

**НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ  
МЕДИЦИНЫ СО РАН**

На правах рукописи

Мохамед Ислам Сабер Еад

**Молекулярные механизмы, опосредующие противоопухолевую  
активность бычьей панкреатической РНКазы А и микробной рибонуклеазы  
*Bacillus pumilus* (биназы)**

1.5.3 – молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель  
д.б.н., Миронова Надежда Львовна

Новосибирск – 2022

# ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ОГЛАВЛЕНИЕ</b> .....	<b>1</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ</b> .....	<b>5</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	<b>8</b>
Актуальность темы исследования. ....	8
Цели и задачи исследования.....	10
Научная новизна полученных результатов.....	11
Практическая значимость .....	12
Методология и методы исследования .....	12
Положения, выносимые на защиту.....	13
Апробация работы и публикации. ....	13
Личный вклад соискателя.....	14
Структура и объем диссертации .....	15
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ПРИРОДНЫЕ РИБОНУКЛЕАЗЫ С ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ И ПРОТИВОВИРУСНЫМ И ДЕЙСТВИЕМ.</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1. Введение</b> .....	<b>16</b>
<b>1.2. РНКазы с противоопухолевой активностью, принадлежащие семейству РНКазы А</b> .....	<b>17</b>
1.2.1. РНКазы семенников быка (BS-РНКазы).....	18
1.2.2. Бычья панкреатическая РНКазы А и панкреатическая РНКазы 1 человека .....	20
1.2.3. Онконаза и амфиназа (РНКазы из ооцитов <i>R. pipiens</i> ) .....	23
<b>1.3. РНКазы с противоопухолевой активностью, принадлежащие семейству РНКазы Т1</b> .....	<b>26</b>
1.3.1. $\alpha$ -Сарцин – РНКазы из <i>Aspergillus giganteus</i> .....	27
1.3.2. Барназа – РНКазы <i>B. amyloliquefaciens</i> .....	28

1.3.3. Биназа – РНКазы <i>V. pumilus</i> .....	30
1.3.4. Бальназа (РНКазы <i>V. altitudinis</i> ) и балифаза (РНКазы <i>V. licheniformis</i> ) .....	33
<b>1.4. Механизм противоопухолевой активности экзогенных РНКаз.....</b>	<b>34</b>
<b>1.5. РНКазы с противовирусным действием.....</b>	<b>39</b>
<b>1.6. Противоопухолевые РНКазы в клинических испытаниях .....</b>	<b>44</b>
<b>1.7. Заключение .....</b>	<b>45</b>
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>	<b>47</b>
<b>2.1. Материалы.....</b>	<b>47</b>
2.1.1. Реактивы и препараты.....	47
2.1.2. Оборудование .....	48
2.1.3. Буферы и растворы.....	50
2.1.4. Праймеры для ПЦР .....	50
2.1.5. Культура клеток.....	50
2.1.6. Лабораторные животные и модели опухолей.....	52
<b>2.2. Методы .....</b>	<b>52</b>
2.2.1. Определение миграционной активности клеток A549, HepG2, MCF-7, HuTu 80, HeLa и В16 под действием РНКазы А и биназы методом зарастания царапины (Scratch assay).....	52
2.2.2. Влияние РНКазы А и биназы на жизнеспособность опухолевых клеток.....	53
2.2.3. Влияние РНКазы А на подвижность, адгезию, инвазию клеток HeLa человека и В16 мыши и их способность к колониобразованию .....	54
2.2.4. Исследование влияния биназы на запуск апоптоза в клетках RLS <sub>40</sub> .....	55
2.2.5. Определение активности каспаз-3/-7 и количества каспаза-3/-7-положительных клеток.....	56
2.2.6. Влияние РНКазы А на содержание внутриклеточной РНК в клетках В16 и HeLa .....	56
2.2.7. Конъюгация РНКазы А с биотином.....	57

2.2.8. Исследование проникновения конъюгата РНКазы А-биотин в опухолевые клетки и его ко-локализации с рибонуклеазным ингибитором (RI) с помощью конфокальной микроскопии .....	57
2.2.9. Исследование накопления конъюгата РНКазы А-биотин в опухолевых клетках с помощью проточной цитометрии .....	59
2.2.10. Исследование ко-локализации конъюгата РНКазы А-биотин с димерным белком Ku70/Ku80 .....	60
2.2.11. Исследование влияния РНКазы А и биназы на профиль миРНК в клетках RLS <sub>40</sub> , V16 и HeLa .....	60
2.2.12. Работа с опухолевыми моделями мыши .....	61
2.2.13. Обработка образцов и выделение РНК .....	65
2.2.14. Определение уровня миРНК с помощью stem-loop ОТ-qПЦР .....	66
2.2.15. Определение уровня экспрессии генов-маркеров ЕМТ с помощью ОТ-qПЦР.....	67
2.2.16. Молекулярное моделирование взаимодействия РНКазы А с гетеродимером Ku 70/Ku 80 .....	67
2.2.17. Предсказание мишеней миРНК и функциональный анализ .....	68
2.2.18. Статистика.....	69
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>70</b>
<b>3.1. Исследование влияния РНКазы А на снижение злокачественного потенциала опухолей .....</b>	<b>70</b>
3.1.1. Линии опухолевых клеток, использованные в работе .....	70
3.1.2. Внутриклеточное накопление и локализация конъюгата РНКазы А-биотин и его взаимодействие с RI в клетках V16 и HeLa .....	70
3.1.3. Взаимодействие РНКазы А с гетеродимером Ku70/Ku80: молекулярное моделирование и внутриклеточное поведение .....	72
3.1.4. Влияние РНКазы А на клеточную РНК .....	76
3.1.5. Влияние РНКазы А на миграционную активность, подвижность, инвазию, адгезию и образование колоний клеток V16 и HeLa.....	78

3.1.6. Исследование антиметастатического действия РНКазы А на метастатической модели меланомы В16.....	82
<b>3.2. Исследование влияния биназы на снижение злокачественного потенциала опухоли.....</b>	<b>84</b>
3.2.1. Исследование влияния биназы на жизнеспособность и миграционную активность опухолевых клеток .....	84
3.2.2. Влияние биназы на пролиферацию клеток RLS <sub>40</sub> и индукцию апоптоза .....	87
3.2.3. Исследование противоопухолевого и антиметастатического действия биназы на модели RLS <sub>40</sub> .....	88
3.2.4. Исследование токсического действия биназы у мышей с RLS <sub>40</sub> .....	95
<b>3.3. Поиск миРНК, чувствительных к биназе и РНКазе А, и их биоинформатический анализ.....</b>	<b>96</b>
3.3.1. Изменение профиля миРНК в опухолевых клетках под действием биназы и РНКазы А. ....	96
3.3.2. Профиль миРНК опухолевой ткани и сыворотки крови мышей с RLS <sub>40</sub> обработанных биназой и профиль миРНК в легочной ткани и сыворотке крови мышей с меланомой В16, обработанных РНКазой А .....	99
3.3.3. Исследование влияния РНКазы А на экспрессию маркеров ЕМТ в метастатических очагах и прилегающей ткани легких у мышей с меланомой В16.....	102
3.3.4. Анализ сигнальных путей, контролируемых миРНК, чувствительными к биназе.....	104
3.3.5. Функциональная аннотация миРНК, чувствительных к РНКазе А.....	108
<b>3.4. Заключение .....</b>	<b>110</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>118</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....</b>	<b>120</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>127</b>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

3'-ГМФ – гуанозин-3'-монофосфат

ACTIBIND T2 – an actin-binding fungal T (2) - RNase produced by an *Aspergillus niger*

ALK – щелочная фосфатаза

ALT – аланинтрансфераза

AML1 – белок острой миелоидной лейкемии 1

Amph – амфиназа

ANG – ангиогенин

AST – аспаратаминотрансфераза

ATF3 – фактор активации транскрипции 3

BSA – бычий сывороточный альбумин

BS-PHKаза – рибонуклеаза семенников крупного рогатого скота

BUN – азот мочевины крови

CTX – хлоротоксин

CV-B4 – вирус Коксаки В4

DENV – вирус денге

DEPC – диэтилпирокарибонат

Е6 и Е7– эндогенный папилломавирус человека 6 и 7

ЕСР – эозинофильный катионный белок

EDN – эозинофильный нейротоксин

EGFR –рецептор эпидермального фактора роста

EMCV – вирус энцефаломиокардита

EMT – эпителиально-мезенхимальный перевод

ErbB2 –рецептор тирозинкиназы 2

FAM – флуорофор

FBS – эмбриональная телячья сыворотка

GDP – гуанозин дифосфат

HCV – вирус гепатита С

HER2 – рецептор эпидермального фактора роста человека 2

HIV – вирус иммунодефицита человека

IAV – вирус гриппа А

IFN- $\gamma$  – интерферон-гамма

IL – интерлейкин

JEV – вирус японского энцефалита

LLC – карцинома легких Льюис  
MERS-CoV – коронавирус nCoV, ближневосточный респираторный коронавирусный синдром  
MMP2 – матриксная металлопротеиназа 2  
M-MuLV – обратная транскриптаза  
MTD – максимально переносимая доза  
NSCLC – немелкоклеточный рак легкого  
ONC – онконаза  
PBMC – мононуклеары периферической крови  
PBS – фосфатно-солевой буфер  
PEI25K – полиэтиленимин 25 кДа  
P-gp – Р-гликопротеин  
PHA – фитогемагглютинин  
PNPMA – поли[N-(2-гидроксипропил) метакриламид]  
PIV – вирус парагриппа человека  
PLG-g-mPEG – поли (L-глутаминовая кислота)-графт-поли(этиленгликоль)метилловый эфир  
pre-миРНК – предшественник миРНК  
pri-миРНК – первичная миРНК  
pt-РНКазы – рибонуклеазы панкреатического типа  
RI – ингибитор рибонуклеазы  
RLI – ингибитор РНКазы L  
RLS<sub>40</sub> – лекарственно-устойчивая лимфосаркома  
RPKM – количество фрагмент-специфичных прочтений на 1000 нк на млн прочтений в библиотеке  
RSV – респираторно-синцитиальный вирус  
siRNA – малая интерферирующая РНК  
SV40 – вирус SV40  
Tf – трансферрин  
TfR – рецептор трансферрина  
TIMP-1 – тканевой ингибитор металлопротеиназ 1  
TNF – фактор некроза опухолей  
UMM – неоперабельная злокачественная мезотелиома  
βCD – β-циклодекстрин  
в/б - внутрибрюшинно  
в/в – внутривенно  
в/м – внутримышечно

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ВПГ – вируса простого герпеса

ГНТ – галлуазитовые нанотрубки

ДАБ – диаминобензидин

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дцРНК – двухцепочечная РНК

миРНК – микроРНК

мРНК – матричная РНК

НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого

оцРНК – одноцепочечная РНК

ПХТ – полихимиотерапия

ПЭГ – полиэтиленгликоль

РНК – рибонуклеиновая кислота

РНКаза – рибонуклеаза

рРНК – рибосомальная РНК

тРНК – транспортная РНК

## ВВЕДЕНИЕ

### *Актуальность темы исследования.*

Открытое в 50-х годах прошлого века токсическое действие экзогенных рибонуклеаз (РНКаза) на опухолевые клетки послужило поводом для изучения этих ферментов в качестве противоопухолевых препаратов. Исследователи обратили внимание на экзогенные РНКазы различного происхождения, для которых была обнаружена цитотоксическая и противоопухолевая активность - BS-РНКазу (РНКаза семенников быка) [1–4], онконазу (РНКаза из ооцитов *R. piriens*) [5–7], и ряд микробных РНКаз [8–11].

РНКаза А из поджелудочной железы крупного рогатого скота (РНКаза А) представляет собой небольшой белок (124 аминокислоты, 13.7 кДа), обладает самой высокой каталитической активностью среди белков семейства и была одной из первых рибонуклеаз, для которой была изучена цитотоксическая активность в отношении опухолевых клеток [12–17]. Первые эксперименты показали, что РНКаза А не проявляет цитотоксического действия *in vitro* [18], а *in vivo* оказывает слабое противоопухолевое действие [19]. В одних исследованиях было показано, что РНКаза А ингибирует рост опухоли у мышей и крыс в дозах до 1000 мг/кг, в то время как в других - наблюдалось отсутствие как цитотоксического, так и противоопухолевого действия [12–15,17,20]. Отсутствие противоопухолевого действия РНКазы А объясняли ее инактивацией под действием связывания с внутриклеточным ингибитором рибонуклеаз (RI) [12,13,21–25]. Однако, несмотря на связывание с RI димерные формы РНКазы А проявляли значительный противоопухолевый эффект [26]. Именно эти противоречивые данные заставили исследователей вернуться к изучению противоопухолевого потенциала РНКазы А.

Микробные рибонуклеазы, к которым относятся барназа из *B. amyloliquefaciens* [27–29] и биназа из *B. pumilus* [29,30], представляют интерес для исследователей с точки зрения их возможной противоопухолевой активности. Эти рибонуклеазы относятся к семейству РНКазы T1, и, хотя они существенно (на четыре порядка) менее активны, чем РНКаза А,

обладают значительной цитотоксической активностью по отношению к опухолевым клеткам, так как не связываются с R1. Кроме того, в нескольких работах была продемонстрирована противоопухолевая активность биназы с использованием разных опухолевых моделей мыши [9,31].

За последние 10 лет на различных мышинных моделях опухолей были получены данные, свидетельствующие о высоком противоопухолевом и антиметастатическом потенциале РНКазы А в дозах, не превышающих 10 мкг/кг [32,33]. Открытие внеклеточных циркулирующих РНК и выяснение их роли в опухолевой прогрессии и распространении метастазов [34,35] позволило предположить, что эти РНК вместе с внутриклеточными РНК могут быть молекулярными мишенями РНКазы А и других экзогенных РНКаз.

Исследования, направленные на идентификацию молекулярных мишеней РНКазы А в опухолевой ткани и крови мышей-опухоленосителей (на примере карциномы легких Льюис) показали, что возможный механизм, лежащий в основе противоопухолевой и антиметастатической активности РНКазы А, заключается в деградации циркулирующих РНК, включая миРНК, и изменение паттернов миРНК в опухолевой ткани, а рибонуклеазная активность РНКазы А играет решающую роль в этих событиях [36]. На уровне транскриптома РНКазы А вызывала перестройку внутриклеточных сетей опухолевых клеток, обеспечивающую усиление активности энергетических каскадов, торможение процессов клеточной пролиферации и диссеминации, частичное истощение сигнальных путей, проявляющих опухольстимулирующую активность [37].

Таким образом, существуют отдельные элементы мозаики, из которых можно составить картину противоопухолевого и антиметастатического действия РНКазы А. Однако, накопив большое количество данных о влиянии РНКазы А на прогрессирование опухоли *in vivo*, лишь несколько исследований были посвящены тому, что происходит в опухолевых клетках *in vitro*. Более того, вопрос о влиянии РНКазы А на внутриклеточные РНК до сих пор остается открытым.

Было показано, что биназа проявляет цитотоксическую активность по отношению к опухолевым клеткам, экспрессирующим некоторые онкогены, такие как KIT, AML1-ETO и FLT3 [10,38]. Биназа вызывает расщепление внутриклеточных РНК и индуцирует внутренний путь апоптоза посредством изменений митохондриального потенциала и внешний путь апоптоза за счет повышения экспрессии некоторых проапоптотических генов и активацию инициаторных каспаз [39]. Тем не менее влияние РНКазной активности биназы и участие ее РНК-мишеней в наблюдаемом противоопухолевом эффекте до сих пор не изучено.

Наиболее важной особенностью прогрессирования опухоли является активация регуляторных каскадов, направленных на сохранение выживаемости опухолевых клеток, что позволяет поврежденным клеткам адаптироваться к селективному давлению и ускользать от терапевтических препаратов, а также привлекать соседние нормальные клетки, которые образуют микросреду опухоли для стимуляции собственного роста и инвазии [40]. Применение РНКаз в качестве противоопухолевых агентов может сбалансировать патологические молекулярные изменения, происходящие в опухолевых клетках, и, таким образом, контролировать их злокачественное перерождение и дальнейшие события опухолевой прогрессии.

Таким образом, выяснение ключевых этапов взаимодействия экзогенных рибонуклеаз биназы и РНКазы А с опухолевыми клетками *in vitro* и *in vivo* является крайне актуальным

#### ***Цели и задачи исследования.***

Целью исследования являлось выяснение молекулярных механизмов, опосредующих противоопухолевую активность бычьей панкреатической РНКазы А и микробной рибонуклеазы *V. pumilus* (биназы). В ходе исследования решались следующие задачи:

1. Изучение накопления РНКазы А в опухолевых клетках и ее внутриклеточной локализации, включая совместную локализацию с RI.

2. Исследование роли гетеродимерного внутриклеточного белка Ku70/Ku80 во внутриклеточном накоплении РНКазы А.

3. Изучение способности РНКазы А и биназы влиять на жизнеспособность, миграционные и инвазивные свойства опухолевых клеток *in vitro*.

4. Анализ корреляций между цитотоксическим (*in vitro*) и противоопухолевым (*in vivo*) эффектами рибонуклеаз и изменением профилей миРНК в опухолевых клетках/тканях, метастатических очагах/прилежающих тканях и сыворотке крови.

5. Биоинформационный анализ миРНК, чувствительных к биназе и РНКазе А, их генов-мишеней и регуляторных сетей для выявления основных биологических процессов, модулируемых этими РНКазами в опухоли и ее микроокружении.

#### ***Научная новизна полученных результатов.***

Впервые показано, что РНКазы А эффективно накапливаются в клетках меланомы В16 мыши и клетках эпидермоидной карциномы шейки матки HeLa человека. После проникновения РНКазы А в клетки HeLa и В16 часть фермента остается свободной, не связанной с ингибитором рибонуклеаз, что приводит к снижению уровня цитозольных РНК в обоих типах клеток и рРНК в ядрышках клеток HeLa. Показано, что РНКазы А после проникновения в клетки ко-локализуется вместе с внутриклеточным гетеродимерным белком Ku70/Ku80 в цитозоле и ядре клеток, что может указывать на образование комплекса РНКазы А с белком Ku70/Ku80 и его участие в ее внутриклеточном транспорте.

Показано, что РНКазы А подавляет миграцию и инвазию опухолевых клеток *in vitro*, но не подавляет их жизнеспособность; биназа снижает жизнеспособность опухолевых клеток за счет индукции апоптоза и подавляет их миграцию. Впервые на метастатической модели меланомы В16 *in vivo* показано, что РНКазы А подавляет метастазирование в легкие, меняет профиль миРНК и экспрессию ЕМТ-маркеров в ткани, прилегающей к очагам метастазирования, разрушая формирование благоприятного микроокружения опухоли. На

модели лекарственно-устойчивой лимфосаркомы RLS<sub>40</sub> показано, что биназа замедляет рост первичной опухоли, подавляет развитие метастазов в печени и меняет профиль миРНК в опухолевой ткани, что сопровождается снижением в ней реактивной воспалительной инфильтрации и количества митозов.

Впервые показано, что основными биологическими процессами, модулируемыми РНКазой А в микроокружении опухоли, являются регуляция клеточной адгезии, а также сигнальные пути, связанные с ЕМТ и опухолевой прогрессией. Основными событиями, модулируемыми биназой в опухолевой ткани, являются пролиферация, миграция, апоптоз и сигнальные пути, связанные с опухолевой прогрессией.

### ***Практическая значимость***

Автором на опухолевых моделях *in vivo* выявлен ряд миРНК опухолевой ткани и метастатических очагов, которые могут быть использованы у человека в качестве молекулярных маркеров ответа на лечение и мишеней для ген-направленной терапии. Доказан высокий антиметастатический потенциал бычьей панкреатической РНКазы А на модели метастатической меланомы мыши, характеризующейся высокой агрессивностью и скоростью диссеминации, что позволяет рассматривать эту РНКазу как перспективный препарат для терапии метастазирующих опухолей.

### ***Методология и методы исследования***

В работе применялись стандартные методы выделения РНК, ПЦР в реальном времени, методы оценки миграции и инвазии опухолевых клеток, метод проточной цитофлуориметрии, метод конфокальной микроскопии, методы молекулярного моделирования и биоинформатического анализа. В работе использовали стандартные методы работы с культурами клеток *in vitro* и с опухолевыми моделями на мышах *in vivo* в соответствии с этическими протоколами.

### ***Положения, выносимые на защиту***

1. РНКаза А эффективно накапливается в клетках меланомы В16 мыши и эпидермоидной карциномы шейки матки HeLa человека. После проникновения РНКазы А в клетки HeLa и В16 часть фермента остается не связанной с ингибитором рибонуклеаз, что приводит к снижению уровня внутриклеточных РНК в обоих типах клеток.

2. РНКаза А подавляет миграцию и инвазию ряда опухолевых клеток *in vitro*, но не влияет на их жизнеспособность. Биназа снижает жизнеспособность опухолевых клеток за счет индукции апоптоза и подавляет их миграцию.

3. РНКаза А подавляет метастазирование в легкие мышей с метастатической меланомой В16, меняет профиль миРНК и экспрессию EMT-маркеров в ткани, прилегающей к очагам метастазирования, разрушая формирование благоприятного микроокружения опухоли.

4. Биназа замедляет рост первичной лекарственно-устойчивой лимфосаркомы RLS<sub>40</sub>, подавляет развитие метастазов в печени и меняет профиль миРНК в опухолевой ткани, что сопровождается снижением в ней пролиферативного потенциала.

5. Основными биологическими процессами, модулируемыми миРНК, чувствительными к РНКазе А, в микроокружении опухоли являются регуляция клеточной адгезии, а также сигнальные пути, связанные с эпителиально-мезенхимальным переходом.

6. Основными событиями, модулируемыми миРНК, чувствительными к биназе, в опухолевой ткани являются пролиферация, апоптоз, миграция и сигнальные пути, связанные с опухолевой прогрессией.

### ***Апробация работы и публикации.***

Работа была представлена на российских и международных конференциях в виде устных и постерных докладов: «57-ая Международная научная студенческая конференция» (Новосибирск, 2019), Всероссийская мультиконференция с участием международных компаний «Биотехнология - медицине будущего» (Новосибирск, 2019), 4<sup>th</sup> ICNHBAS (Хургада, Египет,

2019), «I Объединенный научный форум, VI съезд физиологов СНГ, VI съезд биохимиков России, IX Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Сочи, Россия, 2019), «57-я Международная научная студенческая конференция» (Новосибирск, Россия, 2020), «Биотоп 2020: актуальные вопросы современной биологии» (Новосибирск, Россия, 2020), школа молодых ученых Molbd 2021 «Молекулярные основы заболеваний: что молекулярная биология может сделать для современной медицины» (Новосибирск, Россия, 2021), «Microbiology: yesterday, today and tomorrow» (Казань, Россия, 2021).

По материалам диссертации опубликовано 3 работы, из них 1 публикация в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ и 2 публикации в международных научных журналах, включенных в список базы данных Scopus и Web of Science.

#### ***Личный вклад соискателя***

Представленные в работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследования, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов.

Эксперименты с животными на опухолевых моделях проведены совместно с к.м.н. Сеньковой А.В. (ИХБФМ СО РАН). Эксперименты по исследованию противоопухолевого действия биназы спланированы и проведены совместно с д.б.н. Митькевичем В.А. (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН) и Надыровой А. И. (Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, Казань). Эксперименты по конфокальной микроскопии проведены совместно с к.б.н. Марковым О.В. (ИХБФМ СО РАН). Биоинформатический анализ проведен под руководством к.б.н. А.В. Маркова. Патоморфологический анализ гистологических образцов и биохимический анализ крови проведен к.м.н. Сеньковой А.В. и Савиным И.А. (ИХБФМ СО РАН). Молекулярное моделирование проведено к.б.н. Марковым А.В.

### *Структура и объем диссертации*

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования, их обсуждения, выводов и списка использованной литературы. Работа оформлена на 145 страницах машинописного текста, содержит 10 таблиц и 27 рисунков. Библиография включает 310 наименований.

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ПРИРОДНЫЕ РИБОНУКЛЕАЗЫ С ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ И ПРОТИВОВИРУСНЫМ И ДЕЙСТВИЕМ.

## 1.1. Введение

По данным ВОЗ, онкологические заболевания являются ведущей причиной смерти во всем мире. В 2020 году было зарегистрировано около 10 миллионов смертей от онкологических заболеваний [41]. Это вызвано совокупными проблемами, такими как неэффективность современных методов лечения рака и отсутствие государственных стратегий диагностики метастатических заболеваний на ранних стадиях развития. В настоящее время основным направлением деятельности исследований стал поиск потенциально эффективных способов терапии онкологических заболеваний с избирательным токсическим действием на опухолевые клетки.

К таким препаратам можно отнести экзогенные рибонуклеазы, изучение цитотоксической и противоопухолевой активности которых в последние несколько десятков лет привлекает исследователей. Эндогенные РНКазы выполняют в клетке важные функции и контролируют множество биологических процессов. Они участвуют в удалении праймеров при репликации ДНК, в биогенезе тРНК и мРНК, обороте РНК-транскриптов [42]. Все эти функции высоко консервативны и необходимы эукариотическим клеткам для поддержания РНК-гомеостаза клетки [42–45]. Эндогенные РНКазы модулируют процессинг, деградацию и контроль качества РНК, регулируют экспрессию генов, рост и дифференцировку клеток, участвуют в сигнальных путях физиологической гибели клеток [29]. Нарушение функционирования внутриклеточных РНКаз может привести к злокачественному перерождению клетки и, таким образом, восполнение недостаточной их функции за счет использования экзогенных РНКаз является одним из способов нормализации клеточных процессов.

Противоопухолевые рибонуклеазы представляют собой небольшие основные белки (10–29 кДа), принадлежащие к двум семействам РНКаз – РНКазы А и РНКазы Т1. Их

цитотоксические свойства напрямую связаны со способностью катализировать расщепление фосфодиэфирных связей в РНК. Среди известных рибонуклеаз, обладающих противоопухолевой активностью, следует отметить BS-РНКазу из семенников крупного рогатого скота [4], онконазу из ооцитов лягушки *R. pipiens* [6,46,47], бычью панкреатическую РНКазу А [33,48], модифицированные варианты РНКазы 1 человека [49], принадлежащие к семейству РНКазы А; микробные РНКазы - барназу из *B.amyloliquefaciens* [50] и биназу из *B. pumilis* [9,51], принадлежащие к семейству РНКазы Т1 [8,10,38,52].

В обзоре рассмотрены экзогенные рибонуклеазы с противоопухолевым и противовирусным действием и обсуждены механизмы их цитотоксичности и противоопухолевой активности.

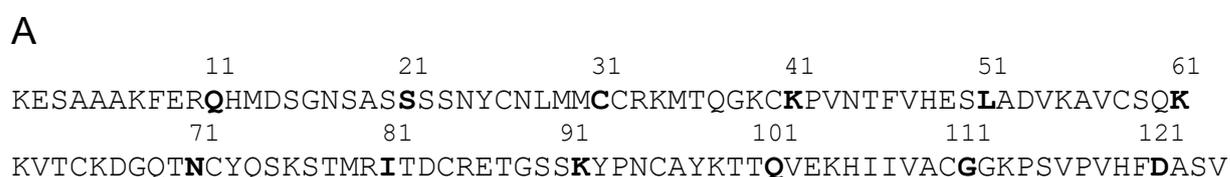
## **1.2. РНКазы с противоопухолевой активностью, принадлежащие семейству**

### **РНКаза А**

Семейство РНКазы А представляет собой специфичное для позвоночных семейство генов, которое претерпело быструю дивергенцию [53–55]. Несмотря на то, что некоторые члены семейства имеют низкую идентичность последовательностей (30%), все они имеют схожую трехмерную структуру и содержат консервативный мотив (СКХХНТФ). РНКазы семейства РНКазы А представляют собой небольшие секреторные белки (13–15 кДа) с коротким сигнальным пептидом из 25–27 аминокислот. Зрелый белок формирует  $\alpha + \beta$  почковидную складку, стабилизированную тремя-четырьмя дисульфидными связями. В кислотно-основном механизме каталитического действия рибонуклеаз участвует консервативная каталитическая триада, образованная двумя остатками His и одним остатком Lys [56]. Белки семейства РНКазы А расщепляют одноцепочечную РНК (оцРНК) со специфичностью P<sub>up</sub>-Pu [53,54,56].

### 1.2.1. РНКазы семенников быка (BS-РНКазы)

BS-РНКазы – рибонуклеаза из семенников крупного рогатого скота, является природным димером с молекулярной массой 27.22 кДа и изоэлектрической точкой 10.3. BS-РНКазы способна образовывать димеры двух типов. Димер первого типа формируется за счет ковалентных взаимодействий между аминокислотными остатками Cys31 и Cys32, димеры второго типа образуются путем обмена N-концами  $\alpha$ -спиралей фермента (Рис. 1). Олигомеризация BS-РНКазы опосредует цитотоксичность этого фермента - только димеры, образующиеся за счет обменных взаимодействий, способны убивать опухолевые клетки [57,58].



**Б**



**Рис. 1.** Первичная (А) и трехмерная структура (Б) BS-РНКазы. Трехмерная структура (код PDB 1Y92 [59]).

BS-РНКазы является близким гомологом бычьей панкреатической РНКазы А, и присутствует исключительно в семенной жидкости, где она играет роль в иммунной защите [60,61]. BS-РНКазы, несмотря на 80% идентичность по аминокислотному составу с панкреатической РНКазой А, является единственным членом семейства, присутствующим *in vivo* в виде гомодимера. Благодаря своей естественной димерной форме BS-РНКазы способна избегать связывания с цитозольным RI при попадании в клетку.

Фермент проявляет цитотоксическую активность по отношению к опухолевым клеткам только в димерной форме, и рибонуклеазная активность имеет решающее значение для этой активности. Тем не менее, группы D'Alessio и Raines показали, что отдельная субъединица BS-РНказы, обладающая более высокой каталитической активностью, чем димер, не оказывает цитотоксического действия на опухолевые клетки [62,63]. Объяснение заключалось в том, что цитозольным RI инактивируется отдельная субъединица, а не димерная форма фермента. Кроме того, оказалось, что димерная, но не мономерная форма BS-РНказы, дестабилизирует мембраны опухолевых клеток, и эта дестабилизация способствует противоопухолевому действию фермента [64,65].

Противоопухолевую активность BS-РНказы изучали, в основном, на опухолевых клеточных линиях и в меньшей степени на моделях опухолей *in vivo*. BS-РНказа проявляла цитотоксическое действие на различных линиях опухолевых клеток: клетки фибробластов, миелоидные клетки, клетки нейробластомы и карциномы щитовидной железы [1,66,67]. Было показано, что BS-РНказа способна ингибировать пролиферацию раковых клеток за счет индукции аутофагии [68]. BS-РНказа индуцировала апоптоз миелоидных клеток ML-2 и NB-1, клеток нейробластомы NB-2 и клеток некоторых линиях карциномы [67]. Показано, что BS-РНказа проявляла цитотоксичность по отношению к раковым клеткам щитовидной железы [66]. Благодаря высокой селективности BS-РНказы к опухолевым клеткам тиреоидного происхождения *in vitro*, этот фермент был выбран в качестве препарата против агрессивного рака щитовидной железы [69].

BS-РНказа проникает в клетку путем эндоцитоза. Было показано, что внутриклеточная маршрутизация BS-РНказы в злокачественных клетках локализована в транс-сети Гольджи, [70,71]. BS-РНказа способна дестабилизировать искусственные мембраны, и существует предположение, что этот механизм используется ею для проникновения сквозь мембраны сети Гольджи, позволяя BS-РНказе достигать цитозоля [72]. Основными мишенями BS-РНказы являются рРНК, расщепление которых в итоге приводит к ингибированию синтеза белка, и

последующему апоптозу [73]. Интересно, что BS-РНКаза обнаруживается также в ядрышках злокачественных клеток. Неизвестно, как фермент достигает ядра, тем не менее обнаружена корреляция между цитотоксичностью BS-РНКаза и снижением активности теломеразы, а также уровнем РНК, связанной с теломеразой, в пролиферирующих клетках [70,74,75]. Следовательно, теломерная РНК может быть еще одной мишенью BS-РНКаза.

### 1.2.2. Бычья панкреатическая РНКаза А и панкреатическая РНКаза 1 человека

РНКаза А поджелудочной железы крупного рогатого скота (РНКаза А) представляет собой небольшой белок (124 аминокислоты, 13.7 кДа) (Рис. 2) и обладает самой высокой каталитической активностью среди белков своего семейства. РНКаза А катализирует расщепление РНК по фосфодиэфирным связям после остатков пиримидинов в одноцепочечных участках. РНКаза А — первая рибонуклеаза, противоопухолевую активность которой изучали *in vitro* [14,15] и *in vivo* [13,14,16,17,20].

Однако полученные результаты оказались противоречивыми. Этот фермент в дозах 40–1000 мг/кг вызывал замедление роста солидных и асцитных опухолей у мышей и крыс [12,13]. В других исследованиях было показано, что РНКаза А не проявляет цитотоксического и противоопухолевого действия даже при введении высоких доз фермента в солидные опухоли [22–24]. Были предприняты попытки исследовать панкреатическую РНКазу 1 человека, относящуюся к семейству РНКаза А и обладающую высокой каталитической активностью, в качестве противоопухолевого препарата, однако фермент показал очень слабое цитотоксическое действие в культурах клеток. Отсутствие цитотоксической активности РНКаза А и РНКаза 1 объясняли их инактивацией внутриклеточным RI, образующим с этими РНКазами чрезвычайно прочный комплекс ( $K_d < 10^{-15}$  M) [25].

В ряде работ повышение цитотоксичности РНКаза А и РНКаза 1 достигалось за счет конъюгации этих РНКаз с пептидами, белками и антителами, что повышало эффективность их



Несмотря на обнадеживающие результаты, интерес к терапевтическому потенциалу РНКазы А надолго исчез, но вновь возник через несколько десятилетий. В 2002 г. конъюгация РНКазы А с поли[N-(2-гидроксипропил)метакриламидом] привела к созданию конструкций, эффективно подавляющих рост меланомы мышей линии nude [87]. В 2005 г. появились первые сведения о цитотоксическом действии вариантов РНКаз, инактивируемых RI [26]. Был разработан цитотоксический вариант панкреатической РНКазы человека PE5, содержащий сигнал ядерной локализации, который, несмотря на свою чувствительность к RI, продемонстрировал высокую цитотоксичность по отношению к различным линиям опухолевых клеток [88]. В дальнейшем дополнительные модификации структуры PE5 привели к появлению вариантов РНКазы 1 с высокой цитотоксичностью [89].

На нескольких моделях опухолей мышей, было продемонстрировано, что РНКазы А при внутримышечном введении в диапазоне микрограммовых доз проявляет противоопухолевую и антиметастатическую активность [33,48]. Поиск молекулярных мишеней РНКазы А в опухоли и крови мышей с карциномой легких Льюис показал, что противоопухолевое и антиметастатическое действие РНКазы А реализуется посредством деградации внеклеточных циркулирующих миРНК и сопровождается значительным повышением синтеза миРНК в опухолевой ткани [36]. Повышение уровня экспрессии миРНК в опухоли было связано с повышением экспрессии генов, участвующих в биогенезе миРНК, таких как *Drosha*, *Xpo5*, *Dicer* и *Ago2*. Показано, что рибонуклеазная активность РНКазы А играет решающую роль как в противоопухолевой/антиметастатической активности, так и во влиянии на экспрессию миРНК и генов процессинга миРНК [36].

Более того, было обнаружено, что РНКазы А влияет на транскриптом карциномы легких Льюис, приводя к подавлению экспрессии 644 транскриптов и повешению экспрессии 322 транскриптов. Большая часть генов участвует в сигнальных путях, которые поддерживают энергетический обмен, способствуют росту и трансформации клеток, модулируют опухолевое микроокружение и компоненты внеклеточного матрикса. Наряду с этим в опухолевой ткани

РНКаза А вызывала активацию углеводного обмена, стимуляцию инозитолфосфатного каскада и окислительного фосфорилирования, а также перестройку процессов апоптоза, транскрипции, контроля клеточного цикла и адгезии. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что реорганизация внутриклеточной сети опухолевых клеток, вызванная РНКазой А, привела к усилению активности энергетических каскадов, подавлению процессов роста и диссеминации клеток и частичному истощению сигнальных путей, обладающих опухоль-стимулирующей активностью [37].

### 1.2.3. Онконаза и амфиназа (РНказы из ооцитов *R. pipiens*)

Обнаружено, что у лягушек ооциты и ранние эмбрионы способны секретировать РНказы для защиты потомства от инфекции [90–94]. Антипролиферативные свойства таких РНКаз привлекли внимание фармацевтических компаний с момента их открытия [95,96]. Ооциты *R. pipiens* (леопардовая лягушка) и ранние эмбрионы содержат большое количество основного белка, который продемонстрировал анти пролиферативную/цитотоксическую активность в отношении нескольких линий опухолевых клеток *in vitro* [97,98], а также противоопухолевую активность *in vivo* [99]. Онконаза и амфиназа представляют собой две гомологичные РНказы, впервые выделенные корпорацией Alfacell из *R. pipiens*. Онконаза была выделена три десятилетия назад [95], а амфиназа — на десять лет позже [100].

Онконаза представляет собой белок небольшого размера (11.82 кДа), первоначально названный Р-30, а позднее онконаза или ранпирназа. Последовательность аминокислот в онконазе имеет высокую гомологию с последовательностью ферментов семейства РНказы А [95]. Онконаза проявляет высокую рибонуклеазную активность, которая в  $10^2$ - $10^5$  раз ниже активности РНказы А [95,101]. Хотя онконаза является РНКазой амфибии и имеет только 30% идентичность последовательности с бычьей панкреатической РНКазой А, онконаза включена в семейство рибонуклеазы панкреатического типа (pt-РНКаза) [102]. Онконаза является более основной, чем РНКаза А [137], это белок состоит из 104 аминокислотных остатков (Рис. 3, А) [101]. Тем не менее, структура онконазы похожа на структуру РНказы А и состоит из трех  $\alpha$ -

спиралей, окружающих V-образный мотив  $\beta$ -складки, стабилизированных 4 дисульфидными связями, три из которых есть в структуре РНКазы А (Рис. 3, Б).

**А**

```

          11          21          31          41          51          61
PCADWLTFQKHITNTRDVDCDNIMSTNLFHCKDKNTFIYSRPEPVKAICKGIIASKNVLTT
          71          81          91          101
SEFYLSDCNVTSRPCKYKLKKSTNKFCVTCENQAPVHFVGVGSC

```

**Б**



**Рис. 3.** Первичная (А) и трехмерная структура (Б) онконазы. Трехмерная структура (код PDB 1ONC [101]).

Онконаза проявляет антипролиферативную и цитотоксическую активность в отношении раковых клеток за счет деградации молекул тРНК и дцРНК, что приводит к апоптозу [103]. Противоопухолевую активность онконазы также связывают с ее действием на предшественники миРНК [104]. Общий механизм нацеливания на тРНК может быть общим с самыми древними РНКазами млекопитающих. Более того, сходство между структурами тРНК и предшественниками миРНК, которые являются мишенями для онконазы, указывает на то, что для распознавания и расщепления РНК онконазе требуются специфическая вторичная, по всей видимости, шпилечная структура [104].

Было обнаружено, что онконаза подавляет миРНК путем расщепления ее предшественников, тем самым уменьшая количество зрелых миРНК, возникающих в результате активности Dicer [103,104]. Таким образом онконаза опосредует противоопухолевое действие с

помощью миРНК, например, вызывает подавление NF- $\kappa$ B путем повышения экспрессии miR-17 и снижения экспрессии miR-30c [104,105].

Онконаза связывается с клеточной поверхностью и использует энергозависимый процесс эндоцитоза для проникновения в клетку [106], где она предпочтительно разрушает тРНК и предшественники миРНК [103]. Деградация РНК приводит к ингибированию синтеза белка, перестройке регуляторных путей под действием нового пула миРНК, сгенерированного онконазой, и, в конечном счете, к гибели клетки. Онконаза обладает цитостатическим эффектом, останавливая клеточный цикл в фазе G1 [98], а также способна действовать, как цитотоксический агент [106]. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что повреждение тРНК под действием онконазы может представлять собой проапоптотический сигнал [103], после чего запускается каспаза-зависимый апоптоз. Интересным фактом является то, что онконаза-индуцированный апоптоз не зависит от статуса p53 [6]. Антипролиферативное действие онконазы на раковые клетки опосредуется индукцией аутофагии [107].

Цитостатические и цитотоксические свойства онконазы исследовали на клеточных линиях лейкемии человека HL-60, карциномы A-253 и аденокарциномы толстой кишки Colo 320 CM [98]. Цитотоксичность онконазы была показана на опухолевых клеточных линиях различного гистогенеза: В-клеточных лимфопролиферативных заболеваниях [108], хроническом миелоидном лейкозе [109], карциноме легкого и аденокарциноме поджелудочной железы [97], множественной миеломе, аденокарциноме и раке предстательной железы [110].

Онконаза обладает неспецифическими цитотоксическими эффектами, такими как сперматогенный, эмбриотоксический и нефротоксический эффект. Недавние исследования показали, что в сочетании со стандартными химиотерапевтическими препаратами онконаза может проявлять синергетический эффект при лечении онкологических заболеваний [111]. В последнее время основной целью исследователей является модификация онконазы и оценка полученных конструкций по таким параметрам как клеточное поглощение, цитотоксичность, способность избегать RI и функциональность [112].

### 1.3. РНКазы с противоопухолевой активностью, принадлежащие семейству

#### РНКазы T1

Обнаружено много РНКаз бактериального происхождения, обладающих цитотоксической активностью. В отличие от цитотоксических РНКаз млекопитающих, принадлежащих к семейству РНКазы А, микробные РНКазы принадлежат к семейству РНКазы T1. Микробные РНКазы не чувствительны к действию RI и обладают широким спектром возможностей для экономически малозатратной биоинженерии, поэтому они особенно привлекательны в качестве препаратов с противоопухолевой активностью.

Существует четыре бактериальных РНКазы, принадлежащих к микробному семейству РНКаз N1/T1 [113]. К ним относятся: барназа *B. amyloliquefaciens* (молекулярная масса 12.38 кДа, 110 аминокислотных остатков) [27–29], биназа *B. pumilus* (молекулярная масса 12.4 кДа, 109 аминокислотных остатков) [29,30], балифаза *B. licheniformis* [114] и бальназа из *B. altitudinis* (молекулярная масса 12-12.5 кДа, 109 аминокислотных остатков) [115].

Несмотря на то, что секретируемые РНКазы бацилл сходны по своим физико-химическим и каталитическим свойствам, они различаются по способу димеризации и стабильности димерных форм, что сказывается на цитотоксических свойствах этих РНКаз. Гидролиз нуклеиновых кислот микробными РНКазами происходит путем реакции переэтерификации, что приводит к образованию гуанозин-2'3'-циклофосфатов в качестве промежуточных продуктов гидролиза, которые затем расщепляются до 3'-фосфатов [116].

Структурные исследования выявили сходную вторичную структуру и организацию активных центров у представителей микробных РНКаз. Связывание 3'-ГМФ происходит в петле, узнающей субстрат («петля узнавания»), образованной аминокислотными остатками 55-61, при этом фосфатная группа фиксируется в каталитическом центре тремя инвариантными остатками в молекуле бактериальных РНКаз: Glu72, Arg86 и His101 [117,118].

### 1.3.1. $\alpha$ -Сарцин – РНКаза из *Aspergillus giganteus*

РНКазы грибов также известны как риботоксины, к которым принадлежат  $\alpha$ -сарцин, митогиллин и рестриктоцин. Риботоксины расщепляют эукариотическую 28S рРНК большой субъединицы рибосомы по единственной фосфодиэфирной связи и таким образом инактивируют синтез белков, вызывая апоптоз и клеточную смерть [119–121].

$\alpha$ -сарцин представляет собой полипептидный токсин длиной 150 аминокислотных остатков, секретлируемый *Aspergillus giganteus* MDH 18894 [122].  $\alpha$ -сарцин принадлежит к группе белков I типа [123]. Это самый важный член семейства грибковых риботоксинов [124], которые имеют очень похожую трехмерную структуру [125].  $\alpha$ -сарцин обладает РНКазной активностью и классифицируется как циклизующая рибонуклеаза. His50, Glu96 и His137 являются аминокислотными остатками, участвующими в механизме катализа [126,127].

$\alpha$ -сарцин, в основном, известен своим вкладом в изучение структуры рибосом. В бесклеточных системах  $\alpha$ -сарцин ингибирует биосинтез белка путем специфического расщепления одной фосфодиэфирной связи 28S рРНК в высококонсервативной последовательности в сарцин/рициновой петле с образованием так называемого  $\alpha$ -фрагмента,  $\approx$  0.4 kb [123,128].  $\alpha$ -сарцин способен взаимодействовать с липидными бислоями, способствуя их слиянию и текучести, а также способен транслоцироваться в фосфолипидные везикулы [129].

$\alpha$ -сарцин показал высокую цитотоксическую активность против ряда опухолей. Инкубация опухолевых клеток с  $\alpha$ -сарцином приводила к фрагментации ДНК, активации каспазы-3 и расщеплению поли(АДФ-рибозо)полимеразы [130]. Кроме того,  $\alpha$ -сарцин индуцировал гибель клеток рабдомиосаркомы человека за счет индукции апоптоза. Хотя  $\alpha$ -сарцин продемонстрировал хорошую противоопухолевую активность, тем не менее, он проявлял высокую гепатотоксичность и вызывал токсические поражения сердца у здоровых животных [120,131].

### 1.3.2. Барназа – РНКаза *B. amyloliquefaciens*

Барназа, рибонуклеаза *B. amyloliquefaciens*, представляет собой небольшой белок размером 110 аминокислот (Рис. 3). Он не имеет дисульфидных связей и не требует для своей функции посттрансляционных модификаций, двухвалентных катионов или других не пептидных компонентов [27,132]. Благодаря этим свойствам барназа активна в клетках любого типа.

**А**

```
          11          21          31          41          51          61
A QVINTFDGVADYLQTYHKL PDNYITKSEA QALGWVASKGNLADVAPGKSI GGDI FSNREG
          71          81          91          101
K L P G K S G R T W R E A D I N Y T S G F R N S D R I L Y S S D W L I Y K T T D A Y Q T F T K I R
```

**Б**



**Рис. 4.** Первичная (А) и трехмерная структура (Б) барназы. Трехмерная структура (код PDB 2KF4[133]).

Барназа синтезируется как активный профермент, процессируется путем удаления N-концевого сигнального пептида и секретируется во внеклеточное пространство. У *Bacillus amyloliquefaciens* синтезируется специфический внутриклеточный ингибитор барназы барстар. Барстар прочно связывается с барназой и тем самым подавляет ее внутриклеточную ферментативную активность и защищает клетку-хозяина от повреждающего действия этой РНКазы.

Барстар состоит из 89 аминокислотных остатков и образует с барназой высокостабильный нековалентный комплекс [27]. Форма и заряд взаимодействующих поверхностей высоко комплементарны [134]. Барстар ингибирует активность барназы, пространственно блокируя ее активный центр [29]. Это взаимодействие стабилизируется

положительно заряженными аминокислотами Lys27, Arg59, Arg83 и Arg87 барназы и отрицательно заряженными остатками Asp35, Asp39 и Glu76 барстара [135]. Обнаружено, что барназа в мономерном состоянии связана с барстар [27,28,136], но после димеризации барназа становится активной и в таком виде проявляет противоопухолевую активность против многих типов опухолевых клеток [137–139].

Векторные конструкции, экспрессирующие барназу, используются для позитивной селекции клонированных вставок [140,141], создания мужской и женской стерильности у растений [142,143], придания посевам устойчивости к нематодам [144], производства сильнодействующих агентов для уничтожения личинок третьей стадии хлопковой совки [145] для элиминации опухолевых клеток [146]. Способность барназы образовывать высокоаффинный комплекс с барстаром используется для изучения белок-белковых и белок-нуклеотидных взаимодействий [147]. Рекомбинантную барназу применяют в качестве агента для элиминации РНК из образцов плазмидной ДНК, применяемой для вакцинации и генной терапии [148].

Показано, что барназа проявляет противоопухолевую активность в отношении клеточных линий карциномы и лейкемии человека [138]. Цитотоксичность фермента обусловлена структурными и физико-химическими свойствами белка, такими как положительный заряд, высокая каталитическая активность и стабильность, а также устойчивостью к R1 млекопитающих [138]. Было показано, что барназа не отдает предпочтения определенным типам клеточной РНК. В клетках, обработанных ферментом, сильно снижается уровень внутриклеточной РНК, что подтверждает, что токсичнее действие барназы осуществляется именно за счет каталитической активности фермента [138]. Мутант барназы, не обладающий ферментативной активностью, не оказывал токсического действия на изолированные перфузированные почки крысы [149]. Клетки под действием барназы гибли по пути апоптоза, на что указывает появление на внешней плазматической мембране остатков фосфотидилсерина, фрагментация хроматина, а также активация каспазы-3 [138].

Для адресной доставки фермента к опухолевым клеткам две молекулы барназы перекрестно сшивали с одноцепочечным варибельным фрагментом (ScFv) антитела 4D5, распознающим HER2 - онкомаркер, гиперэкспрессирующийся в различных типах карцином. Цитотоксическое действие полученной конструкции на HER2-положительную карциному яичек увеличилось в 1000 раз по сравнению с действием интактной барназы [137]. Фрагмент антитела не только способствовал доставке барназы к поверхности опухолевых клеток, но и позволял ферменту проникать внутрь клетки с помощью рецептор-опосредованного эндоцитоза [150]. Слитый белок, состоящий из барназы и эпитопа с-Мус, продемонстрировал специфическое истощение пула анти-с-мус В-клеток [151].

Барназа была исследована на клеточных линиях млекопитающих в виде химерного токсина, состоящего из барназы и токсина *A. P. aeruginosa* (PE) [152]. Полученный гибридный токсин снижал жизнеспособность PE-резистентных клеток L929 благодаря рибонуклеазной активности барназы, которая успешно доставлялась в цитоплазму с помощью транслокационного домена PE. Другой химерный токсин на основе PE, содержащий барназу вместо ферментативно активного домена III PE, показал токсичность по отношению к опухолевым клеткам, включая устойчивые к PE гибридомы [50,153]. В той же работе Prior и соавторами было предложено использовать барназу в качестве токсического модуля для таргетной терапии онкологических заболеваний [50]. Идея использования таргетной барназы в качестве лекарственного средства подтверждается тем фактом, что барназа может успешно продуцироваться бактериями в присутствии барстарта. Благодаря рибонуклеазной активности и защите вируспродуцирующих клеток барстартом, барназа также может стать компонентом суицидной генной терапии, но этот потенциал еще предстоит исследовать [154].

### 1.3.3. Биназа – РНКазы *B. pumilus*

Биназа — член семейства РНКаз N1/T1, однодоменный белок, состоящий из 109 аминокислотных остатков (Рис. 5, А), с молекулярной массой 12.4 кДа [155]. Фермент относится к катионным белкам с изоэлектрической точкой 9.5 и термостабилен в диапазоне рН

3-9 [29]. Биназа *B. pumilus* была выделена и очищена из культуральной жидкости *B. pumilus* 7P, аминокислотная последовательность определена Афанасенко с соавторами [155].

Активный центр биназы состоит из пяти аминокислотных остатков: Lys26, Glu72, Arg82, Arg86 и His101 [118]. Каталитическая активность биназы блокируется природным ингибитором барназы барстаром, но его сродство к биназе значительно ниже, чем к барназе [156]. Биназа катализируют расщепление РНК сходным с барназой образом. Расщепление одноцепочечной РНК происходит в реакции переэтерификации путем нуклеофильной атаки фосфора на 2'-ОН группу с образованием 2'3'-циклофосфата и последующем гидролизе циклофосфата с образованием 3'-фосфата [157]. На первом этапе ионизированный Glu72 действует как основание и акцептирует протон от 2'-ОН группы, тогда как His101, как кислота, отдает протон уходящей группе.

**А**

```

      11           21           31           41           51           61
AVINTFDGVADYLIRYKRLPNDYITKSQASALGWVASKGDLAEVAPGKSIGGDVFSNREGR
      71           81           91           101
LPSAGSRTWREADINYVSGFERNADRLVYSSDWLIYKTTDHYATFTRIR

```

**Б**



**Рис. 5.** Первичная (А) и трехмерная (Б) структура биназы. Трехмерная структура (код PDB 1GOU [158]).

Биназа представляет собой димер [30,159], и обладает цитотоксической активностью по отношению к трансформированным миелоидным клеткам и фибробластам, а также клеткам карциномы шейки матки SiHa, инфицированных вирусом папилломы [30,160–162]. Для объяснения противоопухолевых эффектов биназы Ильинской и соавторами был предложен молекулярный механизм, в котором противоопухолевая активность биназы реализуется без

расщепления РНК. Согласно этому механизму что биназа взаимодействует с KRAS, стабилизируя неактивную GDP-связанную конформацию RAS, тем самым ингибируя передачу сигналов MAPK/ERK [163].

В опухолевых клетках биназа запускает как митохондриальный, так и лиганд-зависимый пути апоптоза [9]. Фермент проникает в клетку в составе эндосом и действует на РНК в цитоплазме, влияя на экспрессию генов и запуская апоптоз путем индукции каспазы-9. Кроме того, биназа активирует факторы NF- $\kappa$ B и TNF, которые опосредуют апоптоз, запуская каспазу-8. Активация каспаз 3, 6 и 7 приводит к гибели клеток [164].

Биназа проявляет избирательную цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам человека, экспрессирующим определенные онкогены: *RAS*, *KIT*, *AML/ETO*, *FLT3*, *E6* и *E7* [39,164,165]. Биназа индуцирует апоптоз эмбриональных клеток HEK и HEK<sub>hSK4</sub> почки [166], клеток миелоидного лейкоза K562, трансгенных миелоидных клеток FDC P1iR1171, экспрессирующих онкоген *KIT* [161], и *RAS*-экспрессирующих фибробластов NIH3T3, но не влияет на нормальные фибробласты [8] и миелоидные клетки FDC-P1, не экспрессирующие онкоген *KIT* [161]. Кроме того, биназа цитотоксична для *H-ras*-экспрессирующих клеток мышинной глиомы С6 линии [167]. Показано, что биназа вызывает гибель мышинных трансформированных эпителиальных клеток легкого MLE-12, не оказывая существенного влияния на нормальные клетки АТ-II [168]. Хотя обработка клеток биназой приводит к снижению уровня внутриклеточной РНК, этот процесс не связан напрямую с индукцией апоптоза. Снижение количества суммарной клеточной РНК в опухолевых клетках мыши под действием биназы сопровождается увеличением экспрессии проапоптотических генов *p53* и *hSK4*, а уровень мРНК антиапоптотического гена *bcl-2* снижается. Вероятно, гидролиз РНК биназой запускает каскад реакций которые регулируют гены, контролирующие апоптоз [169].

Биназа эффективно ингибирует рост и метастазирование опухолей у животных [9]. Показано, что внутрибрюшинное введение биназы в дозе 1 мг/мл животными с карциномой легких Льюис (LLC) и лимфосаркомой RLS<sub>40</sub> вызывало снижение роста опухоли до 45% и

угнетало развитие метастазов до 50% [9]. Биназа продемонстрировала высокий антиметастатический эффект на модели меланомы В16 мыши [9].

Оказалось, что биназа снижает токсическое влияние опухолей на печень и способствует нормализации ее регенеративного потенциала. Лечение животных с RLS<sub>40</sub> биназой совместно с ПХТ показало, что барназа снижает гепатотоксичность ПХТ при сохранении ее противоопухолевого эффекта [9].

Недавно было обнаружено, что селективность биназы в отношении опухолевых клеток обусловлена ее прямым взаимодействием с эндогенным белком K-ras. Исследование активированного K-ras с использованием не гидролизуемого аналога GTP (GTP $\gamma$ S) показало, что биназа препятствует обмену GDP на GTP и уменьшает взаимодействие между белком K-ras и белковыми факторами GEF и SOS1. Анализ фосфорилирования эффекторов K-ras, белков АКТ и ERK1/2, подтвердил ингибирование сигнального пути MAPK/ERK [163]. Таким образом, было доказано, что селективность биназы в отношении опухолевых клеток связана с взаимодействием биназы и белка K-ras, что приводит к блокированию сигнального пути MAPK/ERK и запуску апоптоза в опухолевых клетках.

#### **1.3.4. Бальназа (РНКаза *B. altitudinis*) и балифаза (РНКаза *B. licheniformis*)**

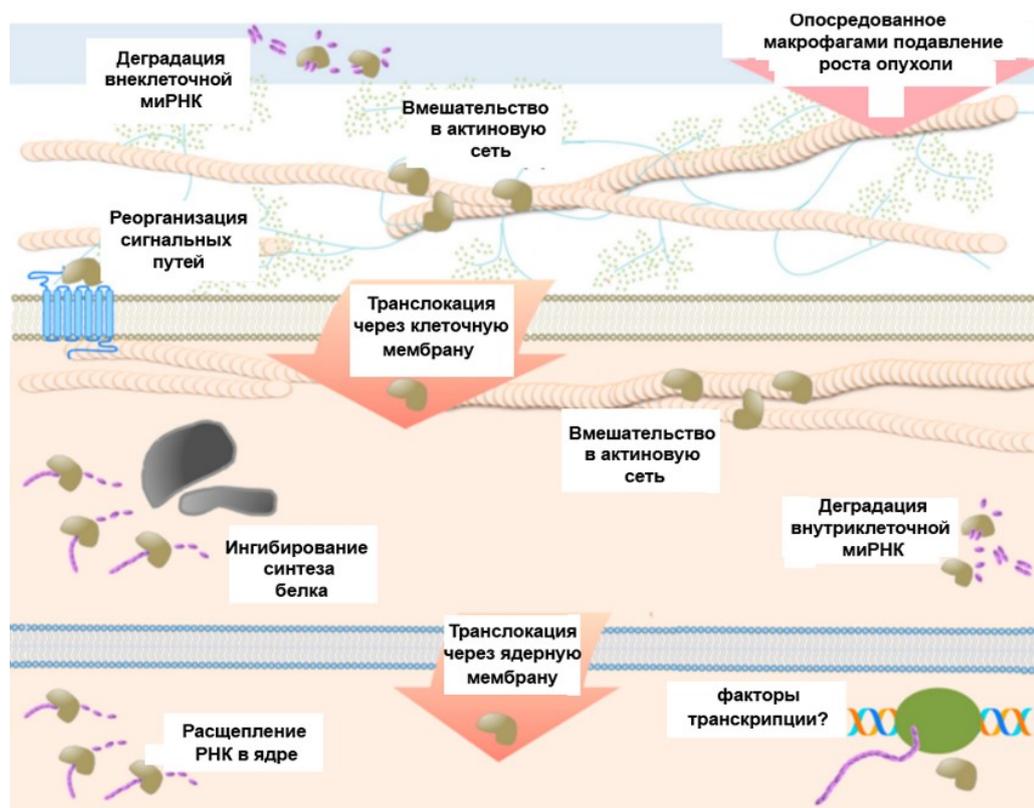
Обнаружено, что бактерии *B. altitudinis* секретирует в окружающую среду низкомолекулярную гуанинспецифическую РНКазу, которая была названа бальназой [115]. Бальназа является ближайшим гомологом биназы и отличается от нее только одной аминокислотной заменой (Thr106 в биназе заменяется на Ala106 в бальназе) [170]. Другой представитель микробных РНКаз, относящихся к семейству РНКаз T1 – балифаза *B. licheniformis*. Как и бальназа, балифаза состоит из 109 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу около 12–12.5 кДа. Согласно pI и общей средней гидропатичности, все три РНКазы являются основными гидрофильными белками, в то же время балифаза является более кислой [170].

В нативных условиях бальназа и балифаза существуют только в виде димеров. И именно за счет стабильности димерной структуры эти РНКазы проявляют противоопухолевую активность. Исследование цитотоксического действия бальназы и балифаза на клетки аденокарциномы легкого человека А549 показало, что бальназа и балифаза способны вызывать гибель опухолевых клеток [170]. Поскольку эти рибонуклеазы открыты относительно недавно, данных об их противоопухолевой активности накоплено очень мало.

#### **1.4. Механизм противоопухолевой активности экзогенных РНКаз**

Многочисленные исследования позволили собрать по фрагментам механизм цитотоксического действия большинства экзогенных РНКаз с противоопухолевой активностью. Этот механизм состоит из нескольких стадий: (1) на первой стадии РНКаз связывается с мембраной опухолевой клетки; (2) на второй стадии происходит ее интернализация; (3) далее происходит ее перемещение и выход в цитозоль; (4) разрушение РНК; (5) запуск апоптоза [171]. На рис. 6 показано схематическое изображение различных механизмов действия экзогенных противоопухолевых РНКаз.

На сегодняшний день взаимодействие РНКаз с поверхностными клеточными структурами считается одним из наиболее значимых процессов, играющих важную роль в запуске каскада реакций, приводящих к гибели опухолевых клеток. Интернализация РНКаз происходит либо путем специфического взаимодействия с клеточными рецепторами [172], либо путем их прямого взаимодействия с клеточной мембраной [173]. РНКазы взаимодействуют с поверхностью клетки-мишени за счет вовлечения мембранных липидов, ионных каналов и рецепторов, а также посредством неспецифического электростатического связывания [174]. Одним из механизмов, лежащих в основе селективной цитотоксичности биназы и других катионных РНКаз, является способность РНКаз взаимодействовать с анионными группами на поверхности раковых клеток [175]. Известно, что опухолевые клетки более электроотрицательны, чем нормальные клетки, из-за высокого содержания кислых фосфолипидов [176].



**Рис. 6.** Схематическое изображение различных механизмов противоопухолевого действия экзогенных РНКаз.

Для увеличения катионности РНКаз с целью усиления их противоопухолевых свойств исследователи получали мутантные формы ферментов с увеличенным числом положительно заряженных аминокислотных остатков и использовали ферментативную димеризацию. Замена отрицательно заряженных аминокислотных остатков в РНКазе *S. aureofaciens* (РНКазы Sa) на положительно заряженные повышала цитотоксическую активность фермента [8,177]. Так РНКазы Sa индуцировала гибель клеток Касуми-1 (острый миелоидный лейкоз) за счет апоптоза, и этот эффект достоверно коррелировал с повышением катионности фермента [164]. Введение положительно заряженных остатков в аминокислотную последовательность онконазы значительно повышало ее цитотоксичность [178].

Однако оказалось, что одного лишь увеличения заряда недостаточно для успешной интернализации РНКаз в клетку. Показана чрезвычайно важная роль специфической ориентации молекулы РНКаз (онконазы, BS-РНКазы, РНКазы 1 и РНКазы А) относительно клеточной мембраны [173]. Например, нативная димерная BS-РНКазы принимает наиболее

благоприятную ориентацию для своей интернализации, когда оба ее N-конца направлены к клеточной мембране [72]. Мутантная BS-РНКаза Gly38Lys с дополнительным катионным остатком, ориентированным к N-концу, имела большее сродство к мембране и была более цитотоксичной, чем BS-РНКаза дикого типа [68]. Представленные данные демонстрируют важность трехмерной структуры РНКаз, в частности ориентации основных зарядов, влияющих на цитотоксический потенциал этих ферментов.

Некоторые РНКазы могут также осуществлять свое взаимодействие с определенными рецепторами опухолевой клетки. В качестве примера можно привести поверхностный актин, присутствующий в опухолевых клетках, который используется в качестве рецептора РНКазой АСТИВИНД Т2 [179].

Показано, что нативные и мутантные димерные РНКазы сильно влияют на агрегацию, текучесть и слияние клеточных мембран [72]. Было обнаружено, что РНКазы А и ее аналог, панкреатическая рибонуклеаза человека (РНКаза 1) специфически взаимодействуют с нейтральным гексасахаридным гликофинголипидом Globo H [174], в больших количествах присутствующим в некоторых опухолевых клетках и расположенным на внешней стороне клеточной мембраны [180]. Онконаза и BS-РНКаза взаимодействуют со специфическими небелковыми рецептороподобными молекулами на плазматической мембране, что не характерно для других РНКаз [70].

После связывания с поверхностью клетки важным этапом является интернализация РНКаз. На клетках HeLa и K562 было показано, что онконаза и РНКазы А интернализуются в ранние эндосомы через клатрин- и кавеолин-независимые пути [172], тогда как эндоцитоз онкоказы в клетках Jurkat происходит динамин-зависимым путем [181]. Эти данные свидетельствуют о том, что РНКазы могут использовать разные пути для проникновения в клетки. BS-РНКаза интернализуется путем эндоцитоза как в нормальные, так и в опухолевые клетки, но только в опухолевых клетках достигает комплекса Гольджи, обеспечивающего его цитозольную доставку.

При попадании в цитозоль РНКазы сталкиваются с внутриклеточным ингибитором РНКаз млекопитающих (RI). RI представляет собой белок массой 50 кДа, присутствующий в цитоплазме, митохондриях и ядре клеток животных и человека [182]. Биологические функции RI еще полностью не выяснены. Считается, что RI участвует в окислительно-восстановительном гомеостазе клетки [183]. RI блокирует РНКазы млекопитающих, образуя с ними прочные комплексы, подавляя тем самым их каталитическую активность. Филогенетическая удаленность РНКаз бактерий и РНКаз амфибий от РНКаз млекопитающих обуславливает их нечувствительность к RI и делает их потенциальными противоопухолевыми агентами. BS-РНКазы нечувствительны к RI за счет естественной димеризации, образуя трехмерные структуры, недоступные для связывания ингибитором. Было предположено, что для проявления цитотоксичности РНКаз по отношению к опухолевым клеткам они должны избегать взаимодействия с RI, однако эта гипотеза является спорной. Naddeo и его коллеги показали, что димеры РНКазы А, несмотря на их сильное связывание с RI, вызывают значительные цитотоксические эффекты [26]. Ближайший родственник РНКазы А, ангиогенин способен связываться с цитозольным RI, однако, при попадании в клетку он фосфорилируется протеинкиназой С и циклин-зависимой киназой, что позволяет ангиогенину уклоняться от RI и проникать в ядро [184].

Далее РНКазы попадают в цитозоль, где разрушают клеточную РНК, запуская механизмы апоптоза [172]. РНКазы *in vitro* разрушают рРНК и тРНК в равных количествах, тем не менее, в клетках для каждой РНКазы предпочтительнее определенный тип РНК: BS-РНКазы и сSBL разрушают рРНК [74,185], а онконаза – тРНК и предшественники миРНК [30,103,186,187]. Было показано, что мишенями РНКаз могут быть онкогенные мРНК, например c-kit, AML-ETO, RAS [188,189].

Исследователи нашли несколько объяснений этому факту: (1) специфическая локализация РНК и РНКазы внутри клетки; (2) взаимодействие различных типов РНК с определенными белковыми комплексами, предотвращающими или способствующими

ассоциации с РНКазы; (3) модификация фермента, которой он может подвергнуться после проникновения в клетку [171]. Цитотоксический эффект РНКаз связан не только с последствиями прямой деградации РНК, но и с регуляторными эффектами продуктов ее гидролиза. Было показано, что прямыми мишенями РНКазы А могут выступать внеклеточные циркулирующие миРНК крови [36], изменение профиля которых приводит к изменению профиля миРНК опухолевой клетки и реорганизации внутриклеточных энергетических и метаболических каскадов и частичному истощению опухоль-ассоциированных сигнальных путей [37].

Интересно, что для проявления цитотоксической активности РНКазам не всегда требуется проникать в цитозоль клетки. Так, было показано, что биназа не проникает в клетки MLE-12, трансформированные SV<sub>40</sub>, но они проявляют к ней высокую чувствительность [168]. Некоторые РНКазы проявляют противоопухолевую активность независимо от их ферментативной активности. Было показано, что АСТІВІND — внеклеточная рибонуклеаза *A. niger* T2 РНКазы и ее денатурированная форма обладают антиклоногенной активностью в отношении линий опухолевых клеток человека и ингибируют развитие ксенотрансплантата опухоли у мышей. Этот белок нарушает организацию внутриклеточной актиновой сети, подавляя подвижность и инвазивность клеток [179]. Этот же механизм характерен и для человеческого гомолога этой РНКазы RNASET2. Показано, что инактивация посредством мутации или денатурации человеческого RNASET2 не подавляет его противоопухолевую активность, что указывает на то, что для этого белка каталитическая активность для подавления опухоли не важна. Этот белок разрушает внутриклеточную актиновую сеть в клеточных линиях толстой кишки и меланомы, ингибируя миграцию клеток.

Во внеклеточном пространстве РНКазы могут выполнять некоторые из следующих функций: вмешательство в организацию внеклеточной актиновой сети, подавление подвижности и инвазивности клеток; разрушение внеклеточных циркулирующих РНК, включая миРНК; участие в регуляции иммунного ответа. Так, например, RNASET2 на уровне организма

может играть роль автономного онкосупрессора, изменяя баланс между про- и противоопухолевыми звеньями врожденного иммунитета и действуя как аларминоподобный макрофагальный супрессор опухолей [190–193].

### **1.5. РНКазы с противовирусным действием**

Среди множества биологических функций РНКаз одной из важных функций является противовирусная активность [194–196]. В целом стратегии, применяемые РНКазами против вирусов, включают: (1) ингибирование репликации вируса за счет собственной рибонуклеазной активности; (2) регуляция иммунного распознавания и ответа организма-хозяина; (3) регулирование образования гранул стресса; (4) индукция аутофагии и (5) запуск апоптоза [197] (Таблица 1).

Наиболее изучена противовирусная активность нейротоксина эозинофилов (EDN/РНКазы 2) в отношении RSV, PIV и ВИЧ [198,199]. Исследования рекомбинантного EDN человека против RSV и PIV показали, что рибонуклеазная активность EDN важна для проявления им противовирусной активности, но не уникальна [204]. Противовирусные РНКазы из препаратов хорионического гонадотропина человека (ХГЧ), содержащие EDN, проявляют анти-ВИЧ-активность, что может быть связано с ингибированием репликации ВИЧ в хронически инфицированных лимфоцитах и моноцитах [204]. Кроме того, добавление рекомбинантного EDN снижает инфекционность RSV *in vitro* в эпителиальных клетках, инфицированных RSV [199,200]. С помощью сайт-направленного мутагенеза была идентифицирована область в EDN, отвечающая за взаимодействие с капсидом RSV [201]. Интересным фактом является то, что после RSV-бронхиолита в сыворотке крови происходит повышение уровня EDN, что используют в качестве прогностического маркера рецидивирующего бронхообструктивного синдрома [202].

**Таблица 1.** Механизмы противовирусного действия РНКаз [197]

РНКазы	Предлагаемый механизм	Вирус	Ссылки
РНКаза А	Ингибирует репликацию вируса в РНА-стимулированных Т-клеточных бластах	HIV-1	[203]
РНКаза 2/EDN	Ингибирует репликацию вируса в РНА-стимулированных Т-клеточных бластах	HIV-1	[203,204]
	Расщепляет вирусную РНК в клетках АСН2	HIV-1	[203,204]
	Снижает инфекционность PIV в клетках RhMk	PIV	[199]
	Взаимодействует с вирусным капсидом и проникает в вирион (клетки HEp-2)	RSV-B	[199,201]
РНКаза 3/ЕСР	Ингибирует репликацию в клетках HEp-2 и THP-1	RSV-B	[205,206]
РНКаза 5 /ANG	Ингибирует репликацию в РНА-стимулированных Т-клеточных бластах или РВМС	HIV-1	[203,207]
BS-РНКаза	Ингибирует репликацию в клетках лейкемии Н9	HIV-1	[208]
Онконаза	Ингибирует репликацию в клетках лейкемии Н9 и U937	HIV-1	[186,208,209]
	Ингибирует репликацию путем удаления tRNA <sup>Lys</sup> , которая используется вирусом в качестве праймера для обратной транскрипции	HIV-1	[186,208,209]
РНКаза L	Ингибирует репликацию вируса	CV-B4	[210]
	Ингибирует синтез вирусной РНК в клетках LS1	EMCV	[211–214]
	Усиливает передачу сигналов IFN-β у мышей	EMCV	[211–214]
	Ингибирует репликацию в клетках Jurkat	HIV-1	[215]
Регназа/МСРІР1	Ингибирует репликацию вируса в клетках гепатомы	HCV	[216]
	Расщепляет вирусную РНК <i>in vitro</i>	HCV, DENV	[216,217]
РНКаза Р	Расщепляет транскрипты вирусной РНК в клетках	HCV	[218]
Биназа	Ингибирует репликацию вируса в клетках MRC5	MERS-CoV	[160]
	Оказывает прямое действие на мРНК вируса в клетках А549 и MDCK-II	IAV	[219,220]

HEp-2: карцинома гортани человека; MDCK-II: эпителиальные клетки Мадин-Дарби почек собаки; MRC5: фибробласты легких плода человека; РВМС: мононуклеары периферической крови; RhMk: почка макаки резус; THP-1: моноцитарная клеточная линия человека; CV-B4: вирус Коксаки В4; DENV: вирус денге; EMCV: вирус энцефаломиокардита; HCV: вирус гепатита С; HIV: вирус иммунодефицита человека; IAV: вирус гриппа А; JEV: вирус японского энцефалита; MERS-CoV: коронавирус nCoV; PIV: вирус парагриппа человека; RSV: респираторно-синцитиальный вирус.

Другая эозинофильная рибонуклеаза, катионный белок эозинофилов ECP/РНКазы 3, также обладает анти-RSV активностью, хотя и в меньшей степени, чем EDN [205]. Более высокая противовирусная активность EDN/РНКазы 2 по сравнению с ECP/РНКазы 3 объясняется наличием у первого специфического участка на С-концевой петле. Недавно была продемонстрирована противовирусная активность ECP/РНКазы 3 в отношении RSV, экспрессирующегося в макрофагах. Кроме того, сравнительный транскриптомный анализ показал, что противовирусные свойства ECP связаны с его каталитической активностью [206]. При ВИЧ-инфекции как у взрослых, так и у детей в крови обнаруживаются повышенные уровни ECP [221,222].

Нет никаких доказательств того, что EDN/ECP оказывает прямое влияние на CoV, но высокие уровни EDN обнаруживаются в крови больных, инфицированных SARS-CoV [223]. Недавно сообщалось, что инфекция SARS-CoV-2 приводит к эозинопении [224,225]. Точно так же повышение уровня эозинофилов связано с лучшим прогнозом выздоровления от COVID-19, и EDN был предложен в качестве нового клинического биомаркера заболевания [226–228].

Помимо белков эозинофильного происхождения, следует отметить ангиогенин (ANG/РНКазы 5), который проявляет противовирусное действие [229]. ANG может подавлять репликацию ВИЧ-1 дозозависимым образом [207]. При заражении RSV в инфицированных клетках значительно усиливается продукция tiРНК из tРНК под действием ANG. В настоящее время известно, что в условиях клеточного стресса tiРНК способствуют сборке гранул стресса [230]. Было показано, что ANG, EDN и РНКазы А способны ингибировать репликацию ВИЧ-1 в ВИЧ-инфицированных РНА-стимулированных РВМС [203]. Другой член семейства РНКазы А BS-РНКазы также продемонстрировал способность ингибировать репликацию ВИЧ в клетках лейкемии Н9 [208]. Было обнаружено, что расщепление дцРНК BS-РНКазой индуцируется IFN- $\gamma$  [231].

РНКазы амфибий онконаза с высокой эффективностью подавляла репликацию ВИЧ-1 в клетках лейкемии Н9 [208]. Было показано, что онконаза вызывает селективную деградацию

вирусной РНК без влияния на рРНК и мРНК [186]. Со способностью онконазы ингибировать репликацию ВИЧ связана специфическая активность онконазы в отношении тРНК: онконаза расщепляет тРНК<sup>Lys</sup>, которая служит праймером для обратной транскрипции ВИЧ [209]. Авторы также предполагают, что ингибирование репликации ВИЧ онконазой может быть опосредовано индукцией синтеза IL-10 [232]. Недавно Виланова с соавторами сообщили, что противовирусное действие онконазы может быть опосредовано активацией фактора транскрипции ATF3, который может ингибировать репликацию вируса и запускает апоптоз инфицированной клетки [232]. Кроме того, сообщается, что ATF3 вызывает латентное состояние вируса простого [233]. В настоящее время ведутся исследования по применению онконазы в составе монотерапии или в качестве адъюванта для борьбы с вирусными инфекциями, включая SARS-CoV и RSV (<http://tamirbio.com/>) [232].

В целом, индукцию под действием экзогенных РНКаз путей апоптоза или аутофагии можно рассматривать как стратегию, способствующую удалению инфицированных патогенами клеток [68,233–236]. Rains с соавторами был сконструирован зимоген, где использование протеазы ВИЧ служит системой активации для высвобождения РНКазы А, которая разрушает вирусный геном [237].

РНКазы L представляет собой внутриклеточную эндонуклеазу, которая активируется при вирусных инфекциях и регулируется интерфероном [238]. Активированная РНКазы L расщепляет оцРНК вируса, тем самым подавляя репликацию вируса, синтез белка и сборку вирионов. Кроме того, РНКазы L может дополнительно усиливать передачу сигналов IFN и способствовать образованию гранул стресса, которые активируют другие белки с противовирусными функциями [239–241].

Вирусы, содержащие оцРНК, могут прямо или косвенно ингибироваться РНКазой L (Таблица 1) [238,242]. Активированная РНКазы L расщепляет РНК как клетки-хозяина, так и вируса, что приводит к образованию продуктов, которые, в свою очередь, могут активировать RIG-I и стимулировать экспрессию IFN- $\beta$  во время инфекции HCV [212,243]. РНКазы L

напрямую подавляет репликацию ВИЧ-1 без участия интерферона [215]. Было обнаружено, что IFN- $\gamma$  ингибирует RSV в эпителиальных клетках человека. Однако, в клетках, гиперэкспрессирующих ингибитор РНКазы L (RLI), этот противовирусный эффект ослабляется, что свидетельствует о том, что активированная РНКаза L необходима для IFN- $\gamma$ -опосредованной активности против RSV [244]. РНКаза L защищает клетки мозга от устойчивой инфекции MHV и тем самым предотвращает демиелинизацию и нейродегенерацию [245]. Образование гранул стресса и запуск аутофагии могут быть индуцированы РНКазой L при инфицировании клеток вирусами, содержащими оцРНК [213,246].

Пристальное внимание уделяется эндогенным РНКазам процесса РНК-интерференции, участвующего в противовирусной защите [247,248]. Ведущую роль играет РНКаза Dicer, продуцирующая миРНК и использующая в качестве субстрата дцРНК (промежуточный продукт репликации вирусов) [248].

МСРIP1 (Регназа 1) представляет собой zink-finger белок человека, обладающий как противовирусной, так и эндорибонуклеазной активностью, и участвует в клеточном воспалительном ответе, который регулирует период полужизни мРНК и миРНК. Нуклеазный домен МСРIP1 способен расщеплять оцРНК и проявляет высокое сродство к вирусной РНК [217]. Интересно, что РНКаза Р человека с эндорибонуклеазной активностью способна расщеплять транскрипты HCV и за счет этого подавлять его сборку [218].

Микробные РНКазы также были исследованы в качестве противовирусных агентов (Таблица 1). Ильинская и ее коллеги исследовали потенциал биназы в отношении вируса гриппа А. Было обнаружено, что биназа оказывает прямое действие на вирусную мРНК *in vitro*, так и *in vivo* [219,220]. Биназа с высокой эффективностью подавляла репликацию коронавирусов в клетках (MERS-CoV и человеческого низкопатогенного штамма CoV-229E) [160]. Противовирусная активность других микробных РНКаз подробно описаны в обзоре Ильинской и Mahmud [194].

## 1.6. Противоопухолевые РНКазы в клинических испытаниях

В данной части обзора суммированы клинические испытания, проведенные с противоопухолевыми РНКазами к настоящему времени. В двух клинических испытаниях фазы I с участием пациентов с солидными опухолями было показано, что онконаза хорошо переносится пациентами, но нефротоксична в высоких дозах. МTD (максимально переносимая доза в зависимости от токсичности) составила 960 мг/м<sup>2</sup>/неделю, а рекомендуемые дозы для фазы II составили 480 мг/м<sup>2</sup>/неделю [106].

В исследовании фазы II было продемонстрировано, что онконаза увеличивает медианное время выживания у пациентов с прогрессирующим немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) по сравнению с пациентами, получающими химиотерапию. Исследование фазы I/II с участием пациентов с прогрессирующим раком поджелудочной железы, получавших онконазу и тамоксифен, показало потенциальную активность этой комбинации в соответствии с доклиническими результатами. Это исследование было прекращено в 1998 г., поскольку переносимые уровни онконазы не давали значительного преимущества по сравнению с гемцитабином (Gemzar®) [249]. В исследовании фазы II лечение пациентов с рецидивом рака предстательной железы лечили комбинацией онконазы и тамоксифена продемонстрировано крайне низкий клинический эффект (не опубликовано, хотя и завершено). Исследования фазы II онконазы у пациентов с прогрессирующим раком молочной железы и метастатическим раком почки, также показали невысокую клиническую эффективность. [250].

В многоцентровом клиническом исследовании фазы II, проведенном у пациентов с УММ (неоперабельная злокачественная мезотелиома), онконаза продемонстрировала достаточную эффективность, в том числе и для пациентов, предварительно получивших один или несколько курсов химиотерапии. Общая медиана выживаемости составила 6 месяцев для выборки рандомизированных пациентов, и 8.3 месяца для экспериментальной выборки. Полученные результаты послужили основанием для начала рандомизированного исследования III фазы [251].

Клиническое исследование фазы III для пациентов со злокачественная мезотелиомой, получавших либо онконазу, либо доксорубицин, не выявило существенных различий в эффективности терапии. Однако в группе, получавшей онконазу, было выявлено увеличение количество пациентов с неблагоприятным прогнозом. Согласно ретроспективному анализу онконаза продемонстрировала высокую эффективность. Медиана выживаемости составило 11.6 месяцев для группы, получавшей онконазу, по сравнению с 9.6 месяца для группы, получавшей доксорубицин.

Клинические испытания показали, что онконаза хорошо переносится больными, обладает низкой иммуногенностью, но высокой нефротоксичностью [251,252]. Однако недавние клинические испытания онконазы для лечения пациентов с немелкоклеточным раком легкого и мезотелиомой были преждевременно прекращены [253,254].

С 2010 года по настоящее время было проведено несколько клинических исследований бычьей панкреатической РНКазы А для лечения различных типов опухолей. В первом исследовании (Фаза I, [255]), проводившемся с сентября 2010 г. по июнь 2012 г., РНКазы А использовалась перорально препарат (O'Shadi R) для лечения пациентов с различными видами опухолей. Хотя официальный отчет об этом исследовании еще не представлен, с тех пор стартовало еще четыре клинических испытания РНКазы А: для лечения метастатического немелкоклеточного рака легкого [256], мезотелиомы [257], базально-клеточной карциномы [258], острого миелоидного лейкоза и лимфоидного лейкоза [259]. Вариант человеческой панкреатической РНКазы 1, но 95% идентичный последовательности НР-РНКазы 1, названный QBI-139, изучается в фазе I клинических испытаний для лечения прогрессирующих рефрактерных солидных опухолей [260].

## **1.7. Заключение**

Благодаря природной способности рибонуклеаз расщеплять РНК, они давно рассматриваются исследователями как перспективные противоопухолевые препараты.

Накоплен большой объем данных, подтверждающих, что опухоль-ассоциированные РНК являются мишенями экзогенных РНКаз в опухолевых клетках.

Заметным недостатком РНКаз является их фармакокинетика, связанная с их белковой природой и небольшими размерами, что способствует легкому выведению из организма. Чтобы обойти этот недостаток, в последние несколько лет были предложены различные подходы, такие как димеризация или мультимеризация, конъюгация, и большинство из них направлено на использование в комбинации с различными наноносителями. Это позволит получить селективные негенотоксичные противоопухолевые препараты, которые могут воздействовать на многофакторный фенотип опухолевой клетки и ее окружения.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Материалы

#### 2.1.1. Реактивы и препараты

В работе были использованы диэтилпиروкарбонат (DEPC), формальдегид, раствор WST-1, МТТ (3- (4,5-диметилтиазол-2-ил) -2,5-дифенилтетразолий бромид, бычья панкреатическая РНКазы А (из поджелудочной железы крупного рогатого скота, лиофилизированная, 13700 г/моль), TWEEN®20 и BSA производства Sigma-Aldrich, США; обратная транскриптаза MuLV, 5×RT PCR буфер, кристаллический фиолетовый и EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin производства Thermo Fisher Scientific, США; димексид производства Татхимфарм препараты; раствор антибиотиков и антимикотика (100 ед./мл пенициллина, 0.1 мг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина) производства MP Biomedicals, США; фосфатно-солевой буфер (PBS), среда IMDM, среда DMEM, FBS, глутамин производства ICN Biomedicals, США; 10% нейтральный забуференный формалин, этанол, ксилол, парафин HISTOMIX производства БиоВитрум, Россия; гематоксилин, эозин, гематоксилин Майера, субстрат 3,3'-диаминобензидин (ДАБ), вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) производства Abcam, США; набор для анализа Caspase-Glo® 3/7 производства Promega, США; реагент TRIzol, среда Fluoromount-G™, набор CellEvent® Caspase-3/-7 Green, Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody(Alexa Fluor Plus 488), eBioscience™ Streptavidin APC, Ku70/Ku80 Monoclonal Antibody (162) (MA1-21818), ProLong™ Glass Antifade Mountant with NucBlue™ Stain производства Thermo Fisher Scientific, США; Amicon Ultra 10K MWCO производства Millipore, США; Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit производства Millipore, США; наборы для измерения АЛТ HT-A206-120, АСТ HT-A109-120, щелочной фосфатазы HT-A205-120, концентрации общего белка НТТ251-125, креатинина HT-C225-250 и мочевины в крови HT-B253-150 производства HTI, США; Anti-Ribonuclease Inhibitor/RAI antibody (ab217132), Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (ab150077), Anti-Cleaved

Caspase-3 antibody (ab2302), Anti-E Cadherin antibody [M168] - C-terminal (ab76055), Recombinant Anti-Vimentin antibody [EPR3776] - Cytoskeleton Marker (ab92547) производства Abcam, США; Anti-PCNA (2139510) производства Sony Biotechnology, США; Human/Mouse Caspase-7 Antibody (MAB823) производства R&D Systems, США; Spring Bioscience detection system производства Spring Bioscience, США; трипановый синий производства BioRad, США; SYTO RNASelect производства Molecular Probes, США; 2 × BioMaster HS-qPCR SYBR Blue производства Biolabmix, Россия.

Остальные использованные в работе реактивы были отечественного производства и имели квалификацию “о.с.ч.” и “х.ч.”.

Конъюгат РНКазы А с биотином был любезно предоставлен к.б.н. Марковым О.В. (ИХБФМ СО РН, Новосибирск).

Биназа была любезно предоставлена д.б.н. Ильинской О.Н. (Институт фундаментальной медицины и биологии, КГУ, Казань). Биназу (12.3 кДа) выделяли из ростовой среды клеток *Escherichia coli* BL21, несущих плазмиду pGEMGX1/ent/Bi. Очистку фермента проводили, как описано в [261]. Содержание эндотоксинов в препаратах биназы, определенное с помощью Limulus amoebocyte lysate test (LAL) (Charles River Endosafe), составило 5 EU/мг. Каталитическая активность биназы по отношению к дрожжевой РНК, измеренная модифицированным методом Анфинсена [262], составила  $14 \times 10^6$  Ед / мг при pH 8.5.

### **2.1.2. Оборудование**

В работе использовали pH-метр Orion 410A (США); центрифуги Mini Spin Plus Eppendorf, Eppendorf 5415 (Eppendorf, Германия) и Contron T42K (Centricon Instruments, Италия); миксеры Vortex-Genie 2 (Scientific Industries) и ULTRA-TURRAX® Tube Drive (Applied Biosystems), автоматическую пипетку Repeater® Xstream (Eppendorf), микроскопы Axioimager Z (ZEISS, Германия), AxioStar plus, оснащенный камерой MRc5 (ZEISS, Германия), Zeiss Primo Vert (Zeiss, Германия), оснащенный камерой AxioCam ERc5s CCD, конфокальный микроскоп LSM710

(Zeiss, Германия); прибор для автоматического подсчета клеток Automated Cell Counter TC20 (Bio-Rad, Сингапур), анализатор клеток в реальном времени (RTCA DP) xCelligence System (ACEA Biosciences, США), спектрофотометра Bio Mate 3 (Thermo Electron Corporation, Мадисон, США), спектрофотометр NanoDrop™ OneC (Thermo Fisher Scientific, США); многоканальный спектрофотометр CLARIOstar (BMG Labtech, Ортенберг, Германия); многоканальный спектрофотометр Multiscan RC (Thermo LabSystems, Финляндия), iBright™ CL1500 Imaging Systems (Thermo Fisher Scientific, США), Ultrasonic cleaner 08849-02 (Cole-Parmer, USA), проточный флуцитометр NovoCyte (ACEA Biosciences Inc., США); прибор для ПЦР в реальном времени iQ™ Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США), прибор для ПЦР в реальном времени CFX96 Real-Time PCR (Bio-Rad Laboratories, США); биохимический анализатор HTI BioChem FC-200 Auto Chemistry Analyzer (HTI, USA). Qubit (Invitrogen, США), Bioanalyzer (Agilent Technologies, США).

Для обработки полученных результатов использовалось следующее программное обеспечение: Microsoft Excel 2010, Adobe Photoshop CS3, Axiovision v. 3.1, ImageJ, Statistica 10.0, CXP Analysis, CFX Maestro; ZEN (Zeiss, Германия); RTCA (версия 1.2, Roche Diagnostics), сервер ClusPro, Cytoscape v. 3.7.2 и 3.9.0 (Cytoscape, США).

Для анализа данных использовались интернет-ресурсы NCBI Primer BLAST, Miranda (<http://microRNA.org>), TargetScan Mouse 7.0 0 (<http://www.targetscan.org>), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), (<http://www.genome.jp/kegg/kaas/>); база данных miRTarBase v. 8.0 (Mus musculus); REACTOME (группа Reactome, США и Великобритания) и WikiPathways (WikiPathway, США, Нидерланды, Австрия, Бразилия); Gene Ontology (Gene Ontology, США), база данных Protein Data Bank, серверные платформы HDOCK (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>) и PatchDock (<https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>), Chimera / BIOVIA.

Для работы с клетками использовали ламинарный бокс Ламинар-С (Ламинарные системы, Россия), CO<sub>2</sub>-инкубатор производства Sanyo (Япония). Для наблюдения за клетками

использовали инвертированный микроскоп Биолам П2-1 (ЛОМО, Россия). Культуральный пластик был производства TPP (Швейцария) и Costar (США).

### 2.1.3. Буферы и растворы

Таблица 2. Буферы и растворы

Название	Состав
Блокирующий буфер	PBS, содержащий 0.05% Tween 20 и 1% BSA
Буфер для пермеабилзации	PBS, содержащий 0.1% Tween 20 и 0.5% BSA
PBS	1.47 мМ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4.29 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 137 мМ NaCl

### 2.1.4. Праймеры для ПЦР

Для проведения реакции обратной транскрипции в работе использовали рандомизированные гексапраймеры. Для дизайна шпилечных RT-праймеров к миРНК использовали последовательность петли, описанную в [263].

Для проведения реакции обратной транскрипции мы использовали миРНК-специфические праймеры типа «стебель-петля» (Таблица 3). Последовательности миРНК-специфических праймеров и универсального обратного праймера показаны в Таблице 4. Последовательности специфических праймеров к генам *Cdh1*, *Tjp1*, *Fn*, *Vim* и *Hprt* мыши были выбраны с использованием программ NCBI Primer-BLAST и OligoAnalyzer 3.1. Их последовательности приведены в Таблице 4. Прямой праймер к *U6* был выбран на основании литературных данных [264]. *HPRT* и *U6* использовали в качестве референсных генов.

### 2.1.5. Культура клеток

Клетки В16-F10 (меланома мыши), Клеточные линии аденокарциномы легких A549, эпидермоидной карциномы шейки матки HeLa, гепатоцеллюлярной карциномы HepG2, молочной железы MCF-7 и двенадцатиперстной кишки HuTu80 человека были получены из банка были получены из банка клеточных культур Института Цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% FBS и 1%

**Таблица 3.** Последовательности праймеров для обратной транскрипции миРНК

Наименование	Последовательность праймера, 5' → 3'
RT mir-31	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCAGCTATGCC
RT mir-21	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCAACATCAG
RT mir-145a	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGGGATTCT
RT mir-155	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTGGATACGAC
RT mir-10b	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCACAAATTCG
RT let7-g	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAACCTGTACAA
RT U6	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAAAATATGGAACG

**Таблица 4.** Последовательность прямых и обратных РНК-специфических праймеров

Наименование	Последовательность праймеров, 5' → 3'
mir-31-F	AGGCAAGATGCTGGCA
mir-21-F	AGACTAGCTTATCAGACTGA
mir-145a-F	AGGTCCAGTTTTCCAGGA
mir-155-F	ACTTAATGCTAATTGTGATAGG
mir-10b-F	TACCCTGTAGAACCGAA
let7-g-F	AACGCTGAGGTAGTAGTTTGT
U6-F	CTCGCTTCGGCAGCACA
Universal-R для миРНК	GTGCAGGGTCCGAGGT
Cdh1-F	GAAGAAGGAGGTGGAGAAGAAG
Cdh1-R	CATCAGGATTGGCAGGACG
Vim-F	CTCCTACGATTCACAGCCAC
Vim-R	GAGCCACCGAACATCCTG
Fn-F	CTTTGTGGTCTCATGGGTCTC
Fn-R	AGCAGGTCAGGAATGTTAC
Tjp1-F	CGAGTTGCAATGGTTAACGG
Tjp1-R	CAGGATCTGGGTGACTTACAG
HPRT-F	CTGGTGAAAAGGACCTCTCGAAG
HPRT-R	CCAGTTTCACTAATGACACAAACG

раствор антибиотика-антимикотика (полная среда), в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C (стандартные условия).

Клетки RLS<sub>40</sub> были получены из коллекции клеток ИХБФМ СО РАН (Новосибирск, Россия). Клетки RLS<sub>40</sub> к в полной среде IMDM, содержащей 10% FBS, 1% раствор антибиотика в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Клетки пересеивали каждый три дня для поддержания экспоненциального роста.

### **2.1.6. Лабораторные животные и модели опухолей**

Самцы мышей CBA / LacSto (далее CBA) и C57Bl/6 (далее C57Bl) возрастом 10–14 недель были получены из вивария ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия. Животных содержали по 10 особей в клетке в хорошо освещенном помещении. Мыши имели свободный доступ к еде и воде. Эксперименты с животными проводили согласно директиве ECC Directive 2010/63/EU. Протоколы экспериментов были одобрены Комитетом по этике экспериментов на животных Института цитологии и генетики СО РАН (протокол № 50 от 23.05.2019).

Для экспериментов *in vivo* использовали меланому B16 мыши и лимфосаркому RLS<sub>40</sub>.

## **2.2. Методы**

### **2.2.1. Определение миграционной активности клеток A549, HepG2, MCF-7, HuTu 80, HeLa и B16 под действием РНКазы А и биназы методом зарастания царапины (Scratch assay)**

Клетки A549, HepG2, MCF-7, HuTu80, HeLa человека и B16 мыши высевали в 12-луночные культуральные планшеты ( $2 \times 10^4$  кл/луночку) и выращивали до состояния 95%-ного конфлюэнтного монослоя. В клеточном монослое наносили царапины носиком пипетки на 200 мкл шириной 0.5 мм, монослой трижды промывали PBS для удаления открепленных клеток и инкубировали в среде DMEM, содержащей биназу (2.5–100 мкг/мл) или РНКазу А (2.5 – 10 мкг/мл), при 37°C и 5%-ном насыщении CO<sub>2</sub> в течение 72 ч.

Границы царапины маркировали и фотографировали зоны повреждения каждые 2 ч 24 ч в течение двух суток с помощью микроскопа Zeiss Primo Vert, оснащенного камерой Olympus SC35. Длину зоны миграции оценивали, как разницу между границами царапин через 0 и 72 ч после нанесения повреждения. Площадь миграции оценивали, как отношение площади, заполненной клетками через 72 ч, к начальной площади царапины, относительно контроля. Скорость миграции клеток оценивали путем расчета степени зарастания царапины по формуле:

$v = (1 - X) \times 100\%$ , где  $X$  – отношение свободной площади царапины через 24, 48 и 72 ч к первоначальной площади царапины. Для подсчета использовали программу ImageJ [265].

Для оценки статистической достоверности данных, полученных для контроля и каждой дозы РНКазы А и биназы, получали фотографии в трех независимых экспериментах, данные усредняли, и приводили в виде  $MEAN \pm SE$ .

### **2.2.2. Влияние РНКазы А и биназы на жизнеспособность опухолевых клеток**

Жизнеспособность клеток линии HepG2, MCF-7, KB-1-3, A549, HuTu 80, Hela человека и В16 мыши к РНКазе А и биназе определяли с помощью МТТ теста [266]. Для этого клетки высаживали в 96-луночный планшет по  $2.5 \times 10^3$  клеток на лунку в среде DMEM, содержащей 10% FBS и 1%-ный раствор антибиотиков и антимикотика. Через 24 ч среду заменяли на среду без FBS, добавляли РНКазу А в диапазоне концентраций 20 – 1000 мкг/мл или биназу в диапазоне концентраций 10–1000 мкг/мл и инкубировали при 37°C и 5%-ном CO<sub>2</sub> в течение 48 ч. Далее к клеткам добавляли раствор МТТ до концентрации 0.5 мг/мл и инкубировали в течение 3 – 4 ч в тех же условиях. Среду удаляли, образовавшиеся в клетках кристаллы формазана растворяли в 100 мкл DMSO и измеряли оптическую плотность по разности поглощения на длинах волн  $\Delta$  ( $\lambda 570 - \lambda 630$ ) нм на многоканальном спектрофотометре Multiscan RC (Labsystems, Финляндия). Данные представляли в виде процента живых клеток относительно контроля.

Жизнеспособность клеток линии RLS<sub>40</sub> мышцы к РНКазе А и биназе определяли с помощью WST-теста. Клетки RLS<sub>40</sub> высевали на 96-луночный планшет ( $4 \times 10^4$  кл/лунку) в среде IMDM без сыворотки и добавляли биназу в диапазоне концентраций 50-700 мкг/мл. Планшет инкубировали в стандартных условиях в течение 48 часов. Раствор WST-1 добавляли согласно протоколу производителя, и клетки инкубировали еще 3-4 часа в тех же условиях. Оптическую плотность полученного раствора (А) измеряли при длинах волн 450 и 620 нм на многоканальном спектрофотометре Multiscan RC (Labsystems, Финляндия). Активность митохондриальных дегидрогеназ рассчитывали, как разницу в оптической плотности  $\Delta A = (A_{450} - A_{620})$ . Дыхательная активность необработанных клеток принималась за 100%.

### **2.2.3. Влияние РНКазы А на подвижность, адгезию, инвазию клеток HeLa человека и В16 мышцы и их способность к колониеобразованию**

Анализ подвижности. Клетки В16 и HeLa в среде DMEM без сыворотки высевали в верхнюю камеру 16-луночного СИМ-планшета из расчета  $2 \times 10^4$  кл/лунку и добавляли РНКазу А в концентрациях 2.5, 5 и 10 мкг/мл. Для стимуляции подвижности клеток в нижнюю камеру СИМ-планшета вносили DMEM, содержащую 10% FBS в качестве хемоаттрактанта. Индекс клеток (электрический импеданс) отслеживали в реальном времени с помощью прибора xCelligence System (ACEA Biosciences, Сан-Диего, США) в течение 48 ч [267].

Анализ адгезии. Клетки В16 и HeLa в среде DMEM, содержащей 10% FBS, высевали в 24-ти луночный планшет из расчета  $0.5 \times 10^6$  кл/лунку и инкубировали в присутствии РНКазы А (2.5, 5 и 10 мкг/мл) в течение 24 ч. Клетки обрабатывали трипсином и ресуспендировали в 1 мл среды DMEM. 100 мкл клеточной суспензии вносили в лунку 96-ти луночного планшета и оставляли для прилипания на 1 ч при 37°C. Далее к клеткам добавляли раствор МТТ до концентрации 0.5 мг/мл и инкубировали в течение 3 – 4 ч в тех же условиях. Среду удаляли, образовавшиеся в клетках кристаллы формазана растворяли в 100 мкл DMSO и измеряли оптическую плотность по разности поглощения на длинах волн  $\Delta(\lambda_{570} - \lambda_{630})$  нм на

многоканальном спектрофотометре Multiscan RC (Labsystems, Финляндия). Данные представляли в виде процента живых клеток относительно контроля.

Анализ инвазии. Анализ инвазии клеток В16 и HeLa проводили в 16-ти луночном СИМ-планшете, предварительно покрытом матригелем. Клетки В16 и HeLa высаживали в верхнюю камеру СИМ-планшета в среде DMEM, не содержащей сыворотки и антибиотика, из расчета  $0.2 \times 10^5$  кл/лунку. В нижнюю камеру вносили среду DMEM, содержащую 10% FBS. В верхнюю камеру добавляли РНКазу А в концентрациях 2.5, 5 и 10 мкг/мл и инкубировали клетки в течение 48 ч. Анализ инвазии проводили в реальном времени с помощью прибора xCELLigence DP (Roche Diagnostics, Германия).

Анализ образования колоний. Клетки В16 и HeLa высаживали в 96-ти луночный планшет из расчета 200 кл/лунку в среде DMEM с 10% FBS, добавляли РНКазу А в диапазоне концентраций 0.625 – 10 мкг/мл и инкубировали в течение 14 и 8 дней, соответственно, в стандартных условиях. Среду удаляли, клеточные колонии фиксировали 4%-ным параформальдегидом, окрашивали кристаллическим фиолетовым (0.1 % масс. /об.) и фотографировали с использованием iBright™ CL1500 Imaging Systems (Thermo Fisher Scientific, США). Процент площади, покрытой колониями клеток, рассчитывали с помощью плагина ColonyArea ImageJ [268].

#### **2.2.4. Исследование влияния биназы на запуск апоптоза в клетках RLS<sub>40</sub>**

Клетки RLS<sub>40</sub> высаживали в 24-х луночный планшет в среде IMDM с 10% FBS, не содержащей раствора антибиотика-антимикотика, из расчета  $1.5 \times 10^6$  кл/лунку, добавляли биназу (500 мкг/мл) и инкубировали в течение 48 ч в стандартных условиях. Апоптоз в клетках измеряли с использованием Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit согласно протоколу фирмы-производителя. Среду удаляли, клетки суспендировали в связывающем буфере, окрашивали FITC-конъюгированным аннексином V и PI в течение 15 мин в темноте и сразу же анализировали с использованием проточного цитометра NovoCyte (ACEA).

### **2.2.5. Определение активности каспаз-3/-7 и количества каспаза-3/-7-положительных клеток**

Определение активности каспаз-3/-7. Активность каспаз-3/-7 в клетках RLS<sub>40</sub> оценивали с использованием набора для анализа Caspase-Glo® 3/7 в соответствии с инструкциями фирмы производителя. Клетки высаживали в непрозрачный 96-ти луночный планшет из расчета  $0.4 \times 10^5$  кл/лунку и инкубировали в среде IMDM, не содержащем FBS и раствора антибиотика-антимикотика, в присутствии биназы в концентрациях 500 и 700 мкг/мл в течение 48 ч при стандартных условиях. После завершения инкубации в каждую лунку вносили 100 мкл реагента Caspase-Glo® 3/7. Планшет осторожно встряхивали в течение 30 секунд на миксере, а затем инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре в темноте. Люминесценцию регистрировали с помощью прибора CLARIOstar (BMG Labtech, Германия).

Определение количества каспаза-3/-7-положительных клеток. Клетки RLS<sub>40</sub> высаживали в непрозрачный 96-ти луночный планшет из расчета  $0.4 \times 10^5$  кл/лунку и инкубировали в среде IMDM, не содержащем FBS и раствора антибиотика-антимикотика, в присутствии биназы в концентрациях 500 и 700 мкг/мл в течение 48 ч при стандартных условиях. В каждую лунку планшета вносили реагент CellEvent® Caspase-3/7 Green и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте. Количество каспаза-3/-7-положительных клеток анализировали с использованием проточного цитометра NovoCyte (ACEA Biosciences Inc., США).

### **2.2.6. Влияние РНКазы А на содержание внутриклеточной РНК в клетках В16 и HeLa**

Клетки В16 и HeLa в среде DMEM, содержащей 10% FBS и 1% раствор антибиотика и антимикотика, высаживали в 24-х луночный планшет на покровные стекла из расчета  $0.5 \times 10^5$  кл/лунку, добавляли РНКазуА в концентрации 1, 5 и 20 мкМ и инкубировали в течение 4 и 48 ч в стандартных условиях, фиксировали в холодном метаноле в течение 10 мин при  $-20^{\circ}\text{C}$  и дважды промывали PBS. Клетки окрашивали 0.5 мкМ SYTO RNASelect (Molecular Probes, США) в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте [169]. Клетки трижды

промывали PBS и помещали на предметные стекла в каплю ProLong Glass с NucBlue (Invitrogen, США). Образцам давали высохнуть на плоской сухой поверхности в течение 18-24 ч при комнатной температуре в темноте. Интенсивность флуоресценции анализировали с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии на микроскопе LSM710 (Zeiss, Германия) и программного обеспечения Image J. Интенсивность флуоресценции (FI) рассчитывали по уравнению:

$$FI, \% = (RFU_{\text{эксперимент}}/RFU_{\text{контроль}}) \times 100\%$$
, где  $RFU_{\text{контроль}}$  - интенсивность флуоресценции необработанных клеток,  $RFU_{\text{эксперимент}}$  - интенсивность флуоресценции клеток, обработанных РНКазой А.

### **2.2.7. Конъюгация РНКазы А с биотином**

РНКазу А (из бычьей поджелудочной железы, лиофилизированную, 13700 г/мл, Sigma-Aldrich, США) конъюгировали с биотином с использованием реагента EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (ThermoScientific) в соответствии с протоколом производителя. Вкратце, 3 мг РНКазы А, разведенной в 900 мкл 0.1 М  $\text{NaHCO}_3$ , pH 8.3, смешивали с 2.44 мг EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (ThermoFisher, США), разведенной в 100 мкл воды milliQ, и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Конъюгат РНКазы А-биотин очищали центрифугированием на колонках Amicon Ultra 10K MWCO (Millipore, США) по протоколу производителя. Степень конъюгации биотина с РНКазой А оценивали с помощью вестерн-блоттинга. РНКазы А после конъюгации с биотином сохраняла свою рибонуклеазную активность, что подтверждалось расщеплением miR-21-3'-FAM.

### **2.2.8. Исследование проникновения конъюгата РНКазы А-биотин в опухолевые клетки и его ко-локализации с рибонуклеазным ингибитором (RI) с помощью конфокальной микроскопии**

Клетки В16 и HeLa высаживали в полной среде DMEM на покровные стекла в 24-луночный планшет из расчета  $0.4 \times 10^5$  кл/луночку и культивировали в стандартных условиях в

течение ночи. Культуральную среду заменяли средой DMEM, не содержащей сыворотки и раствора антибиотика-антимикотика, добавляли 20 мкМ конъюгата РНКазы А-биотин и клетки инкубировали в стандартных условиях в течение 4 ч.

После завершения инкубации клетки промывали PBS, фиксировали в 4% формальдегиде в течение 20 мин при 37°C и дважды промывали PBS. Клетки были пермеабелизованы путем инкубации в буфере для пермеабелизации в течение 10 мин при комнатной температуре в темноте. После этого клетки дважды промывали PBS и инкубировали с блокирующим буфером в течение 30 мин в тех же условиях. К клеткам добавляли кроличьи поликлональные антитела против RI (RAI, Ab217132, Abcam, США) (1: 300) и инкубировали в течение 1-2 часов в тех же условиях. Затем клетки промывали PBS и инкубировали с козьими антикроличьими антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488 (Ab150077, Abcam, США) и eBioscience™ Streptavidin APC (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 30 мин в тех же условиях. После этого клетки трижды промывали PBS и помещали на предметные стекла в капле ProLong Glass с NucBlue (Thermo Fisher Scientific, США). Приготовленным образцам давали высохнуть на плоской сухой поверхности в течение 18-24 ч при комнатной температуре в темноте.

Внутриклеточную локализацию РНКазы А и RI оценивали с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии на микроскопе LSM710 (Zeiss, Германия) с использованием планапохроматного объектива 63x/1.40 Oil DIC M27. Анализ внутриклеточного накопления РНКазы А проводили с помощью программного обеспечения ZEN (Zeiss, Германия). Конфокальный анализ проводился в трех каналах (синий, зеленый, красный). Флуоресценция в синем канале соответствовала NucBlue (окрашивание ядер); в зеленом канале - RI, окрашенного антителами с Alexa Fluor 488; а красный канал – конъюгату РНКазы А-биотин, окрашенной стрептавидином-APC.

### 2.2.9. Исследование накопления конъюгата РНКазы А-биотин в опухолевых клетках с помощью проточной цитометрии

Клетки В16 и HeLa высаживали в полной среде DMEM в 24-х луночный планшет из расчета  $0.4 \times 10^5$  кл/лунку и культивировали в стандартных условиях в течение ночи. Культуральную среду заменяли средой DMEM, не содержащей сыворотки и раствора антибиотика-антимикотика, добавляли 1 - 20 мкМ конъюгата РНКазы А-биотин и клетки инкубировали в стандартных условиях в течение 4 ч. Клетки подготавливали к окрашиванию Streptavidin APC, как описано в п.2.2.7. К клеткам добавляли eBioscience™ Streptavidin APC (Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. Клетки промывали PBS и анализировали с помощью проточной цитометрии с использованием FC 500 (Beckman Coulter, США). Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения CXP Analysis (Applied Cytometry Systems, Великобритания), как описано в [269].

Интенсивность флуоресценции отдельных клеток измеряли в относительных единицах флуоресценции (RFU). Все эксперименты были проведены в трех экземплярах для статистического анализа; стандартное отклонение среднего не превышало 5%. Эффективность накопления конъюгата РНКазы А характеризовали процентным содержанием FAM-положительных клеток и интенсивностью флуоресценции в образце. Процент FAM-положительных клеток в анализируемых образцах рассчитывали по формуле:

$$\text{FAM} + (\%) = \text{FAM} +_{\text{образец}} (\%) - \text{FAM} +_{\text{контроль}} (\%),$$
 где  $\text{FAM} +_{\text{образец}} (\%)$  - процент флуоресцентно-положительных клеток в анализируемом образце, а  $\text{FAM} +_{\text{контроль}} (\%)$  - процент флуоресцентно-положительных клеток в отрицательном контроле.

Интенсивность флуоресценции клеток рассчитывали по уравнению:

$$\text{FI (RFU)} = \text{FI}_{\text{образец}} (\text{RFU}) - \text{FI}_{\text{контроль}} (\text{RFU}),$$
 где  $\text{FI}_{\text{образец}} (\text{RFU})$  — это средняя флуоресценция клеток в анализируемом образце, а  $\text{FI}_{\text{контроль}} (\text{RFU})$  - средняя флуоресценция

клеток в отрицательном контроле. Клетки, инкубированные в отсутствие РНКазы А, использовали в качестве отрицательного контроля.

#### **2.2.10. Исследование ко-локализации конъюгата РНКазы А-биотин с димерным белком Ku70/Ku80**

Клетки В16 и HeLa инкубировали с конъюгатом РНКазы А-биотин (20 мкМ) и подготавливали к окрашиванию антителами, как описано в п. 2.2.7. Клетки окрашивали Ku70/Ku80 Monoclonal Antibody (162) (MA1-21818, Thermo Fisher Scientific, США) (1: 100) и инкубировали в течение 1 или 2 ч при комнатной температуре в темноте. Затем клетки промывали PBS и инкубировали с Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 488 (A32723, Abcam, США) и eBioscience™ Streptavidin APC (Thermo Fisher Scientific, США). Внутриклеточную локализацию РНКазы А и Ku 70/Ku 80 оценивали с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии, как описано в п.2.2.7.

Конфокальный анализ проводился в трех каналах (синий, зеленый, красный). Флуоресценция в синем канале соответствовала NucBlue (окрашивание ядер); в зеленом канале - Ku 70/Ku 80, окрашенного антителами с Alexa Fluor Plus 488; а красный канал – конъюгату РНКазы А-биотин, окрашенной стрептавидином-APC.

#### **2.2.11. Исследование влияния РНКазы А и биназы на профиль мРНК в клетках RLS<sub>40</sub>, В16 и HeLa**

Клетки RLS<sub>40</sub> в полной среде IMDM высаживали в 12-луночный планшет из расчета  $1.5 \times 10^6$  кл/лунку. К клеткам добавляли биназу в концентрациях 5 и 10 мкг/мл и инкубировали в стандартных условиях (5% CO<sub>2</sub> при 37°C) в течение 24 ч.

Клетки В16 и HeLa в полной среде DMEM высаживали в 12-луночный планшет из расчета  $1.5 \times 10^6$  кл/лунку. К клеткам добавляли РНКазу А (5 мкг/мл) и инкубировали в стандартных условиях (5% CO<sub>2</sub> при 37°C) в течение 48 ч. Клетки собирали центрифугированием и использовали для выделения суммарной клеточной РНК.

## 2.2.12. Работа с опухолевыми моделями мыши

### 2.2.12.1. Трансплантация опухолей

Лимфосаркома RLS<sub>40</sub>. Клетки RLS<sub>40</sub> (10<sup>6</sup> кл/мл в 0.1 мл в физ./р-ре) имплантировали в/м в правую бедренную мышцу мышам линии СВА (самкам/самцы) для формирования солидной опухоли или в/б для формирования опухоли в асцитной форме. Мышей выводили из эксперимента на 18 день развития опухолей.

Метастатическая меланома B16. Клетки B16 (10<sup>5</sup> кл в 0.2 мл PBS) трансплантировали в/в в хвостовую вену мышам линии C57Bl/6J (самкам/самцам). Мышей выводили из эксперимента на 15 день после трансплантации.

Эксперименты на мышах по прививанию опухолей проводили при содействии к.м.н. Сеньковой А.В. (Лаборатория биохимии нуклеиновых кислот, ИХБФМ СО РАН, Новосибирск). Внутривенные инъекции проводила к.м.н. Сенькова А.В.

### 2.2.12.2. Определение параметров опухолевого роста

В ходе эксперимента, как только опухоли начинали пальпироваться, каждые 2 - 3 дня проводили измерение их объема с помощью штангенциркуля. Объем опухоли подсчитывали, используя отношение ( $\pi/6 \times \text{длина} \times \text{высота} \times \text{ширина}$ ) [270]. По окончании каждого эксперимента мыши были препарированы, опухоли изъяты и взвешены. Вес опухоли определяли как разницу между весом лапы с опухолью и противоположной лапы без опухоли. Процент подавления роста опухоли вычисляли по формуле:

$$\text{Ингибирование роста опухоли (\%)} = \left( \frac{\text{Средний вес опухоли}_{\text{контроль}} - \text{Средний вес опухоли}_{\text{эксперимент}}}{\text{Средний вес опухоли}_{\text{контроль}}} \right) \times 100.$$

### *2.2.12.3. Исследование противоопухолевой активности биназы на модели RLS<sub>40</sub> с первичным опухолевым узлом*

Солидные опухоли RLS<sub>40</sub> индуцировали, как описано в п. 2.2.11.1. Животных с RLS<sub>40</sub> делили на группы (n=10), и, начиная с четвертого дня после имплантации опухоли, животные получали следующие инъекции: группа 1 (контроль 1) – физ/раствор (0.1 мл) в/б; 2 и 3 – биназу в дозах 0.5 и 1 мг/кг в/б, соответственно. Инъекции проводили три раза в неделю в течение 2 недель, всего 7 инъекций.

Размер опухоли контролировали через день с использованием штангенциркуля. Образцы крови забирали из ретроорбитаного синуса через 1 ч после последней инъекции биназы. После окончания эксперимента печень, почки, селезенку, тимус и опухоли изымали, фиксировали в 4%-ном параформальдегиде для дальнейшего гистологического и морфометрического анализа. Часть образцов забирали для выделения суммарной РНК.

### *2.2.12.4. Исследование противоопухолевой активности РНКазы А на метастатической модели меланомы В16*

Метастатическую модель меланомы В16 индуцировали, как описано в п. 2.2.11.1. Животных с В16 делили на группы (n=10), и, начиная с четвертого дня после имплантации опухоли, животные получали следующие инъекции: группа 1 (контроль 1) – физ/раствор (0.1 мл) в/м; 2 и 3 – РНКазу А в дозах 0.7 и 7 мкг/кг в/в, соответственно. Инъекции проводили по схеме 5+2 (5 дней инъекции, 2 дня перерыв), всего 11 инъекций.

Образцы крови забирали из ретроорбитаного синуса на 15 день после имплантации опухоли через 1 час после последней инъекции РНКазы А. После окончания эксперимента легкие изымали и фиксировали в 4%-ном параформальдегиде для дальнейшего гистологического и морфометрического анализа. Часть образцов забирали для выделения суммарной РНК. Количество поверхностных метастазов в легких подсчитывали с помощью бинокулярного микроскопа.

### 2.2.12.5. Гистология и морфометрия

Гистологический и морфометрический анализ проводился к.м.н. Сеньковой А.В. (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия). Для гистологического и морфометрического анализа образцы тканей (печени, почек, селезенки, тимуса и опухоли) фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине (BioVitrum, Россия), обезвоживали в восходящих этанолах и ксилолах и заливали парафином HISTOMIX (BioVitrum, Россия). Парафиновые срезы (5 мкм) нарезают на микротоме Microm HM 355S (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США) и окрашивают гематоксилином и эозином. Для иммуногистохимического исследования срезы опухоли (3-4 мкм) депарафинизировали и регидратировали. Извлечение антигена проводили после воздействия в микроволновой печи при 700 Вт. Образцы инкубировали с моноклональными антителами anti-PCNA (2139510, Sony Biotechnology, США), anti-caspase-3 (ab2302, Abcam, США) и anti-caspase-7 (MAB823, R&D Systems, США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Затем срезы инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) (HRP производства Abcam, США); подвергали воздействию субстрата 3,3'-диаминобензидина (DAB) и окрашивали гематоксилином Майера. Все изображения исследовали и сканировали с помощью микроскопа Axiostar Plus, оснащенного цифровой камерой AxioCam MRc5 (Zeiss, Германия), при увеличениях  $\times 100$  и  $\times 400$ .

Для иммуногистохимического исследования срезы легких (3–4 мкм) депарафинизировали и регидратировали. Извлечение антигена проводили после воздействия в микроволновой печи при 700 Вт. Образцы инкубировали с моноклональными антителами anti-E-cadherin (ab76055, Abcam, США) и anti-Vimentin (ab92547, Abcam, США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Затем срезы инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor®488, и помещали в Fluoromount-G™ Mounting Medium (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США). Все изображения исследовали и сканировали с помощью микроскопа Axiostar Plus, оснащенного люминесцентной лампой HBO 50W/AC L1 (Osram, Германия) и цифровой

камерой Axioscam MRc5 (Zeiss, Германия) при увеличении  $\times 100$  (изображения гематоксилина и эозина) и  $\times 200$  (иммуногистохимия на основе флуоресценции).

Процент площади внутренних метастазов определяли по отношению к общей площади срезов с помощью программного обеспечения Adobe Photoshop. Ингибирование развития метастазов оценивали с использованием индекса ингибирования метастазирования (ИИМ), рассчитанного по формуле:

$$\text{ИИМ} = \left[ \frac{\text{Средняя площадь метастазов}_{\text{эксперимент}} - \text{Средняя площадь метастазов}_{\text{контроль}}}{\text{Средняя площадь метастазов}_{\text{контроль}}} \right] \times 100\%$$

ИИМ контрольной группы отражал отсутствие ингибирования метастазов и соответствовал 0 %.

Морфометрический анализ срезов опухоли, селезенки и тимуса выполняли путем подсчета точек с использованием морфометрической сетки, которая состоит из 100 точек тестирования в области тестирования, равной  $3.2 \times 10^6$  мкм<sup>2</sup>. Морфометрический анализ опухолевой ткани включал оценку объемной плотности ( $V_v, \%$ ) неизменной опухолевой ткани, лимфоидной инфильтрации, некроза и числовой плотности ( $N_v$ ) митозов и PCNA-положительных клеток в опухолевой ткани. Морфометрический анализ селезенки включал оценку объемной плотности ( $V_v, \%$ ) красной пульпы, белой пульпы и диаметра лимфоидных фолликулов ( $m$ ). Морфометрический анализ тимуса включал оценку объемной плотности ( $V_v, \%$ ) коркового и мозгового вещества с последующим расчетом индекса коркового/мозгового вещества. Гистологическое исследование печени и почек включало оценку деструктивных изменений (дистрофия и некроз) гепатоцитов и эпителиоцитов в проксимальных канальцах.

Объемная плотность ( $V_v, \%$ ) исследуемой гистологической структуры рассчитывалась по следующей формуле:  $V_v = (P_{\text{структура}} / P_{\text{тест}}) \times 100\%$ , где  $P_{\text{структура}}$  обозначает количество точек над структурой, а  $P_{\text{тест}}$  обозначает общее количество контрольных точек, в данном случае 100. Числовая плотность ( $N_v$ ) исследуемой гистологической структуры рассчитывалась как

количество частиц в единице объема ткани (количество частиц в единице квадрата, в данном случае  $3.2 \times 10^6$  мкм<sup>2</sup>). Каждая изучаемая группа включала 20 мышей, в каждом образце органа было изучено 10 случайных полей, что в общей сложности сформировало 200 тестовых полей для каждой группы мышей.

#### *2.2.12.6. Исследование влияния биназы на биохимические параметры крови лабораторных мышей*

Биохимические показатели сыворотки крови экспериментальных животных с RLS<sub>40</sub>, получавших инъекции биназы, оценивали с помощью автохимического анализатора НТИ BioChem FC-200 (НТИ, США). В сыворотке крови определяли уровни АЛТ (НТ-A206-120, НТИ, США), АСТ (НТ-A109-120, НТИ, США), щелочной фосфатазы (НТ-A205-120, НТИ, США), общего белка (НТТ251-125, НТИ, США), креатинина (НТ-C225-250, НТИ, США) и азот мочевины крови, BUN (НТ-B253-150, НТИ, США).

#### **2.2.13. Обработка образцов и выделение РНК**

Получение сыворотки крови. Кровь собирали с помощью канюли из ретро-орбитального синуса экспериментальных животных и использовали для получения сыворотки. Сыворотку крови получали методом формирования тромба при 37 °С в течение 30 мин с последующей инкубацией при 4 °С в течение ночи. Тромб извлекали и сыворотку центрифугировали (1500 g, 4 °С, 20 мин). Образцы сывороток хранили при -70 °С. Образцы сывороток объединяли по группам.

Выделение РНК. Выделение вРНК из сыворотки крови, суммарной клеточной РНК из клеток RLS<sub>40</sub>, В16 и HeLa и образцов тканей опухоли RLS<sub>40</sub>, ткани легких с метастатическими очагами В16 и прилегающей ткани легких проводили с использованием реагента TRIzol (Invitrogen, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Образцы солидных опухолей RLS<sub>40</sub> предварительно гомогенизировали.

Клетки ( $5-10 \times 10^6$ ) осаждали центрифугированием при 450 g. в течение 5 мин. Супернатант удаляли, к осадку клеток добавляли 1 мл TRIzol, тщательно перемешивали и инкубировали при 24 °C в течение 5 мин. Далее к образцу добавляли 0.2 мл хлороформа, встряхивали и инкубировали при 24 °C в течение 3 мин. Водную фазу отделяли от органической центрифугированием (12000 g, 4 °C, 15 мин). РНК осаждали из водной фазы 0.5 объемами изопропанола при 24 °C в течение 10 мин. Осадок РНК отделяли центрифугированием (12000 g, 4 °C, 5 мин), промывали 75%-ным этанолом, высушивали при 24 °C в течение 5-10 мин и растворяли в H<sub>2</sub>O milli Q, хранили при -20 °C.

Концентрацию РНК в образцах измеряли спектрофотометрически при 260 и 280 нм с использованием спектрофотометра Bio Mate 3 (Thermo Electron Corporation) и Qubit (Invitrogen, США). Целостность и количество общей РНК проверяли с помощью Bioanalyzer (Agilent Technologies, США).

#### **2.2.14. Определение уровня миРНК с помощью stem-loop ОТ-qПЦР**

Уровень миРНК в сыворотке крови, клетках и тканях анализировали с помощью stem-loop ПЦР [263,271]. Реакция смесь объемом 40 мкл содержала 5 мкг суммарной РНК или вРНК, 5×RT-буферов, 100 единиц обратной транскриптазы M-MuLV-RN и 0.05 мкМ специфичных для миРНК праймеров стебель-петля (Таблица 3). Реакционную смесь инкубировали: 16°C, 30 мин; 30°C, 30 с; 42°C, 30 с, 40 циклов; 85° C, 5 мин.

Реакционная смесь для ПЦР объемом 20 мкл содержала 2×BioMaster HS-qPCR SYBR Blue («Биолабмикс», Россия) и 0.05 мкМ прямых миРНК-специфичных праймеров и универсального обратного праймера (Таблица 4). Условия ПЦР были следующими: 95°C, 5 мин; 95°C, 15 с; 58°C, 15 с, 40 циклов; 72°C, 30 с; 75°C, 15 с. Полученные данные ПЦР анализировали с помощью стандартной программы Bio-Rad iQ5 v.2.0 (Bio-Rad Laboratories, США). Для каждого образца определяли пороговый цикл (Ct). Количественную оценку уровня представленности транскриптов и относительной экспрессии миРНК в опухолевых клетках и

опухолевой ткани проводили путем сравнения значений  $C_t$  для миРНК и U6 мяРНК. Концентрацию миРНК в сыворотке нормализовали на объем сыворотки.

### **2.2.15. Определение уровня экспрессии генов-маркеров EMT с помощью ОТ-кПЦР**

Реакционная смесь объемом 40 мкл содержала 5 мкг суммарной клеточной РНК, 5×RT-буфер, 100 единиц обратной транскриптазы M-MuLV-RN и 0.05 мкМ гексапраймера. Реакцию обратной транскрипции проводили в следующих условиях: 16°C, 30 мин; 30°C, 30 с; 42 ° C, 30 с, 40 циклов; 85°C, 5 мин.

Реакционная смесь для ПЦР объемом 25 мкл содержала 2×BioMaster HS-qPCR SYBR Blue (Biolabmix, Россия) и 0.05 мкМ прямых и обратных специфических праймеров для Cdh1, Tjp1, Fn и Vim (Таблица 4). Условия ПЦР были следующими: 95°C, 5 мин; 95°C, 10 с, 51°C, 30 с, 40 циклов; 72°C, 30 с. Полученные данные ПЦР анализировали с помощью программы CFX Maestro для ПЦР в реальном времени CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США). Для каждого образца определяли пороговый цикл ( $C_t$ ). Количественная оценка проводилась путем сравнения значений  $C_t$  для генов EMT и гена HPRT.

### **2.2.16. Молекулярное моделирование взаимодействия РНКазы А с гетеродимером Ku 70/Ku 80**

Моделирование способности РНКазы А связываться с гетеродимером Ku 70/Ku 80 проводилось совместно с к.б.н. Марковым А.В. (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск). Для этого кристаллические структуры РНКазы А (1FS3) и гетеродимера Ku 70/Ku 80 (1JEQ), полученные из базы данных Protein Data Bank, были освобождены от молекул воды с помощью BIOVIA Discovery Studio. Их способность связываться друг с другом была проанализирована с помощью двух независимых серверных платформ HDOCK (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>) и PatchDock (<https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>), основанных на разных алгоритмах - гибридном алгоритме стыковки и принципе комплементарности поверхности, соответственно.

По окончании молекулярного моделирования с помощью программного обеспечения Chimera/BIOVIA визуализировали 10 лучших белковых структур.

### **2.2.17. Предсказание мишеней миРНК и функциональный анализ**

Гены-мишени миРНК, изменяющиеся в опухоли под действием биназы, были предсказаны с помощью плагина CyTargetLinker v. 4.1.0 [272] на основе взаимодействий с миРНК-мишенями, депонированных в экспериментально проверенной базе данных miRTargetBase v. 8.0 (*Mus musculus*) [273].

Гены-мишени миРНК, изменяющиеся в опухоли под действием РНКазы А, были предсказаны с использованием четырех независимых баз данных миРНК, включая miRmap (<https://mirmap.ezlab.org/app/>), miRSystem (<http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw/>), miRDB (<http://mirdb.org/>) и miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) с последующим анализом диаграммы Венна с использованием инструмента Venny 2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>).

Полученную сеть регуляторных взаимодействий визуализировали с помощью Cytoscape v. 3.7.2 и 3.9.0 (The Cytoscape Consortium, США). Функциональный анализ выявленных генов-мишеней проводили с помощью плагина ClueGO v. 2.5.4 в Cytoscape [274]. Гены были картированы в Gene Ontology (Biological Processes) (Gene Ontology Consortium, США), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Kyoto University and University of Tokyo, Biomolecules 2020, 10, 1509 6 из 21 Япония), REACTOME (The Reactome group, США и Великобритания) и WikiPathways (The WikiPathway Team, США, Нидерланды, Австрия, Бразилия). Обогащение терминов было проверено с помощью двустороннего гипергеометрического теста, который был скорректирован с использованием метода Бонферрони. В анализ были включены только термины с  $p \leq 0.05$ . Функциональная группировка и связывание расширенных терминов были выполнены с помощью каппа-статистики (каппа-оценка = 0.4). Общие ключевые гены были проанализированы с точки зрения их участия в

путях и событиях, связанных с опухолевой прогрессией, с использованием баз данных GeneCards [275] и KEGG [276].

### **2.2.18. Статистика**

Для статистической обработки данных использовали t-тест Стьюдента и односторонний дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. Значение  $p < 0.05$  отражало статистически значимые различия. Для статистического анализа использовали программа STATISTICA 10.0.

## **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

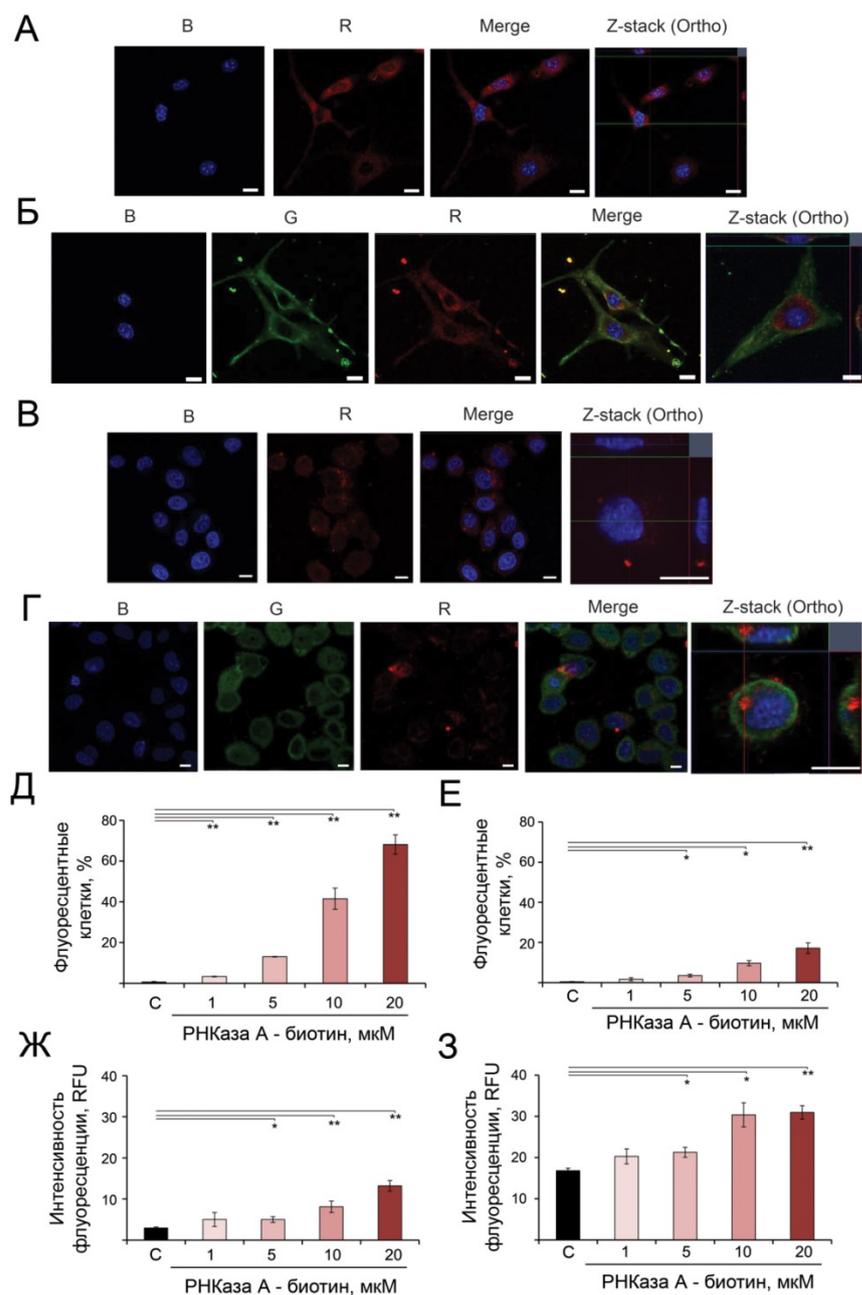
### **3.1. Исследование влияния РНКазы А на снижение злокачественного потенциала опухолей**

#### **3.1.1. Линии опухолевых клеток, использованные в работе**

В работе использовали семь линий опухолевых клеток человека и мыши: аденокарциномы легких А549, эпидермоидной карциномы шейки матки HeLa, гепатоцеллюлярной карциномы HepG2, рака молочной железы MCF-7 и аденокарциномы двенадцатиперстной кишки HuTu80 человека, растущие в виде монослоя; суспензионную культуру лекарственно-устойчивой лимфосаркомы RLS<sub>40</sub> и культуру меланомы B16 мыши, растущую в виде монослоя. Клетки RLS<sub>40</sub> и B16 использовали в экспериментах *in vitro*, поскольку именно на этих опухолевых моделях предполагалось исследование противоопухолевой и антиметастатической активности биназы и бычьей панкреатической РНКазы А *in vivo*.

#### **3.1.2. Внутриклеточное накопление и локализация конъюгата РНКазы А-биотин и его взаимодействие с RI в клетках B16 и HeLa**

На первом этапе было исследовано проникновение и внутриклеточное накопление РНКазы А на клетках двух клеточных линий - меланомы B16 мыши нейроэктодермального происхождения и клетках эпидермоидной карциномы человека HeLa эпителиального происхождения - с помощью конфокальной микроскопии. Для этой цели был получен конъюгат РНКазы А с биотином, и было показано, что этот конъюгат сохраняет рибонуклеазную активность. Клетки B16 и HeLa инкубировали в присутствии конъюгата РНКазы А-биотин в течение 4 ч, окрашивали стрептавидином-APC для визуализации местоположения РНКазы А (панель R), антителами к RI (панель G), NucBlue для визуализации ядер (панель B) и анализировали с помощью конфокальной микроскопии (Рис. 7, А-Г).



**Рис 7.** Накопление РНКазы А клетках В16 и HeLa и локализация с RI. Флуоресцентная визуализация РНКазы А и RI в клетках В16 (А и Б) и HeLa (В и Г). Клетки В16 и HeLa инкубировали в присутствии конъюгата РНКазы А - биотин (20 мкМ) в течение 4 ч, окрашивали NucBlue, стрептавидином-APC и FITC-mAb к RI и анализировали с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии. В - NucBlue; G – RI-FITC, R – APC (конъюгат РНКазы А–биотин/стрептавидин). Масштаб: 10 мкм. Эффективность проникновения конъюгата РНКазы А - биотин в клетки В16 (Д и Ж) и HeLa (Е и З). Клетки В16 и HeLa инкубировали с конъюгатом в (1 - 20 мкМ) при 37°C в течение 4 ч и анализировали с помощью проточной цитометрии. Данные представлены как MEAN ± SEM. Данные анализировали с помощью t-теста Стьюдента. Статистически достоверными считали данные с \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . С (контроль) – клетки, инкубированные в отсутствие РНКазы А.

Полученные данные показали, что РНКазы А эффективно накапливаются в цитозоле как клеток В16, так и клеток HeLa (Рис. 7, А и В, R). В клетках В16 РНКазы А равномерно распределены по всей цитоплазме, тогда как в клетках HeLa часть РНКазы А локализована вблизи ядра (Рис. 7, А, В). RI локализуется по всей цитоплазме клеток (Рис. 7, Б, Г, G). После проникновения в клетки В16 РНКазы А практически полностью связывается с RI (Рис. 7, Б Merge и Z-stack). Интересно, что в клетках HeLa только часть РНКазы А связана с RI в области, близкой к ядру (Рис. 7, Г, Merge), тогда как вблизи цитоплазматической мембраны РНКазы А остаются в свободном состоянии (Рис. 7, Г, Z-stack, красный сигнал).

Интересным фактом является то, что конъюгат РНКазы А с биотином накапливается в клетках В16 и HeLa с разной эффективностью, как это показали данные проточной цитометрии (Рис. 7, Д - З). При низких концентрациях конъюгата РНКазы А-биотин (1 – 5 мкМ) количество флуоресцентных клеток составило 3 – 13 % для В16 и 2 – 4 % для HeLa (Рис. 7, Д, Е). Увеличение концентрации конъюгата до 10 и 20 мкМ приводило к существенному увеличению эффективности его накопления в клетках В16 (42% и 68% соответственно), однако, уровень накопления конъюгата в клетках HeLa составил 10% и 17%, соответственно (Рис. 7, Д, Е). Уровни интенсивности флуоресценции увеличивались с увеличением концентрации конъюгата РНКазы А-биотин в среде, достигая 13.2 и 30.0 RFU для клеток В16 и HeLa соответственно (Рис. 7, Ж, З).

Таким образом, четко продемонстрировано, что РНКазы А проникают в клетки В16 и HeLa, а эффективность ее внутриклеточного накопления коррелирует с концентрацией РНКазы А в клеточной среде. В клетках В16 РНКазы А оказывается большей частью связанной с RI, тогда как в клетках HeLa большее количество РНКазы А остается в свободном состоянии.

### **3.1.3. Взаимодействие РНКазы А с гетеродимером Ku70/Ku80: молекулярное моделирование и внутриклеточное поведение**

Ku белок является одним из клеточных белков, выполняющих множество функций, внутриклеточная концентрация которого составляет 1.5 мкМ [277]. Ku белок представляет

собой комплекс, состоящий из двух тесно связанных субъединиц, названных Ku70 и Ku80 [278], локализованных как в цитозоле, так и в ядре. Гетеродимерный белок Ku70/Ku80 долгое время считался ядерным белком, играющим роль в репарации ДНК [279], тем не менее, в настоящее время появилось много свидетельств, что Ku белок выполняет и другие функции в цитозоле и на внешней мембране: распознавание цитозольной ДНК и последующая активация врожденного иммунного ответа [280], регуляция апоптоза и митоза [281], участие в гипоксии, метаболизме и воспалительных реакциях [282]. Ku белок способен распознавать шпилечную РНК, хотя и менее эффективно, чем двухцепочечную ДНК [283], поэтому он считается РНК-связывающим белком.

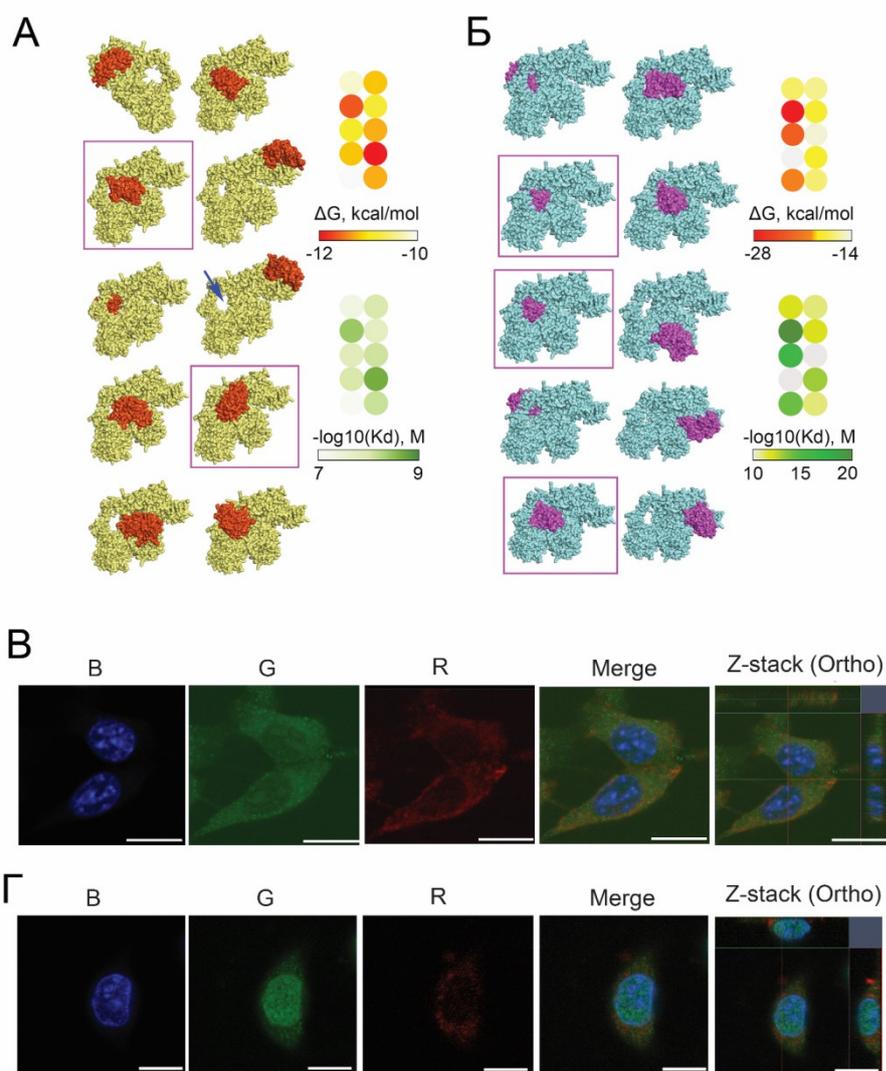
В недавних работах было продемонстрировано, что некоторые клетки млекопитающих используют Ku белок в ассоциированной с мембраной форме для взаимодействия со своим микроокружением, состоящим из других клеточных компонентов и внеклеточного матрикса (ECM) [284]. Существуют свидетельства того, что Ku белок также может играть роль в миграции и инвазии опухолевых клеток. Сообщалось об участии ассоциированного с мембраной Ku70/Ku80 в межклеточном взаимодействии [285–287]. В нескольких исследованиях было показано присутствие гетеродимера Ku70/Ku80 на поверхности различных опухолевых клеток, включая лейкоз, множественную миелому и клеточные линии солидных опухолей [286–288]. Существуют данные, что функция Ku-белка на поверхности клетки, вероятно, играет важную роль в инвазии опухоли [289].

Учитывая все вышесказанное, представлялось интересным изучить участие белка Ku70/Ku80 во взаимодействии РНКазы А с опухолевыми клетками, ее проникновении и внутриклеточном транспорте. Поэтому на следующем этапе способность гетеродимера Ku70/Ku80 связываться с РНКазой А была проанализирована с помощью метода молекулярного моделирования. Для этого кристаллические структуры РНКазы А (1FS3, база данных белков RSCB) и гетеродимера Ku70/Ku80 (1JEQ, база данных белков RSCB) были освобождены от молекул воды с помощью BIOVIA Discovery Studio, и их способность связываться друг с

другом была проанализирована с использованием двух независимых серверных платформ HDOCK (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>) и PatchDock (<https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>), основанных на разных алгоритмах - гибридном докинг-алгоритме и принципе комплементарности поверхностей, соответственно. По окончании молекулярного моделирования 10 лучших белковых структур были визуализированы с помощью программного обеспечения Chimera/BIOVIA.

С помощью программного обеспечения Discovery Studio и Web-ресурс PRODIGY (<https://bianca.science.uu.nl/prodigy/>) были определены характеристики связывания РНКазы А с гетеродимером Ku70/Ku80. Как видно из докинг-комплексов, представленных на Рис. 8, А и Б, РНКазы А имеет несколько сайтов связывания с гетеродимером Ku70/Ku80. Среди этих комплексов наименьшие значения энергии связи  $\Delta G$  и константы диссоциации  $K_d$  были обнаружены для комплексов, в которых РНКазы А была связана в ДНК-связывающей полости гетеродимера Ku70/Ku80, показанной синей стрелкой (Рис. 8, А). В то же время выявлена прямая корреляция между глубиной проникновения РНКазы А в эту структуру и значениями  $\Delta G$  и  $K_d$  для таких комплексов; эта закономерность была характерна для обеих используемых биоинформационных платформ (Рис. 8, А, Б, структуры отмечены фиолетовыми рамками). Таким образом, проведенный молекулярный докинг подтверждает потенциальную способность РНКазы А образовывать тримерный белковый комплекс с гетеродимером Ku70/Ku80, что может лежать в основе механизма проникновения РНКазы А в клетки и ее внутриклеточного транспорта.

Далее с помощью конфокальной микроскопии было исследовано взаимодействие РНКазы А с гетеродимером Ku70/Ku80 на начальном этапе проникновения РНКазы А в клетки В16 и HeLa (Рис. 8, В, Г). Видно, что большое количество Ku70/Ku80 локализовано по всей цитоплазме клеток В16 и в околядерном пространстве (Рис. 8, В, Г). РНКазы А проникает в клетки В16 и накапливается в цитозоле (Рис. 8, В, R), но комплексов между РНКазой А и



**Рис. 8.** Взаимодействие РНКазы А с гетеродимером Ku70/Ku80. **А** и **Б.** Результаты молекулярного моделирования. Гетеродимер Ku70/Ku80 окрашен в желтый (**А**) или голубой (**Б**) цвет, РНКазы А окрашена в оранжевый (**А**) или сиреневый (**Б**) цвет. Синей стрелкой обозначена ДНК-связывающая петля, формируемая гетеродимером Ku70/Ku80. Докинг-комплексы, характеризующиеся наименьшими значениями  $\Delta G$  и Kd, выделены сиреневыми рамками. **В** и **Г.** Флуоресцентная визуализация РНКазы А и Ku 70/80 в клетках В16 и HeLa, соответственно. Клетки В16 и HeLa инкубировали с конъюгатом РНКазы А - биотин (20 мкМ) в течение 4 ч, окрашивали NucBlue, стрептавидином-АРС и FITC-mAb к Ku70/Ku80 и анализировали с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии. В - NucBlue; G – FITC-mAb к Ku70/Ku80, R – АРС (конъюгат РНКазы А– биотин/стрептавидин). Масштаб 10 мкм. Ku70/Ku80 в клетках В16 не визуализируется (Рис. 8, В, Merge и Z-stack), вероятно, из-за низкого сигнала флуоресценции РНКазы А.

В клетках HeLa Ku70/Ku80 локализовался, в основном, внутри ядра и в гораздо меньшем количестве в цитоплазме (Рис. 8, Г, G). Обнаружено, что в клетках HeLa РНКазы А

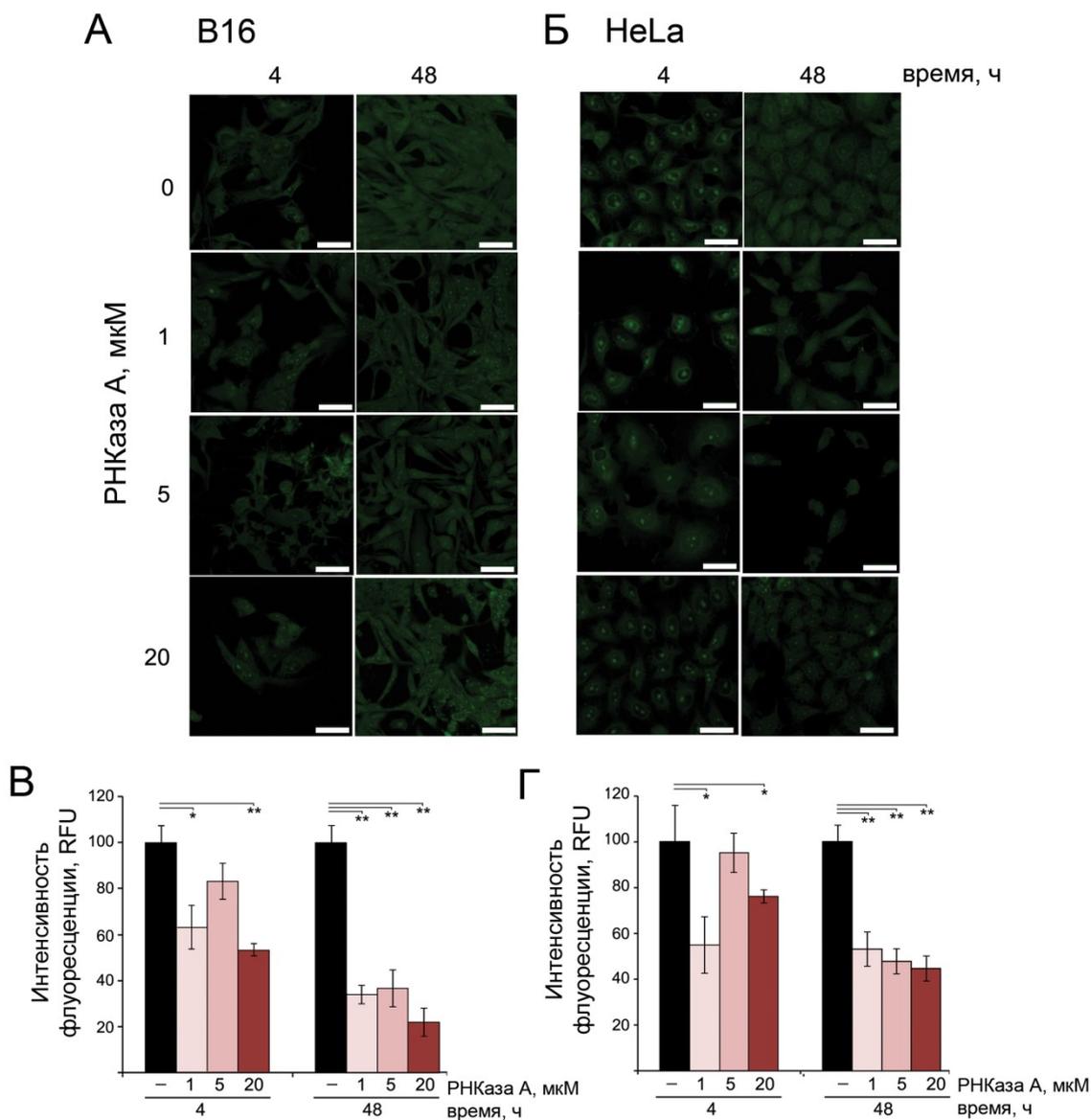
накапливается очень эффективно и локализуется в ядре и цитоплазме (Рис. 8, Г, R). На панели слияния наблюдается значительное снижение красного и зеленого сигналов, соответствующих РНКазе А и гетеродимеру Ku70/Ku80, соответственно, что свидетельствует об образовании между ними комплекса (Рис. 8, Г, Merge и Z-stack).

Поскольку Ku70/Ku80 способен перемещаться между ядром и цитоплазмой, а большое количество этого белка содержится в ядре клеток HeLa, возможно, что РНКазы А оказываются в ядре за счет ее транслокации в составе комплекса с Ku70/Ku80, что также не может быть исключено для клеток В16.

#### **3.1.4. Влияние РНКазы А на клеточную РНК**

Из полученных ранее данных видно, что часть РНКазы А в опухолевых клетках остается несвязанной с RI, что свидетельствует о ее способности влиять на внутриклеточные РНК. Поэтому на следующем этапе с помощью конфокальной микроскопии было проведено исследование изменения внутриклеточного содержания РНК в клетках В16 и HeLa после инкубации клеток с РНКазой А и окрашивания SYTO RNASelect (Рис. 9, А, Б). В интактных клетках В16 и HeLa РНК визуализировалась по всей цитоплазме и внутри ядра, а в клетках HeLa РНК также четко визуализировалась на границе ядра (Рис. 9, Б). В ядрах клеток В16 и HeLa отчетливо видны ядрышки. При этом в ядрах клеток HeLa ядрышки представлены в значительно большем количестве и имеют более интенсивную флуоресценцию, чем в клетках В16.

Инкубация клеток В16 и HeLa с РНКазой А в концентрациях 1 и 5 мкМ в течение 4 ч не влияла на общее содержание РНК (Рис. 9, А–Г). Увеличение концентрации РНКазы А до 20 мкМ вызывало снижение общего содержания РНК через 4 ч на 40 и 25% для клеток В16 и HeLa, соответственно. Продолжительная инкубация клеток с РНКазой А (48 ч) приводила к



**Рис. 9.** Влияние РНКазы А на содержание внутриклеточных РНК в клетках В16 мыши и HeLa человека. **А** и **Б.** Флуоресцентная визуализация внутриклеточной РНК в клетках В16 и HeLa, соответственно. Клетки В16 и HeLa инкубировали в присутствии РНКазы А в диапазоне концентраций 1 - 20 мкМ в течение 4 и 48 ч, окрашивали SYTO RNASelect и анализировали с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии. **В** и **Г.** Содержание внутриклеточных РНК в клетках В16 и HeLa, соответственно. Данные представлены как MEAN±SEM. Анализ данных проводили с помощью t-теста Стьюдента. Данные считали достоверными при \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . Масштаб 10 мкм.

значительному снижению интенсивности флуоресценции (Рис. 9, А и Б): в клетках В16 общее содержание РНК снижалось на 70% при концентрациях РНКазы А 1 и 5 мкМ и достигало 80% при 20 мкМ. В клетках HeLa через 48 ч содержание РНК существенно снижалось на 55% даже

при самой низкой концентрации РНКазы А (1 мкМ). Интересен тот факт, что РНКаза А, снижая общее содержание РНК в клетках, также уменьшала количество ядрышек в ядре и интенсивность их флуоресценции, что хорошо видно в клетках HeLa (Рис. 9, Б).

Таким образом, наглядно показано, что РНКаза А после проникновения в клетки снижает содержание в них РНК, причем в большей степени в клетках В16, чем в HeLa. Это может быть связано с несколькими причинами: РНКаза А более эффективно проникает в клетки В16, чем в HeLa; после проникновения в клетки В16 РНКаза А локализуется в цитозоле, а после проникновения в клетки HeLa локализуется в большей степени в ядре. Так, в клетках В16 РНКаза А снижала, в основном, содержание цитозольной РНК, тогда как в клетках HeLa снижала содержание рРНК, которая экспрессируется в ядрышках, и уменьшала количество/интенсивность флуоресценции ядрышек.

### **3.1.5. Влияние РНКазы А на миграционную активность, подвижность, инвазию, адгезию и образование колоний клеток В16 и HeLa**

Исследование влияния РНКазы А на жизнеспособность опухолевых клеток А549, HepG2, MCF-7, HuTu80, HeLa и В16 мыши проводили с помощью МТТ теста. Клетки высаживали в 96-ти луночный планшет в среде DMEM, содержащей 10% FBS и 1%-ный раствор антибиотиков и антимикотика, добавляли РНКазу А в диапазоне доз 2.5 – 200 мкг/мл и инкубировали при 37°C и 5%-ном CO<sub>2</sub> в течение 48 ч. Оказалось, что РНКаза А во всем диапазоне концентраций не влияла на жизнеспособность опухолевых клеток.

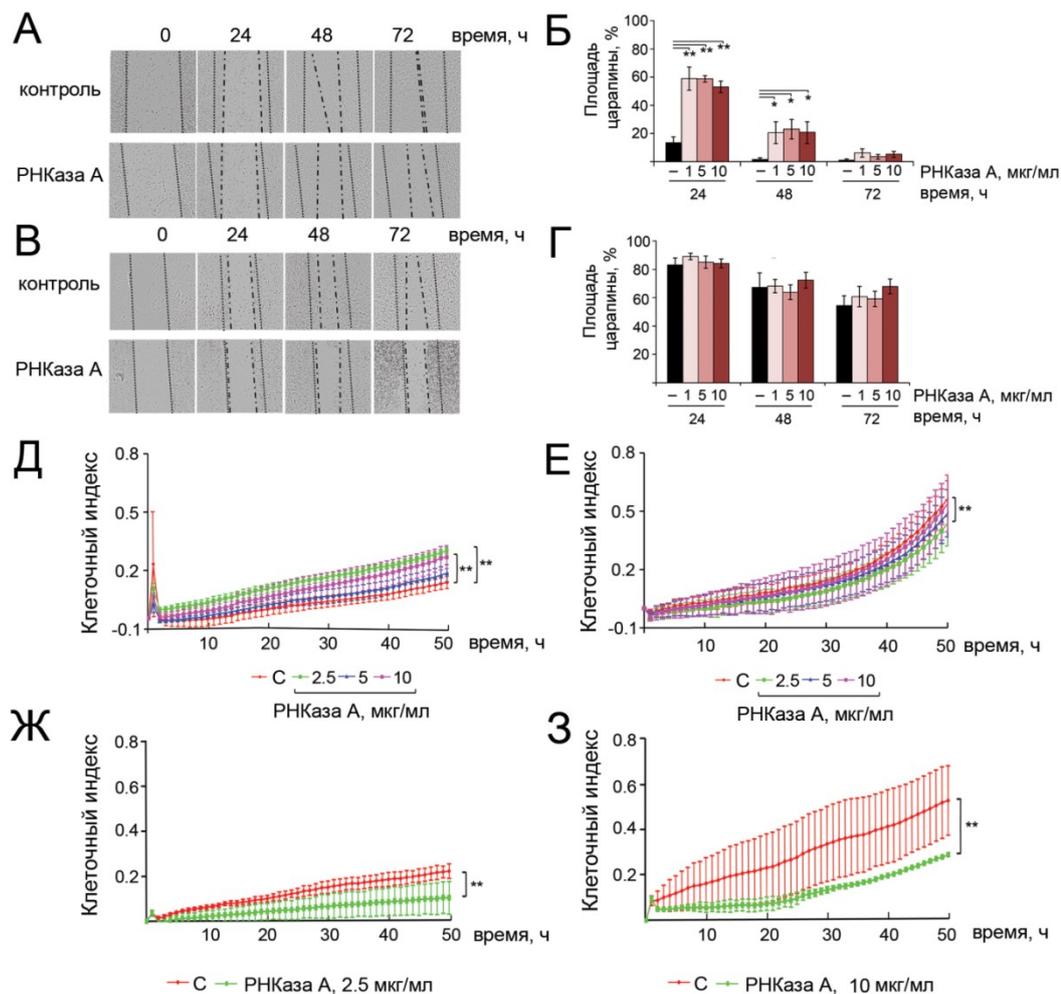
Влияние РНКазы А на миграционную активность опухолевых клеток было исследовано на клетках В16 и HeLa с помощью метода зарастания царапины (“Scratch assay”). Целостность сформированного клетками монослоя нарушали нанесением царапины и измеряли скорость ее заполнения клетками в отсутствие (контроль) или в присутствии РНКазы А в концентрациях 2.5, 5 и 10 мкг/мл. Инкубация клеток В16 в присутствии РНКазы А в течение 24 ч приводила к 3-кратному снижению миграции клеток: площади царапин составили 60% в экспериментальных лунках и 18% в контрольных лунках относительно изначальной площади царапины в точке 0

(Рис. 10, А, Б). Инкубация клеток с РНКазой А в течение 48 ч вызывала более выраженное снижение миграции: площадь царапины составила 20-25% и 5% в экспериментальных и контрольных лунках, соответственно. За время инкубации 72 ч различий уже не наблюдалось (Рис. 10, А, Б). РНКазы А практически не влияла на миграцию клеток HeLa за время инкубации 24 и 48 ч. Лишь через 72 ч наблюдалось незначительное дозозависимое снижение миграционной активности клеток: площадь свободной царапины составляла 75% для клеток HeLa, обработанных РНКазой А, и 55% для контрольных клеток (Рис. 10, В, Г).

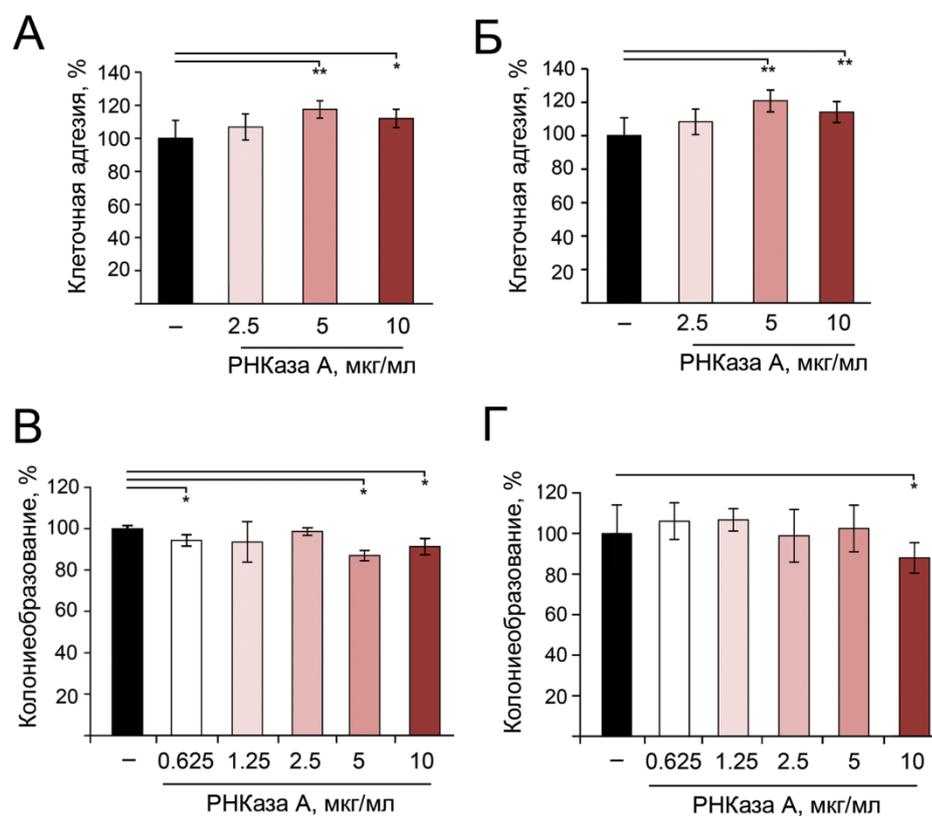
Подвижность опухолевых клеток играет важную роль в метастазировании. Было предположено, что РНКазы А может влиять на подвижность клеток В16 и HeLa. Подвижность клеток В16 и HeLa в присутствии РНКазы А в диапазоне концентраций 2.5, 5 и 10 мкг/мл измеряли с помощью “transwell migration assay” при стимуляции FBS в качестве хемоаттрактанта в течение 48 ч в стандартных условиях с использованием системы xCelligence (Рис. 10). Как видно из Рис. 10, подвижность клеток В16 не очень высока и составляет 0.1, тогда как клетки HeLa значительно более подвижны, и их подвижность составляет 0.4 (Рис. 10, Д и Е). РНКазы А не вызывает подавления миграции в использованном диапазоне концентраций, тогда как в случае клеток HeLa наблюдается подавление миграции в 1.3 раза.

Влияние РНКазы А на инвазивный потенциал клеток В16 и HeLa отслеживали в 16-луночном СИМ-планшете, предварительно покрытом матригелем, в режиме реального времени. Было обнаружено, под действием РНКазы А происходит замедление инвазии клеток В16 и HeLa (Рис. 10, Ж и З). Удивительно, но медленно заполняющие царапину клетки HeLa высокоподвижны и инвазивны по сравнению с клетками В16.

Было обнаружено, что РНКазы А лишь незначительно усиливала клеточную адгезию как клеток В16, так и клеток HeLa: увеличение клеточной адгезии в присутствии РНКазы А в концентрациях 5 и 10 мкг/мл составляло 20% и статистически значимо отличалось от контрольной группы (Рис. 11, А, Б).



**Рис. 10.** Влияние РНКазы А на миграцию, подвижность и инвазию клеток V16 и HeLa. **А** и **В.** Фотографическое изображение заполнения царапины опухолевыми клетками V16 и HeLa, соответственно, через 24 - 72 ч инкубации в присутствии РНКазы А (5 мкг/мл). Прерывистой линией отмечены границы изначального повреждения монослоя; пунктирной линией – границы монослоя после инкубации с РНКазой А. Увеличение  $\times 4$ . **Б** и **Г.** Площадь зарастания царапины в культурах клеток V16 и HeLa, соответственно, через 24 - 72 ч инкубации с РНКазой А (2.5 - 10 мкг/мл) относительно контроля. **Д** и **Е.** Transwell migration assay клеток V16 и HeLa в присутствии РНКазы А, стимулированный FBS и хемоаттрактантом. Клетки V16 и HeLa в верхней камере инкубировали с РНКазой А в концентрации 2.5 - 10 мкг/мл в течение 48 ч. Миграцию клеток в нижнюю камеру анализировали путем измерения импеданса в режиме реального времени с использованием системы xCELLigence. **Ж** и **З.** Transwell invasion assay клеток V16 и HeLa в присутствии РНКазы А, стимулированный FBS. Клетки V16 и HeLa инкубировали в верхней камере в присутствии РНКазы А в концентрациях 2.5 и 10 мкг/мл, соответственно, и отслеживали скорость инвазии клеток в нижнюю камеру сквозь матригель в режиме реального времени с помощью системы xCELLigence. Статистическую обработку данных проводили с использованием t-теста Стьюдента. Данные представлены как MEAN  $\pm$  SEM. Данные считали достоверными при  $p < 0.05$ .



**Рис. 11.** Влияние РНКазы А на метастатические свойства клеток В16 и HeLa. **А и Б.** Изменение адгезии клеток В16 и HeLa в присутствии РНКазы А (2.5 - 10 мкг/мл) в течение 24 ч. Степень клеточной адгезии определяли с помощью МТТ-теста. **В и Г.** Клоногенная активность клеток В16 и HeLa в присутствии РНКазы А. Клетки В16 и HeLa инкубировали с РНКазой А в концентрации 0.625 - 10 мкг/мл в течение 8 и 14 дней, соответственно, и окрашивали кристаллическим фиолетовым. Оценка уровня образования колоний проводилась с помощью плагина ColonyArea ImageJ. Данные анализировали с помощью t-теста Стьюдента. Данные представлены как MEAN ± SEM. Статистически достоверными считали данные с \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

Клоногенную активность клеток В16 и HeLa, определяющую способность одиночных клеток формировать колонии и связанную со стволовостью опухолевых клеток [290], сравнивали с клетками, инкубированными в присутствии РНКазы А в диапазоне концентраций 0.625 – 10 мкг/мл. Клетки В16 и HeLa высевали при низкой плотности (200 клеток/лунку) в DMEM с добавлением 10% FBS и инкубировали в присутствии РНКазы А в течение 8 и 14 дней, соответственно, с последующей визуализацией колоний. Оказалось, что РНКаза А незначительно снижала клоногенность клеток В16 и HeLa, этот эффект достигал 12% и

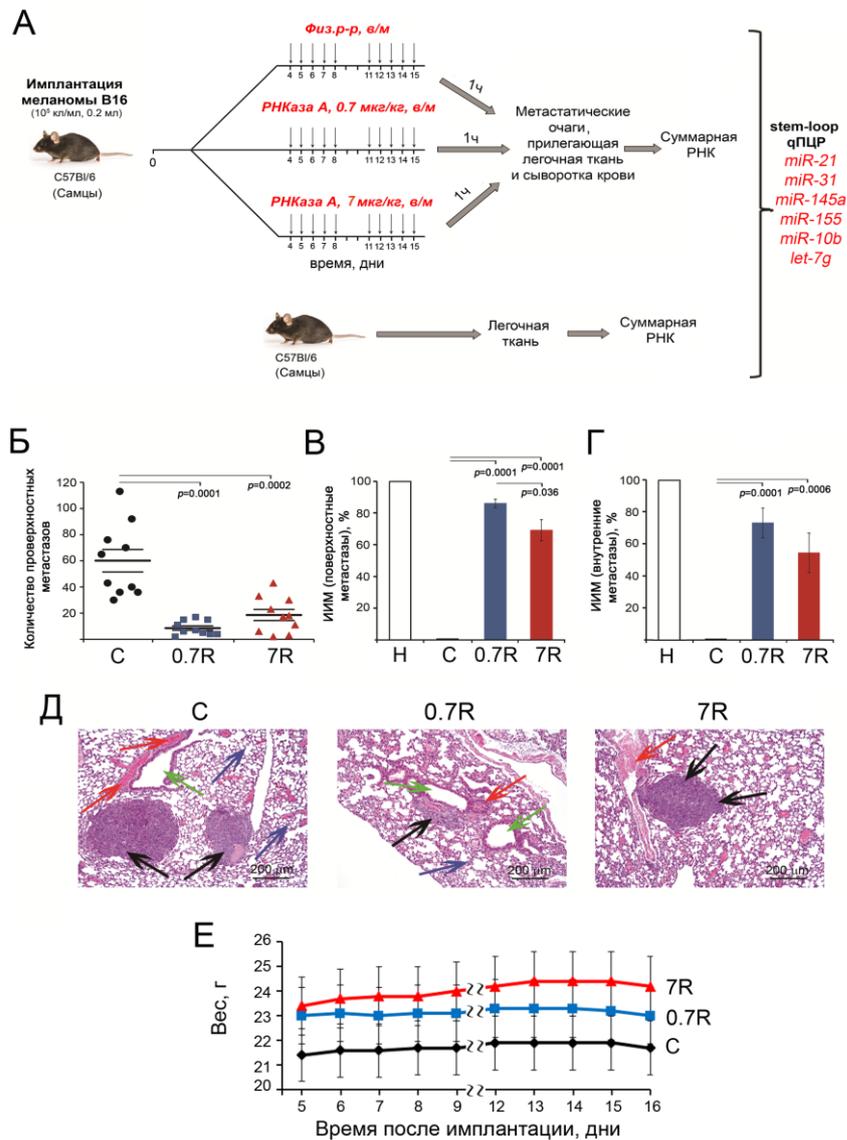
статистически достоверно отличался от контроля при концентрациях РНКазы А 5 и 10 мкг/мл (Рис. 11, В и Г).

Таким образом, наблюдалось значительное влияние РНКазы А на снижение миграции, подвижности и инвазии опухолевых клеток, в то время как влияние фермента на адгезию и образование колоний было небольшим.

### **3.1.6. Исследование антиметастатического действия РНКазы А на метастатической модели меланомы В16**

Способность РНКазы А влиять на метастазирование изучали на модели метастатической меланомы В16 без первичного опухолевого узла. Метастатическую модель В16 индуцировали у мышей с помощью введения клеток В16 в латеральную хвостовую вену мышей линии С57В1 (Рис. 12, А). Животные были разделены на три группы и, начиная с 4-го дня после имплантации опухоли, получали следующие инъекции внутримышечно: С (контроль) – физ./раствор; 0.7 R и 7 R – РНКазу А в дозах 0.7 и 7 мкг/кг, соответственно, по схеме 5+2 в течение двух недель. Используемые в исследовании дозы были выбраны в соответствии дозами, продемонстрировавшими эффективное ингибирование метастазирования на других опухолевых моделях [33,36]. Через час после последней инъекции у животных собирали образцы крови, ткань легких с метастатическими очагами и прилегающую легочную ткань для последующего гистологического анализа и оценки уровней экспрессии миРНК.

Оказалось, что введение РНКазы А мышам с В16 РНКазой А оказывает влияние как на количество поверхностных метастазов, так и на площадь поверхностных и внутренних метастазов (Рис. 12, Б – Г). В легких контрольной группы среднее количество поверхностных метастазов составило  $60.1 \pm 8.6$ . Введение РНКазы А в дозах 0.7 и 7 мкг/кг привело к снижению количества поверхностных метастазов в 7 и 3.2 раза и составило  $8.6 \pm 1.7$  и  $18.6 \pm 4.3$ , соответственно (Рис. 12, Б). Ингибирование развития поверхностных и внутренних метастазов оценивали путем подсчета индекса ингибирования метастазирования (ИИМ) с использованием



**Рис 12.** Влияние РНКазы А на метастазы у мышей с меланомой В16. **А.** Дизайн эксперимента. Клетки В16 ( $10^5$  клеток, 0,2 мл) имплантировали в/в мышам С57В1/6. Начиная с 4-го дня после имплантации опухоли, животные получали физ.р-р (группа С) или РНКазу А в дозах 0,7 (группа 0.7R) и 7 (группа 7R) мкг/кг в/м ежедневно по схеме 5+2. Через 1 ч после последней инъекции собирали кровь и легочную ткань и использовали для анализа метастазов и уровня miРНК. **Б.** Количество поверхностных метастазов в легких у мышей с В16. **В** и **Г.** ИИМ (индекс ингибирования метастазов) поверхностных и внутренних метастазов в легких мышей с В16 под действием РНКазы А. Данные анализировали с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки и представляли как MEAN±SEM. Данные считали достоверными при  $p < 0.05$ . **Д.** Гистотопограммы срезов легких мышей с меланомой В16. Метастатические очаги обозначены черными стрелками, прилегающая легочная ткань - синими стрелками, кровеносные сосуды - красными стрелками, бронхи - зелеными стрелками. Окрашивание гематоксилином и эозином, исходное увеличение  $\times 100$ . **Е.** Вес мышей во время эксперимента.

морфометрического анализа. ИИМ поверхностных метастазов у мышей с меланомой В16, получавших РНКазу А в дозах 0.7 и 7 мкг/кг, составил  $86 \pm 2.7$  и  $69.1 \pm 6.7\%$ , соответственно (Рис. 12, В). Введение РНКазы А в дозах 0.7 и 7 мкг кг приводило к снижению средней площади внутренних метастазов в 3.7 и 2.2 раза при значениях ИИМ  $73.1 \pm 9.2$  и  $54.4 \pm 12.3\%$  соответственно (Рис. 12, Г). Гистологическое исследование показало, что метастатические очаги меланомы В16 в легких контрольных и экспериментальных мышей имели примерно одинаковую структуру: округлую форму с четкими границами, располагались преимущественно вокруг кровеносных сосудов и бронхов и были представлены полиморфными или веретеновидными атипичными клетками, содержащий коричневый пигмент меланин (Рис. 12, Д). В ходе эксперимента было показано, что масса мышей в группах достоверно не различается, что свидетельствует об отсутствии системного токсического действия РНКазы А в использованных дозах (Рис. 12, Е).

Таким образом, впервые была продемонстрирована способность РНКазы А подавлять развитие метастазов меланомы, которая характеризуется высокой агрессивностью и скоростью диссеминации.

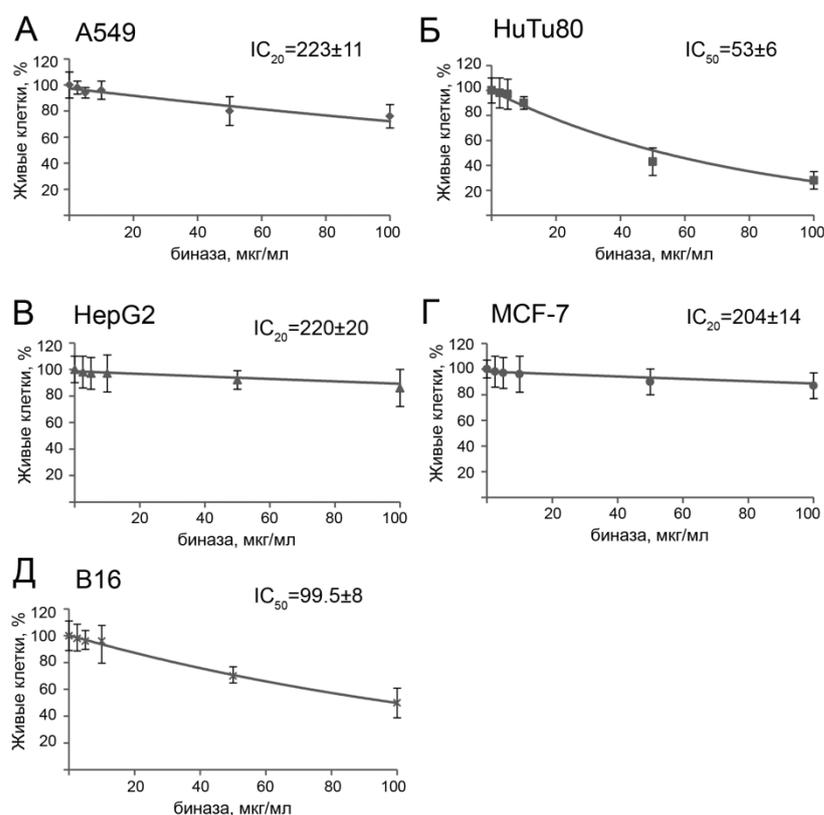
## **3.2. Исследование влияния биназы на снижение злокачественного потенциала опухоли**

### **3.2.1. Исследование влияния биназы на жизнеспособность и миграционную активность опухолевых клеток**

Для оценки способности биназы влиять на жизнеспособность и препятствовать миграционной активности опухолевых клеток эпителиального происхождения были выбраны четыре линии опухолевых клеток человека: легких А549, печени НерG2, молочной железы MCF-7 и двенадцатиперстной кишки HuTu 80. В качестве альтернативной линии сравнения использовали клетки меланомы В16 мыши, развивающейся из меланоцитов и метастазирующей лимфогенным и гематогенным путем почти во все органы.

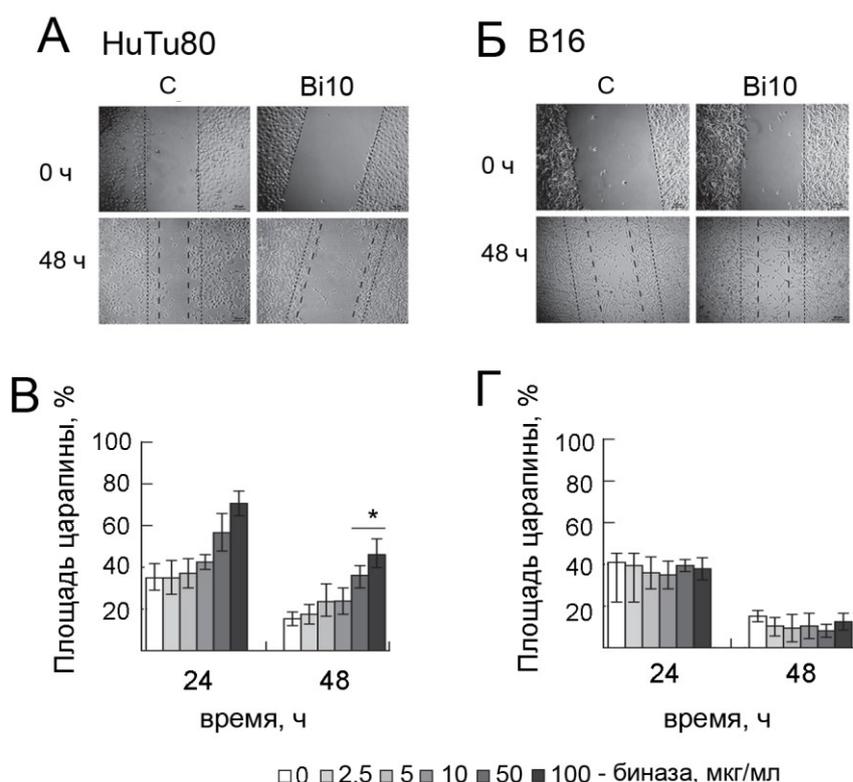
Исследование влияния биназы на жизнеспособность опухолевых клеток проводили с помощью МТТ теста. Клетки высаживали в 96-ти луночный планшет в среде DMEM, содержащей 10% FBS и 1%-ный раствор антибиотиков и антимикотика, добавляли биназу в диапазоне доз 2.5 – 100 мкг/мл и инкубировали при 37°C и 5%-ном CO<sub>2</sub> в течение 48 ч.

Оказалось, что опухолевые клетки HepG2, MCF-7 и A549 были слабо чувствительно к биназе: для клеток этих опухолевых линий удалось достичь только значений IC<sub>20</sub>, которая находилась в диапазоне 204 – 223 мкг/мл (Рис. 13, А, В, Г). Клетки линий HuTu80 и B16 были чувствительны к биназе: IC<sub>50</sub> для этих клеточных линий составили 53±6 и 99.5±8 мкг/мл, соответственно, при этом линия клеток HuTu80 была в 2 раза чувствительнее к биназе, чем B16 (Рис. 13, Б, Д).



**Рис. 13.** Влияние биназы на жизнеспособность клеток A549 (А), HuTu80 (Б), HepG2 (В), MCF-7 (Г) и B16 (Д). Жизнеспособность клеток оценивали после 48 ч инкубации с биназой в диапазоне доз 2.5 – 100 мкг/мл. За 100% принята жизнеспособность клеток без обработки биназой. \* –  $p < 0.05$ .

Влияние биназы на миграционную активность опухолевых клеток исследовали с помощью метода зарастания царапины (“Scratch assay”). Целостность сформированного клетками монослоя нарушали нанесением царапины и измеряли скорость ее заполнения клетками в отсутствие (контроль) или в присутствии биназы в концентрации 2.5 – 100 мкг/мл. Показано, что инкубация в течение 72 ч с биназой в концентрации до 100 мкг/мл не влияла на миграцию клеток НерG2, MCF-7 и A549 (первичные данные не приведены). Торможение миграции клеток НuTu80 под действием биназы через 24 ч было статистически недостоверным



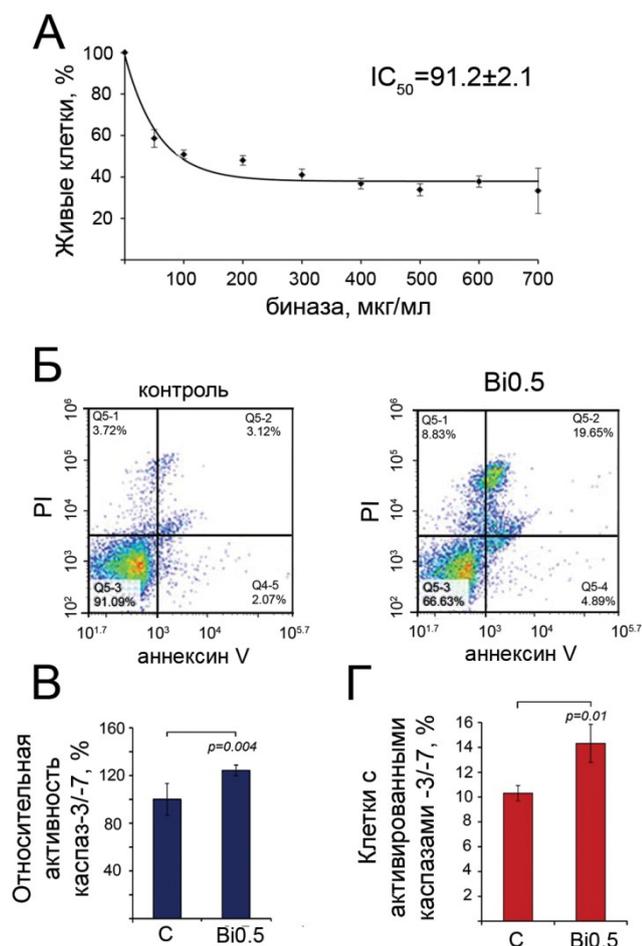
**Рис. 14.** Влияние биназы на миграцию клеток NuTu80 и V16. **А** и **Б.** Фотографическое изображение заполнения царапины опухолевыми клетками NuTu80 и V16, соответственно, через 48 ч инкубации в присутствии биназы (10 мкг/мл). Прерывистой линией отмечены границы изначального повреждения монослоя; пунктирной линией – границы монослоя после инкубации с биназой. Увеличение  $\times 4$ . **В** и **Г.** Площадь зарастания царапины в культурах клеток NuTu 80 и V16, соответственно, через 24 и 48 ч инкубации с биназой (10 мкг/мл) относительно контроля. С (контроль) – клетки, инкубированные в отсутствие биназы; Vi10 – клетки V16 и HeLa, инкубированные в присутствии биназы в концентрации 10 мкг/мл. Данные анализировали с помощью t-теста Стьюдента. Данные представлены как MEAN  $\pm$  SEM, \*  $p < 0.05$ .

по сравнению с контролем (необработанные клетки), после 48 ч инкубации миграционная активность клеток снизилась до 66% (Рис. 14, В). Клетки В16 за время инкубации с биназой 24 ч и 48 ч не снижали свою миграционную активность (Рис. 14, Г).

### **3.2.2. Влияние биназы на пролиферацию клеток RLS<sub>40</sub> и индукцию апоптоза**

Клетки суспензионной линии RLS<sub>40</sub> обрабатывали биназой в концентрациях 50-700 мкг/мл и определяли их жизнеспособность методом WST-1-теста (Рис. 15, А). Из представленных данных видно, что при концентрации биназы 100 мкг/мл жизнеспособность клеток RLS<sub>40</sub> снижалась на 50%, а в диапазоне концентраций 400–700 мкг/мл происходило снижение выживаемости клеток до 30% (Рис. 15, А). Значение IC<sub>50</sub> биназы по отношению к клеточной линии RLS<sub>40</sub> составило 91.7±2.1 мкг/мл.

Далее была исследована способность биназы вызывать апоптоз в опухолевых клетках на примере клеток RLS<sub>40</sub>. Для достижения выраженного эффекта была использована концентрация биназы, соответствующая 5-ти кратной IC<sub>50</sub>. Показано, что цитотоксический эффект биназы на клетки RLS<sub>40</sub> реализуется за счет индукции апоптоза (Рис. 15, Б). Процент клеток в состоянии позднего апоптоза в популяции, обработанной биназой (0.5 мг/мл, 48 ч), увеличился в 6.3 раза по сравнению с необработанными клетками и достиг 20% (Рис. 15, Б, правая панель, Annexin V FITC + / PI +, правый верхний квадрант). Индуцированный биназой апоптоз сопровождался активацией ключевых каспазы-3 и каспазы-7 в клетках RLS<sub>40</sub> (Рис. 15, В). Более того, было обнаружено, что обработка клеток биназой приводила к накоплению клеток, активно экспрессирующих каспазы -3 и -7 (Рис. 15, Г). Таким образом, полученные результаты продемонстрировали, что биназа подавляет жизнеспособность клеток лимфосаркомы RLS<sub>40</sub>, вызывая каспаза-зависимый апоптоз.



**Рис. 15.** Влияние биназы на жизнеспособность клеток лимфосаркомы RLS<sub>40</sub> мыши и способность индуцировать в них апоптоз. **А.** Жизнеспособность клеток RLS<sub>40</sub> в присутствии биназы. Клетки RLS<sub>40</sub> инкубировали с биназой в концентрации 100 – 700 мкг/мл в течение 48 ч. **Б.** Индукция апоптоза в клетках RLS<sub>40</sub> под действием биназы. Клетки инкубировали в присутствии биназы (0.5 мг/мл) в течение 48 ч. Клетки окрашивали Аннексин V FITC/PI и анализировали с помощью проточной цитометрии. Нижний левый квадрант - % живых клеток, нижний правый квадрант - % клеток в состоянии раннего апоптоза, верхний правый квадрант - % клеток в состоянии позднего апоптоза, верхний левый квадрант - % некротизированных клеток. **В.** Активация каспаз-3 / -7 в клетках RLS<sub>40</sub> под действием биназы. **Г.** Влияние биназы на популяцию клеток RLS<sub>40</sub> с активированными каспазами -3 / -7. С (контроль) – клетки, инкубированные в отсутствие биназы, Bi0.5 – клетки, инкубированные в присутствии биназы в концентрации 0.5 мкг/мл. Данные анализировали с помощью t-теста Стьюдента. Данные представлены как MEAN± SEM. Статистически достоверными считали данные с  $p < 0.05$ .

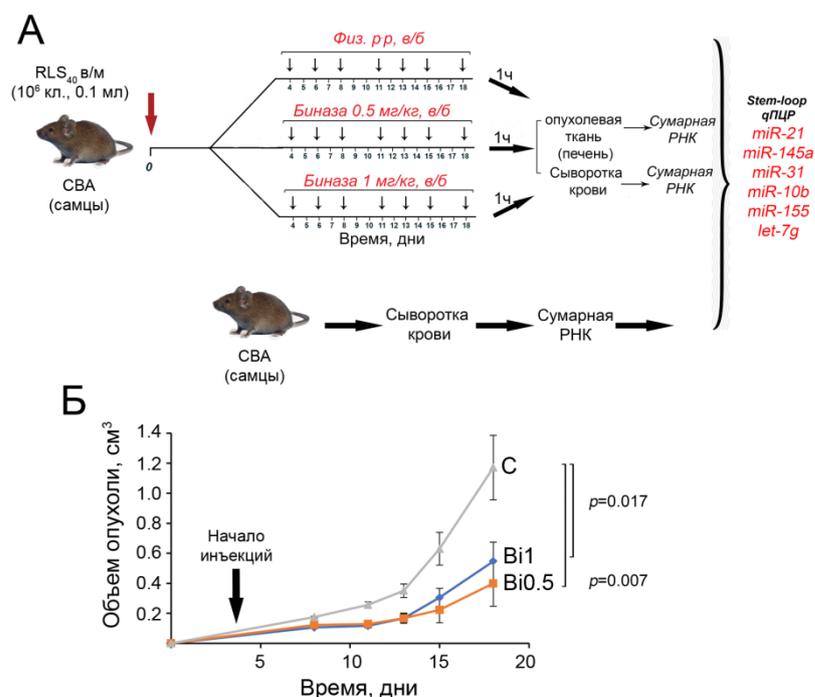
### 3.2.3. Исследование противоопухолевого и антиметастатического действия биназы на модели RLS<sub>40</sub>

Первое исследование способности биназы замедлять рост первичной опухоли и развитие метастазов было выполнено с использованием трех опухолевых моделей мыши разных

гистологических типов, имеющих прямое отношение к опухолям человека: карциноме легких Льюис (LLC), лимфосаркоме RLS<sub>40</sub> и меланоме B16 [291]. Было показано, что внутривентральные инъекции биназы (диапазон доз 1–5 мг/кг) приводили к замедлению роста первичной опухоли до 45% в модели RLS<sub>40</sub> и подавляли развитие метастазов до 50% в случае RLS<sub>40</sub>.

В данной части работы для детального изучения противоопухолевого потенциала биназы была выбрана лимфосаркома RLS<sub>40</sub> с учетом ряда специфических характеристик этой опухоли. Прежде всего, RLS<sub>40</sub> образует первичные опухолевые узлы и метастазы в печень. Поскольку биназа будет метаболизироваться в печени, эта модель позволит отследить тройную нагрузку на печень, то есть нагрузку от опухоли, метастазов и метаболических изменений вследствие опухолевой прогрессии. Во-вторых, лимфосаркома RLS<sub>40</sub> представляет собой опухоль с фенотипом множественной лекарственной устойчивости, которая имеет нарушенную систему ABC-транспортеров, участвующую в выкачивании химиотерапевтических препаратов из клетки.

Клетки RLS<sub>40</sub> (10<sup>6</sup> кл., 0.1 мл) имплантировали в/м мышам СВА и, начиная с 4-го дня после имплантации, животным вводили в/б физ./р-р или биназу в дозах 0.5 и 1 мг/кг три раза в неделю согласно схеме, представленной на Рисунке 16. Через 1 ч после последней инъекции образцы опухоли, крови и печени собирали и использовали для анализа метастазов и уровня миРНК. В ходе эксперимента проводили измерение объема опухоли. Как видно из данных, представленных на Рис. 16, Б, биназа значительно подавляла рост первичных опухолевых узлов: при дозе биназы 0.5 мг/кг наблюдалось замедление роста опухоли на 60%. Двукратное увеличение дозы биназы не усиливало противоопухолевый эффект, поскольку замедление роста опухоли было примерно таким же без статистически значимой разницы между группами (Рис. 16, Б).

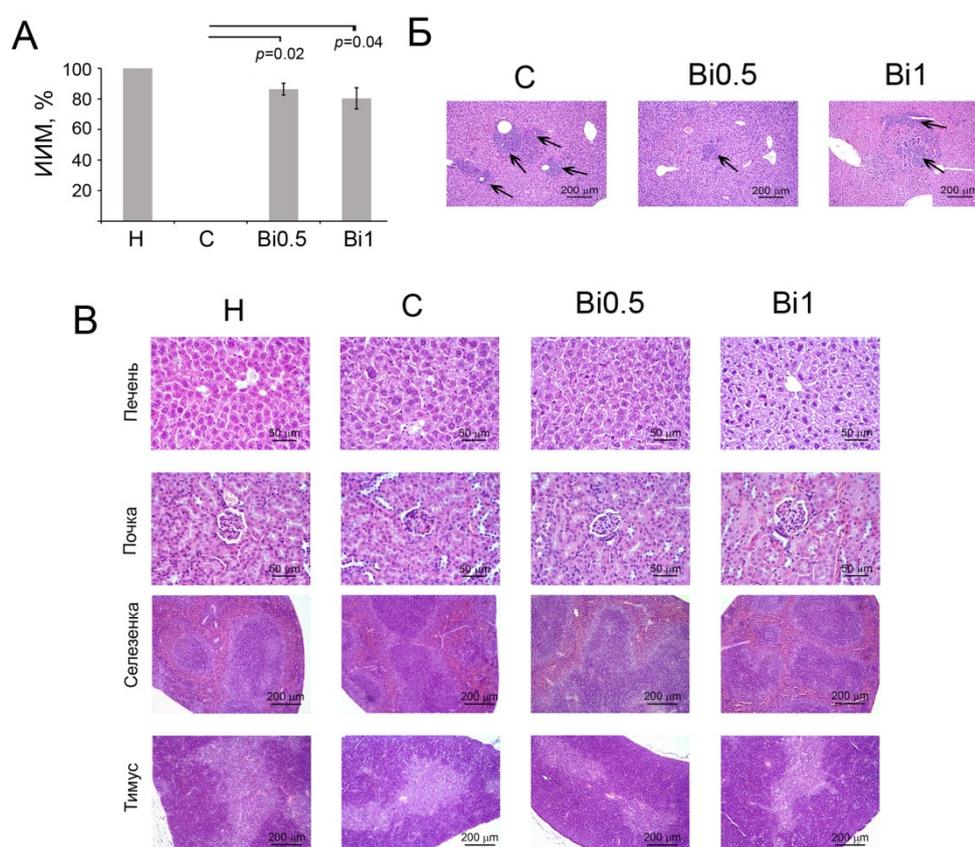


**Рис. 16.** Исследование противоопухолевого и антиметастатического действия биназы на модели лимфосаркомы RLS<sub>40</sub>. **А.** Дизайн эксперимента. Клетки RLS<sub>40</sub> (10<sup>6</sup> кл., 0.1 мл) имплантировали в/м мышам СВА и с 4-го дня после имплантации животным вводили в/б физ./р-р или биназу в дозах 0.5 и 1 мг/кг три раза в неделю. Через 1 ч после последней инъекции образцы опухоли, крови и печени собирали и использовали для анализа метастазов и уровня миРНК. **Б.** Динамика роста опухоли. **С** (контроль) – мыши с RLS<sub>40</sub>, получавшие инъекции физ./раствора. Статистическую обработку данных проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. Данные считали достоверными при  $p < 0.05$ . Данные представлены как MEAN±SEM.

Введение биназы приводило к подавлению роста метастазов (Рис. 17). Поскольку большинство метастазов в печени были внутренними, был проведен расчет ИИМ на основе морфометрических измерений площади метастазов по отношению к общей площади печени. Биназа в обеих дозах эффективно подавляла развитие метастазов RLS<sub>40</sub> в печени с ИИМ 80–86% (Рис. 17, А).

Метастазы лимфосаркомы RLS<sub>40</sub> в печени были представлены преимущественно округлыми очагами с нечеткими границами, состоящими из крупных мономорфных атипичных лимфоидных клеток, которые были сопоставимы с клетками, образующими первичный опухолевый узел; количество таких очагов значительно уменьшилось после обработки биназой (Рис. 17, Б). Гистологический анализ тканей печени и почек показал, что рост опухоли

сопровождался умеренными деструктивными изменениями в паренхиме печени и почек, представленными дистрофией и некрозом гепатоцитов и эпителиоцитов проксимальных канальцев (Рис. 17, В). Низкие дозы биназы не увеличивали деструкцию печени и почек (Рис. 17, В), в то время как биназа в дозе 1 мг/кг усиливала деструктивные изменения, особенно в



**Рис. 17.** Влияние биназы на метастазы, органы выделения и иммунные органы у мышей с RLS<sub>40</sub>. **А.** ИИМ в печени мышей с RLS<sub>40</sub> под действием биназы. Статистическую обработку данных проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. Данные считали достоверными при  $p < 0.05$ . Данные представлены как  $MEAN \pm SEM$ . **Б.** Гистотопограммы срезов печени мышей с RLS<sub>40</sub>, получавших биназу. Метастазы обозначены черными стрелками. Окрашивание гематоксилином и эозином, исходное увеличение  $\times 200$ . **В.** Гистотопограммы срезов печени, почек, селезенки и тимуса. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 400$ . Масштаб соответствует 50 мкм (печень, почка) и 200 мкм (селезенка, тимус). Мыши с RLS<sub>40</sub> получали в/б инъекции физ./р-ра или биназы в дозах 0.5 (группа Bi0.5) и 1 мг/кг (группа Bi1) три раза в неделю по схеме, приведенной на Рис. 16. Н – здоровые животные, С (контроль) – мыши с RLS<sub>40</sub>, получавшие инъекции физ./раствора.

печени, с преобладанием необратимых некротических изменений (Рис. 17, В). Это свидетельствует о том, что противоопухолевая активность биназы, применяемой в дозе более 1 мг/кг, ограничивалась токсичностью для печени, которая усугублялась метастазами опухоли в печень.

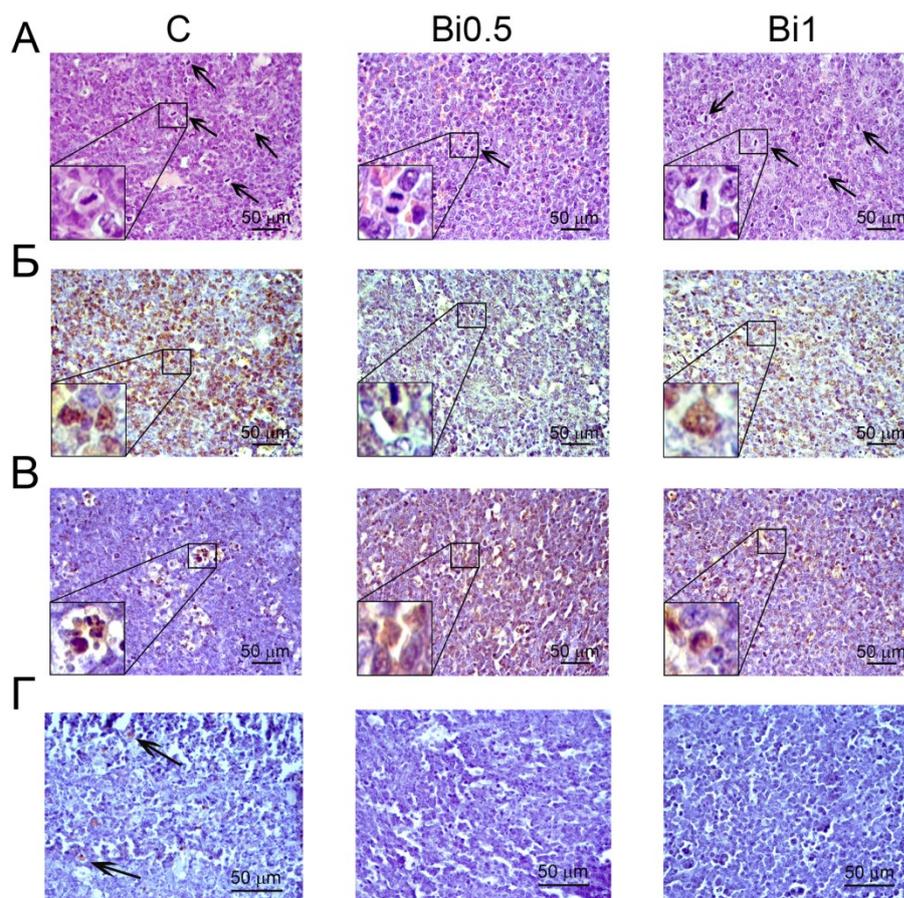
Морфометрическое исследование селезенки и тимуса показало, что прогрессирование опухоли сопровождалось умеренными иммуномодулирующими эффектами: объемная плотность белой пульпы и диаметр лимфоидных фолликулов увеличились в 1.2 раза по сравнению со здоровыми животными (Рис. 17, В). Введение биназы вызывало выраженные признаки активации селезенки: увеличение размера и количества лимфоидных фолликулов, их слияние и образование в них зародышевых центров (Рис. 18, В, Таблица 6). В тимусе мышей с RLS<sub>40</sub> объемные плотности коркового и мозгового вещества в экспериментальной и контрольной группах существенно не отличались от этих параметров у здоровых животных (Рис. 17, В, Таблица 5). Таким образом, морфофункциональные изменения селезенки и тимуса указывают на неспецифическую активацию иммунной системы во время терапии биназой.

**Таблица 5.** Морфологические параметры селезенки и тимуса здоровых мышей и мышей с RLS<sub>40</sub>, получавших инъекции биназы

<b>Морфологические параметры</b>	<b>Н</b>	<b>С</b>	<b>Вi0.5</b>	<b>Вi1</b>
<b>Селезенка</b>				
Красная пульпа, V <sub>v</sub> , %	57.3±3.1	49.4±2.9 <sup>1)</sup>	31.2±1.1 <sup>1,2)</sup>	30.4±0.8 <sup>1,2)</sup>
Белая пульпа, V <sub>v</sub> , %	42.6±1.9	50.4±2.9 <sup>1)</sup>	68.5±1.1 <sup>2)</sup>	69.5±0.8 <sup>1,2)</sup>
Диаметр фолликулов, мкм	229.9±13.5	270.2±10.1 <sup>1)</sup>	322.3±7.6 <sup>1,2)</sup>	325±11.8 <sup>1,2)</sup>
<b>Тимус</b>				
Кора, Вв, %	39.9±1.6	35.1±3.8	40.5±1.1	40.4±2.2
Мозговое вещество, V <sub>v</sub> , %	55±1.9	64.8±3.8	59.5±1.1	59.5±2.2
Корково-мозговой индекс	0.7±0.1	0.7±0.2	0.7±0.03	0.7±0.08

Н – здоровые мыши, С (контроль) – мыши с RLS<sub>40</sub>, получавшие инъекции физ./раствора, Вi0.5 и Вi1 – мыши с RLS<sub>40</sub>, получавшие инъекции биназы в дозах 0.5 и 1 мг/кг, соответственно.<sup>1)</sup> Отличия от здоровых мышей достоверны при  $p \leq 0.05$ , <sup>2)</sup> отличия от контрольных мышей достоверны при  $p \leq 0.05$ .

Наряду с уменьшением объема опухоли биназа также вызывала изменения гистологических характеристик опухолей. Опухоли имели округлую форму с четкими границами и очагами некроза в центральной части опухолевых узлов во всех исследуемых группах. Опухолевая ткань была представлена крупными мономорфными атипичными лимфоидными клетками с высокой митотической скоростью и пролиферативной активностью (Рис. 18, А).



**Рис. 18.** Влияние биназы на количество митозов, PCNA-, каспаза-7- и каспаза-3-положительных клеток в опухолевой ткани после введения биназы мышам с RLS<sub>40</sub>. Гистотопограммы срезов опухоли. **А.** Окрашивание гематоксилином и эозином. **Б, В и Г.** Иммуногистохимическое окрашивание моноклональными антителами против PCNA, каспазы-7 и каспазы-3, соответственно. События митоза и каспаза-3-положительные клетки обозначены черными стрелками. Увеличение: × 400. Мыши с RLS<sub>40</sub> получали в/б инъекции физ./р-ра или биназы в дозах 0.5 и 1 мг/кг три раза в неделю по схеме, приведенной на Рис. 17. **С** (контроль) – мыши с RLS<sub>40</sub>, получавшие инъекции физ./раствора, **Bi0.5** и **Bi1** – мыши с RLS<sub>40</sub>, получавшие инъекции биназы в дозах 0.5 и 1 мг/кг, соответственно.

Морфометрический анализ с последующим расчетом морфологических параметров опухолевой ткани показал, что в контрольной группе численная плотность митозов составила  $5.6 \pm 0.4$  на тестовую площадь, а объемная плотность PCNA-положительных опухолевых клеток составила  $62.7 \pm 3.8\%$  (Таблица 6). В группе, получавшей биназу в дозе 0.5 мг/кг, наблюдалось 5.1-кратное снижение численной плотности митозов и 2.9-кратное уменьшение объемной плотности PCNA-положительных клеток по сравнению с контролем (Рис. 18, А, Б, Таблица 6). Биназа в дозе 1 мг/кг не оказывала столь выраженных эффектов: количество митозов и PCNA-положительных клеток уменьшилось всего в 1.8 и 1.4 раза по сравнению с контрольной группой, соответственно (Рис. 18, Б, Таблица 6).

**Таблица 6.** Влияние биназы на морфологическую организацию опухолевой ткани RLS<sub>40</sub>

<b>Морфологический параметр</b>	<b>С</b>	<b>Bi0.5</b>	<b>Bi1</b>
Неизменная опухолевая ткань, V <sub>v</sub> , %	71.2±1.3	74.5±1.7 <sup>1)</sup>	74.4±1 <sup>1)</sup>
Лимфоидная инфильтрация, V <sub>v</sub> , %	19.5±1.4	14.3±0.9 <sup>1)</sup>	15±0.9 <sup>1)</sup>
Некротические изменения, V <sub>v</sub> , %	9±0.9	10.9±2	10.3±0.8
Митотические клетки, N <sub>v</sub>	5.6±0.4	1.1±0.3 <sup>1)</sup>	3.2±1 <sup>1)</sup>
PCNA-положительные клетки, V <sub>v</sub> , %	62.7±3.8	21.4±2.3 <sup>1)</sup>	44.7±9.5 <sup>1)</sup>
Каспаза-7 положительные клетки, N <sub>v</sub>	5.3±0.5	25.9±2.3 <sup>1)</sup>	17.8±3.5 <sup>1)</sup>

С (контроль) – мыши с RLS<sub>40</sub>, получавшие инъекции физ./раствора, Bi0.5 и Bi1 – мыши с RLS<sub>40</sub>, получавшие инъекции биназы в дозах 0.5 и 1 мг/кг, соответственно.<sup>1)</sup> Отличия от контрольных мышей достоверны при  $p \leq 0.05$ .

Опухолевая ткань RLS<sub>40</sub> изначально характеризовалась определенным уровнем спонтанного апоптоза: объемная плотность положительных по каспазе-7 клеток составила  $5.3 \pm 0.5\%$  от общей опухолевой ткани (Рис. 18, В, Таблица 6), а плотность каспазы-3 была  $2.5 \pm 0.3\%$  (Рис. 18, Г). Введение биназы приводило к индукции апоптоза, что выражалось в увеличении объемной плотности каспаза-7-положительных клеток в 4.9 и 3.4 раза при дозах биназы 0.5 и 1 мг/кг, соответственно по сравнению с контролем (Рис. 18, В, Таблица 6). После введения мышам с RLS<sub>40</sub> биназы в опухоли не были обнаружены каспаза-3-положительные клетки, что, скорее всего, было связано с тем, что каспаза-3 не участвовала в ранних событиях апоптоза. Кроме того, в опухолях как контрольной, так и экспериментальной групп были

обнаружены некротические изменения и воспалительная инфильтрация, представленная преимущественно лимфоцитами (Таблица 6). Области воспаления в опухолевой ткани уменьшились в 1.4 и 1.3 раза после введения биназы (0.5 и 1 мг/кг, соответственно), тогда как площадь некроза была одинаковой во всех группах (Таблица 6).

### 3.2.4. Исследование токсического действия биназы у мышей с RLS<sub>40</sub>

Для оценки токсического действия биназы в экспериментальной и контрольной группах оценивали биохимические параметры сыворотки крови и морфологические изменения в печени и почках. Биохимия крови мышей с RLS<sub>40</sub> показала, что развитие опухоли приводило к 1.7- и 1.2-кратному увеличению уровней AST и креатинина, соответственно, по сравнению со здоровыми животными (Таблица 7). Введение биназы в дозе 0.5 мг/кг не вызывало

**Таблица 7.** Влияние биназы на биохимические параметры крови мышей с RLS<sub>40</sub>.

Группы	Биохимические параметры					
	Печень				Почки	
	ALT, U/L	AST, U/L	ALK, U/L	Суммарный белок, г/л	Креатинин, мМ	BUN, мМ
<b>Н</b>	42±1.6	67.3±1.5	68.1±5.5	55.4±2.1	32.9±1.3	9.9±0.1
<b>С</b>	39.4±3.4	114.2±13 <sup>1)</sup>	79.8±20	53.4±2.3	39.3±1.3 <sup>1)</sup>	8.4±0.2 <sup>1)</sup>
<b>Вi0.5</b>	35.6±1.7*	116.5±14.4 <sup>1)</sup>	130.5±13.5 <sup>1,2)</sup>	62.4±2.1 <sup>1,2)</sup>	31.2±5.1 <sup>2)</sup>	8.8±0.5 <sup>1)</sup>
<b>Вi1</b>	60.9±10.3 <sup>1,2)</sup>	211.4±49.8 <sup>1,2)</sup>	134.5±14.8 <sup>1,2)</sup>	61.9±3.2 <sup>1,2)</sup>	39.2±1.2 <sup>1)</sup>	9.7±1.2

Н – здоровые мыши, С (контроль) – мыши с RLS<sub>40</sub>, получавшие инъекции физ./раствора, Вi0.5 и Вi1 – мыши с RLS<sub>40</sub>, получавшие инъекции биназы в дозах 0.5 и 1 мг/кг, соответственно. <sup>1)</sup> Отличия от здоровых мышей достоверны при  $p \leq 0.05$ , <sup>2)</sup> Отличия от контрольных мышей были достоверны при  $p \leq 0.05$ .

токсического повреждения печени или возрастания уровней печеночных ферментов. Тем не менее, биназа в дозе 1 мг/кг была гепатотоксичной и приводила к увеличению уровней ALT, AST и ALK в 1.5, 3.1 и 2 раза, соответственно, по сравнению со здоровыми животными и в 1.5, 1.9 и 1.7 раза, соответственно, по сравнению с контрольной группой (Таблица 7).

### **3.3. Поиск миРНК, чувствительных к биназе и РНКазе А, и их биоинформатический анализ**

#### **3.3.1. Изменение профиля миРНК в опухолевых клетках под действием биназы и РНКазы А.**

Было исследовано влияние биназы на ряд миРНК в клетках RLS<sub>40</sub>. Панель миРНК включала miR-21a, miR-10b, miR-145a, miR-31, let-7g и miR-155 (Таблица 8). Эти миРНК были отобраны путем сравнения библиотек, приготовленных из миРНК, выделенных из сыворотки крови и опухолевой ткани у мышей с карциномой легких Льюис до и после лечения РНКазой А. Алгоритм отбора миРНК состоял из профилирования экспрессии миРНК в сыворотке крови и опухолевой ткани мышей с LLC без лечения и получавших РНКазу А, дополнительной сортировки идентифицированных миРНК по уровню представленности (количество ридов на килобайт на миллион (RPKM)) и кратности изменения в порядке убывания [36]. Поскольку миРНК являются тканеспецифичными, а LLC и RLS<sub>40</sub> имеют эпителиальное и гематопозитическое происхождение, соответственно, было выбрано шесть миРНК, чтобы обеспечить перекрытие между профилями миРНК этих различных тканей в случае, если некоторые из миРНК не экспрессируются на должном уровне в клетках RLS<sub>40</sub>. Поскольку онкомиры miR-21a и miR-155 часто сверхэкспрессируются в диффузных крупноклеточных В-лимфомах человека [292,293], которым гомологична лимфосаркома RLS<sub>40</sub> мыши, это было дополнительным основанием для их выбора в панель миРНК.

Вначале были определены уровни экспрессии выбранных миРНК в клетках RLS<sub>40</sub>, B16 и HeLa с помощью stem-loop RT-qПЦР. Наиболее высокий уровень экспрессии миРНК был характерен для клеток RLS<sub>40</sub> (Таблица 8). Наиболее экспрессируемыми миРНК были miR-155, let-7g и miR-21a с уровнями экспрессии 1.9, 1.8 и 1.7 соответственно, miR-10b и miR-145a экспрессировались на умеренном уровне с уровнями экспрессии 1.5 и 1.4, а miR-31 экспрессировалась на самом низком уровне 0.85 (Таблица 8). В клетках B16 и HeLa эти миРНК

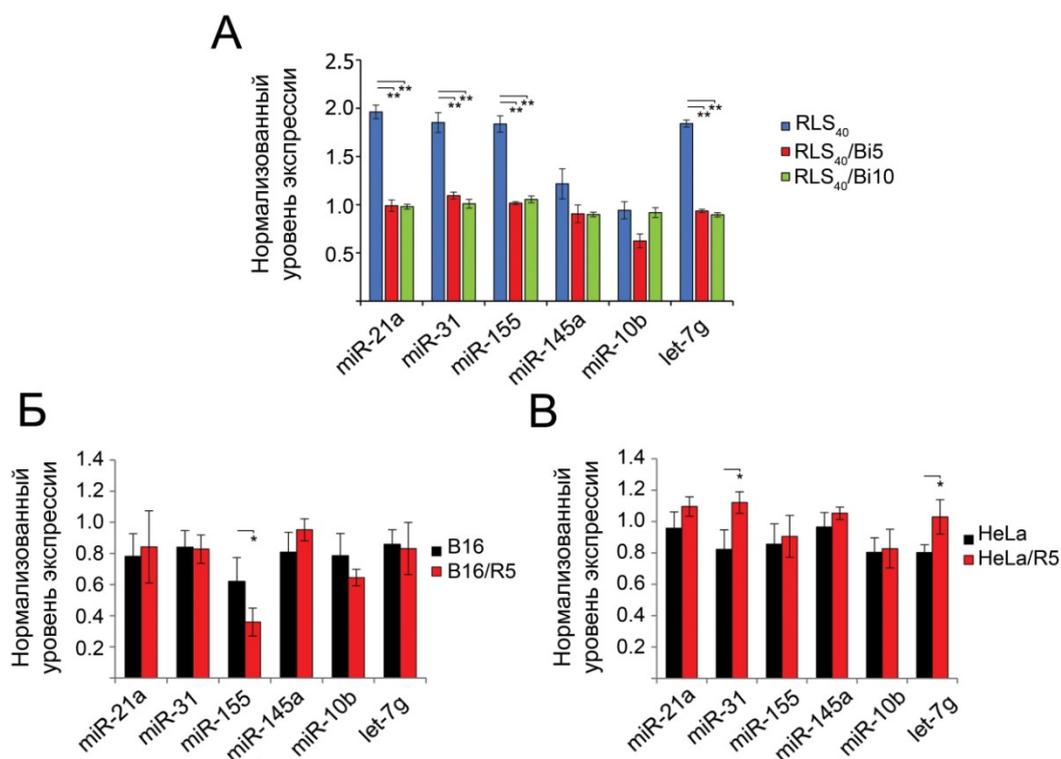
также экспрессировались, но на более низком уровне (Таблица 8). В клетках меланомы B16 miR-155 экспрессировалась на уровне 0.56, тогда как остальные миРНК – на уровне 0.7 – 0.8. В клетках HeLa все шесть миРНК экспрессировались на уровне 0.9 – 1 (Таблица 8).

**Таблица 8.** Уровни миРНК в клетках RLS<sub>40</sub>, B16 и HeLa *in vitro* и изменение их уровня после обработки клеток биназой и РНКазой А.

миРНК	Интактные клетки			Клетки, обработанные		
				Биназой	РНКазой А	
	Абсолютный уровень экспрессии, а.у. <sup>2)</sup>			Кратное изменение уровня миРНК <sup>3)</sup>		
	RLS <sub>40</sub>	B16	HeLa	RLS <sub>40</sub>	B16	HeLa
miR-21a	1.7	0.7	0.9	2.0↓	n.a.	n.a.
miR-145a	1.4	0.8	0.95	n.a.	n.a.	n.a.
miR-31	0.85	0.75	0.86	1.6↓	n.a.	n.a.
miR-10b	1.5	0.8	0.78	n.a.	1.1 – 1.5↓	n.a.
let-7g	1.8	0.75	0.8	1.6↓	n.a.	n.a.
miR-155	1.9	0.56	1.0	1.8↓	1.6 – 2.0↓↓	n.a.
U6 snRNA <sup>1)</sup>	0.4	0.86	0.82	0.4	n.a.	n.a.

Клетки B16 и HeLa инкубировали в присутствии РНКазы А (5 мкг/мл) в течение 48 ч в стандартных условиях. Уровни миРНК определяли с помощью RT-qPCR. <sup>1)</sup> миРНК U6 использовали в качестве референса для нормализации уровня миРНК; <sup>2)</sup> значения ПЦР нормированы на значение наиболее экспрессированного образца и представлены в условных единицах (а.у.); <sup>3)</sup> уровни миРНК, нормализованные на уровень миРНК U6; n.a. – не влияет.

Инкубация клеток RLS<sub>40</sub> в присутствии биназы в концентрации 5 мкг/мл в течение 24 ч приводила к снижению уровней экспрессии miR-21a, let-7g, miR-31 и miR-155 в 1.6–2 раза (Таблица 8, Рис. 19, А); дальнейшее увеличение концентрации биназы до 10 мкг/мл не усиливало этот эффект. Уровни miR-10b и miR-145a после обработки биназой не изменялись (Рис. 19, А). Инкубация клеток B16 в присутствии РНКазы А в концентрации 5 мкг/мл приводила к снижению уровней экспрессии miR-10b и miR-155 в 1.1-2 раза (Таблица 8, Рис. 19, Б). Уровни let-7g, miR-21a, miR-31 и miR-145a не изменились после инкубации с РНКазой А (Рис. 19, Б). В клетках HeLa не наблюдалось никакого влияния РНКазы А на уровень экспрессии исследованных миРНК (Таблица 8, Рис. 19, В).



**Рис. 19.** Влияние биназы и РНКазы А на экспрессию миРНК в клетках RLS<sub>40</sub>, B16 и HeLa *in vitro*. **А.** Экспрессия миРНК в клетках после обработки биназой. **Б и В.** Экспрессия миРНК в клетках B16 и HeLa после обработки РНКазой А, соответственно. Клетки RLS<sub>40</sub> инкубировали в присутствии биназы в концентрациях 5 (группа RLS<sub>40</sub>/Bi5) и 10 мкг/мл (группа RLS<sub>40</sub>/Bi10) в течение 24 ч. Клетки B16 и HeLa инкубировали в присутствии РНКазы А в концентрации 5 мкг/мл (группы B6/R5 и HeLa/R5) в течение 48 ч. Уровни экспрессии миРНК были нормализованы на уровень экспрессии U6 мяРНК. Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Стьюдента (*t*-test). Данные считали достоверными при \**p* < 0.05. Данные представлены как MEAN±SD.

Биназа представляет собой гуанинспецифичную рибонуклеазу, поэтому мы попытались сопоставить количество остатков гуанина в миРНК и наблюдаемые эффекты. Действительно, оказалось, что уровень миРНК, содержащих 5-7 остатков гуанина, фосфодиэфирная связь которых чувствительна к расщеплению биназой, сильно снизился, в то время как уровни miR-145a и miR-10b с четырьмя остатками гуанинами не изменились после обработки клеток биназой (Таблица 9).

**Таблица 9.** Последовательность миРНК.

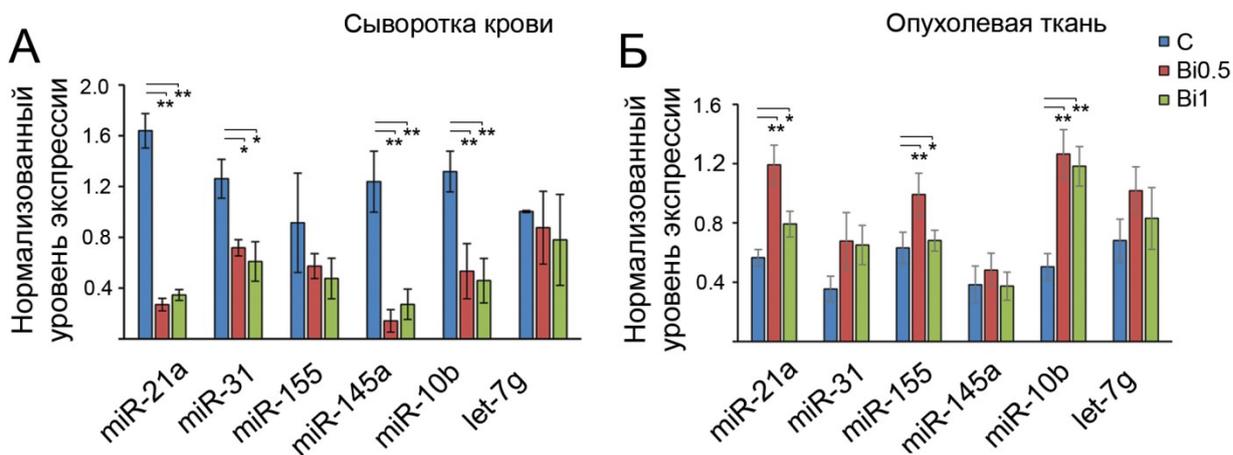
Номер библиотеке по RPKM <sup>1)</sup>	в по	Топ миРНК (LLC NGS data) [36]	Последовательность миРНК, 5'→3'	Количество остатков гуанина <sup>2)</sup>
1		mir-21a	UAG <u>C</u> UUAUCAG <u>A</u> CUG <u>A</u> UG <u>U</u> UG <u>A</u>	5
10		mir-145a	<u>G</u> UCCAG <u>U</u> UUUCC <u>C</u> CAG <u>G</u> AAUCC <u>C</u> U	4
15		mir-31	AGGCAAG <u>A</u> UG <u>C</u> UGGCAUAG <u>C</u> UG	7
29		mir-10b	UACCCU <u>G</u> UAG <u>A</u> ACCGAAUUU <u>G</u> UG	4
46		let-7g	UGAG <u>G</u> UAG <u>U</u> AG <u>U</u> UUUG <u>U</u> ACAG <u>U</u> U	7
47		miR-155	UUAAUG <u>C</u> UAAUUG <u>U</u> G <u>A</u> UAGGG <u>G</u> U	7

<sup>1)</sup> RPKM (количество прочтений на kb на миллион) = количество прочтений конкретной миРНК/(размер миРНК (kb) × общее количество прочтений в библиотеке (млн)); <sup>2)</sup> указаны остатки гуанина, поддающиеся расщеплению биназой.

### 3.3.2. Профиль миРНК опухолевой ткани и сыворотки крови мышей с RLS<sub>40</sub> обработанных биназой и профиль миРНК в легочной ткани и сыворотке крови мышей с меланомой B16, обработанных РНКазой А

Профили миРНК в опухолевой ткани и сыворотке крови мышей с RLS<sub>40</sub> после лечения биназой анализировали с помощью stem-loop RT-qПЦР. Как и ожидалось, введение мышам биназы приводило к снижению уровня большинства из проанализированных миРНК в сыворотке крови: уровень miR-21a, miR-31, miR-145a и miR-10b и снижался в 2 – 6 раз (Рис. 20, А). Также наблюдалось снижение уровня miR-155 и let-7g, однако, оно было статистически недостоверным относительно контрольной группы. Ранее полученные результаты показали, что биназа *in vitro* вызывала снижение уровней четырех из шести проанализированных миРНК (Рис. 19, А). Тем не менее, введение биназы мышам с RLS<sub>40</sub> приводило к возрастанию уровней пяти миРНК в опухолевой ткани: онкомиров miR-21, miR-10b, miR-31 и miR-155 и онкосупрессора let-7g (Рис. 20, Б). Эффекта от введения биназы на miR-145a не обнаружено.

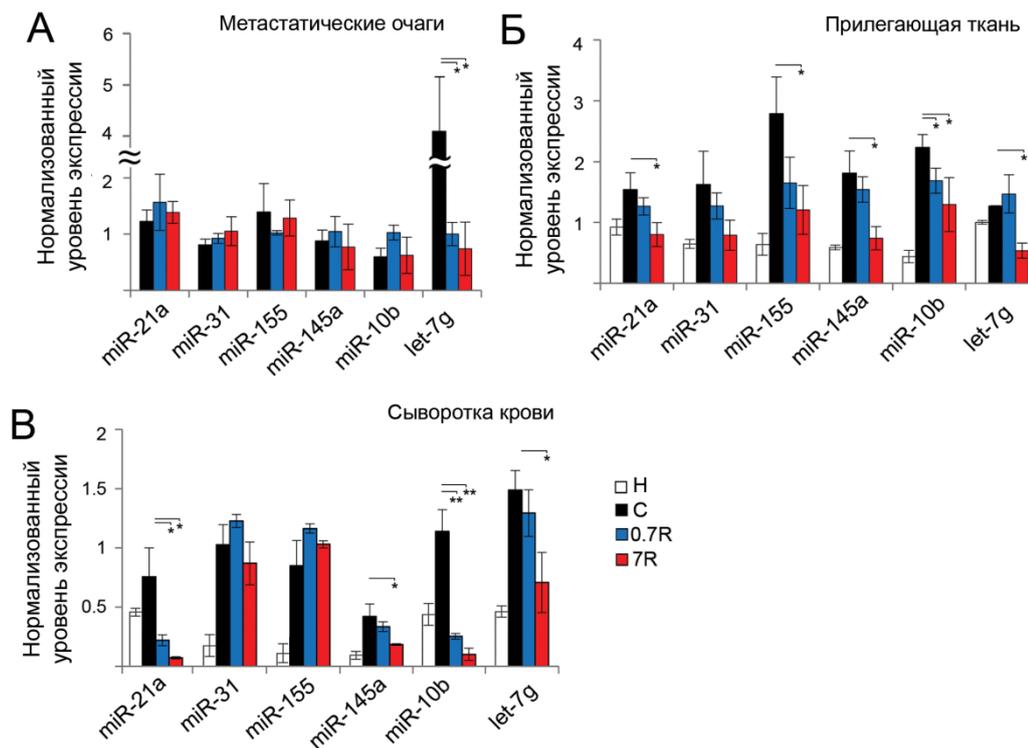
Были проанализированы паттерны экспрессии миРНК в метастатических очагах, прилегающей к ним легочной ткани и сыворотке крови мышей с B16, получавших инъекции РНКазы А (Рис. 21, А–В). В метастатических очагах исследуемые миРНК детектировались на уровне 0.4 – 1.5 за исключением let-7g, уровень которой был самым высоким и составил 4.



**Рис. 20.** Влияние биназы на уровень миРНК в сыворотке крови (А) и опухолевой ткани (Б) мышей с RLS<sub>40</sub>. Данные ОТ-qПЦР. Мыши с RLS<sub>40</sub> получали в/б инъекции физ./р-ра или биназы в дозах 0.5 и 1 мг/кг три раза в неделю по схеме, приведенной на Рис. 16. Уровень экспрессии миРНК в тканях нормализовали на уровень экспрессии U6 мяРНК, в сыворотке крови – на объем сыворотки. С (контроль) – мыши с RLS<sub>40</sub>, получавшие инъекции физ./раствора, Bi0.5 и Bi1 – мыши с RLS<sub>40</sub>, получавшие инъекции биназы в дозах 0.5 и 1 мг/кг, соответственно. Статистическую обработку данных проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. Данные считали достоверными при \**p* < 0.05. Данные представлены как MEAN±SEM.

Введение РНКазы А не приводило к достоверному изменению уровня исследуемых миРНК за исключением let-7g, уровень которой упал в 4 раза (Рис. 21, А).

Интересно, что профиль миРНК в здоровой ткани и ткани, прилегающей к метастатическим очагам, существенно различается. Так, было показано, что в тканях, прилегающих к метастатическим очагам, наблюдается увеличение уровня 5 миРНК по сравнению со здоровыми тканями легких: miR-21a - в 1.5 раза, miR-31 - в 2.4 раза, miR-155 - в 4 раза, miR-145a - в 2.8 раза, miR-10b – в 4.5-раза (Рис. 21, Б). Уровень let-7g оставался практически таким же, как и в здоровой легочной ткани (Рис. 21, Б). Введение РНКазы А мышам с В16 (группы 0.7R и 7R) приводило к снижению уровня экспрессии miR-21a, miR-31, miR-145a, miR-155 и miR-10b по сравнению с контрольной группой (без лечения), и этот эффект зависел от дозы фермента (Рис. 21, Б). В группе 0.7R наблюдалось некоторое снижение уровня этих миРНК, тогда как в группе 7R снижение достигало уровня здоровых животных. Следует отметить, что в группе 7R наблюдалось существенное снижение уровня let-7g даже ниже уровня здоровых животных (Рис. 21, Б).



**Рис. 21.** Влияние РНКазы А на уровень миРНК в метастатических очагах (А), прилегающей к ним ткани (Б) и сыворотке крови (В) мышей с метастатической моделью меланомы В16. Данные ОТ-қПЦР. Мыши с В16 получали в/м инъекции физ./р-ра или РНКазы А в дозах 0.7 и 7 мкг/кг по схеме, приведенной на Рис. 12. Уровень экспрессии миРНК в тканях нормализовали на уровень экспрессии U6 мяРНК, в сыворотке крови – на объем сыворотки. Н – здоровые мыши, С (контроль) – мыши с В16, получавшие физ./раствор, 0.7R и 7R – мыши с В16, получавшие РНКазу А в дозах 0.7 и 7 мкг/кг, соответственно. Статистическую обработку данных проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным критерием Тьюки. Данные считали достоверными при \* $p < 0.05$ . Данные представлены как  $MEAN \pm SEM$ .

В сыворотке крови здоровых животных проанализированные миРНК обнаруживаются на уровне 0.2 – 0.4 (Рис. 21, В). Прогрессирование меланомы приводило к выраженному повышению уровня всех миРНК. При введении РНКазы А в дозе 0.7 мкг/кг (группа 0.7R) выявлено достоверное снижение уровня miR-21a в 3.5 раза, miR-10b – в 4.5 раза, miR145a и let-7g - в 1.3 раза (Рис. 21, В). Повышение дозы РНКазы А до 7 мкг/кг (группа 7R) приводило к снижению уровня miR-21a и miR-10b в 11 раз, miR-145a и let-7g в 2.1 – 2.3 раза, в то время как уровни miR-31 и miR-155 оставались неизменными (Рис. 21, В).

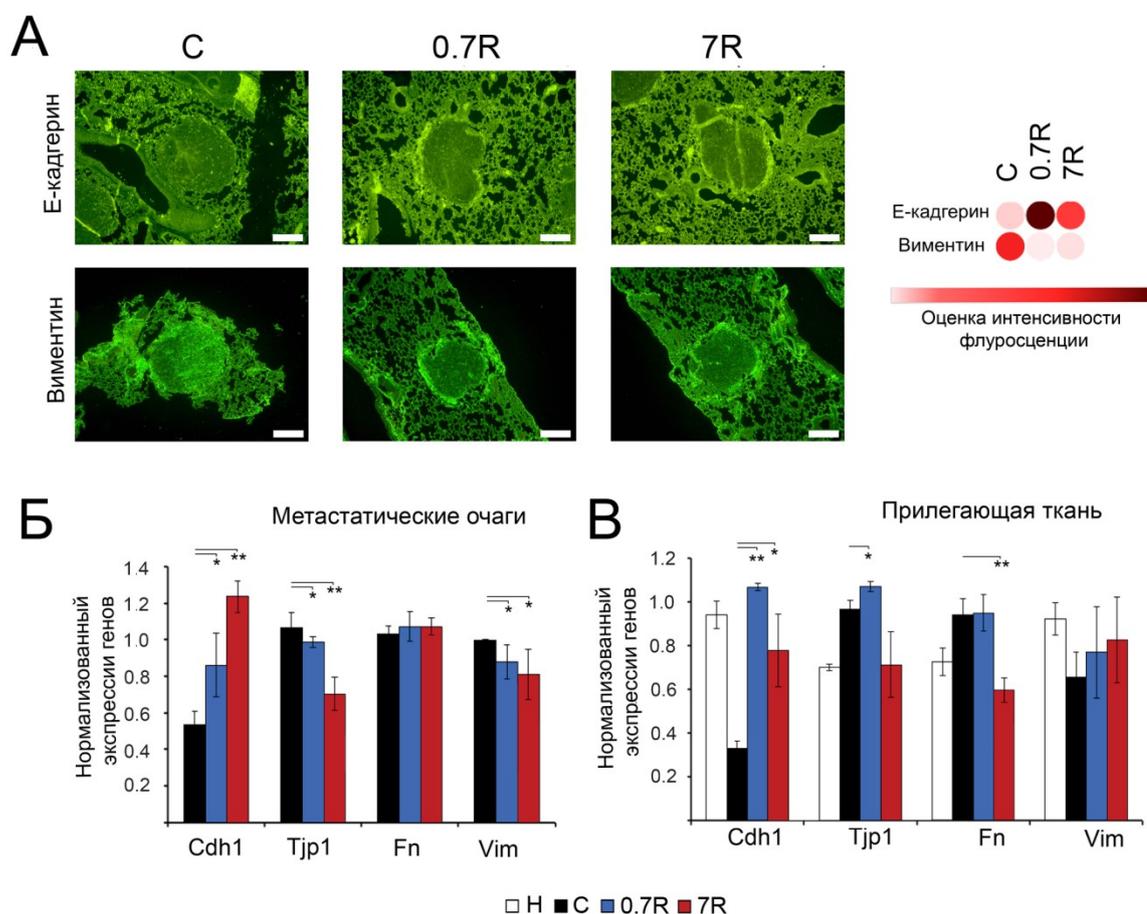
### 3.3.3. Исследование влияния РНКазы А на экспрессию маркеров ЕМТ в метастатических очагах и прилегающей ткани легких у мышей с меланомой В16

Для того, чтобы оценить влияние РНКазы А на развитие метастазов, была исследована экспрессия маркеров в метастатических очагах, связанных с эпителиально-мезенхимальным переходом (ЕМТ): Cdh1, Tjp1, Fn и Vim, играющих важную роль в инвазии и метастазировании. Экспрессию Е-кадгерина и виментина исследовали с помощью флуоресцентной иммуногистохимии. Как видно из представленных данных, метастатические очаги характеризуются низким уровнем экспрессии Е-кадгерина и средним уровнем экспрессии виментина (Рис. 22, А). Введение РНКазы А мышам с В16 усиливало экспрессию Е-кадгерина в очагах метастазов в легких: интенсивность флуоресценции увеличивалась в 2–2.3 раза в группах 0.7 R и 7 R по сравнению с контролем (Рис. 22, А). Одновременно с повышением экспрессии Е-кадгерина наблюдалось снижение экспрессии виментина в 2.5-2.6 раз в метастатических очагах тех же групп по сравнению с контрольными животными (Рис. 22, А). Следует отметить, что влияние РНКазы А на экспрессию ЕМТ-маркеров в метастатических очагах в дозе 0.7 мкг/кг были более выражены, чем в дозе 7 мкг/кг.

В метастатических очагах уровень экспрессии Cdh1 составил 0.5, тогда как уровни экспрессии остальных ЕМТ-маркеров были около 1 (Рис. 22, Б). Введение РНКазы А (группа 0.7R) вызывало повышение уровня экспрессии Cdh1 в 1.6 раз, при этом экспрессия Vim снижалась в 1.1 раз, а уровни экспрессии Tjp1 и Fn не изменялись (Рис. 22, Б). Увеличение дозы РНКазы А до 7 мкг/кг (группа 7R) приводило к увеличению экспрессии Cdh1 в 2.4 раза, снижению экспрессии Vim и Tjp1 в 1.2 - 1.4 раза, тогда как уровень Fn остается неизменным (Рис. 22, Б).

Было проведено сравнение уровня экспрессии ЕМТ-маркеров в тканях, прилегающих к метастатическим очагам, с уровнем экспрессии в ткани легких здоровых животных, поскольку они имеют одно и то же происхождение (эпителиальное) в отличие от метастатических очагов, имеющих нейроэктодермальное происхождение. Легочная ткань, прилегающая к

метастатическим очагам, характеризовалась достоверным снижением уровня *Cdh1* в 3 раза относительно здорового контроля, повышением уровня экспрессии *Tjp1* и *Fn* в 1.3 раза и снижением уровня экспрессии *Vim* в 1.5 раза (Рис. 22, В). Введение РНКазы А (группа 0.7R)



**Рис. 22.** Влияние РНКазы А на экспрессию ЕМТ-ассоциированных маркеров в метастатических очагах и прилегающих к ним тканях у мышей с меланомой В16. **А.** Флуоресцентная визуализация Е-кадгерина и виментина в легких мышей с В16. Срезы легких окрашивали первичными антителами против Е-кадгерина и виментина с последующей инкубацией с вторичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor® 488. Увеличение  $\times 200$ . Тепловая карта интенсивности флуоресценции, соответствующая экспрессии Е-кадгерина и виментина. **Б** и **В.** Уровень экспрессии генов *Cdh1*, *Tjp1*, *Fn* и *Vim* в метастатических очагах и прилегающих тканях легких мышей с меланомой В16, соответственно, получавших в/м РНКазу А в дозах 0.7 и 7 мкг/кг по схеме, приведенной на Рис. 16. Данные ОТ-qПЦР. Уровень экспрессии генов нормировали на уровень экспрессии гена *Hprt*. Н – здоровые мыши, С (контроль) – мыши с В16, получавшие инъекции физ./раствора, 0.7R и 7R – мыши с В16, получавшие инъекции РНКазы А в концентрациях 0.7 и 7 мкг/кг, соответственно. Данные представлены как MEAM  $\pm$  SEM. Статистическую обработку данных проводили с использованием t-теста Стьюдента. Данные считали достоверными при \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

приводило к повышению экспрессии *Cdh1* до уровня здоровых животных, повышению экспрессии *Vim* в 1.2 раза, при этом экспрессия *Tjp1* и *Fn* не менялась (Рис. 22, В). Увеличение дозы РНКазы А до 7 мкг/кг (группа 7R) не влияло на экспрессию *Cdh1* (в пределах  $MEAN \pm SEM$ ), вызывало снижение экспрессии *Tjp1* и *Fn* ниже уровня здоровых животных. Также, как и в группе 0.7R, в группе 7R экспрессия *Vim* незначительно увеличивалась и достигала уровня здоровых животных (Рис. 22, В).

#### **3.3.4. Анализ сигнальных путей, контролируемых миРНК, чувствительными к биназе**

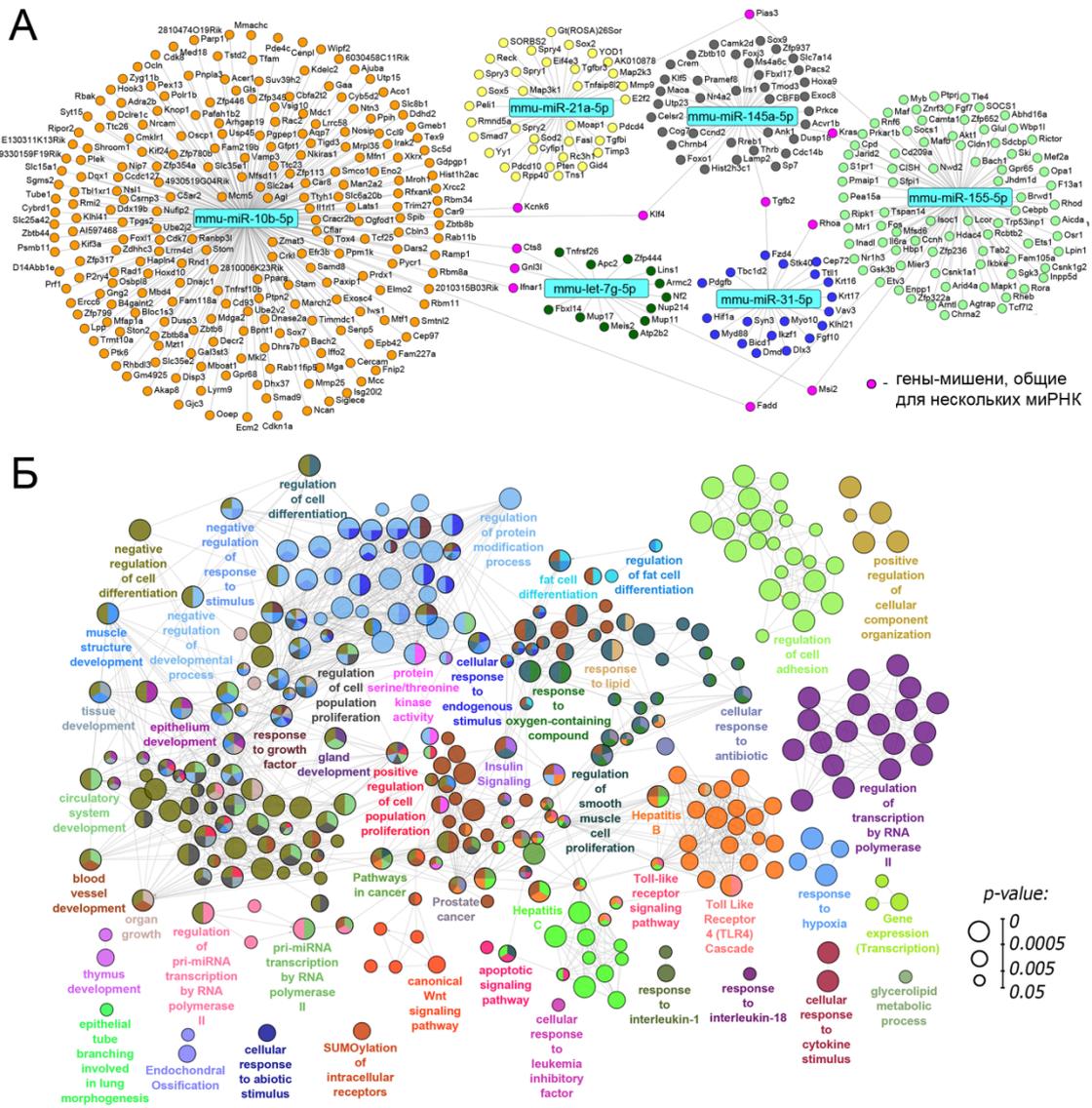
Одной из задач нашего исследования являлось выяснение того, какие биологические процессы и пути могут контролироваться миРНК, восприимчивыми к биназе, и может ли модулирующий эффект биназы на эти миРНК лежать в основе ее биологической активности [9,29,30,39,96,175,294–297]. Для решения этой задачи были проанализированы гены-мишени *miR-21a*, *miR-145a*, *miR-31*, *miR-10b*, *miR-155* и *let-7g* с использованием базы данных *miRTarBase* [273]. Регулом был реконструирован с учетом полученных нами экспериментальных данных, что позволило рассматривать только отдельные сигнальные пути, валидированные ранее. Как видно из Рис. 23, А, реконструированный регулом характеризовался кластерной структурой: было обнаружено, что каждая отдельная миРНК связана со своим собственным списком генов-мишеней, и только ограниченное количество мишеней было обнаружено как общее для нескольких миРНК.

При анализе генов-мишеней миРНК во внутренних сетях миРНК было обнаружено, что онкомиры *miR-21a*, *miR-10b*, *miR-31* и *miR-155* модулируют функции большого числа генов, связанных с трансформацией клеток, например супрессоров опухолей, ингибиторов пролиферации и миграции и медиаторов апоптоза (Рис. 23, А). Следует отметить, что онкосупрессоры *miR-145a* и *let-7g* практически не имеют мишеней, связанных с усилением прогрессирования опухоли (Таблица S4 и S6, Приложение 1).

Ключевые общие гены, экспрессия которых модулируется выбранными миРНК, были проанализированы с точки зрения их участия в путях и событиях, связанных с опухолевой

прогрессией, с использованием баз данных Gene Card, Pathcards и KEGG pathway [275,276].

Было обнаружено, что одиннадцать общих генов обнаруживаются в сетях миРНК: *CTSB*,



**Рис. 23.** Функциональная аннотация миРНК, изменяющихся в клетках RLS<sub>40</sub> под действием биназы. **А.** Регулом миРНК и их гены-мишени, реконструированные с использованием базы данных miRTarBase 8.0 (*Mus musculus*). Анализ проводился с использованием плагина CyTargetLinker, а сеть визуализировалась с помощью Cytoscape 3.7.2. **Б.** Сеть взаимодействия значимых терминов, обогащенная выявленными генами-мишенями миРНК. Функциональная аннотация была выполнена на ClueGO с использованием GeneOntology (биологические процессы), KEGG, REACTOME и Wikipathways. Функционально сгруппированная сеть была связана на основе показателей каппа терминов. В сеть были включены только термины / пути с  $p < 0.05$  после поправки Бонферрони.

*GNL3L, IFNAR1, KCNK6, KIF4A, PIAS3, KRAS, RHOA, MSI2, FADD* и *TGFB2* (Таблица 10). Рассмотрение событий и путей, в которых эти гены участвуют при опухолевой прогрессии, позволило обнаружить, что основные модулируемые пути включают апоптоз и аутофагию, пролиферацию, пути, связанные с трансформацией (JAK-STAT, PI3K-Akt, Wnt, MAPK Erk, передача сигналов Ras, MAPK, ERK, AGE/RAGE, PKA и TGF-бета), воспаление, ангиогенез, адгезия и миРНК при раке (Таблица 10).

С точки зрения функции гены домашнего хозяйства, которые были обнаружены как общие мишени проанализированных миРНК, очень интересны и связаны с процессингом рРНК, регуляцией экспрессии мРНК на уровне трансляции, обменом белков, регуляцией активности калиевых каналов и эксцизионной репарацией нуклеотидов, связанной с транскрипцией (Таблица 10). Таким образом, общие гены сконструированных сетей миРНК могут рассматриваться как общие игроки в поддержании целостности клеток, транскрипции и трансляции, а также в модуляции путей, связанных с трансформацией.

Далее была проведена комплексная функциональная аннотация выявленных генов-мишеней с использованием баз данных GeneOntology, KEGG, REACTOME и WikiPathways. Полученная сеть путей показала, что изменение в уровнях чувствительных к биназе миРНК могут влиять на широкий спектр процессов и сигнальных путей в клетках (Рис. 23, Б). Было обнаружено, что большинство выявленных терминов связано с процессами, которые уже были идентифицированы как чувствительные к действию биназы. Большое количество терминов, относящихся к апоптозу, жизнеспособности клеток и пролиферации опухолевых клеток, хорошо согласуется со способностью биназы запускать апоптоз в клетках RLS<sub>40</sub>. Таким образом, биназа является модулятором микроокружения опухоли: сигнальных путей, связанных с дифференцировкой клеток (например, «регуляция дифференцировки клеток», «развитие ткани», и др.) и ангиогенез («развитие кровеносных сосудов», «развитие системы кровообращения», «регуляция пролиферации гладкомышечных клеток»).

**Таблица 10.** Общие гены-мишени анализируемых miРНК и их функции.

Событие	Целевой ген	Описание	миРНК	Путь
Апоптоз	<i>CTSB</i>	Cathepsin C	miR-10b/let-7g	Апоптоз и аутофагия Модуляция апоптоза и передача сигналов Активация каспазы через внешний апоптотический сигнальный путь
	<i>KRAS</i>	<i>KRAS</i> Proto-Oncogene, GTPase	miR-155/miR-145a	Путь апоптоза
	<i>FADD</i>	Fas Associated Via Death Domain	miR-155/miR-10b	Модуляция апоптоза и передача сигналов Апоптоз и аутофагия
	<i>TGFB2</i>	Transforming Growth Factor Beta 2	miR-145a/miR-31	Путь клеточного апоптоза Митохондриальный апоптоз
Пролиферация	<i>KIF4A</i>	Kinesin Family Member 4A	miR-10b/miR-145a	Взаимодействие L1CAM
	<i>TGFB2</i>	Transforming Growth Factor Beta 2	miR-145a/miR-31	Путь TGF-бета
Пути, связанные с трансформацией	<i>IFNAR1</i>	Interferon Alpha and Beta Receptor Subunit 1	miR-10b/let-7g	Сигнальный путь JAK-STAT Сигнальный путь PI3K-Akt
	<i>PIAS3</i>	Protein Inhibitor of Activated STAT 3	miR-155/miR-21a	Сигнальный путь JAK-STAT
	<i>KRAS</i>	<i>KRAS</i> Proto-Oncogene, GTPase	miR-155/miR-145a	Путь MAPK Erk Сигнальный путь <i>RAS</i> Онкогенная передача сигналов MAPK
	<i>RHOA</i>	RAS Homolog Family Member A	miR-155/miR-31	ERK-сигнализация Сигнальный путь Wnt путь AGE/RAGE
	<i>FADD</i>	Fas Associated Via Death Domain	miR-155/miR-10b	Сигнальный путь PI3K-Akt
	<i>KCNK6</i>	Potassium Two Pore Domain Channel Subfamily K Member 6	miR10b/miR-21a	PKA-сигнализация
	<i>TGFB2</i>	Transforming Growth Factor Beta 2	miR-145a/miR-31	Путь TGF-бета
Иммунитет/ Воспаление	<i>PIAS3</i>	Protein Inhibitor of Activated STAT 3	miR-155/miR-21a	IL6-опосредованная передача сигналов
	<i>RHOA</i>	RAS Homolog Family Member A	miR-155/miR-31	Путь CCR5 в макрофагах (передача сигналов хемокинов)
	<i>FADD</i>	Fas Associated Via Death Domain	miR-155/miR-10b	Каскад толл-подобного рецептора 4 (TLR4)
	<i>TGFB2</i>	Transforming Growth Factor Beta 2	miR-145a/miR-31	Сигнальный путь толл-подобного рецептора Сигнализация плазмينا
Ангиогенез	<i>TGFB2</i>	Transforming Growth Factor Beta 2	miR-145a/miR-31	Ангиогенез

**Таблица 10.** Общие гены-мишени анализируемых миРНК и их функции (продолжение)

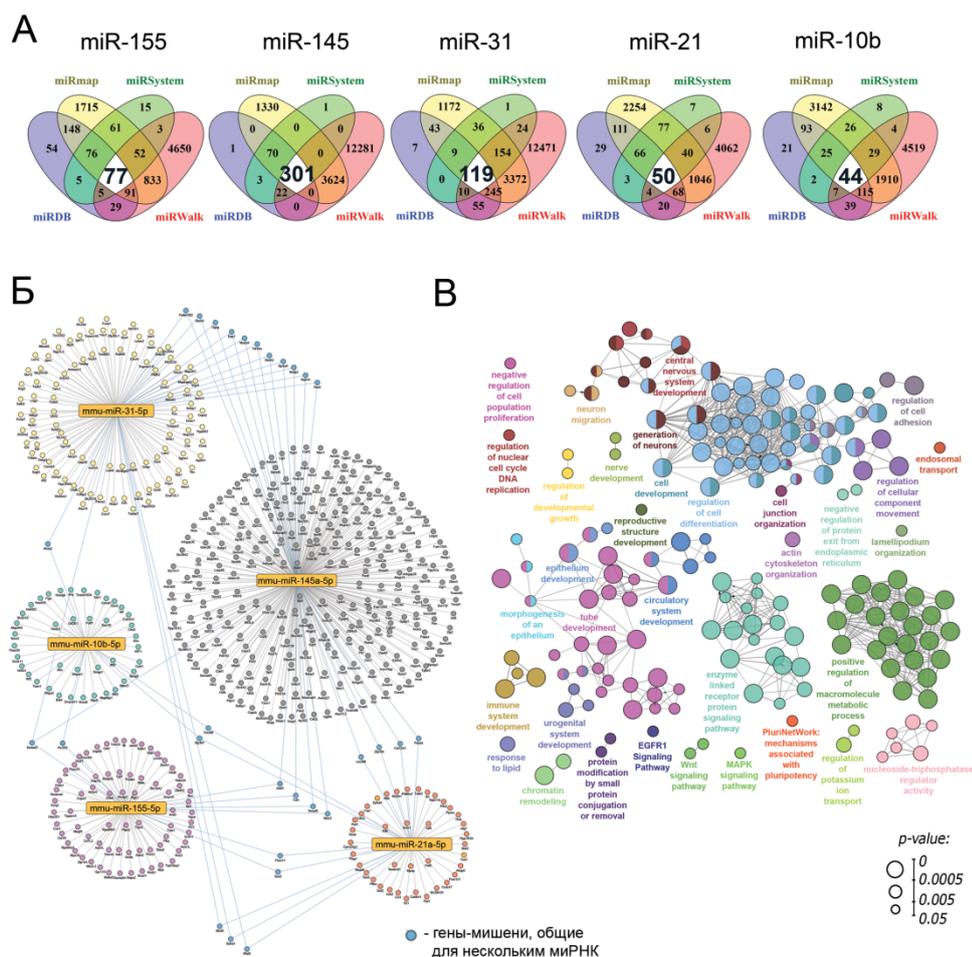
Событие	Целевой ген	Описание	миРНК	Путь
Адгезия	<i>RHOA</i>	<i>RAS</i> Homolog Family Member A	miR-155/miR-31	Ремоделирование цитоскелета (адгезия и миграция клеток) Соединение приверженцев
	<i>TGFB2</i>	Transforming Growth Factor Beta 2	miR-145a/miR-31	Адгезия клеток
миРНК при опухолевой прогрессии	<i>KRAS</i>	<i>KRAS</i> Proto-Oncogene, GTPase	miR-155/miR-145a	Замалчивание генов-супрессоров опухолей
	<i>MSI2</i>	Musashi RNA Binding Protein 2	miR-155/let-7g	путь надзора за мРНК
	<i>TGFB2</i>	Transforming Growth Factor Beta 2	miR-145a/miR-31	МиРНК при раке
Хозяйственные функции	<i>GNL3L</i>	G Protein Nuclear 3 Like	miR-10b/let-7g	Биогенез рибосом у эукариот
	<i>KCNK6</i>	Potassium Two Pore Domain Channel Subfamily K Member 6	miR-10b/miR-21a	Калиевые каналы Печеночные транспортеры ABC
	<i>PIAS3</i>	Protein Inhibitor Of Activated STAT 3	miR-155/miR-21a	Экспоненциальная репарация нуклеотидов, связанная с транскрипцией (TC-NER)

Для анализа использовалась база данных: Genecard (<https://www.genecards.org>) and KEGG пути (<https://www.kegg.jp/>).

### 3.3.5. Функциональная аннотация миРНК, чувствительных к РНКазе А.

Учитывая способность РНКазы А существенно влиять на экспрессию таких миРНК, как miR -21a, miR-31, miR -145a, miR -155 и miR -10b, в метастатических очагах и прилегающей ткани мышей с меланомой B16, возник вопрос, какие гены могут регулироваться РНКазой А-чувствительными миРНК и в какие биологические процессы могут быть вовлечены эти гены. Для получения ответа на этот вопрос, гены-мишени миРНК были предсказаны с использованием четырех независимых баз данных миРНК miRmap, miRSystem, miRDB и miRWalk. Затем с помощью диаграммы Венна были идентифицированы перекрывающиеся гены, общие для всех анализируемых баз данных миРНК (Рис. 24, А, области перекреста всех четырех массивов).

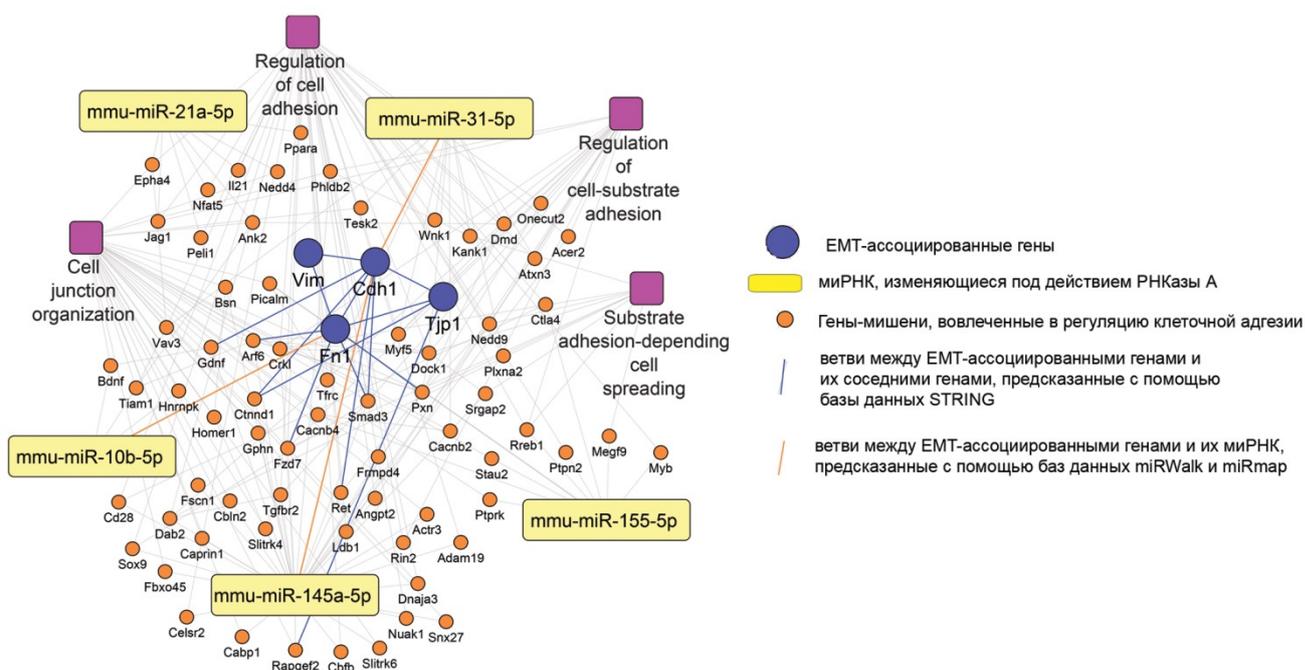
Регулом был реконструирован с учетом полученных нами в данной работе экспериментальных данных, что позволило рассматривать только отдельные сигнальные пути, -



**Рис 24.** Функциональная аннотация миРНК, изменяющихся в клетках В16 под действием РНКазы А. **А.** Венн-диаграмма генов-мишеней miR-155, miR-145ф, miR-31, miR-21ф и miR-10b. Для каждой миРНК гены-мишени были получены из четырех независимых баз данных миРНК. Желтым цветом обозначена miRmap, зеленым - miRSystem, синим - miRDB и красным - miRWalk. Гены-мишени, общие для всех проанализированных баз данных миРНК, отмечены жирным шрифтом. **Б.** Регулом миРНК и их общих генов-мишеней. Сеть была реконструирована и визуализирована с помощью Cytoscape 3.9.0. **В.** Сеть взаимодействия значимых терминов, обогащенная выявленными генами-мишенями миРНК. Функциональная аннотация была выполнена с помощью плагина ClueGO с использованием баз данных GeneOntology (биологические процессы), KEGG, REACTOME и Wikipathways. Функционально сгруппированная сеть была связана на основе каппы терминов. В сеть были включены только термины/пути с  $p < 0.05$  после поправки Бонферрони.

валидированные ранее. Дальнейшая реконструкция регулома, содержащего РНКазы А чувствительные миРНК и их гены-мишени, показала его кластерную архитектуру: все миРНК были ассоциированы преимущественно со своим списком генов-мишеней, и только 29 генов были идентифицированы как общие для нескольких миРНК (Рис. 24, Б). Интересно, что

онкосупрессорная miR-145a оказалась наиболее обогащенной генами-мишенями, включая 20 распространенных регуляторов, по сравнению с онкомирами miR-21a, miR-10b, miR-31 и miR-155. Далее, для понимания внутриклеточных процессов, в регуляцию которых могут быть вовлечены выявленные гены-мишени миРНК, был дополнительно проведен их функциональный анализ. Полученные результаты убедительно показали, что чувствительные к РНКазе А миРНК могут модулировать широкий спектр процессов и сигнальных путей, связанных с пролиферацией и подвижностью опухолевых клеток (Рис. 24, В). Выяснилось, что большинство идентифицированных терминов связаны с процессами, которые уже были выявлены как чувствительные к РНКазой А, например, регуляция клеточной адгезии, морфогенез эпителия, организация ламеллиподия и межклеточных связей (Рис 25).



**Рис. 25.** Предсказанная регуляторная сеть, активируемая РНКазой А в ткани легкого мышей с В16, прилегающей к метастатическим очагам. Сеть была реконструирована по базе данных STRING и визуализирована с помощью Cytoscape 3.9.0.

### 3.4. Заключение

В данной работе был изучен механизм противоопухолевой активности двух рибонуклеаз различного происхождения, принадлежащих к различным классам – бычьей панкреатической РНКазы А, относящейся к семейству РНКазы А, и микробной рибонуклеазы биназы *B. pumilus*,

относящейся к семейству РНКазы Т1. При изучении рибонуклеаз мы фокусировались на нескольких основных направлениях: (1) изучение накопления РНКазы А в опухолевых клетках и ее внутриклеточной локализации, включая совместную локализацию с RI; исследовании роли гетеродимера Ku70/Ku80 во внутриклеточном накоплении РНКазы А; (2) изучение способности РНКазы А и биназы влиять на жизнеспособность, миграционные и инвазивные свойства опухолевых клеток *in vitro*; (3) поиск корреляций между цитотоксическим (*in vitro*) и противоопухолевым (*in vivo*) эффектами рибонуклеаз и изменением профилей миРНК в опухолевых клетках/тканях, метастатических очагах/прилегающих тканях и сыворотке крови; (4) конструирование регуляторных сетей, которые могли бы объяснить наблюдаемые противоопухолевые эффекты, с помощью биоинформатического анализа и интегрирования собственных полученных результатов.

Данные, полученные *in vitro*, показали, что биназа проявляет цитотоксическое действие по отношению к ряду клеток за счет индукции апоптоза, что согласуется с полученными ранее данными [9,39,298]. Наши данные ясно продемонстрировали, что РНКазы А эффективно накапливаются в клетках меланомы В16 мыши и эпидермоидной карциномы шейки матки HeLa человека, при этом фермент не полностью связывается с рибонуклеазным ингибитором, часть его остается в свободном состоянии. Тот факт, что РНКазы А остается несвязанной с RI и каталитически активной после внутриклеточного накопления, подтверждается эффективной деградацией РНК внутри клеток как в клетках В16, так и в клетках HeLa, причем в ядре клеток HeLa этот эффект более выражен.

Таким образом, в нашей работе мы впервые опровергли существовавшее долгое время мнение, что РНКазы А количественно связывается внутри клетки с RI [25,299,300]. RI связывает несколько членов семейства РНКазы А с равновесными константами диссоциации в фемтомолярном диапазоне, образуя один из самых плотных нековалентных комплексов среди биомолекул [301]. Тем не менее, ближайший родственник РНКазы А, ангиогенин, несмотря на то, что было показано, что при попадании в клетку он сталкивается с цитозольным RI,

фосфорилируется протеинкиназой С и циклин-зависимой киназой, что позволяет ангиогенину уклоняться от RI и проникать в ядро [184].

Следует отметить, что снижение количества внутриклеточной РНК в опухолевых клетках под действием РНКазы А не приводило к гибели клеток. Выбор между жизнью и смертью клетки, подвергшейся воздействию экзогенных РНКазы, зависит от характерного паттерна продуктов гидролиза клеточной РНК, который отражает результаты сложных взаимодействий между молекулярными детерминантами РНКаз с одной стороны [30,175] и клеточными мишенями с другой [8,161,302]. Более вероятно, что после расщепления внутриклеточных РНК РНКазой А образуется новый пул РНК (включая регуляторные РНК) и новые сети регуляции РНК.

Нами получены интересные данные о возможной роли гетеродимера Ku70/Ku80 в проникновении и внутриклеточном трафике РНКазы А. Проведенный молекулярный докинг указывает на возможность формирования комплекса с РНКазой А гетеродимером Ku70/Ku80, исходя из чего можно предположить, что РНКазы А проникает в клетки и перемещается в ядро в составе такого комплекса. Результаты конфокальной микроскопии указывают на ко-локализацию гетеродимера Ku70/Ku80 и РНКазы А как в цитоплазме, так и в клеточном ядре.

Наши данные показали, что РНКазы А и биназа влияют на инвазивность опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*. РНКазы А значительно снижала миграцию, подвижность и инвазию опухолевых клеток *in vitro*, в то время как влияние фермента на адгезию и образование колоний было довольно небольшим. Биназа *in vitro* значительно снижала миграционную активность опухолевых клеток. Биназа существенно замедляла рост первичных опухолей и подавляла развитие метастазов в печени *in vivo*. Интересно, что биназа проявляла выраженный противоопухолевый эффект в дозах 0.5 и 1 мг/кг как в отношении роста первичной опухоли, так и развития метастазов. Тем не менее, биназа в дозе 1 мг/кг ухудшала биохимические показатели крови, что свидетельствует о токсичности биназы для печени и почек. Однако мы не наблюдали каких-либо статистически значимых различий в отношении общего анализа крови.

РНКаза А *in vivo* эффективно подавляла развитие метастазов в легких мышей с метастатической меланомой, что сопровождалось изменением экспрессии некоторых ЕМТ-маркеров в очагах метастазирования и прилегающих тканях. ЕМТ является важным событием, которое регулирует инвазию и метастазирование опухоли [303,304]. Е-кадгерин и виментин являются основополагающими маркерами процесса ЕМТ. Е-кадгерин в высокой степени экспрессируется в эпителиальных клетках и формирует массив плотных контактов, тесно скрепляющих опухолевые клетки друг с другом [305]. Снижение функциональности Е-кадгерина в результате мутации, деградации и т. д. является важным фактором, способствующим прогрессированию метастазов при множестве различных злокачественных новообразований на основе эпителия [306]. Виментин, основной промежуточный белок филаментов, присутствующий в стромальных клетках, участвует в адгезии, инвазии, миграции и передаче сигналов опухолевых клеток, регулируя взаимодействие между белками цитоскелета и молекулами клеточной адгезии [307]. В нашем исследовании показано, что введение РНКазы А приводило к повышению уровня *Cdh1*, снижению уровня *Tjp1* и *Vim* в метастатических очагах, что свидетельствует о снижении инвазивного потенциала метастатических клеток. Сходная картина наблюдалась для этих маркеров в легочной ткани, прилегающей к метастатическим очагам, для которой также было характерно снижение экспрессии *Fn*. В результате прилежащая ткань по профилю экспрессии ЕМТ-маркеров приобретает фенотип, сходный со здоровой тканью, что свидетельствует о нарушении РНКазой А формирования благоприятного микроокружения опухоли.

Анализ изменения профилей миРНК в опухолевой ткани и сыворотке крови мышей с *RLS<sub>40</sub>* под действием биназы и в метастатических очагах, прилегающих тканях и сыворотке крови мышей с меланомой *B16* под действием РНКазы А позволил выявить миРНК, чувствительные к их действию. Поскольку ранее была показана способность биназы проникать в клетку и ядро [298], можно предположить, что наблюдаемое снижение уровня миРНК *in vitro* связано с общей деградацией РНК, включая пре-миРНК, как это было показано для онконазы

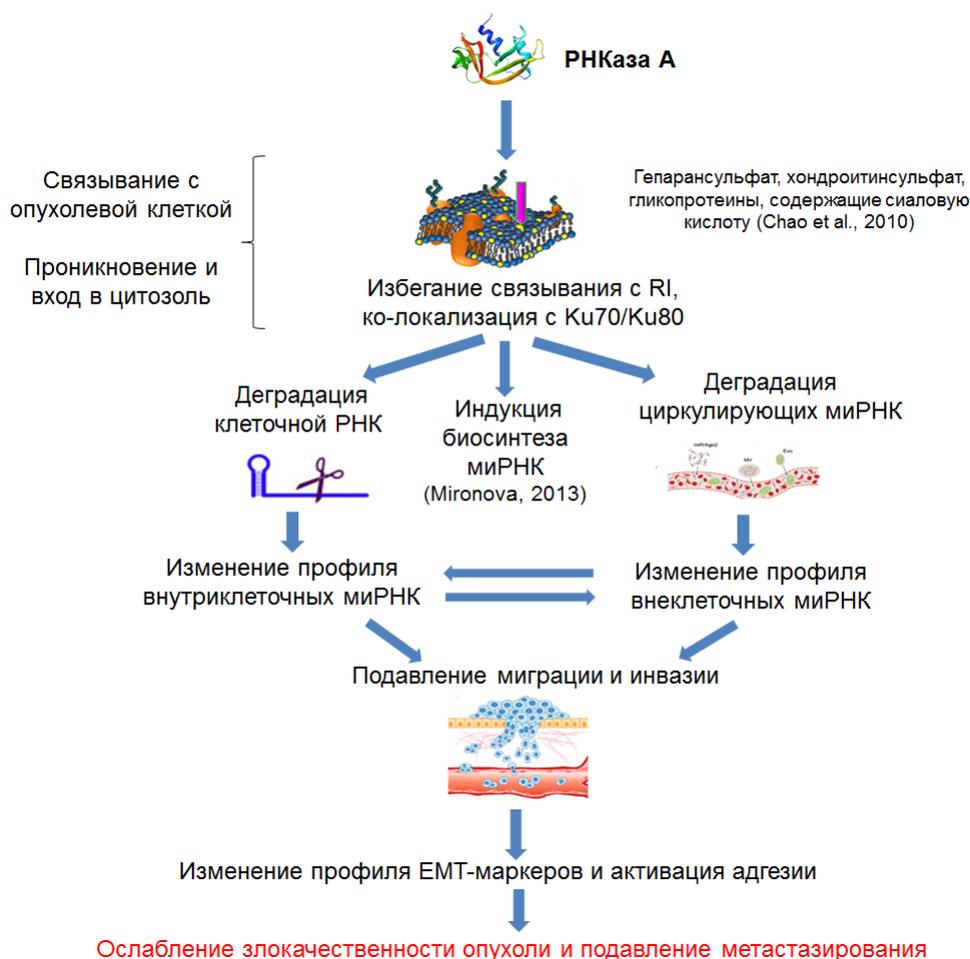
[104], и зрелых миРНК. Увеличение экспрессии внутриклеточных миРНК в опухолевой ткани RLS<sub>40</sub> может быть связано с комбинированными системными эффектами биназы *in vivo*. Биназа расщепляет миРНК в кровотоке, что приводит к снижению их уровня и недостатку для создания благоприятных условий опухолевого окружения. Наблюдаемое усиление экспрессии миРНК в опухолевой ткани может быть связано как с дефицитом миРНК в кровотоке, так и с ускорением биогенеза миРНК в опухолевой ткани из-за расщепления pre-миРНК, pri- миРНК и зрелых миРНК.

Одним из основных результатов нашей работы является обнаружение различий в профиле экспрессии миРНК в метастатических очагах и прилегающих тканях, а также между соседними условно нормальными тканями и тканями легких, взятыми у здоровых животных. Интересно, что в прилегающих условно нормальных тканях наблюдались значительно более высокие уровни миРНК по сравнению со здоровыми животными. Следует отметить, что в метастатических очагах мышей с B16 уровень миРНК был в 2–3 раза ниже по сравнению с прилегающей тканью. При этом в прилегающих тканях введение РНКазы А вызывало снижение уровня миРНК дозозависимым образом, тогда как в метастатических очагах не влияло на экспрессию анализируемых миРНК.

Биоинформатический анализ сетей генов-мишеней миРНК с учетом полученных экспериментальных данных показал, что модуляция экспрессии миРНК, чувствительных к биназе, может влиять на широкий спектр процессов в клетках, включая события, связанные с трансформацией клеток, пролиферацией, апоптозом, связанными с раком путями, ангиогенезом и адгезией. Другие процессы, запускаемые биназой, включают воспаление и некоторые хозяйственные функции, такие как биогенез и транспорт рибосом. Интересно, что анализ общих генов внешних сетей миРНК и генов внутренних сетей миРНК выявил *KRAS*, подтвержденную мишень биназы [52], и ряд генов, экспрессия которых чувствительна к другим РНКазам, включая *Acvr1b*, *Ccnd2* и *Gaa* (чувствительный к РНКазе А) [37] и *p21* (чувствительный к РНКазам L и MC2) [308,309].

Наши результаты ясно показали, что противоопухолевый потенциал РНКазы А тесно связан с подавлением процессов, связанных с ЕМТ. Принимая во внимание высокое обогащение ряда терминов, связанных с ЕМТ, в сети путей генов-мишеней миРНК, чувствительных к РНКазе А (Рис. 23, В), возник вопрос, могут ли эти миРНК участвовать в регуляции анти-ЕМТ-активности РНКазы А. Анализ регуляторных сетей, состоящих из чувствительных к РНКазе А миРНК, их генов-мишеней, включенных в функциональные термины, связанные с ЕМТ, и чувствительных к РНКазе А ЕМТ-ассоциированных маркеров (Cdh1, Fn1, Tjp1, Vim), продемонстрировал, что в основе наблюдаемых изменений экспрессии ключевых ЕМТ-ассоциированных генов, лежит изменение профиля миРНК в метастатических очагах и прилегающих тканях под действием РНКазы А. Уровень анализируемых маркеров ЕМТ может регулироваться непосредственно РНКазой А-чувствительными миРНК (miR-10b, miR-31, miR-145a) или косвенно с помощью ряда генов-мишеней миРНК, предсказанных нашим подходом *in silico* (Arf6, Ctnnd1, Fzd7, Gdnf, Smad3, Pxn, Ret) (Рис. 25).

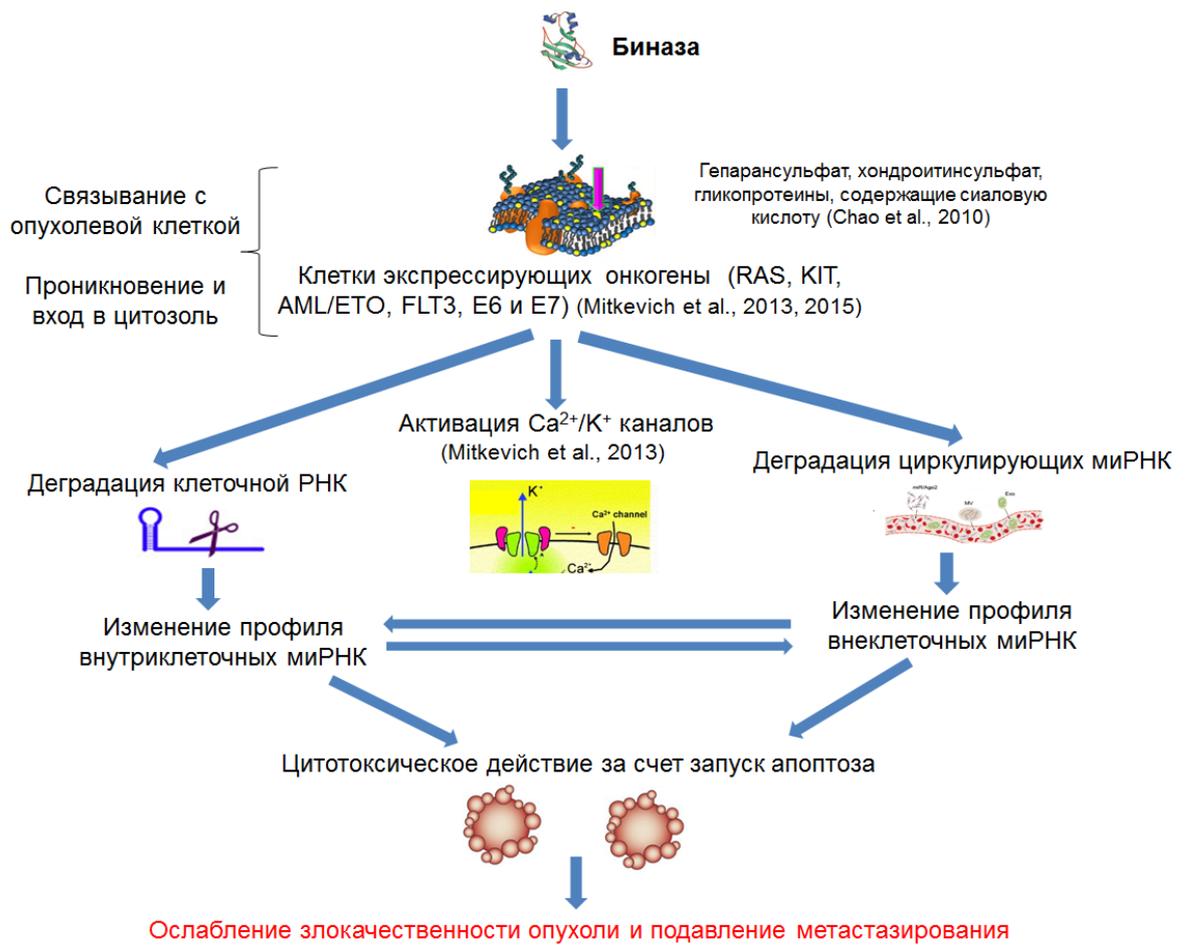
На основании полученных данных была выдвинута гипотеза о потенциальном механизме противоопухолевого действия РНКазы А и биназы (Рис. 26 и 27). Согласно этой гипотезе РНКазы А и биназа связываются с опухолевой клеткой, причем селективность их взаимодействия с поверхностью опухолевых клеток достигается за счет экспонирования на их поверхности гликозаминогликанов, такими как гепарансульфат и хондроитинсульфат, а также с гликопротеинов, содержащих сиаловую кислоту [310]. РНКазы А проникает в цитозоль, расщепляет внутриклеточные РНК с последующим изменением профиля миРНК (понижение или повышение экспрессии опухолевых супрессоров и онкомиров). В изменение профиля миРНК в клетке так же вносит вклад действие РНКазы А на белки – участники биогенеза миРНК [36]. Параллельно с этим происходит деградация внеклеточных циркулирующих РНК, включая миРНК, что также оказывает регуляторное воздействие на опухолевые клетки. Вследствие регуляторной реорганизации опухолевой клетки под действием РНКазы А, а также разрушения благоприятного опухолевого микроокружения вследствие изменения профиля



**Рис. 26.** Гипотетический механизм противоопухолевой активности РНКазы А.

EMT-маркеров, происходит подавление миграции и инвазии опухолевых клеток, активация адгезии, и, как следствие, снижение уровня метастазирования.

Бионаза после связывания с опухолевой клеткой проникает в цитозоль, где способна вызывать деградацию клеточной РНК, активацию  $Ca^{2+/K^+}$  каналов и запуск апоптоза. Селективность бионазы по отношению к опухолевым клеткам определяется не только связыванием с поверхностными гликозаминогликанами, но и за счет экспрессии клетками ряда онкогенов. Бионаза в цитозоле расщепляет внутриклеточные РНК с последующим изменением профиля миРНК. Параллельно с этим происходит деградация внеклеточных циркулирующих миРНК. Вследствие этого происходит подавление миграции опухолевых клеток, их гибель и, как следствие, ингибирование роста первичной опухоли и метастазирования.



**Рис. 27.** Гипотетический механизм противоопухолевой активности биназы.

## ВЫВОДЫ

Данная работа представляет собой фундаментальное исследование, в ходе которого были выяснены молекулярные механизмы, опосредующие противоопухолевую активность бычьей панкреатической РНКазы А и микробной рибонуклеазы *B. pumilus* (биназы).

1. Впервые продемонстрировано, что РНКазы А после проникновения в клетки меланомы В16 мыши и эпидермоидной карциномы шейки матки HeLa человека частично остается не связанной с ингибитором рибонуклеаз, что приводит к снижению уровня внутриклеточных РНК в обоих типах клеток.

2. Показана способность РНКазы А ко-локализоваться с внутриклеточным гетеродимерным белком Ku70/Ku80, что может лежать в основе механизма проникновения РНКазы А в клетки и ее внутриклеточного транспорта.

3. Показано, что РНКазы А подавляет миграцию и инвазию ряда опухолевых клеток *in vitro*, но не влияет на их жизнеспособность. Биназа снижает жизнеспособность опухолевых клеток за счет индукции апоптоза и подавляет их миграцию.

4. Показано, что РНКазы А подавляет метастазирование в легкие мышей с метастатической меланомой В16, меняет профиль миРНК и экспрессию ЕМТ-маркеров в ткани, прилегающей к очагам метастазирования, разрушая формирование благоприятного микроокружения опухоли.

5. Показано, что биназа замедляет рост первичной лекарственно-устойчивой лимфосаркомы RLS<sub>40</sub>, подавляет развитие метастазов в печени и меняет профиль миРНК в опухолевой ткани, что сопровождается снижением в ней пролиферативного потенциала.

6. С помощью биоинформатического анализа с наложением экспериментальных данных проведена функциональная аннотация генов-мишеней миРНК, чувствительных к РНКазе А и биназе. Показано:

- Основными биологическими процессами, модулируемыми миРНК, чувствительными к РНКазе А, в микроокружении опухоли являются регуляция клеточной адгезии, а также сигнальные пути, связанные с эпителиально-мезенхимальным переходом.

- Основными событиями, модулируемыми миРНК, чувствительными к биназе, в опухолевой ткани являются пролиферация, апоптоз, миграция и сигнальные пути, связанные с опухолевой прогрессией.

## Приложение 1

**Таблица S1.** Гены-мишени миРНК-21а мыши, участвующие в проонкогенных событиях и сигнальных каскадах.

	Ген-мишень	Описание	Сигнальный путь или событие	Функция
1	<i>PDCD10</i>	Programmed Cell Death 10	- C-МYC	- Пролиферации клеток; - Апоптоз; - Миграция клеток; - Ангиогенез, васкулогенез и гемопоэз.
2	<i>PTEN</i>	Phosphatase And Tensin Homolog	- ИЛ-2; - PI3K-Akt; - p53; - миРНК при раке; - путь Т-клеточного рецептора; - путь В-клеточного рецептора; - MAPK; - RhoA.	- Супрессор опухоли. Действует как протеинфосфатаза двойной специфичности.
3	<i>RC3H1</i>	Ring Finger And CCCH-Type Domains 1	- гомеостаз РНК в клетке.	- Гомеостаз миРНК; - Посттранскрипционный репрессор мРНК.
4	<i>PDCD4</i>	Programmed Cell Death 4	- апоптоз и аутофагия; - MAPK.	- Ингибирует инициацию трансляции и кэп-зависимой трансляции; - Ингибирует события, важные для запуска инвазии и последующей JUN-зависимой транскрипции; - Играет роль в апоптозе; - Ингибирует неопластическую трансформацию.
5	<i>TGFBI</i>	Transforming Growth Factor Beta Induced	- адгезия	- Клеточная адгезия.
6	<i>TIMP3</i>	TIMP Metalloproteinase Inhibitor 3	- матриксные металлопротеиназы; - ангиогенез; - клеточная адгезия, ремоделирование ВКМ; - миРНК при раке; - VEGF.	- Инактивация металлопротеиназ (ММП 1 - 3, ММП-7, ММП-9, ММП 13 - 15).
7	<i>MMP9</i>	Matrix Metalloproteinase 9	- Нарушение регуляции транскрипции при раке; - Wnt-β-катенин.	- Локальный протеолиз внеклеточного матрикса; - Металлопептидазная активность.

**Таблица S2.** Гены-мишени миРНК-10b мыши, участвующей в проонкогенных событиях и путях.

	Ген-мишень	Описание	Сигнальный путь или событие	Функция
1	<i>RAB11B</i>	RAB11B, Member <i>RAS</i> Oncogene Family	- везикулярно-опосредованный транспорт; - аутофагии; - моделирование контактов клеток Сертоли-Сертоли; - ремоделирование адгезионных контактов	- Ключевой регулятор внутриклеточного мембранного транспорта.
2	<i>MCC</i>	MCC Regulator Of WNT Signaling Pathway	- Wnt.	- Подавляет пролиферацию клеток и путь Wnt/ $\beta$ -катенин; - Модулирует миграцию клеток.
3	<i>VAMP3</i>	Vesicle Associated Membrane Protein 3	- везикулярно-опосредованный транспорт - моделирование контактов клеток Сертоли-Сертоли	- Везикулярный транспорт.
4	<i>LATS1</i>	Large Tumor Suppressor Kinase 1	- повреждение ДНК - Wnt / Hedgehog / Notch	- Играет ключевую роль в контроле размера органа и подавлении роста опухоли, ограничивая пролиферацию и способствуя апоптозу; - Регулирует гены, важные для клеточной пролиферации, гибели и миграции клеток; - Участвует в контроле экспрессии p53.
5	<i>TCF25</i>	Transcription Factor 25	- неканонический путь Wnt - регуляция активированного РАК-2p34 посредством деградации, опосредованной протеасомами.	- Регулирует гибель клеток; - Действует, как репрессор транскрипции.
6	<i>PTPN2</i>	Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 2	- JAK-STAT	- Отрицательно регулирует многочисленные сигнальные пути и биологические процессы, такие как гемопоэз, воспалительная реакция, пролиферация и дифференцировка клеток, и гомеостаз глюкозы.
7	<i>CDK7</i>	Cyclin Dependent Kinase 7	- циклины и регуляция клеточного цикла - клеточный цикл.	- Участвует в контроле клеточного цикла и в транскрипции РНК, опосредованной РНК-полимеразой II.

**Таблица S2.** Гены-мишени миРНК-10b мыши, участвующей в проонкогенных событиях и путях (продолжение).

	Ген-мишень	Описание	Сигнальный путь или событие	Функция
8	<i>PTK6</i>	Protein Tyrosine Kinase 6	- клеточный цикл; - путь PTK6.	- Регуляция различных сигнальных путей, которые контролируют дифференцировку и поддержание нормального эпителия, а также рост опухоли; - Способствует пролиферации, миграции и инвазии; - Способствует активации онкогенных сигнальных путей.
9	<i>CDKN1A</i>	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A	- циклины и регуляция клеточного цикла; - p53; - клеточный цикл; - JAK-STAT; - модуляция апоптоза и передача сигналов; - контрольные точки клеточного цикла.	- Участвует в опосредованном p53/TP53 ингибировании клеточной пролиферации в ответ на повреждение ДНК; - Играет важную роль в контроле прогрессирования клеточного цикла и остановке G2, вызванной повреждением ДНК.
10	<i>PRF1</i>	Perforin 1	- модуляция апоптоза и передача сигналов.	- Играет ключевую роль в зависимой от секреторных гранул гибели клеток; - Способствует цитолизу и апоптозу клеток-мишеней.
11	<i>DNASE2</i>	Deoxyribonuclease 2, Lysosomal	- везикулярно-опосредованный транспорт - лизосомальная деградация	- Играет главную роль в деградации ядерной ДНК при клеточном апоптозе во время развития.
12	<i>PSMB11</i>	Proteasome Subunit Beta 11	- клеточный цикл; - контрольные точки клеточного цикла; - митотическая метафаза и анафаза	- Играет ключевую роль в развитии CD8-позитивных Т-клеток; - Расщепляет пептиды с Arg, Phe, Tyr, Leu и Glu.

**Таблица S3.** Гены-мишени miRNA-31 мышцы, участвующей в проонкогенных событиях и путях.

	Ген-мишень	Описание	Сигнальный путь или событие	Функция
1	<i>PDGFB</i>	Platelet Derived Growth Factor Subunit B	- MAPK; - RAS; - JAK-STAT; - miRNA при раке; - PI3K-Akt.	- Регуляция эмбрионального развития, клеточной пролиферации, клеточной миграции и хемотаксиса; - Заживление ран.
2	<i>TBC1D2</i>	TBC1 Domain Family Member 2	- везикулярно-опосредованный транспорт; - TBC/RABGAP	- Сигнальный эффектор, участвующий в ингибировании деградации кадгерина и уменьшении межклеточной адгезии.
3	<i>FGF10</i>	Fibroblast Growth Factor 10	- RAS; - MAPK; - PI3K-Akt; - пути при раке.	- Играет важную роль в регуляции эмбрионального развития, клеточной пролиферации и дифференциации клеток.

**Таблица S4.** Гены-мишени miRNA-145a мышцы, участвующей в проонкогенных событиях и путях.

	Ген-мишень	Описание	Сигнальный путь или событие	Функция
1	<i>ACVR1B</i>	Activin A Receptor Type 1B	- апоптоз; - MAPK.	- Регулирует патологические процессы, включая заживление ран, продукцию внеклеточного матрикса, иммуносупрессию и канцерогенез.
2	<i>CDC14B</i>	Cell Division Cycle 14B	- клеточный цикл	- Фосфатаза двойной специфичности, участвующая в реакции на повреждение ДНК; - Важный регулятор контрольной точки повреждения ДНК G2.

**Таблица S5.** Гены-мишени миРНК-155 мыши, участвующей в проонкогенных событиях и путях.

	<b>Ген-мишень</b>	<b>Описание</b>	<b>Сигнальный путь или событие</b>	<b>Функция</b>
1	<i>CISH</i>	Cytokine inducible SH2 containing protein	- ИЛ-2; - JAK-STAT; - сигнальный путь толл-подобного рецептора.	- Негативная регуляция цитокинов.
2	<i>RHOD</i>	<i>RAS</i> Homolog Family Member D	- ИЛ-2; - митотическая прометафаза; - апоптоз; - молекулярные механизмы развития рака; - RAS.	- Участвует в координации мембранного транспорта с функцией цитоскелета; - Модулирует реорганизацию актинового цитоскелета и фокальную адгезию.
3	<i>TSPAN14</i>	Tetraspanin 14	- врожденный иммунитет.	- Регулирует созревание и транспортировку трансмембранной металлопротеазы ADAM10; - Отрицательно регулирует ADAM10-опосредованное расщепление GP6; - Способствует опосредованному ADAM10 расщеплению CDH5.
4	<i>CSNK1A1</i>	Casein Kinase 1 Alpha 1	- Wnt; - PI3K-Akt; - p53	- Регулирует миграцию эпителиальных клеток; - Играет роль в расхождении хромосом во время митоза; - Участвует в передаче сигналов Wnt; - Фосфорилирует большое количество белков.
5	<i>TAB2</i>	TGF-Beta Activated Kinase 1 (MAP3K7) Binding Protein 2	- MAPK; - ИЛ-1 - Сигнальный путь рецепторов смерти; - Молекулярные механизмы рака	- Способствует активации MAP3K7 в сигнальном пути IL1.
6	<i>PATJ</i>	PATJ Crumbs Cell Polarity Complex Component	- организация клеточных соединений; - PI3K-Akt; - Плотные контакты.	- Регулирует нацеливание белков, полярность клеток и целостность плотных контактов.
7	<i>AGTRAP</i>	Angiotensin II Receptor Associated Protein	- MAPK	- Вызывает снижение клеточной пролиферации и транскрипционной активности, стимулируемой ангиотензином II.

**Таблица S5.** Гены-мишени miРНК-155 мыши, участвующей в проонкогенных событиях и путях (продолжение).

	<b>Ген-мишень</b>	<b>Описание</b>	<b>Сигнальный путь или событие</b>	<b>Функция</b>
8	<i>ETV3</i>	ETS Variant Transcription Factor 3	- дифференцировка и рост макрофагов	- Репрессирует транскрипцию, что способствует остановке роста во время терминальной дифференцировки макрофагов; - Подавляет активность промотора MMP1.
9	<i>TP53INP1</i>	Tumor Protein P53 Inducible Nuclear Protein 1	- TP53	- Двойной регулятор транскрипции и аутофагии; - Обладает как p53/TP53-независимой регуляторной функцией внутриклеточных активных форм кислорода (АФК), так и p53/TP53-зависимой регуляторной функцией транскрипции; - Действует как супрессор опухоли, вызывая гибель клеток посредством аутофагии и каспазозависимого механизма.
10	<i>RIPK1</i>	Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 1	- внешний апоптотический сигнальный путь; - Апоптоз и аутофагия	- Ключевой регулятор TNF-опосредованного апоптоза, некроптоза и путей воспаления.
11	<i>SIPR1</i>	Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1	- сигнальный путь сфинголипидов; - ИЛ-4; ИЛ-13.	- Миграция клеток; - Регуляции ангиогенеза и созревания сосудов.
12	<i>PMAIP1</i>	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1	- Апоптоз и аутофагия; - Пути при раке; - Молекулярные механизмы рака; - TP53.	- Активация каспаз. Способствует изменениям митохондриальной мембраны и оттоку апоптотических белков из митохондрий.
13	<i>SGK3</i>	Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase Family Member 3	- PI3K/Акт	- Регуляция ионных каналов, мембранных переносчиков, клеточного роста, пролиферации, выживания и миграции.
14	<i>GPR65</i>	G Protein-Coupled Receptor 65	- гастрин-CREB с участием PKC и MAPK	- Дифференцировка Т-клеток.
15	<i>FGF7</i>	Fibroblast Growth Factor 7	- АКТ; - RAS; - MAPK; - пути при раке.	- Регуляция эмбрионального развития, клеточной пролиферации и дифференциации клеток.
16	<i>MYB</i>	MYB Proto-Oncogene, Transcription Factor	- PI3K-Akt; - IL4.	- Контроль пролиферации и дифференцировки гемопоэтических клеток-предшественников.

**Таблица S6.** Гены-мишени let-7g мыши, участвующей в проонкогенных событиях и путях.

	<b>Ген-мишень</b>	<b>Описание</b>	<b>Сигнальный путь или событие</b>	<b>Функция</b>
1	<i>APC2</i>	APC Regulator of WNT Signaling Pathway 2	- PI3K-Akt; - miРНК при раке; - Wnt; - пути в раке	- Передача сигналов Wnt путем быстрой деградации CTNNB1.

## Список литературы

1. Cinatl J., Cinatl J., Kotchetkov R., Vogel J.U., Woodcock B.G., Matousek J., Pouckova P., Kornhuber B. Bovine seminal ribonuclease selectively kills human multidrug-resistant neuroblastoma cells via induction of apoptosis. // *Int. J. Oncol.* – 1999. – V. 15. – № 5. – P. 1001–1009.
2. Kotchetkov R., Cinatl J., Krivtchik A.A., Vogel J.-U., Matousek J., Pouckova P., Kornhuber B., Schwabe D., Cinatl Jr J. Selective activity of BS-RNase against anaplastic thyroid cancer. // *Anticancer Res.* – 2001. – V. 21. – № 2A. – P. 1035–1042.
3. Lee J.E., Raines R.T. Cytotoxicity of bovine seminal ribonuclease: Monomer versus dimer // *Biochemistry.* – 2005. – V. 44. – № 48. – P. 15760–15767.
4. Pouckova P., Zadinova M., Hloušková D., Strohalm J., Plocova D., Špunda M., Olejar T., Zitko M., Matoušek J., Ulbrich K. Polymer-conjugated bovine pancreatic and seminal ribonucleases inhibit growth of human tumors in nude mice // *J. Control. release.* – 2004. – V. 95. – № 1. – P. 83–92.
5. Lee J.E., Raines R.T. Ribonucleases as novel chemotherapeutics // *BioDrugs.* – 2008. – V. 22. – № 1. – P. 53–58.
6. Costanzi J., Sidransky D., Navon A., Goldsweig H. Ribonucleases as a novel pro-apoptotic anticancer strategy: Review of the preclinical and clinical data for ranpirnase // *Cancer Invest.* – 2005. – V. 23. – № 7. – P. 643–650.
7. Lee I., Lee Y.H., Mikulski S.M., Lee J., Covone K., Shogen K. Tumoricidal effects of onconase on various tumors // *J. Surg. Oncol.* – 2000. – V. 73. – № 3. – P. 164–171.
8. Ilinskaya O., Decker K., Koschinski A., Dreyer F., Repp H. Bacillus intermedius ribonuclease as inhibitor of cell proliferation and membrane current // *Toxicology.* – 2001. – V. 156. – № 2–3. – P. 101–107.
9. Mironova N.L., Petrushanko I.Y., Patutina O.A., Sen'kova A. V., Simonenko O. V., Mitkevich V.A., Markov O. V., Zenkova M.A., Makarov A.A. Ribonuclease binase inhibits primary tumor growth and metastases via apoptosis induction in tumor cells // *Cell Cycle.* – 2013. – V. 12. – № 13. – P. 2120–2131.
10. 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. Sensitivity of acute myeloid leukemia Kasumi-1 cells to binase toxic action depends on the expression of KIT and AML1-ETO oncogenes // *Cell Cycle.* – 2011. – V. 10. – № 23. – P. 4090–4097.
11. Sen'kova A. V., Mironova N.L., Patutina O.A., Mitkevich V.A., Markov O. V., Petrushanko I.Y., Burnysheva K.M., Zenkova M.A., Makarov A.A. Ribonuclease binase decreases destructive changes of the liver and restores its regeneration potential in mouse lung carcinoma model // *Biochimie.* – 2014. – V. 101. – P. 256–259.
12. Ledoux L. Action of ribonuclease on two solid tumours in vivo // *Nature.* – 1955. – V. 176. – № 4470. – P. 36–37.
13. Ledoux L. Action of ribonuclease on certain ascites tumours // *Nature.* – 1955. – V. 175. – № 4449. – P. 258–259.
14. Ledoux L. Action of ribonuclease on neoplastic growth II. Action on landschütz ascites cells in vitro // *Biochim Biophys Acta.* – 1956. – V. 20. – № C. – P. 369–377.
15. Ledoux L., Revell S.H. Action of ribonuclease on neoplastic growth. I. Chemical aspects of normal tumour growth: The landschütz ascites tumour // *Biochim Biophys Acta.* – 1955. – V. 18. – № C. – P. 416–426.
16. Aleksandrowicz J., Urbanczyk J., Ostrowska A., Sierko J. Further research on the activity of

- ribonucleases in the blood and urine of patients suffering from proliferative hemocytopenia // *Blood*. – 1958. – V. 13. – № 7. – P. 652–664.
17. Telford I.R., Kemp J.F., Taylor E.F., Yeaman M.W. Effect of Ribonuclease on Survival of Ascites Tumor Bearing Mice // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1959. – V. 100. – № 4. – P. 829–831.
  18. Kim J.-S., Soucek J., Matousek J., Raines R.T. Catalytic activity of bovine seminal ribonuclease is essential for its immunosuppressive and other biological activities // *Biochem. J.* – 1995. – V. 308. – № 2. – P. 547–550.
  19. Saxena S.K., Sirdeshmukh R., Ardelt W., Mikulski S.M., Shogen K., Youle R.J. Entry into cells and selective degradation of tRNAs by a cytotoxic member of the RNase A family // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – № 17. – P. 15142–15146.
  20. Aleksandrowicz J. Intracutaneous Ribonuclease in Chronic Myelocytic Leukæmia // *Lancet*. – 1958. – V. 272. – № 7043. – P. 420.
  21. Poučková P., Zadinová M., Hloušková D., Strohalm J., Plocová D., Špunda M., Olejár T., Zitko M., Matoušek J., Ulbrich K., Souček J. Polymer-conjugated bovine pancreatic and seminal ribonucleases inhibit growth of human tumors in nude mice // *J. Control. Release*. – 2004. – V. 95. – № 1. – P. 83–92.
  22. De Lamirande G. Action of deoxyribonuclease and ribonuclease on the growth of Ehrlich ascites carcinoma in mice // *Nature*. – 1961. – V. 192. – № 4797. – P. 52–54.
  23. Raines R.T. Ribonuclease A // *Chem. Rev.* – 1998. – V. 98. – № 3. – P. 1045–1065.
  24. Leland P.A., Raines R.T. Cancer chemotherapy - Ribonucleases to the rescue // *Chem. Biol.* – 2001. – V. 8. – № 5. – P. 405–413.
  25. Johnson R.J., McCoy J.G., Bingman C.A., Phillips G.N., Raines R.T. Inhibition of Human Pancreatic Ribonuclease by the Human Ribonuclease Inhibitor Protein // *J. Mol. Biol.* – 2007. – V. 368. – № 2. – P. 434–449.
  26. Naddeo M., Vitagliano L., Russo A., Gotte G., D'Alessio G., Sorrentino S. Interactions of the cytotoxic RNase A dimers with the cytosolic ribonuclease inhibitor // *FEBS Lett.* – 2005. – V. 579. – № 12. – P. 2663–2668.
  27. Hartley R.W. Barnase and barstar: two small proteins to fold and fit together // *Trends Biochem. Sci.* – 1989. – V. 14. – № 11. – P. 450–454.
  28. Hartley R.W. Barnase-barstar interaction // *Methods Enzymol.* – 2001. – V. 341. – P. 599–611.
  29. Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O. Barnase and binase: twins with distinct fates // *FEBS J.* – 2011. – V. 278. – № 19. – P. 3633–3643.
  30. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents // *BioEssays*. – 2008. – V. 30. – № 8. – P. 781–790.
  31. Mohamed I.S.E., Sen'kova A. V., Nadyrova A.I., Savin I.A., Markov A. V., Mitkevich V.A., Makarov A.A., Ilinskaya O.N., Mironova N.L., Zenkova M.A. Antitumour activity of the ribonuclease binase from bacillus pumilus in the RLS40 tumour model is associated with the reorganisation of the miRNA network and reversion of cancer-related cascades to normal functioning // *Biomolecules*. – 2020. – V. 10. – № 11. – P. 1–20.
  32. Shklyayeva O.A., Mironova N.L., Malkova E.M., Taranov O.S., Ryabchikova E.I., Zenkova M.A., Vlasov V. V. Cancer-suppressive effect of RNase A and DNase I // *Dokl. Biochem. Biophys.* – 2008. – V. 420. – № 1. – P. 108–111.
  33. Patutina O., Mironova N., Ryabchikova E., Popova N., Nikolin V., Kaledin V., Vlassov V., Zenkova M. Inhibition of metastasis development by daily administration of ultralow doses of RNase A and DNase I // *Biochimie*. – 2011. – V. 93. – № 4. – P. 689–696.
  34. Dalmay T., Edwards D.R. MicroRNAs and the hallmarks of cancer // *Oncogene*. – 2006. – V.

25. – № 46. – P. 6170–6175.
35. Hussen B.M., Hidayat H.J., Salihi A., Sabir D.K., Taheri M., Ghafouri-Fard S. MicroRNA: A signature for cancer progression // *Biomed. Pharmacother.* – 2021. – V. 138.
  36. Mironova N., Patutina O., Brenner E., Kurilshikov A., Vlassov V., Zenkova M. MicroRNA drop in the bloodstream and microRNA boost in the tumour caused by treatment with ribonuclease A leads to an attenuation of tumour malignancy // *PLoS One.* – 2013. – V. 8. – № 12. – P. e83482.
  37. Mironova N., Patutina O., Brenner E., Kurilshikov A., Vlassov V., Zenkova M. The systemic tumor response to RNase A treatment affects the expression of genes involved in maintaining cell malignancy // *Oncotarget.* – 2017. – V. 8. – № 45. – P. 78796–78810.
  38. Mitkevich V.A., Orlova N.N., Petrushanko I.Y., Simonenko O.V., Spirin P.V. P., M.M. Expression of FLT3-ITD oncogene confers mice progenitor B-cells BAF3 sensitivity to the ribonuclease binase cytotoxic action // *Mol. Biol.* – 2013. – V. 47. – P. 282–285.
  39. 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. Ribonuclease binase apoptotic signature in leukemic Kasumi-1 cells // *Biochimie.* – 2013. – V. 95. – № 6. – P. 1344–1349.
  40. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation // *Cell.* – 2011. – V. 144. – № 5. – P. 646–674.
  41. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA. Cancer J. Clin.* – 2021. – V. 71. – № 3. – P. 209–249.
  42. Reijns M.A.M., Rabe B., Rigby R.E., Mill P., Astell K.R., Lettice L.A., Boyle S., Leitch A., Keighren M., Kilanowski F. Enzymatic removal of ribonucleotides from DNA is essential for mammalian genome integrity and development // *Cell.* – 2012. – V. 149. – № 5. – P. 1008–1022.
  43. Altman S. Ribonuclease P // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* – 2011. – V. 366. – № 1580. – P. 2936–2941.
  44. Wang Y., Medvid R., Melton C., Jaenisch R., Blueloch R. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal // *Nat. Genet.* – 2007. – V. 39. – № 3. – P. 380–385.
  45. Bernstein E., Kim S.Y., Carmell M.A., Murchison E.P., Alcorn H., Li M.Z., Mills A.A., Elledge S.J., Anderson K. V, Hannon G.J. Dicer is essential for mouse development // *Nat. Genet.* – 2003. – V. 35. – № 3. – P. 215–217.
  46. Rybak S.M., Pearson J.W., Fogler W.E., Volker K., Spence S.E., Newton D.L., Mikulski S.M., Ardelit W., Riggs C.W., Kung H.F., Longo D.L. Enhancement of vincristine cytotoxicity in drug-resistant cells by simultaneous treatment with onconase, an antitumor ribonuclease // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1996. – V. 88. – № 11. – P. 747–753.
  47. Lee I., Lee Y.H., Mikulski S.M., Lee J., Covone K., Shogen K. Tumoricidal effects of onconase on various tumors // *J. Surg. Oncol.* – 2000. – V. 73. – № 3. – P. 164–171.
  48. Patutina O.A., Mironova N.L., Ryabchikova E.I., Popova N.A., Nikolin V.P., Kaledin V.I., Vlassov V. V, Zenkova M.A. Tumoricidal Activity of RNase A and DNase I // *Acta Naturae.* – 2010. – V. 2. – № 1. – P. 88–93.
  49. Rutkoski T.J., Kink J.A., Strong L.E., Raines R.T. Human ribonuclease with a pendant poly (ethylene glycol) inhibits tumor growth in mice // *Transl. Oncol.* – 2013. – V. 6. – № 4. – P. 392–397.
  50. Prior T.I., Kunwar S., Pastan I. Studies on the activity of barnase toxins in vitro and in vivo // *Bioconj. Chem.* – 1996. – V. 7. – № 1. – P. 23–29.

51. Makeeva A., Rodriguez-Montesinos J., Zelenikhin P., Nesmelov A., Preissner K.T., Cabrera-Fuentes H.A., Ilinskaya O.N. Antitumor macrophage response to bacillus pumilus ribonuclease (Binase) // *Mediators Inflamm.* – 2017. – V. 2017.
52. Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Kretova O. V., Spirin P. V., Zelenikhin P. V., Prassolov V.S., Tchurikov N.A., Ilinskaya O.N., Makarov A.A. Oncogenic c-kit transcript is a target for binase // *Cell Cycle.* – 2010. – V. 9. – № 13. – P. 2674–2678.
53. Goo S.M., Cho S. The expansion and functional diversification of the mammalian ribonuclease a superfamily epitomizes the efficiency of multigene families at generating biological novelty // *Genome Biol. Evol.* – 2013. – V. 5. – № 11. – P. 2124–2140.
54. Cho S., Beintema J.J., Zhang J. The ribonuclease A superfamily of mammals and birds: identifying new members and tracing evolutionary histories // *Genomics.* – 2005. – V. 85. – № 2. – P. 208–220.
55. Rosenberg H.F. RNase A ribonucleases and host defense: an evolving story // *J. Leukoc. Biol.* – 2008. – V. 83. – № 5. – P. 1079–1087.
56. Cuchillo C.M., Nogués M.V., Raines R.T. Bovine pancreatic ribonuclease: fifty years of the first enzymatic reaction mechanism // *Biochemistry.* – 2011. – V. 50. – № 37. – P. 7835–7841.
57. Gotte G., Laurents D. V, Merlino A., Picone D., Spadaccini R. Structural and functional relationships of natural and artificial dimeric bovine ribonucleases: new scaffolds for potential antitumor drugs // *FEBS Lett.* – 2013. – V. 587. – № 22. – P. 3601–3608.
58. Gotte G., Mahmoud Helmy A., Ercole C., Spadaccini R., Laurents D. V, Donadelli M., Picone D. Double domain swapping in bovine seminal RNase: formation of distinct N-and C-swapped tetramers and multimers with increasing biological activities. – 2012.
59. Picone D., Di Fiore A., Ercole C., Franzese M., Sica F., Tomaselli S., Mazzarella L. The role of the hinge loop in domain swapping: The special case of bovine seminal ribonuclease // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280. – № 14. – P. 13771–13778.
60. D'Alessio G., Di Donato A., Parente A., Piccoli R. Seminal RNase: a unique member of the ribonuclease superfamily // *Trends Biochem. Sci.* – 1991. – V. 16. – P. 104–106.
61. Gupta S.K., Haigh B.J., Griffin F.J., Wheeler T.T. The mammalian secreted RNases: mechanisms of action in host defence // *Innate Immun.* – 2013. – V. 19. – № 1. – P. 86–97.
62. Kim J.-S., Souček J., Matoušek J., Raines R.T. Structural basis for the biological activities of bovine seminal ribonuclease // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270. – № 18. – P. 10525–10530.
63. Vescia S., Tramontano D., Augusti-Tocco G., D'Alessio G. In vitro studies on selective inhibition of tumor cell growth by seminal ribonuclease // *Cancer Res.* – 1980. – V. 40. – № 10. – P. 3740–3744.
64. Murthy B.S., Sirdeshmukh R. Sensitivity of monomeric and dimeric forms of bovine seminal ribonuclease to human placental ribonuclease inhibitor // *Biochem. J.* – 1992. – V. 281. – № 2. – P. 343–348.
65. Mancheno J.M., Gasset M., Onaderra M., Gavilanes J.G., Dalessio G. Bovine seminal ribonuclease destabilizes negatively charged membranes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1994. – V. 199. – № 1. – P. 119–124.
66. Kotchetkov R., Cinatl J., Krivtchik A.A., Vogel J.U., Matousek J., Pouckova P., Kornhuber B., Schwabe D., Cinatl J. J. Selective activity of BS-RNase against anaplastic thyroid cancer // *Anticancer Res.* – 2001. – V. 21. – № 2 A. – P. 1035–1042.
67. Marinov I., Soucek J. Bovine seminal ribonuclease induces in vitro concentration dependent apoptosis in stimulated human lymphocytes and cells from human tumor cell lines. // *Neoplasma.* – 2000. – V. 47. – № 5. – P. 294–298.
68. Fiorini C., Gotte G., Donnarumma F., Picone D., Donadelli M. Bovine seminal ribonuclease

- triggers Beclin1-mediated autophagic cell death in pancreatic cancer cells // *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Res.* – 2014. – V. 1843. – № 5. – P. 976–984.
69. Spalletti-Cernia D., Sorrentino R., Di Gaetano S., Arciello A., Garbi C., Piccoli R., D'Alessio G., Vecchio G., Laccetti P., Santoro M. Antineoplastic ribonucleases selectively kill thyroid carcinoma cells via caspase-mediated induction of apoptosis // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2003. – V. 88. – № 6. – P. 2900–2907.
  70. Bracale A., Spalletti-Cernia D., Mastronicola M., Castaldi F., Mannucci R., Nitsch L., D'ALESSIO G. Essential stations in the intracellular pathway of cytotoxic bovine seminal ribonuclease // *Biochem. J.* – 2002. – V. 362. – № 3. – P. 553–560.
  71. Wu Y., Saxena S.K., Ardelt W., Gadina M., Mikulski S.M., De Lorenzo C., D'Alessio G., Youle R.J. A study of the intracellular routing of cytotoxic ribonucleases // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270. – № 29. – P. 17476–17481.
  72. Notomista E., Mancheno J.M., Crescenzi O., Di Donato A., Gavilanes J., D'Alessio G. The role of electrostatic interactions in the antitumor activity of dimeric RNases // *FEBS J.* – 2006. – V. 273. – № 16. – P. 3687–3697.
  73. Ribó M., Benito A., Vilanova M. Antitumor ribonucleases // *Ribonucleases.* – 2011. – P. 55–88.
  74. Mastronicola M.R., Piccoli R., D'Alessio G. Key extracellular and intracellular steps in the antitumor action of seminal ribonuclease // *Eur. J. Biochem.* – 1995. – V. 230. – № 1. – P. 242–249.
  75. Viola M., Libra M., Callari D., Sinatra F., Spada D., Noto D., Emmanuele G., Romano F., Averna M., Pezzino F.M. Bovine seminal ribonuclease is cytotoxic for both malignant and normal telomerase-positive cells // *Int. J. Oncol.* – 2005. – V. 27. – № 4. – P. 1071–1077.
  76. Chatani E., Hayashi R., Moriyama H., Ueki T. Conformational strictness required for maximum activity and stability of bovine pancreatic ribonuclease A as revealed by crystallographic study of three Phe120 mutants at 1.4 Å resolution // *Protein Sci.* – 2002. – V. 11. – № 1. – P. 72–81.
  77. Futami J., Seno M., Ueda M., Tada H., Yamada H. Inhibition of cell growth by a fused protein of human ribonuclease 1 and human basic fibroblast growth factor // *Protein Eng.* – 1999. – V. 12. – № 11. – P. 1013–1019.
  78. Rybak S.M., Saxena S.K., Ackerman E.J., Youle R.J. Cytotoxic potential of ribonuclease and ribonuclease hybrid proteins. // *J. Biol. Chem.* – 1991. – V. 266. – № 31. – P. 21202–21207.
  79. Psarras K., Ueda M., Yamamura T., Ozawa S., Kitajima M., Aiso S., Komatsu S., Seno M. Human pancreatic RNase1-human epidermal growth factor fusion: an entirely human 'immunotoxin analog' with cytotoxic properties against squamous cell carcinomas. // *Protein Eng.* – 1998. – V. 11. – № 12. – P. 1285–1292.
  80. Rutkoski T.J., Kurten E.L., Mitchell J.C., Raines R.T. Disruption of shape-complementarity markers to create cytotoxic variants of ribonuclease A // *J. Mol. Biol.* – 2005. – V. 354. – № 1. – P. 41–54.
  81. Di Donato A., Cafaro V., D'Alessio G. Ribonuclease A can be transformed into a dimeric ribonuclease with antitumor activity // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – № 26. – P. 17394–17396.
  82. Rutkoski T.J., Kink J.A., Strong L.E., Raines R.T. Site-specific PEGylation endows a mammalian ribonuclease with antitumor activity // *Cancer Biol. Ther.* – 2011. – V. 12. – № 3. – P. 208–214.
  83. Piccoli R., Di Gaetano S., De Lorenzo C., Grauso M., Monaco C., Spalletti-Cernia D., Laccetti P., Cinátl J., Matoušek J., D'Alessio G. A dimeric mutant of human pancreatic ribonuclease with selective cytotoxicity toward malignant cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1999. – V. 96. – № 14. – P. 7768–7773.
  84. Suzuki M., Saxena S.K., Boix E., Prill R.J., Vasandani V.M., Ladner J.E., Sung C., Youle R.J.

- Engineering receptor-mediated cytotoxicity into human ribonucleases by steric blockade of inhibitor interaction // *Nat. Biotechnol.* – 1999. – V. 17. – № 3. – P. 265–270.
85. Hoang T.T., Tanrikulu I.C., Vatland Q.A., Hoang T.M., Raines R.T. A human ribonuclease variant and ERK-pathway inhibitors exhibit highly synergistic toxicity for cancer cells // *Mol. Cancer Ther.* – 2018. – V. 17. – № 12. – P. 2622–2632.
  86. D'Avino C., Paciello R., Riccio G., Coppola M., Laccetti P., Maurea N., Raines R.T., De Lorenzo C. Effects of a second-generation human anti-ErbB2 ImmunoRNase on trastuzumab-resistant tumors and cardiac cells // *Protein Eng. Des. Sel.* – 2014. – V. 27. – № 3. – P. 83–88.
  87. Souček J., Poučková P., Strohalm J., Plocova D., Hloušková D., Zadinova M., Ulbrich K. Poly [N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide] conjugates of bovine pancreatic ribonuclease (RNase A) inhibit growth of human melanoma in nude mice // *J. Drug Target.* – 2002. – V. 10. – № 3. – P. 175–183.
  88. Bosch M., Benito A., Ribó M., Puig T., Beaumelle B., Vilanova M. A nuclear localization sequence endows human pancreatic ribonuclease with cytotoxic activity // *Biochemistry.* – 2004. – V. 43. – № 8. – P. 2167–2177.
  89. Vert A., Castro J., Ruiz-Martinez S., Tubert P., Escribano D., Ribo M., Vilanova M., Benito A. Generation of new cytotoxic human ribonuclease variants directed to the nucleus // *Mol. Pharm.* – 2012. – V. 9. – № 10. – P. 2894–2902.
  90. Nitta K., Ozaki K., Ishikawa M., Furusawa S., Hosono M., Kawauchi H., Sasaki K., Takayanagi Y., Tsuiki S., Hakomori S. Inhibition of cell proliferation by *Rana catesbeiana* and *Rana japonica* lectins belonging to the ribonuclease superfamily // *Cancer Res.* – 1994. – V. 54. – № 4. – P. 920–927.
  91. Benito A., Vilanova M., Ribo M. Intracellular routing of cytotoxic pancreatic-type ribonucleases // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2008. – V. 9. – № 3. – P. 169–179.
  92. Tao F., Fan M., Zhao W., Lin Q., Ma R. A novel cationic ribonuclease with antimicrobial activity from *Rana dybowskii* // *Biochem. Genet.* – 2011. – V. 49. – № 5. – P. 369–384.
  93. Hsu C.-H., Chang C.-F., Liao Y.-D., Wu S.-H., Chen C. Solution structure and base specificity of cytotoxic RC-RNase 2 from *Rana catesbeiana* // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2015. – V. 584. – P. 70–78.
  94. Liao Y.-D., Huang H.-C., Leu Y.-J., Wei C.-W., Tang P.-C., Wang S.-C. Purification and cloning of cytotoxic ribonucleases from *Rana catesbeiana* (bullfrog) // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – V. 28. – № 21. – P. 4097–4104.
  95. Ardelt W., Mikulski S.M., Shogen K. Amino acid sequence of an anti-tumor protein from *Rana pipiens* oocytes and early embryos. Homology to pancreatic ribonucleases. // *J. Biol. Chem.* – 1991. – V. 266. – № 1. – P. 245–251.
  96. Ardelt W., Ardelt B., Darzynkiewicz Z. Ribonucleases as potential modalities in anticancer therapy // *Eur. J. Pharmacol.* – 2009. – V. 625. – № 1–3. – P. 181–189.
  97. Mikulski S.M., Viera A., Ardelt W., Menduke H., Shogen K. Tamoxifen and trifluoroperazine (Stelazine) potentiate cytostatic/cytotoxic effects of P-30 protein, a novel protein possessing anti-tumour activity // *Cell Prolif.* – 1990. – V. 23. – № 3. – P. 237–246.
  98. Darzynkiewicz Z., Carter S.P., Mikulski S.M., Ardelt W.J., Shogen K. Cytostatic and cytotoxic effects of Pannon (P-30 Protein), a novel anticancer agent // *Cell Prolif.* – 1988. – V. 21. – № 3. – P. 169–182.
  99. Mikulski S.M., Ardelt W., Shogen K., Bernstein E.H., Menduke H. Striking Increase of Survival of Mice Bearing M 109 Madison Carcinoma Treated With a Novel Protein From With a Novel Protein From Amphibian Embryos // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1990. – V. 82. – № 2. – P. 151–153.
  100. Singh U.P., Ardelt W., Saxena S.K., Holloway D.E., Vidunas E., Lee H.-S., Saxena A., Shogen

- K., Acharya K.R. Enzymatic and structural characterisation of amphinase, a novel cytotoxic ribonuclease from *Rana pipiens* oocytes // *J. Mol. Biol.* – 2007. – V. 371. – № 1. – P. 93–111.
101. Mosimann S.C., Ardelt W., James M.N.G. Refined 1·7 Å X-ray crystallographic structure of P-30 protein, an amphibian ribonuclease with anti-tumor activity // *J. Mol. Biol.* – 1994. – V. 236. – № 4. – P. 1141–1153.
  102. Sorrentino S., Libonati M. Human pancreatic-type and nonpancreatic-type ribonucleases: a direct side-by-side comparison of their catalytic properties // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1994. – V. 312. – № 2. – P. 340–348.
  103. Iordanov M.S., Ryabinina O.P., Wong J., Dinh T.-H., Newton D.L., Rybak S.M., Magun B.E. Molecular determinants of apoptosis induced by the cytotoxic ribonuclease onconase: evidence for cytotoxic mechanisms different from inhibition of protein synthesis // *Cancer Res.* – 2000. – V. 60. – № 7. – P. 1983–1994.
  104. Qiao M., Zu L.-D., He X.-H., Shen R.-L., Wang Q.-C., Liu M.-F. Onconase downregulates microRNA expression through targeting microRNA precursors // *Cell Res.* – 2012. – V. 22. – № 7. – P. 1199–1202.
  105. Goparaju C.M., Blasberg J.D., Volinia S., Palatini J., Ivanov S., Donington J.S., Croce C., Carbone M., Yang H., Pass H.I. Onconase mediated NFKβ downregulation in malignant pleural mesothelioma // *Oncogene.* – 2011. – V. 30. – № 24. – P. 2767–2777.
  106. Wu Y., Mikulski S.M., Ardelt W., Rybak S.M., Youle R.J. A cytotoxic ribonuclease. Study of the mechanism of onconase cytotoxicity // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – № 14. – P. 10686–10693.
  107. Fiorini C., Cordani M., Gotte G., Picone D., Donadelli M. Onconase induces autophagy sensitizing pancreatic cancer cells to gemcitabine and activates Akt/mTOR pathway in a ROS-dependent manner // *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Res.* – 2015. – V. 1853. – № 3. – P. 549–560.
  108. Smolewski P., Witkowska M., Zwolinska M., Cebula-Obrzut B., Majchrzak A., Jeske A., Darzynkiewicz Z., Ardelt W., Ardelt B., Robak T. Cytotoxic activity of the amphibian ribonucleases onconase and r-amphinase on tumor cells from B cell lymphoproliferative disorders // *Int. J. Oncol.* – 2014. – V. 45. – № 1. – P. 419–425.
  109. Turcotte R.F., Lavis L.D., Raines R.T. Onconase cytotoxicity relies on the distribution of its positive charge // *FEBS J.* – 2009. – V. 276. – № 14. – P. 3846–3857.
  110. Ita M., Halicka H.D., Tanaka T., Kurose A., Ardelt B., Shogen K., Darzynkiewicz Z. Remarkable enhancement of cytotoxicity of onconase and cepharanthine when used in combination on various tumor cell lines // *Cancer Biol. Ther.* – 2008. – V. 7. – № 7. – P. 1104–1108.
  111. Mikulski S.M., Grossman A.M., Carter P.W., Shogen K., Costanzi J.J. Phase I human clinical trial of ONCONASE® (P-30 protein) administered intravenously on a weekly schedule in cancer patients with solid tumors // *Int. J. Oncol.* – 1993. – V. 3. – № 1. – P. 57–64.
  112. Taghizadegan N., Firozrai M., Nassiri M., Ariannejad H. Use of molecular dynamic tools in engineering of onconase enzyme to increase cellular uptake and evade RI // *Int. J. Pept. Res. Ther.* – 2020. – V. 26. – № 2. – P. 737–743.
  113. Yoshida H. The ribonuclease T1 family // *Methods Enzymol.* – 2001. – V. 341. – P. 28–41.
  114. Sokurenko Y., Nadyrova A., Ulyanova V., Ilinskaya O. Extracellular ribonuclease from *Bacillus licheniformis* (Balifase), a New member of the N1/T1 RNase superfamily // *Biomed Res. Int.* – 2016. – V. 2016.
  115. Dudkina E., Ulyanova V., Shah Mahmud R., Khodzhaeva V., Dao L., Vershinina V., Kolpakov A., Ilinskaya O. Three-step procedure for preparation of pure *Bacillus altitudinis* ribonuclease // *FEBS Open Bio.* – 2016. – V. 6. – № 1. – P. 24–32.

116. Kumar K., Walz F.G. Probing functional perfection in substructures of ribonuclease T1: double combinatorial random mutagenesis involving Asn43, Asn44, and Glu46 in the guanine binding loop // *Biochemistry*. – 2001. – V. 40. – № 12. – P. 3748–3757.
117. Sevcik J., Dodson E.J., Dodson G.G. Determination and restrained least-squares refinement of the structures of ribonuclease Sa and its complex with 3'-guanylic acid at 1.8 Å resolution // *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci.* – 1991. – V. 47. – № 2. – P. 240–253.
118. Sevcik J., Sanishvili R.G., Pavlovsky A.G., Polyakov K.M. Comparison of active sites of some microbial ribonucleases: structural basis for guanylic specificity // *Trends Biochem. Sci.* – 1990. – V. 15. – № 4. – P. 158–162.
119. Lacadena J., Álvarez-García E., Carreras-Sangrà N., Herrero-Galán E., Alegre-Cebollada J., García-Ortega L., Oñaderra M., Gavilanes J.G., Martínez Del Pozo Á. Fungal ribotoxins: Molecular dissection of a family of natural killers // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2007. – V. 31. – № 2. – P. 212–237.
120. Mironova N., Vlassov V. Surveillance of tumour development: The relationship between tumour-associated RNAs and ribonucleases // *Front. Pharmacol.* – 2019. – V. 10. – P. 1019.
121. Kao R., Shea J.E., Davies J., Holden D.W. Probing the active site of mitogillin, a fungal ribotoxin // *Mol. Microbiol.* – 1998. – V. 29. – № 4. – P. 1019–1027.
122. Olson B.H., Jennings J.C., Roga V., Junek A.J., Schuurmans D.M. Alpha sarcin, a new antitumor agent: II. Fermentation and antitumor spectrum // *Appl. Microbiol.* – 1965. – V. 13. – № 3. – P. 322–326.
123. Wool I.G., Glück A., Endo Y. Ribotoxin recognition of ribosomal RNA and a proposal for the mechanism of translocation // *Trends Biochem. Sci.* – 1992. – V. 17. – № 7. – P. 266–269.
124. Martínez-Ruiz A., Kao R., Davies J., del Pozo Á.M. Ribotoxins are a more widespread group of proteins within the filamentous fungi than previously believed // *Toxicon*. – 1999. – V. 37. – № 11. – P. 1549–1563.
125. Pérez-Cañadillas J.M., Santoro J., Campos-Olivas R., Lacadena J., del Pozo A.M., Gavilanes J.G., Rico M., Bruix M. The highly refined solution structure of the cytotoxic ribonuclease  $\alpha$ -sarcin reveals the structural requirements for substrate recognition and ribonucleolytic activity // *J. Mol. Biol.* – 2000. – V. 299. – № 4. – P. 1061–1073.
126. Lacadena J., Martínez del Pozo A., Lacadena V., Martínez-Ruiz A., Mancheño J.M., Oñaderra M., Gavilanes J.G. The cytotoxin  $\alpha$ -sarcin behaves as a cyclizing ribonuclease // *FEBS Lett.* – 1998. – V. 424. – № 1–2. – P. 46–48.
127. Lacadena J., Martínez del Pozo Á., Martínez-Ruiz A., Pérez-Cañadillas J.M., Bruix M., Mancheño J.M., Oñaderra M., Gavilanes J.G. Role of histidine-50, glutamic acid-96, and histidine-137 in the ribonucleolytic mechanism of the ribotoxin  $\alpha$ -sarcin // *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* – 1999. – V. 37. – № 3. – P. 474–484.
128. Wool I.G. Determination of the 28 S ribosomal RNA identity element (G4319) for alpha-sarcin and the relationship of recognition to the selection of the catalytic site // *J. Mol. Biol.* – 1996. – V. 256. – № 5. – P. 838–848.
129. Gasset M., Mancheño J.M., Lacadena J., Turnay J., Olmo N., Lizarbe M.A., Martínez del Pozo A., Oñaderra M., Gavilanes J.G.  $\alpha$ -Sarcin, a ribosome-inactivating protein that translocates across the membrane of phospholipid vesicles // *Curr Top Pept Protein Res.* – 1994. – V. 1. – P. 99–104.
130. Olmo N., Turnay J., De Buitrago G.G., De Silanes I.L., Gavilanes J.G., Lizarbe M.A. Cytotoxic mechanism of the ribotoxin  $\alpha$ -sarcin: Induction of cell death via apoptosis // *Eur. J. Biochem.* – 2001. – V. 268. – № 7. – P. 2113–2123.
131. Olson B.H., Goerner G.L. Alpha sarcin, a new antitumor agent: I. Isolation, purification, chemical composition, and the identity of a new amino acid // *Appl. Microbiol.* – 1965. – V. 13.

- № 3. – P. 314–321.
132. Schreiber G. Methods for studying the interaction of barnase with its inhibitor barstar // *Nuclease Methods Protoc.* – 2001. – P. 213–226.
  133. Wilton D.J., Kitahara R., Akasaka K., Pandya M.J., Williamson M.P. Pressure-dependent structure changes in barnase on ligand binding reveal intermediate rate fluctuations // *Biophys. J.* – 2009. – V. 97. – № 5. – P. 1482–1490.
  134. Buckle A.M., Schreiber G., Fersht A.R. Protein-protein recognition: Crystal structural analysis of a barnase-barstar complex at 2.0-Å resolution // *Biochemistry.* – 1994. – V. 33. – № 30. – P. 8878–8889.
  135. Wang L., Siu S.W.I., Gu W., Helms V. Downhill binding energy surface of the barnase–barstar complex // *Biopolymers.* – 2010. – V. 93. – № 11. – P. 977–985.
  136. Timofeev V.P., Balandin T.G., Tkachev Y. V., Novikov V. V., Lapuk V.A., Deev S.M. Dynamic spin label study of the barstar-barnase complex // *Biochem.* – 2007. – V. 72. – № 9. – P. 994–1002.
  137. Balandin T.G., Edelweiss E., Andronova N. V., Treshalina E.M., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. Antitumor activity and toxicity of anti-HER2 immunonuclease scFv 4D5-dibarnase in mice bearing human breast cancer xenografts // *Invest. New Drugs.* – 2011. – V. 29. – № 1. – P. 22–32.
  138. Edelweiss E., Balandin T.G., Ivanova J.L., Lutsenko G. V., Leonova O.G., Popenko V.I., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. Barnase as a new therapeutic agent triggering apoptosis in human cancer cells // *PLoS One.* – 2008. – V. 3. – № 6.
  139. Ivanova Y.L., Edelweiss E.F., Leonova O.G., Balandin T.G., Popenko V.I., Deyev S.M. Immunocytochemical visualization of P185 HER2 receptor using antibodies fused with dibarnase and conjugate of barstar with colloidal gold // *Mol. Biol.* – 2013. – V. 47. – № 5. – P. 701–711.
  140. Yazynin S., Lange H., Mokros T., Deyev S., Lemke H. A new phagemid vector for positive selection of recombinants based on a conditionally lethal barnase gene // *FEBS Lett.* – 1999. – V. 452. – № 3. – P. 351–354.
  141. Deyev S.M., Yazynin S.A., Kuznetsov D.A., Jukovich M., Hartley R.W. Ribonuclease-charged vector for facile direct cloning with positive selection // *Mol. Gen. Genet. MGG.* – 1998. – V. 259. – № 4. – P. 379–382.
  142. Goldman M.H., Goldberg R.B., Mariani C. Female sterile tobacco plants are produced by stigma-specific cell ablation. // *EMBO J.* – 1994. – V. 13. – № 13. – P. 2976–2984.
  143. Mariani C., De Beuckeleer M., Truettner J., Leemans J., Goldberg R.B. Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene // *Nature.* – 1990. – V. 347. – № 6295. – P. 737–741.
  144. Van Poucke K., Karimi M., Gheysen G. Analysis of nematode-responsive promoters in sugar beet hairy roots. // *Meded. Rijksuniv. Gent. Fak. Landbouwk. Toegep. Biol. Wet.* – 2001. – V. 66. – № 2b. – P. 591–598.
  145. Qin Q., Liu Y.-L., Zhu Y., Li S.-Y., Qi Y.-P. Construction of a transposon-mediated baculovirus vector Hanpvid and a new cell line for expressing barnase // *BMB Rep.* – 2005. – V. 38. – № 1. – P. 41–48.
  146. Leuchtenberger S., Perz A., Gatz C., Bartsch J.W. Conditional cell ablation by stringent tetracycline-dependent regulation of barnase in mammalian cells // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – V. 29. – № 16. – P. e76–e76.
  147. Hoefling M., Gottschalk K.E. Barnase–Barstar: From first encounter to final complex // *J. Struct. Biol.* – 2010. – V. 171. – № 1. – P. 52–63.

148. Voss C., Lindau D., Flaschel E. Production of recombinant RNase Ba and its application in downstream processing of plasmid DNA for pharmaceutical use // *Biotechnol. Prog.* – 2006. – V. 22. – № 3. – P. 737–744.
149. Ilinskaya O.N., Vamvakas S. Nephrotoxic effects of bacterial ribonucleases in the isolated perfused rat kidney // *Toxicology.* – 1997. – V. 120. – № 1. – P. 55–63.
150. Schirrmann T., Krauss J., Arndt M.A.E., Rybak S.M., Dübel S. Targeted therapeutic RNases (ImmunoRNases) // *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2009. – V. 9. – № 1. – P. 79–95.
151. Stepanov A. V, Belogurov Jr A.A., Ponomarenko N.A., Stremovskiy O.A., Kozlov L. V, Bichucher A.M., Dmitriev S.E., Smirnov I. V, Shamborant O.G., Balabashin D.S. Design of targeted B cell killing agents // *PLoS One.* – 2011. – V. 6. – № 6. – P. e20991.
152. Prior T.I., FitzGerald D.J., Pastan I. Barnase toxin: a new chimeric toxin composed of pseudomonas exotoxin A and barnase // *Cell.* – 1991. – V. 64. – № 5. – P. 1017–1023.
153. Prior T.I., FitzGerald D.J., Pastan I. Translocation mediated by domain II of Pseudomonas exotoxin A: transport of barnase into the cytosol // *Biochemistry.* – 1992. – V. 31. – № 14. – P. 3555–3559.
154. Shilova O., Kotelnikova P., Proshkina G., Shramova E., Deyev S. Barnase-Barstar Pair: Contemporary Application in Cancer Research and Nanotechnology // *Molecules.* – 2021. – V. 26. – № 22. – P. 6785.
155. Aphanasenko G.A., Dudkin S.M., Kaminir L.B., Leshchinskaya I.B., Severin Es. Primary structure of ribonuclease from *Bacillus intermedius* 7P // *FEBS Lett.* – 1979. – V. 97. – № 1. – P. 77–80.
156. Mitkevich V.A., Schulga A.A., Ermolyuk Y.S., Lobachov V.M., Chekhov V.O., Yakovlev G.I., Hartley R.W., Pace C.N., Kirpichnikov M.P., Makarov A.A. Thermodynamics of denaturation of complexes of barnase and binase with barstar // *Biophys. Chem.* – 2003. – V. 105. – № 2–3. – P. 383–390.
157. Сокуренок Ю.В., Зеленихин П.В., Ульянова В.В., Колпаков А.И., Мюллер Д., Ильинская О.Н. ИДЕНТИФИКАЦИЯ 2, 3-сГМР КАК ИНТЕРМЕДИАТА КАТАЛИТИЧЕСКОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ РНК БИНАЗОЙ И ОЦЕНКА ЕГО БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ // *Биоорганическая химия.* – 2015. – V. 41. – № 1. – P. 37.
158. Polyakov K.M., Lebedev A.A., Okorokov A.L., Panov K.I., Schulga A.A., Pavlovsky A.G., Karpeisky M.Y., Dodson G.G. The structure of substrate-free microbial ribonuclease binase and of its complexes with 3' GMP and sulfate ions // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* – 2002. – V. 58. – № 5. – P. 744–750.
159. Dudkina E., Kayumov A., Ulyanova V., Ilinskaya O. New insight into secreted ribonuclease structure: binase is a natural dimer // *PLoS One.* – 2014. – V. 9. – № 12. – P. e115818.
160. Müller C., Ulyanova V., Ilinskaya O., Pleschka S., Mahmud R.S. A novel antiviral strategy against MERS-CoV and HCoV-229E using binase to target viral genome replication // *Bionanoscience.* – 2017. – V. 7. – № 2. – P. 294–299.
161. Ilinskaya O.N., Zelenikhin P. V, Petrushanko I.Y., Mitkevich V.A., Prassolov V.S., Makarov A.A. Binase induces apoptosis of transformed myeloid cells and does not induce T-cell immune response // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – V. 361. – № 4. – P. 1000–1005.
162. Mitkevich V.A., Burnysheva K.M., Petrushanko I.Y., Adzhubei A.A., Schulga A.A., Chumakov P.M., Makarov A.A. Binase treatment increases interferon sensitivity and apoptosis in SiHa cervical carcinoma cells by downregulating E6 and E7 human papilloma virus oncoproteins // *Oncotarget.* – 2017. – V. 8. – № 42. – P. 72666.
163. Ilinskaya O.N., Singh I., Dudkina E., Ulyanova V., Kayumov A., Barreto G. Direct inhibition of oncogenic KRAS by *Bacillus pumilus* ribonuclease (binase) // *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Res.* – 2016. – V. 1863. – № 7. – P. 1559–1567.

164. Mitkevich V.A., Ilinskaya O.N., Makarov A.A. Antitumor RNases: killer's secrets // *Cell Cycle*. – 2015. – V. 14. – № 7. – P. 931–932.
165. Wu S., Shi X., Sun J., Liu Y., Luo Y., Liang Z., Wang J., Zeng X. The significance of programmed cell death ligand 1 expression in resected lung adenocarcinoma // *Oncotarget*. – 2017. – V. 8. – № 10. – P. 16421.
166. Ilinskaya O.N., Koschinski A., Repp H., Mitkevich V.A., Dreyer F., Scholtz J.M., Pace C.N., Makarov A.A. RNase-induced apoptosis: fate of calcium-activated potassium channels // *Biochimie*. – 2008. – V. 90. – № 5. – P. 717–725.
167. Cabrera-Fuentes H.A., Zelenikhin P. V, Kolpakov A.I., Preissner K.T., Ilinskaya O.N. 18. Comparative Toxicity of Binase towards Tumor and Normal Cells // *Toxicon*. – 2012. – V. 2. – № 60. – P. 104–105.
168. HA C.F., Kalacheva N. V, Mukhametshina R.T., Zelenichin P. V, Kolpakov A.I., Barreto G., Praïssner K.T., Il'inskaia O.N. Binase penetration into alveolar epithelial cells does not induce cell death // *Biomed. Khim.* – 2012. – V. 58. – № 3. – P. 272–280.
169. Mitkevich V.A., Tchurikov N.A., Zelenikhin P. V., Petrushanko I.Y., Makarov A.A., Ilinskaya O.N. Binase cleaves cellular noncoding RNAs and affects coding mRNAs // *FEBS J.* – 2010. – V. 277. – № 1. – P. 186–196.
170. Surchenko Y. V, Dudkina E. V, Nadyrova A.I., Ulyanova V. V, Zelenikhin P. V, Ilinskaya O.N. Cytotoxic Potential of Novel Bacillary Ribonucleases Balnase and Balifase // *Bionanoscience*. – 2020. – V. 10. – № 2. – P. 409–415.
171. Benito A., Ribó M., Vilanova M. On the track of antitumour ribonucleases // *Mol. Biosyst.* – 2005. – V. 1. – № 4. – P. 294–302.
172. Haigis M.C., Raines R.T. Secretory ribonucleases are internalized by a dynamin-independent endocytic pathway // *J. Cell Sci.* – 2003. – V. 116. – № 2. – P. 313–324.
173. Sundlass N.K., Eller C.H., Cui Q., Raines R.T. Contribution of electrostatics to the binding of pancreatic-type ribonucleases to membranes // *Biochemistry*. – 2013. – V. 52. – № 37. – P. 6304–6312.
174. Kanwar S.S., Kumar R. Ribonuclease as anticancer therapeutics // *Enz Eng.* – 2017. – V. 6. – № 162. – P. 2.
175. Makarov A.A., Ilinskaya O.N. Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets // *FEBS Lett.* – 2003. – V. 540. – № 1–3. – P. 15–20.
176. Ran S., Downes A., Thorpe P.E. Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels // *Cancer Res.* – 2002. – V. 62. – № 21. – P. 6132–6140.
177. Ilinskaya O.N., Koschinski A., Mitkevich V.A., Repp H., Dreyer F., Pace C.N., Makarov A.A. Cytotoxicity of RNases is increased by cationization and counteracted by KCa channels // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – V. 314. – № 2. – P. 550–554.
178. Futami J., Yamada H. Design of cytotoxic ribonucleases by cationization to enhance intracellular protein delivery // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2008. – V. 9. – № 3. – P. 180–184.
179. Roiz L., Smirnoff P., Bar-Eli M., Schwartz B., Shoseyov O. ACTIBIND, an actin-binding fungal T2-RNase with antiangiogenic and anticarcinogenic characteristics // *Cancer*. – 2006. – V. 106. – № 10. – P. 2295–2308.
180. Trevino S.R., Scholtz J.M., Pace C.N. Amino acid contribution to protein solubility: Asp, Glu, and Ser contribute more favorably than the other hydrophilic amino acids in RNase Sa // *J. Mol. Biol.* – 2007. – V. 366. – № 2. – P. 449–460.
181. Rodríguez M., Torrent G., Bosch M., Rayne F., Dubremetz J.-F., Ribó M., Benito A., Vilanova M., Beaumelle B. Intracellular pathway of Onconase that enables its delivery to the cytosol // *J. Cell Sci.* – 2007. – V. 120. – № 8. – P. 1405–1411.

182. Furia A., Moscato M., Cali G., Pizzo E., Confalone E., Amoroso M.R., Esposito F., Nitsch L., D'Alessio G. The ribonuclease/angiogenin inhibitor is also present in mitochondria and nuclei // *FEBS Lett.* – 2011. – V. 585. – № 4. – P. 613–617.
183. Monti D.M., Gesualdi N.M., Matoušek J., Esposito F., D'Alessio G. The cytosolic ribonuclease inhibitor contributes to intracellular redox homeostasis // *FEBS Lett.* – 2007. – V. 581. – № 5. – P. 930–934.
184. Hoang T.T., Raines R.T. Molecular basis for the autonomous promotion of cell proliferation by angiogenin // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – V. 45. – № 2. – P. 818.
185. Liao Y.-D., Huang H.-C., Chan H.-J., Kuo S.-J. Large-Scale Preparation of a Ribonuclease from *Rana catesbeiana* (Bullfrog) Oocytes and Characterization of Its Specific Cytotoxic Activity against Tumor Cells // *Protein Expr. Purif.* – 1996. – V. 7. – № 2. – P. 194–202.
186. Saxena S.K., Gravell M., Wu Y.N., Mikulski S.M., Shogen K., Ardelt W., Youle R.J. Inhibition of HIV-1 production and selective degradation of viral RNA by an amphibian ribonuclease // *J. Biol. Chem.* – 1996. – V. 271. – № 34. – P. 20783–20788.
187. Ardelt B., Ardelt W., Darzynkiewicz Z. Cytotoxic ribonucleases and RNA interference (RNAi) // *Cell Cycle.* – 2003. – V. 2. – № 1. – P. 22–24.
188. Mironova N.L., Patutina O.A., Brenner E.V., Kurilshchikov A.M., Vlassov V.V. Z.M.. Identification of molecular targets of RNase A in antitumor therapy // *First Meet. Fram. French-Siberian Cent. Res. Educ. —Nucleic Acid - Protein Interact. Life Sci.* – 2013.
189. Миронова Н.Л., Патутина О.А., Бреннер Е.В., Курильщикова А.М., Зенкова М.А. В., В.В. Экзогенные нуклеазы как средства подавления опухолевой прогрессии путем инактивации опухоль-ассоциированных нуклеиновых кислот // *Всероссийская конференция с международным участием «Биотехнология – медицине будущего».* – 2017.
190. Acquati F., Possati L., Ferrante L., Campomenosi P., Talevi S., Bardelli S., Margiotta C., Russo A., Bortoletto E., Rocchetti R. Tumor and metastasis suppression by the human RNASET2 gene // *Int. J. Oncol.* – 2005. – V. 26. – № 5. – P. 1159–1168.
191. Acquati F., Mortara L., De Vito A., Baci D., Albini A., Cippitelli M., Taramelli R., Noonan D.M. Innate immune response regulation by the human RNASET2 tumor suppressor gene // *Front. Immunol.* – 2019. – V. 10. – P. 2587.
192. Roiz L., Smirnoff P., Lewin I., Shoseyov O., Schwartz B. Human recombinant RNASET2: A potential anti-cancer drug // *Oncoscience.* – 2016. – V. 3. – № 2. – P. 71.
193. Smirnoff P., Roiz L., Angelkovitch B., Schwartz B., Shoseyov O. A recombinant human RNASET2 glycoprotein with antitumorigenic and antiangiogenic characteristics: expression, purification, and characterization // *Cancer.* – 2006. – V. 107. – № 12. – P. 2760–2769.
194. Ilinskaya O.N., Mahmud R.S. Ribonucleases as antiviral agents // *Mol. Biol.* – 2014. – V. 48. – № 5. – P. 615–623.
195. Rosenberg H.F., Domachowske J.B. Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens // *J. Leukoc. Biol.* – 2001. – V. 70. – № 5. – P. 691–698.
196. Schein C.H. From housekeeper to microsurgeon: the diagnostic and therapeutic potential of ribonucleases // *Nat. Biotechnol.* – 1997. – V. 15. – № 6. – P. 529–536.
197. Li J., Boix E. Host defence RNases as antiviral agents against enveloped single stranded RNA viruses // *Virulence.* – 2021. – V. 12. – № 1. – P. 444–469.
198. Rosenberg H.F. Eosinophil-derived neurotoxin (EDN/RNase 2) and the mouse eosinophil-associated RNases (mEars): expanding roles in promoting host defense // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – V. 16. – № 7. – P. 15442–15455.
199. Domachowske J.B., Dyer K.D., Bonville C.A., Rosenberg H.F. Recombinant human eosinophil-

- derived neurotoxin/RNase 2 functions as an effective antiviral agent against respiratory syncytial virus // *J. Infect. Dis.* – 1998. – V. 177. – № 6. – P. 1458–1464.
200. Rosenberg H.F. Eosinophil-derived neurotoxin/RNase 2: connecting the past, the present and the future // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2008. – V. 9. – № 3. – P. 135–140.
  201. Sikriwal D., Seth D., Parveen S., Malik A., Broor S., Batra J.K. An insertion in loop L7 of human eosinophil-derived neurotoxin is crucial for its antiviral activity // *J. Cell. Biochem.* – 2012. – V. 113. – № 10. – P. 3104–3112.
  202. Kim C.-K., Seo J.K., Ban S.H., Fujisawa T., Kim D.W., Callaway Z. Eosinophil-derived neurotoxin levels at 3 months post-respiratory syncytial virus bronchiolitis are a predictive biomarker of recurrent wheezing // *Biomarkers.* – 2013. – V. 18. – № 3. – P. 230–235.
  203. Bedoya V.I., Boasso A., Hardy A.W., Rybak S., Shearer G.M., Rugeles M.T. Ribonucleases in HIV type 1 inhibition: effect of recombinant RNases on infection of primary T cells and immune activation-induced RNase gene and protein expression // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* – 2006. – V. 22. – № 9. – P. 897–907.
  204. Lee-Huang S., Huang P.L., Sun Y., Huang P.L., Kung H., Blithe D.L., Chen H.-C. Lysozyme and RNases as anti-HIV components in  $\beta$ -core preparations of human chorionic gonadotropin // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1999. – V. 96. – № 6. – P. 2678–2681.
  205. Domachowske J.B., Dyer K.D., Adams A.G., Leto T.L., Rosenberg H.F. Eosinophil cationic protein/RNase 3 is another RNase A-family ribonuclease with direct antiviral activity // *Nucleic Acids Res.* – 1998. – V. 26. – № 14. – P. 3358–3363.
  206. Lu L., Wei R., Prats-Ejarque G., Goetz M., Wang G., Torrent M., Boix E. Human RNase3 immune modulation by catalytic-dependent and independent modes in a macrophage-cell line infection model // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2021. – V. 78. – № 6. – P. 2963–2985.
  207. Cocchi F., DeVico A.L., Lu W., Popovic M., Latinovic O., Sajadi M.M., Redfield R.R., Lafferty M.K., Galli M., Garzino-Demo A. Soluble factors from T cells inhibiting X4 strains of HIV are a mixture of  $\beta$  chemokines and RNases // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2012. – V. 109. – № 14. – P. 5411–5416.
  208. Youle R.J., Wu Y.-N., Mikulski S.M., Shogen K., Hamilton R.S., Newton D., D'Alessio G., Gravel M. RNase inhibition of human immunodeficiency virus infection of H9 cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1994. – V. 91. – № 13. – P. 6012–6016.
  209. Suhasini A.N., Sirdeshmukh R. Onconase action on tRNA<sup>Lys3</sup>, the primer for HIV-1 reverse transcription // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – V. 363. – № 2. – P. 304–309.
  210. Flodström-Tullberg M., Hultcrantz M., Stotland A., Maday A., Tsai D., Fine C., Williams B., Silverman R., Sarvetnick N. RNase L and double-stranded RNA-dependent protein kinase exert complementary roles in islet cell defense during coxsackievirus infection // *J. Immunol.* – 2005. – V. 174. – № 3. – P. 1171–1177.
  211. Li X.-L., Blackford J.A., Hassel B.A. RNase L Mediates the Antiviral Effect of Interferon through a Selective Reduction in Viral RNA during Encephalomyocarditis Virus Infection // *J. Virol.* – 1998. – V. 72. – № 4. – P. 2752–2759.
  212. Malathi K., Dong B., Gale M., Silverman R.H. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity // *Nature.* – 2007. – V. 448. – № 7155. – P. 816–819.
  213. Chakrabarti A., Ghosh P.K., Banerjee S., Gaughan C., Silverman R.H. RNase L triggers autophagy in response to viral infections // *J. Virol.* – 2012. – V. 86. – № 20. – P. 11311–11321.
  214. Li G., Xiang Y., Sabapathy K., Silverman R.H. An apoptotic signaling pathway in the interferon antiviral response mediated by RNase L and c-Jun NH2-terminal kinase // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – № 2. – P. 1123–1131.
  215. Maitra R.K., Silverman R.H. Regulation of human immunodeficiency virus replication by 2', 5'-oligoadenylate-dependent RNase L // *J. Virol.* – 1998. – V. 72. – № 2. – P. 1146–1152.

216. Lin R.-J., Chu J.-S., Chien H.-L., Tseng C.-H., Ko P.-C., Mei Y.-Y., Tang W.-C., Kao Y.-T., Cheng H.-Y., Liang Y.-C. MCP1P1 suppresses hepatitis C virus replication and negatively regulates virus-induced proinflammatory cytokine responses // *J. Immunol.* – 2014. – V. 193. – № 8. – P. 4159–4168.
217. Lin R.J., Chien H.L., Lin S.Y., Chang B.L., Yu H.P., Tang W.C., Lin Y.L. MCP1P1 ribonuclease exhibits broad-spectrum antiviral effects through viral RNA binding and degradation // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – V. 41. – № 5. – P. 3314–3326.
218. Nadal A., Martell M., Lytle J.R., Lyons A.J., Robertson H.D., Cabot B., Esteban J.I., Esteban R., Guardia J., Gómez J. Specific cleavage of hepatitis C virus RNA genome by human RNase P // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – № 34. – P. 30606–30613.
219. Shah Mahmud R., Mostafa A., Müller C., Kanrai P., Ulyanova V., Sokurenko Y., Dzieciolowski J., Kuznetsova I., Ilinskaya O., Pleschka S. Bacterial ribonuclease binase exerts an intra-cellular anti-viral mode of action targeting viral RNAs in influenza a virus-infected MDCK-II cells // *Virol. J.* – 2018. – V. 15. – № 1. – P. 1–12.
220. Shah Mahmud R., Müller C., Romanova Y., Mostafa A., Ulyanova V., Pleschka S., Ilinskaya O. Ribonuclease from bacillus acts as an antiviral agent against negative-and positive-sense single stranded human respiratory RNA viruses // *Biomed Res. Int.* – 2017. – V. 2017.
221. Onorato J., Esposito S., Scovena E., Morandi B., Morelli M., Pizzi M., Zisa G., Marchisio P., Principi N. Eosinophil involvement and serum IgE level in HIV-1-infected children // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 1999. – V. 104. – № 1. – P. 245–247.
222. Paganelli R., Fanales-Belasio E., Scala E., Carmini D., Mezzaroma I., Pinter E., Aiuti F. Serum eosinophil cationic protein (ECP) in human immunodeficiency virus (HIV) infection // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 1991. – V. 88. – № 3. – P. 416–418.
223. Lee Y.-S., Chen C.-H., Chao A., Chen E.-S., Wei M.-L., Chen L.-K., Yang K.D., Lin M.-C., Wang Y.-H., Liu J.-W. Molecular signature of clinical severity in recovering patients with severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) // *BMC Genomics.* – 2005. – V. 6. – № 1. – P. 1–10.
224. Lippi G., Henry B.M. Eosinophil count in severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) // *QJM An Int. J. Med.* – 2020.
225. Lindsley A.W., Schwartz J.T., Rothenberg M.E. Eosinophil responses during COVID-19 infections and coronavirus vaccination // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2020. – V. 146. – № 1. – P. 1–7.
226. Rodrigo-Muñoz J.M., Sastre B., Cañas J.A., Gil-Martínez M., Redondo N., Del Pozo V. Eosinophil response against classical and emerging respiratory viruses: COVID-19 // *J Investig Allergol Clin Immunol.* – 2020. – V. 31. – № 2. – P. 94–107.
227. Liu F., Xu A., Zhang Y., Xuan W., Yan T., Pan K., Yu W., Zhang J. Patients of COVID-19 may benefit from sustained lopinavir-combined regimen and the increase of eosinophil may predict the outcome of COVID-19 progression // *Int. J. Infect. Dis.* – 2020. – V. 95. – P. 183–191.
228. Dosanjh A. Eosinophil-derived neurotoxin and respiratory tract infection and inflammation: implications for COVID-19 management // *J. Interf. Cytokine Res.* – 2020. – V. 40. – № 9. – P. 443–445.
229. Sheng J., Xu Z. Three decades of research on angiogenin: a review and perspective // *Acta Biochim Biophys Sin.* – 2016. – V. 48. – № 5. – P. 399–410.
230. Wang Q., Lee I., Ren J., Ajay S.S., Lee Y.S., Bao X. Identification and functional characterization of tRNA-derived RNA fragments (tRFs) in respiratory syncytial virus infection // *Mol. Ther.* – 2013. – V. 21. – № 2. – P. 368–379.
231. Schein C.H., Haugg M., Benner S.A. Interferon- $\gamma$  activates the cleavage of double-stranded RNA by bovine seminal ribonuclease // *FEBS Lett.* – 1990. – V. 270. – № 1–2. – P. 229–232.

232. Vert A., Castro J., Ribó M., Benito A., Vilanova M. Activating transcription factor 3 is crucial for antitumor activity and to strengthen the antiviral properties of Onconase // *Oncotarget*. – 2017. – V. 8. – № 7. – P. 11692.
233. Navarro S., Aleu J., Jimenez M., Boix E., Cuchillo C.M., Nogues M. V. 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.* – 2008. – V. 65. – № 2. – P. 324–337.
234. Chang K.-C., Lo C.-W., Fan T., Chang M.D.-T., Shu C.-W., Chang C.-H., Chung C.-T., Fang S., Chao C.-C., Tsai J.-J. TNF- $\alpha$  mediates eosinophil cationic protein-induced apoptosis in BEAS-2B cells // *BMC Cell Biol.* – 2010. – V. 11. – № 1. – P. 1–14.
235. Lu L., Li J., Moussaoui M., Boix E. Immune modulation by human secreted RNases at the extracellular space // *Front. Immunol.* – 2018. – V. 9. – P. 1012.
236. Lu L., Arranz-Trullén J., Prats-Ejarque G., Pulido D., Bhakta S., Boix E. Human antimicrobial RNases inhibit intracellular bacterial growth and induce autophagy in mycobacteria-infected macrophages // *Front. Immunol.* – 2019. – V. 10. – P. 1500.
237. Turcotte R.F., Raines R.T. Design and characterization of an HIV-specific ribonuclease zymogen // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. – 2008. – V. 24. – № 11. – P. 1357–1363.
238. Silverman R.H. Viral encounters with 2', 5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response // *J. Virol.* – 2007. – V. 81. – № 23. – P. 12720–12729.
239. Banerjee S., Gusho E., Gaughan C., Dong B., Gu X., Holvey-Bates E., Talukdar M., Li Y., Weiss S.R., Sicheri F. OAS-RNase L innate immune pathway mediates the cytotoxicity of a DNA-demethylating drug // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2019. – V. 116. – № 11. – P. 5071–5076.
240. Drappier M., Michiels T. Inhibition of the OAS/RNase L pathway by viruses // *Curr. Opin. Virol.* – 2015. – V. 15. – P. 19–26.
241. Manivannan P., Siddiqui M.A., Malathi K. RNase L amplifies interferon signaling by inducing protein kinase R-mediated antiviral stress granules // *J. Virol.* – 2020. – V. 94. – № 13. – P. e00205-20.
242. Ezelle H.J., Malathi K., Hassel B.A. The roles of RNase-L in antimicrobial immunity and the cytoskeleton-associated innate response // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – V. 17. – № 1. – P. 74.
243. Malathi K., Saito T., Crochet N., Barton D.J., Gale M., Silverman R.H. RNase L releases a small RNA from HCV RNA that refolds into a potent PAMP // *Rna*. – 2010. – V. 16. – № 11. – P. 2108–2119.
244. Behera A.K., Kumar M., Lockey R.F., Mohapatra S.S. 2'-5' Oligoadenylate synthetase plays a critical role in interferon- $\gamma$  inhibition of respiratory syncytial virus infection of human epithelial cells // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – № 28. – P. 25601–25608.
245. Ireland D.D.C., Stohlman S.A., Hinton D.R., Kapil P., Silverman R.H., Atkinson R.A., Bergmann C.C. RNase L mediated protection from virus induced demyelination // *PLoS Pathog.* – 2009. – V. 5. – № 10. – P. e1000602.
246. Larsen K.P., Mathiharan Y.K., Kappel K., Coey A.T., Chen D.-H., Barrero D., Madigan L., Puglisi J.D., Skiniotis G., Puglisi E.V. Architecture of an HIV-1 reverse transcriptase initiation complex // *Nature*. – 2018. – V. 557. – № 7703. – P. 118–122.
247. Ge Q., Filip L., Bai A., Nguyen T., Eisen H.N., Chen J. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2004. – V. 101. – № 23. – P. 8676–8681.
248. Haasnoot J., Westerhout E.M., Berkhout B. RNA interference against viruses: strike and counterstrike // *Nat. Biotechnol.* – 2007. – V. 25. – № 12. – P. 1435–1443.
249. Chun H., Costanzi J., Mittelman A. Phase I/II trial of onconase (ONC) plus tamoxifen (TMX) in patients (pts) with advanced pancreatic carcinoma (APC) // *Proc Am Soc Clin Oncol*. – 1995. –

- V. 517.
250. Puccio C., Mittelman A., Chun H., Costanzi J., Panella T., Coombe N., Shogen K., Mikulski S. A new anticancer RNase (Onconase): clinical trial in patients (pts) with breast cancer (BC) // *Proc Am Soc Clin Oncol.* – 1996. – V. 242.
  251. Mikulski S.M., Costanzi J.J., Vogelzang N.J., McCachren S., Taub R.N., Chun H., Mittelman A., Panella T., Puccio C., Fine R. Phase II trial of a single weekly intravenous dose of ranpirnase in patients with unresectable malignant mesothelioma // *J. Clin. Oncol.* – 2002. – V. 20. – № 1. – P. 274–281.
  252. Altomare D.A., Rybak S.M., Pei J., Maizel J. V, Cheung M., Testa J.R., Shogen K. Onconase responsive genes in human mesothelioma cells: implications for an RNA damaging therapeutic agent // *BMC Cancer.* – 2010. – V. 10. – № 1. – P. 1–12.
  253. NCT01184287 C. go. I. A Study Of Ranpirnase(Onconase®) To Pemetrexed Plus Carboplatin In Patients With Non-Squamous Non-Small Cell Lung Cancer [Electronic resource].
  254. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00003034. ONCONASE Plus Doxorubicin Versus Doxorubicin Alone For Patients With Malignant Pleural or Peritoneal Mesothelioma Who Have Had No More Than One Prior Chemotherapy Regimen [Electronic resource].
  255. Evaluation of the Safety and Efficacy of Oshadi D and Oshadi R for Cancer Treatment // *Clin. Trials.gov*, Identifier NCT01201018. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01201018>. – 2012.
  256. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02134990. Oshadi D and Oshadi R in Combination With Docetaxel, as 2nd Line Therapy for Metastatic Non Small Cell Lung Cancer [Electronic resource].
  257. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01627795. Safety and Efficacy of Oshadi D and Oshadi R for Malignant Mesothelioma Treatment [Electronic resource].
  258. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02007317. Safety and Efficacy of Oshadi D and Oshadi R in Basal Cell Carcinoma Patients Prior to Tumor Excision a Phase 2 Study [Electronic resource].
  259. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02462265. Oshadi D & Oshadi R Combined With Salvage Chemotherapy for Relapsed Acute Myeloid Leukemia or Lymphoid Leukemia Patients [Electronic resource].
  260. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00818831. A Study of QBI-139 in Subjects With Advanced Solid Tumors [Electronic resource].
  261. Schulga A., Kurbanov F., Kirpichnikov M., Protasevich I., Lobachov V., Ranjbar B., Chekhov V., Polyakov K., Engelborghs Y., Makarov A. Comparative study of binase and barnase: experience in chimeric ribonucleases // *Protein Eng.* – 1998. – V. 11. – № 9. – P. 775–782.
  262. Колпаков А.И., Ильинская О.Н. Оптимизация метода определения рибонуклеазной активности с использованием высокополимерной РНК // *Клиническая и лабораторная диагностика.* – 1999. – № 5. – P. 14–16.
  263. Varkonyi-Gasic E., Wu R., Wood M., Walton E.F., Hellens R.P. Protocol: A highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs // *Plant Methods.* – 2007. – V. 3. – № 1. – P. 12.
  264. Schmittgen T.D., Jiang J., Liu Q., Yang L. A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – V. 32. – № 4.
  265. Schindelin J., Rueden C.T., Hiner M.C., Eliceiri K.W. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis // *Mol. Reprod. Dev.* – 2015. – V. 82. – № 7–8. – P. 518–529.
  266. Park J.G., Kramer B.S., Carmichael J., Minna J.D., Gazdar A.F., Steinberg S.M., Collins J.M. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay // *Cancer Res.* – 1987. – V. 47. – № 22. – P. 5875–5879.

267. Baek S.H., Ko J.H., Lee H., Jung J., Kong M., Lee J.W., Lee J., Chinnathambi A., Zayed M., Alharbi S.A., Lee S.G., Shim B.S., Sethi G., Kim S.H., Yang W.M., Um J.Y., Ahn K.S. Resveratrol inhibits STAT3 signaling pathway through the induction of SOCS-1: Role in apoptosis induction and radiosensitization in head and neck tumor cells // *Phytomedicine*. – 2016. – V. 23. – № 5. – P. 566–577.
268. Guzmán C., Bagga M., Kaur A., Westermarck J., Abankwa D. ColonyArea: An ImageJ plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays // *PLoS One*. – 2014. – V. 9. – № 3. – P. e92444.
269. Markov O. V., Mironova N.L., Shmendel E. V., Serikov R.N., Morozova N.G., Maslov M.A., Vlassov V. V., Zenkova M.A. Multicomponent mannose-containing liposomes efficiently deliver RNA in murine immature dendritic cells and provide productive anti-tumour response in murine melanoma model // *J. Control. Release*. – 2015. – V. 213. – P. 45–56.
270. Tomayko M.M., Reynolds C.P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 1989. – V. 24. – № 3. – P. 148–154.
271. Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J., Zhou Z., Lee D.H., Nguyen J.T., Barbisin M., Xu N.L., Mahuvakar V.R., Andersen M.R., Lao K.Q., Livak K.J., Guegler K.J. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – V. 33. – № 20. – P. e179.
272. Kutmon M., Kelder T., Mandaviya P., Evelo C.T.A., Coort S.L. CyTargetLinker: a cytoscape app to integrate regulatory interactions in network analysis // *PLoS One*. – 2013. – V. 8. – № 12. – P. e82160.
273. Huang H.-Y., Lin Y.-C.-D., Li J., Huang K.-Y., Shrestha S., Hong H.-C., Tang Y., Chen Y.-G., Jin C.-N., Yu Y. miRTarBase 2020: updates to the experimentally validated microRNA–target interaction database // *Nucleic Acids Res.* – 2020. – V. 48. – № D1. – P. D148–D154.
274. Bindea G., Mlecnik B., Hackl H., Charoentong P., Tosolini M., Kirilovsky A., Fridman W.-H., Pagès F., Trajanoski Z., Galon J. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks // *Bioinformatics*. – 2009. – V. 25. – № 8. – P. 1091–1093.
275. Genecards®. The Human Gene Database. [Electronic resource].
276. KEGG. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. [Electronic resource].
277. Koike M., Ikuta T., Miyasaka T., Shiomi T. Ku80 can translocate to the nucleus independent of the translocation of Ku70 using its own nuclear localization signal // *Oncogene*. – 1999. – V. 18. – № 52. – P. 7495–7505.
278. Walker J.R., Corpina R.A., Goldberg J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair // *Nature*. – 2001. – V. 412. – № 6847. – P. 607–614.
279. Gottlieb T.M., Jackson S.P. The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen // *Cell*. – 1993. – V. 72. – № 1. – P. 131–142.
280. Zhang X., Brann T.W., Zhou M., Yang J., Oguariri R.M., Lidie K.B., Imamichi H., Huang D.-W., Lempicki R.A., Baseler M.W., Veenstra T.D., Young H.A., Lane H.C., Imamichi T. Cutting edge: Ku70 is a novel cytosolic DNA sensor that induces type III rather than type I IFN // *J. Immunol.* – 2011. – V. 186. – № 8. – P. 4541–4545.
281. Jette N., Lees-Miller S.P. The DNA-dependent protein kinase: A multifunctional protein kinase with roles in DNA double strand break repair and mitosis // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* – 2015. – V. 117. – № 2–3. – P. 194–205.
282. Goodwin J.F., Knudsen K.E. Beyond DNA repair: DNA-PK function in cancer // *Cancer Discov.* – 2014. – V. 4. – № 10. – P. 1126–1139.
283. Kaczmarek W., Khan S.A. Lupus autoantigen Ku protein binds HIV-1 TAR RNA in vitro // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1993. – V. 196. – № 2. – P. 935–942.

284. Monferran S., Muller C., Mourey L., Frit P., Salles B. The Membrane-associated form of the DNA repair protein Ku is involved in cell adhesion to fibronectin // *J. Mol. Biol.* – 2004. – V. 337. – № 3. – P. 503–511.
285. Lynch E.M., Moreland R.B., Ginis I., Perrine S.P., Faller D. V. Hypoxia-activated ligand HAL-1/13 is lupus autoantigen Ku80 and mediates lymphoid cell adhesion in vitro // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2001. – V. 280. – № 4 49-4. – P. C897-911.
286. Tai Y.T., Podar K., Kraeft S.K., Wang F., Young G., Lin B., Gupta D., Lan B.C., Anderson K.C. Translocation of Ku86/Ku70 to the multiple myeloma cell membrane: Functional implications // *Exp. Hematol.* – 2002. – V. 30. – № 3. – P. 212–220.
287. Teoh G., Urashima M., Greenfield E.A., Nguyen K.A., Lee J.F., Chauhan D., Ogata A., Treon S.P., Anderson K.C. The 86-kD subunit of Ku autoantigen mediates homotypic and heterotypic adhesion of multiple myeloma cells // *J. Clin. Invest.* – 1998. – V. 101. – № 6. – P. 1379–1388.
288. Prabhakar B.S., Allaway G.P., Srinivasappa J., Notkins A.L. Cell surface expression of the 70-kD component of Ku, a DNA-binding nuclear autoantigen // *J. Clin. Invest.* – 1990. – V. 86. – № 4. – P. 1301–1305.
289. Muller C., Paupert J., Monferran S., Salles B. The double life of the Ku protein: Facing the DNA breaks and the extracellular environment // *Cell Cycle.* – 2005. – V. 4. – № 3. – P. 438–441.
290. Franken N.A.P., Rodermond H.M., Stap J., Haveman J., van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro // *Nat. Protoc.* – 2006. – V. 1. – № 5. – P. 2315–2319.
291. Nakanishi H., Takenaga K., Oguri K., Yoshida A., Okayama M. Morphological characteristics of tumours formed by Lewis lung carcinoma-derived cloned cell lines with different metastatic potentials: structural differences in their basement membranes formed in vivo // *Virchows Arch. A.* – 1992. – V. 420. – № 2. – P. 163–170.
292. Medina P.P., Nolde M., Slack F.J. OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma // *Nature.* – 2010. – V. 467. – № 7311. – P. 86–90.
293. Eis P.S., Tam W., Sun L., Chadburn A., Li Z., Gomez M.F., Lund E., Dahlberg J.E. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2005. – V. 102. – № 10. – P. 3627–3632.
294. Giancola C., Ercole C., Fotticchia I., Spadaccini R., Pizzo E., D'Alessio G., Picone D. Structure–cytotoxicity relationships in bovine seminal ribonuclease: new insights from heat and chemical denaturation studies on variants // *FEBS J.* – 2011. – V. 278. – № 1. – P. 111–122.
295. Fang E.F., Ng T.B. Ribonucleases of different origins with a wide spectrum of medicinal applications // *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Reviews Cancer.* – 2011. – V. 1815. – № 1. – P. 65–74.
296. Kurinenko B.M., Sobchuk L.I., Khaïbullina S.A., RSh B. Experimental research on the antitumor effectiveness of *Bac. intermedius* RNase // *Eksp. Onkol.* – 1988. – V. 10. – № 6. – P. 54–57.
297. Kurinenko B.M., Sergeeva E. V, Sobchuk L.I., RSh B., Khaïbullina S.A. In vitro and in vivo studies of RNase of *Bacillus intermedius* // *Antibiot. i khimioterapiia= Antibiot. chemotherapy [sic].* – 1989. – V. 34. – № 4. – P. 266–270.
298. Cabrera-Fuentes H.A., Aslam M., Saffarzadeh M., Kolpakov A., Zelenikhin P., Preissner K.T., Ilinskaya O.N. Internalization of *Bacillus intermedius* ribonuclease (BINASE) induces human alveolar adenocarcinoma cell death // *Toxicol.* – 2013. – V. 69. – P. 219–226.
299. Haigis M.C., Kurten E.L., Raines R.T. Ribonuclease inhibitor as an intracellular sentry // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – V. 31. – № 3. – P. 1024–1032.
300. Rutkoski T., Raines R. Evasion of Ribonuclease Inhibitor as a Determinant of Ribonuclease Cytotoxicity // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2008. – V. 9. – № 3. – P. 185–199.

301. Lee F.S., Shapiro R., Vallee B.L. Tight-binding inhibition of angiogenin and ribonuclease A by placental ribonuclease inhibitor // *Biochemistry*. – 1989. – V. 28. – № 1. – P. 225–230.
302. Ilinskaya O.N., Dreyer F., Mitkevich V.A., Shaw K.L., Pace C.N., Makarov A.A. Changing the net charge from negative to positive makes ribonuclease Sa cytotoxic // *Protein Sci.* – 2002. – V. 11. – № 10. – P. 2522–2525.
303. Baulida J. Epithelial-to-mesenchymal transition transcription factors in cancer-associated fibroblasts // *Mol. Oncol.* – 2017. – V. 11. – № 7. – P. 847–859.
304. Puisieux A., Brabletz T., Caramel J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors // *Nat. Cell Biol.* – 2014. – V. 16. – № 6. – P. 488–494.
305. Vella L.J. The emerging role of exosomes in epithelial-mesenchymal-transition in cancer // *Front. Oncol.* – 2014. – V. 4. – № NOV.
306. Loh C.Y., Chai J.Y., Tang T.F., Wong W.F., Sethi G., Shanmugam M.K., Chong P.P., Looi C.Y. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges // *Cells*. – 2019. – V. 8. – № 10.
307. Handra-Luca A., Hong S.M., Walter K., Wolfgang C., Hruban R., Goggins M. Tumour epithelial vimentin expression and outcome of pancreatic ductal adenocarcinomas // *Br. J. Cancer*. – 2011. – V. 104. – № 8. – P. 1296–1302.
308. Al-Haj L., Blackshear P.J., Khabar K.S.A. Regulation of p21/CIP1/WAF-1 mediated cell-cycle arrest by RNase L and tristetraprolin, and involvement of AU-rich elements // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – V. 40. – № 16. – P. 7739–7752.
309. Fang E.F., Zhang C.Z.Y., Zhang L., Fong W.P., Ng T.B. In vitro and in vivo anticarcinogenic effects of RNase MC2, a ribonuclease isolated from dietary bitter melon, toward human liver cancer cells // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2012. – V. 44. – № 8. – P. 1351–1360.
310. Chao T.Y., Lavis L.D., Raines R.T. Cellular uptake of ribonuclease A relies on anionic glycans // *Biochemistry*. – 2010. – V. 49. – № 50. – P. 10666–10673.