлено не только последствиями прямой дегградации РНК, но и регуляторными эффектами продуктов ее гидролиза [20, 86]. В проявление биологических эффектов РНКаз вносят вклад различные клеточные механизмы, включающие некаталитическое взаимодействие РНКаз с клеточными компонентами, интернализацию белков внутрь клетки, а также способность избегать действия ИР. Каждый тип цитотоксических РНКаз имеет свой специфический набор молекулярных механизмов, определяющий противоопухолевое действие фермента, однако главным среди них является структурная организация молекул РНКаз, которая вносит вклад в каждый из представленных молекулярных механизмов.

Результаты наших исследований обнаруживают прямую корреляцию между цитотоксичностью и стабильностью димерных структур РНКаз, подтверждая основополагающую роль надмолекулярной организации ферментов в проявлении их противоопухолевого действия. ●

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 18-74-00108 в рамках программы повышения конкурентоспособности ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nucleases / Eds Linn S.M., Lloyd R.S., Roberts R.J. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1994.
2. Bechhofer D.H., Deutscher M.P. // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2019. V. 54. P. 242–300.
3. Ezelle H.J., Malathi K., Hassel B.A. // Int. J. Mol. Sci. 2016. V. 17. P. 74.
4. Lee H., Lee D.G. // J. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 29. P. 1014–1021. doi:10.4014/jmb.1904.04017.
5. Ramos H.J., Souza E.M., Soares-Ramos J.R., Pedrosa F.O. // J. Biotechnol. 2006. V. 126. P. 291–294. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.04.020.
6. Olombrada M., Martínez-del-Pozo A., Medina P., Budia F., Gavilanes J.G., García-Ortega L. // Toxicon. 2014. V. 83. P. 69–74. doi:10.1016/j.toxicon.2014.02.022.
7. Rossier O., Dao J., Cianciotto N.P. // Microbiology. 2009. V. 155. P. 882–890. doi:10.1099/mic.0.023218-0.
8. Agaisse H., Gominet M., Okstad O.A., Kolstø A.B., Lereclus D. // Mol. Microbiol. 1999. V. 32. P. 1043–1053. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01419.x.
9. Шах Махмуд Р., Гарифулина К.И., Ульянова В.В., Евтюгин В.Г., Миндубаева Л.Н., Хазиева Л.Р., Дудкина Е.В., Вершинина В.И., Колпаков А.И., Ильинская О.Н. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2017. Т. 35. С. 59–64. doi:10.18821/0208-0613-2017-35-2-59-64.
10. Maksimov I.V., Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Veselova S.V., Alekseev V.Yu., Shein M.Yu., Avalbaev A.M., Dhaware P.D., Mehrete G.T., Singh B.P., Khairullin R.M. // Plants (Basel). 2019. V. 8. P. 575. doi: 10.3390/plants8120575.
11. Sassa H. // Breed Sci. 2016. V. 66. P. 116–121. doi:10.1270/jsbbs.66.116.
12. Lee H.H., Wang Y.N., Hung M.C. // Mol. Aspects Med. 2019. V. 70. P. 106–116. doi:10.1016/j.mam.2019.03.003.
13. Wang Y.N., Lee H.H., Chou C.K., Yang W.H., Wei Y., Chen C.T., Yao J., Hsu J.L., Zhu C., Ying H. // Cancer Cell. 2018. V. 33. P. 752–769. doi:10.1016/j.ccell.2018.02.012.
14. Majchrzak A., Witkowska M., Mędra A., Zwolińska M., Bogusz J., Cebula-Obrzut B., Darzynkiewicz Z., Robak T., Smolewski P. // Postepy Hig. Med. Dosw. 2013. V. 67. P. 1166–1172.

15. Wang X., Guo Z // *Oncol. Lett.* 2015. V. 9. P. 1337–1342. doi: 10.3892/ol.2014.2835.
16. Marinov I., Soucek J. // *Neoplasma.* 2000. V. 47. P. 294–298.
17. Fiorini C., Gotte G., Donnarumma F., Picone D., Donadelli M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1843. P. 976–984. doi: 10.1016/j.bbamer.2014.01.025
18. Mitkevich V.A., Ilinskaya O.N., Makarov A.A. // *Cell Cycle.* 2015. V. 14. P. 931–932.
19. Mitkevich V.A., Burnysheva K.M., Pterushanko I.Y., Adzhubei A.A., Schulga A.A., Chumakov P.M., Makarov A.A. // *Oncotarget.* 2017. V. 8. P. 72666–72675. doi: 10.18632/oncotarget.20199.
20. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. // *Bioessays.* 2008. V. 8. P. 781–790.
21. Mitkevich V.A., Kretova O.V., Petrushanko I.Y., Burnysheva K.M., Sosin D.V., Simonenko O.V., Ilinskaya O.N., Tchurikov N.A., Makarov A.A. // *Biochimie.* 2013. V. 95. P. 1344–1349. doi: 10.1016/j.biochi.2013.02.016.
22. Surchenko Y., Dudkina E., Nadyrova A., Ulyanova V., Zelenikhin P., Ilinskaya O. // *BioNanoScience.* 2020. <https://doi.org/10.1007/s12668-020-00720-6>.
23. Sevcik J., Sanishvili R.G., Pavlovsky A.G., Polyakov K.M. // *Trends Biochem. Sci.* 1990. V. 15. P. 158–162.
24. Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O. // *FEBS J.* 2011. V. 278. P. 3633–3643.
25. Makarov A.A., Ilinskaya O.N. // *FEBS Lett.* 2003. V. 540. P. 15–20.
26. Nakamura A., Koide Y., Miyazaki H., Kitamura A., Masaki H., Beppu T., Uozumi T. // *Eur. J. Biochem.* 1992. V. 209. P. 121–127. doi:10.1111/j.1432-1033.1992.tb17268.x.
27. Skvortsova M.A., Bocharov A.L., Yakovlev G.I., Znamenskaya L.V. // *Biochemistry (Moscow).* 2002. V. 67. P. 802–806. doi:10.1023/a:1016356926125.
28. Yoshida H. // *Methods Enzymol.* 2001. V. 341. P. 28–41.
29. Дементьев А.А., Орлов В.М., Шляпников С.В. // *Биоорганическая химия.* 1993. Т. 19. С. 853–861.
30. Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O., Harwood C.R. // *Microbiol. Res.* 2015. V. 170. P. 131–138. doi:10.1016/j.micres.2014.08.005.
31. Botella E., Hübner S., Hockamp K., Hansen A., Bisicchia P., Noone D., Powell L., Salzberg L.I., Devine K.M. // *Microbiology.* 2011. V. 157. P. 2470–2484.
32. Харитоновна М.А., Вершинина В.И. // *Микробиология.* 2009. Т. 78. С. 187–192.
33. Сокуренок Ю.В., Зеленихин П.В., Ульянова В.В., Колпаков А.И., Мюллер Д., Ильинская О.Н. // *Биоорганическая химия.* 2015. Т. 41. С. 37–43.
34. Jackson E.K., Mi Z., Janesko-Feldman K., Jackson T.C., Kochanek P.M. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2019. V. 316. P. R783–R790.
35. Ulyanova V., Shah Mahmud R., Dudkina E., Vershinina V., Domann E., Ilinskaya O. // *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2016. V. 62. P. 181–188.
36. Leshchinskaia I.B., Kupriyanova F.G., Yakovlev G.I., Kipenskaya L.V., Ilinskaya O.N. // *Karadeniz J. Med. Sci.* 1995. V. 8. P. 218–219.
37. Ilinskaya O.N., Krylova N.I. // *PriU bioWim mikrobiol.* 1993. V. 29. P. 280–285.
38. Hartley R.W., Rogerson D.L., Jr. // *Prep. Biochem.* 1972. V. 2. P. 229–242.
39. Лещинская И.Б., Булгакова Р.Ш., Балабан Н.П., Егорова Г.С. // *Прикладная биохимия и микробиология.* 1974. Т. 10. С. 242–247.
40. Dudkina E., Ulyanova V., Shah Mahmud R., Khodzhaeva V., Dao L., Vershinina V., Kolpakov A., Ilinskaya O. // *FEBS Open Bio.* 2016. V. 6. P. 24–32.
41. Sokurenko Yu., Nadyrova A., Ulyanova V., Ilinskaya O. // *BioMed Res. Int.* 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4239375>.
42. Дементьев А.А., Рябченко Н.Ф., Протасевич И.И., Голышин П.Н., Степанов А.И., Орлов В.Н., Пустобаев В.Н., Макаров А.А., Моисеев Г.И., Карпейский М.Я., Шляпников С.В., Кирпичников М.П. // *Мол. биол.* 1992. Т. 26. С. 1338–1348.
43. Marianayagam N.J., Sunde M., Matthews J.M. // *Trends Biochem. Sci.* 2004. V. 29. P. 618–625.
44. Dudkina E., Kayumov A., Ulyanova V., Ilinskaya O. // *PLoS One.* 2014. V. 9. P. e115818. doi:10.1371/journal.pone.0115818.
45. Dudkina E., Ulyanova V., Ilinskaya O. // *BioNanoScience.* 2017. V. 7. P. 127–129. <https://doi.org/10.1007/s12668-016-0305-y>.
46. Poliakov K.M., Goncharuk D.A., Trofimov A.A., Safonova T.N., Mit'kevich V.A., Tkach E.N., Makarov A.A., Shulga A.A. // *Mol. Biol.* 2010. V. 44. P. 922–928.
47. Polyakov K.M., Lebedev A.A., Okorokov A.L., Panov K.I., Shulga A.A., Pavlovsky A.G., Karpeisky M.Y., Dodson G.G. // *Acta Cryst. D Biol. Crystallogr.* 2002. V. 58. P. 744–750.
48. Aphanasenko G.A., Dudkin S.M., Kaminir L.B., Leshchinskaya I.B., Severin E.S. // *FEBS Lett.* 1979. V. 97. P. 77–80.
49. Mitkevich V.A., Schulga A.A., Trofimov A.A., Dorovatovskii P.V., Goncharuk D.A., Tkach E.N., Makarov A.A., Polyakov K.M. // *Acta Cryst. D Biol. Crystallogr.* 2003. V. 69. P. 991–996.
50. Ermakova E. // *Biophys. Chem.* 2007. V. 130. P. 26–31.
51. Breitwieser G.E. // *Circ. Res.* 2004. V. 94. P. 17–27.
52. Hirota S. // *J. Inorg. Biochem.* 2019. V. 194. P. 170–179. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2019.03.002.
53. Orlikowska M., Jankowska E., Kolodziejczyk R., Jaskolski M., Szymanska A // *J. Struct. Biol.* 2011. V. 173. P. 406–413. doi: 10.1016/j.jsb.2010.11.009.
54. Liu C., Sawaya M.R., Eisenberg D. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011. V. 18. P. 49–55. doi: 10.1038/nsmb.1948.
55. Anfinsen C.B. // *Science.* 1973. V. 181. P. 223–230. doi: 10.1126/science.1814096.223.
56. Bennett M.J., Schlunegger M.P., Eisenberg D. // *Protein Sci.* 1995. V. 4. P. 2455–2468. doi: 10.1002/pro.5560041202.
57. Liu Y., Eisenberg D. // *Protein Sci.* 2002. V. 11. P. 1285–1299. doi: 10.1110/ps.0201402.
58. Wang L., Pang Y., Holder T., Brender J.R., Kurochkin A.V., Zaideweg E.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 98. P. 7684–7689. doi:10.1073/pnas.121069998.
59. Bennett M.J., Sawaya M.R., Eisenberg D. // *Structure.* 2006. V. 14. P. 811–824. doi: 10.1016/j.str.2006.03.011.
60. Garvie C.W., Vasanthavada K., Xiang Q. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. V. 1834. P. 1562–1571.
61. Lin R.J., Chien H.L., Lin S.Y., Chang B.L., Yu H.P. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. P. 3314–3326.
62. Gotte G., Mahmoud Helmy A., Ercole C., Spadaccini R., Laurents D.V., Donadelli M., Picone D. // *PLoS One.* 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0046804.
63. Zuo Y., Deutscher M.P. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 50160–50164.
64. Mathy N., Hebert A., Mervelet P., Benard L., Dorleans A., Sierra-Gallay I.L., Noirot P., Putzer H., Condon C. // *Mol. Microbiol.* 2010. V. 75. P. 489–498.
65. Gotte G., Laurents D.V., Merlino A., Picone D., Spadaccini R. // *FEBS Lett.* 2013. V. 587. P. 3601–3608.
66. Merlino A., Ercole C., Picone D., Pizzo E., Mazzarella L., Sica F. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 376. P. 427–437.
67. Gotte G., Libonati M. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 36670–36679.

68. Crestfield A.M., Stein W.H., Moore S. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1962. V. 1. P. 217–222.
69. Benito A., Laurents D.V., Ribo M., Vilanova M. // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2008. V. 9. P. 370–393. doi: 10.2174/138920308785132695.
70. Libonati M., Gotte G. // *Biochem J.* 2004. V. 380. P. 311–327. doi: 10.1042/bj20031922.
71. Gotte G., Laurents D.V., Libonati M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. V. 1764. P. 44–54.
72. Gotte G., Bertoldi M., Libonati M. // *Eur. J. Biochem.* 1999. V. 265. P. 680–687. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00761.x.
73. Fagagnini A., Pica A., Fasoli S., Montioli R., Donadelli M., Cordani M., Butturini E., Acquasaliente L., Picone D., Gotte G. // *Biochem. J.* 2017. V. 474. P. 3767–3781. doi: 10.1042/BCJ20170541.
74. Libonati M., Gotte G., Vottariello F. // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2008. V. 9. P. 200–209. doi: 10.2174/138920108784567308.
75. Notomista E., Mancheno J.M., Crescenzi O., Di Donato A., Gavilanes J., D'Alessio G. // *FEBS J.* 2006. V. 273. P. 3687–3697. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05373.x.
76. Sundlass N.K., Eller C.H., Cui Q., Raines R.T. // *Biochemistry.* 2013. V. 52. P. 6304–6312. doi: 10.1021/bi400619m.
77. Shah Mahmud R., Mostafa A., Müller C., Kanrai P., Ulyanova V., Sokurenko Y., Dzieciolowski J., Kuznetsova I., Ilinskaya O., Pleschka S. // *Virol. J.* 2018. V. 15. P. 1–12. doi: 10.1186/s12985-017-0915-1.
78. Kim J.S., Soucek J., Matousek J., Raines R.T. // *Biochem. J.* 1995. V. 308. P. 547–550.
79. Rosenberg H.F. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 7876–7881.
80. Alford S., Pearson J., Carette A., Ingham R., Howard P. // *BMC Biochem.* 2009. doi: 10.1186/1471-2091-10-9.
81. Navarro S., Aleu J., Jimenez M., Boix E., Cuchillo C.M., Nogues M.V. // *Cell. Mol. Life Sci: CMLS.* 2008. V. 65. P. 324–337.
82. Sorrentino S., Libonati M. // *FEBS Lett.* 1997. V. 404. P. 1–5.
83. Blaszczyk J., Gan J., Tropea J.E., Court D.L., Waugh D.S. // *Structure.* 2004. V. 12. P. 457–466.
84. Mitkevich V.A., Tchurikov N.A., Zelenikhin P.V., Petrushanko I.Y., Makarov A.A., Ilinskaya O.N. // *FEBS J.* 2010. V. 277. P. 186–196.
85. Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Spirin P.V., Fedorova T.V., Kretova O.V., Tchurikov N.A., Prassolov V.S., Ilinskaya O.N., Makarov A.A. // *Cell Cycle.* 2011. V. 10. P. 4090–4097.
86. Ardel T., Ardel W., Darzynkiewicz Z. // *Cell Cycle.* 2003. V. 2. P. 22–24.
87. Haigis M.C., Raines R.T. // *J. Cell Sci.* 2003. V. 116. P. 313–324. doi: 10.1242/jcs.00214
88. Kanwar S.S., Kumar R. // *Enz. Eng.* 2017. doi: 10.4172/2329-6674.1000162.
89. Trevino S.R., Scholtz M., Pace C.N. // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 366. P. 449–460.
90. Bracale A., Spalletti C.D., Mastronicola M.R. // *Biochem. J.* 2002. V. 362. P. 553–560.
91. Ran S., Downes A., Thorpe P.E. // *Cancer Res.* 2002. V. 62. P. 6132–6140.
92. Ilinskaya O., Decker K., Koschinski A., Dreyer F., Repp H. // *Toxicology.* 2001. V. 156. P. 101–107.
93. Ilinskaya O.N., Koschinski A., Mitkevich V.A., Repp H., Dreyer F., Pace C.N., Makarov A.A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. V. 314. P. 550–554.
94. Futami J., Yamada H. // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2008. V. 9. P. 180–184. doi: 10.2174/138920108784567326.
95. Cabrera-Fuentes H.A., Kalacheva N.V., Mukhametshina R.T., Zelenichin P.V., Kolpakov A.I., Barreto G., Praissner K.T., Ilinskaya O.N. // *Biomed. Khim.* 2012. V. 58. P. 272–280.
96. Ilinskaya O.N., Singh I., Dudkina E.V., Ulyanova V.V., Kayumov A., Barreto G. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. V. 1863. P. 1559–1567.
97. Rodriguez M., Torrent G., Bosch M., Rayne F., Dubremetz J.F., Ribó M., Benito A., Vilanova M., Beaumelle B. // *J. Cell Sci.* 2007. V. 120. P. 1405–1411. doi: 10.1242/jcs.03427.
98. Furia A., Moscato M., Cali G., Pizzo E., Confalone E., Amoroso M.R., Esposito F., Nitsch L., D'Alessio G. // *FEBS Lett.* 2011. V. 585. P. 613–617. doi: 10.1016/j.febslet.2011.01.034.
99. Monti D.M., Montesano G.N., Matousek J., Esposito F., D'Alessio G. // *FEBS Lett.* 2007. V. 581. P. 930–934. doi: 10.1016/j.febslet.2007.01.072.