

На правах рукописи

Митькевич Владимир Александрович

**Молекулярный механизм действия и цитотоксические
свойства РНКазы *Streptomyces aureofaciens***

03 00.03- Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Москва – 2005

Работа выполнена в лаборатории конформационной стабильности белков и физических методов анализа Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор,

член-корреспондент РАН

А.А. Макаров

доктор химических наук, профессор

Г.И. Яковлев

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук, профессор В.Г. Туманян

доктор химических наук, профессор В.П. Варламов

Ведущая организация:

Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

Защита состоится «___» июня 2005 года в ___ на заседании диссертационного совета Д 002.235 01 при Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН по адресу: 119991, г. Москва, ул. Вавилова 32.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

Автореферат разослан «___» _____ 2005 года

Учёный секретарь

диссертационного совета,

кандидат химических наук

А.М. Крицын

2006-4
11532

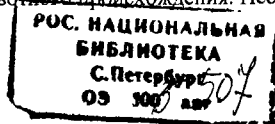
216 4243

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Рибонуклеазы (РНКазаы) являются традиционными объектами исследования молекулярной биологии. Биологические функции РНКаза, важнейших ферментов клеточного метаболизма, заключаются в трансформации РНК от первичных геновых транскриптов до функциональных компонентов трансляционной системы, продукции малых регуляторных РНК и деградации определенных типов РНК. В настоящее время большое внимание уделяется функциям РНКаза, связанным с регуляцией экспрессии генов, ростом и дифференцировкой клеток, защитой от патогенов, индукцией апоптоза. Эти белки находят широкое применение в генной инженерии, биохимии и медицине. Кроме того, они являются удобными объектами для изучения механизмов реализации высокой специфичности ферментов. Поэтому изучение молекулярного механизма действия РНКаза является важной задачей не только для энзимологии ферментов нуклеинового обмена, но и для понимания процессов клеточной регуляции.

В последние годы возрос интерес к созданию эффективных низкомолекулярных ингибиторов РНКаза как потенциальных противораковых средств, подавляющих активность ангиогенина, а также как противоаллергических препаратов, ингибирующих активность РНКаза эозинофилов человека. Потребность в эффективных ингибиторах РНКаза связана и с необходимостью блокирования активности примесных РНКаза при биохимических работах с РНК-содержащими препаратами. Понимание молекулярного механизма действия этих ферментов и изучение структуры их активных центров важно для создания эффективных ингибиторов РНКаза.

Было обнаружено, что некоторые РНКаза семейства РНКаза А токсичны для клеток млекопитающих, особенно для опухолевых клеток. В ряде случаев они избирательно атакуют злокачественные клетки, запуская апоптозную реакцию, и поэтому могут рассматриваться как альтернатива классическим химиотерапевтическим препаратам. Так, РНКаза из ооцитов лягушки *Rana pipiens*, онконаза, в настоящее время проходит клинические испытания как препарат для лечения мезотелиомы легких. Бактериальные РНКаза составляют важное семейство РНКаза, некоторые представители которого также обладают цитотоксическими свойствами. Одним из важных факторов цитотоксичности микробных РНКаза по отношению к клеткам млекопитающих является их невосприимчивость к действию цитоплазматического ингибитора РНКаза, присутствующего практически во всех тканях человека и блокирующего каталитическую активность экзогенных РНКаза животного происхождения. Несмотря на



большой интерес исследователей к цитотоксичным РНКазам, факторы, определяющие их цитотоксичность, до сих пор недостаточно изучены.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы было установление молекулярного механизма действия и определение цитотоксических свойств РНКазы Sa из *Streptomyces aureofaciens*. В задачи исследования входило 1) определение функциональной роли остатков активного центра РНКазы Sa и их вкладов в каталитическую активность фермента; 2) конструирование эффективных низкомолекулярных ингибиторов РНКазы Sa; 3) изучение влияния замен остатков активного центра РНКазы Sa на конформационную стабильность фермента; 4) исследование цитотоксических свойств РНКазы Sa, ее близких гомологов и мутантов с обращенным зарядом, оценка влияния отдельных клеточных компонент на цитотоксические эффекты, проявляемые РНКазами

Научная новизна и практическая ценность работы. Впервые установлена функциональная роль остатков активного центра РНКазы Sa и определены вклады этих остатков в каталитические свойства фермента. Показано, что определяющий вклад в каталитическую активность РНКазы Sa дают остатки Glu54, Arg65 и His85. Обнаружено, что гуаниловая специфичность РНКазы Sa определяется способностью белка образовывать специфичные водородные связи с атомами O6 и N7 гуанинового основания субстрата. Определены константы ионизации каталитических групп фермента. Показано, что катионизация молекулы РНКазы Sa путем замены отрицательно заряженных аминокислотных остатков на поверхности молекулы белка положительно заряженными остатками не приводит к существенным изменениям каталитической активности фермента.

Предложен новый подход к конструированию ингибиторов РНКаз на основе производных нуклеотидов с *N*-гидроксимочевинной, связывающих ионы цинка(II). Показано, что нуклеотидное производное *N*-гидроксимочевины использует ион Zn^{2+} для увеличения эффективности ингибирования энзиматической активности РНКазы Sa и РНКазы из *Bacillus intermedius*, бипазы. Данная стратегия может быть использована как для ингибирования РНКаз, так и ферментов других типов.

Обнаружено, что аминокислотные остатки активного центра РНКазы Sa, отвечающие за связывание лигандов, не оптимальны для термостабильности белка. Это показывает, что недавно предложенная гипотеза о том, что реализация каталитической функции белка сопровождается образованием неоптимальной для его стабильности

структуры активного центра фермента, относится преимущественно к субстрат-связывающему участку.

Обнаружено, что увеличение положительного заряда молекулы РНКазы Sa повышает ее цитотоксичность. Показано, что цитотоксичный мутант РНКазы Sa, в котором пять остатков дикарбоновых кислот заменены на остатки лизина, проявляет специфичность к фибробластам, экспрессирующим онкоген *ras*. Установлено, что клетки, экспрессирующие K_{Ca} -каналы, существенно менее чувствительны к цитотоксичным микробным РНКазам по сравнению с клетками, лишенными этих каналов. Результаты, полученные в работе, показывают, что цитотоксичность РНКаз в значительной степени определяется положительным зарядом их молекул. Избирательная токсичность РНКаз по отношению к раковым клеткам является важным параметром их использования в онкотерапии, поэтому конструирование РНКаз с увеличенным положительным зарядом может привести к созданию эффективных терапевтических средств.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на международной школе по биофизике "From molecular genetics to structural biology", (Grieste, Италия, 1-12 октября 2001), на пятой, шестой и седьмой международных Энгельгардтовских конференциях по молекулярной биологии (Москва, 21-26 июня 2001; Санкт-Петербург – Москва, 29 июня – 5 июля 2003; Суздаль, 28 ноября – 2 декабря 2004), на шестой международной конференции по рибонуклеазам (Bath, Великобритания, 19-23 июня 2002), на международной конференции "Advances in Molecular Cell Biology" (Москва, 17-18 июня 2004).

Публикации. Основной материал диссертационной работы нашел отражение в 11 печатных работах. Из них шесть работ опубликовано в зарубежных журналах, одна в отечественном журнале, одна в сборнике трудов конференции и три в сборниках тезисов докладов научных конференций.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 108 страницах и включает в себя 17 таблиц и 30 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы содержит 160 ссылок.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Структурно-функциональный анализ активного центра РНКазы *Streptomyces aureofaciens* (РНКазы Sa)

Роль аминокислотных остатков Glu54, Arg65 и His85 РНКазы Sa в катализе была постулирована на основании сравнения аминокислотных последовательностей и кристаллических структур ряда гуанил-специфичных микробных РНКаз (Sevcik et al., 1990). В соответствии с данными рентгеноструктурного анализа, во всех комплексах РНКазы Sa с нуклеотидами гуаниновое основание фиксируется примерно одинаково за счет образования сети водородных связей между гетероатомами основания и пептидными группами остатков Gln38, Asp39 и Arg40 и боковой цепью остатка Glu41 (рис 1). Остатки Glu54, Arg65 и His85 локализируются вблизи сахарофосфатного фрагмента нуклеотида. Мы ставили своей целью изучить функциональную роль каталитических остатков. Кроме того, поскольку для реализации гуаниновой специфичности РНКазы Sa достаточно образования водородных связей между белком и кето-группой гуанинового основания, возник вопрос о роли остатков Gln38 и Glu41 в связывании гуанинового основания субстрата. В число исследуемых был также включен остаток Glu74, замена которого на остаток лизина, скорее всего, является причиной снижения ферментативной активности мутанта РНКазы Sa с обращенным зарядом. Для того чтобы оценить вклад остатков Gln38, Glu41, Glu54, Arg65, Glu74 и His85 в каталитическую активность РНКазы Sa, нами было изучено влияние замен, элиминирующих возможную функцию этих остатков, на кинетические параметры ферментативной реакции. В связи с тем, что субстраты РНКаз являются полианионами, было также исследовано влияние изменения общего заряда молекулы РНКазы Sa на ее ферментативную активность.

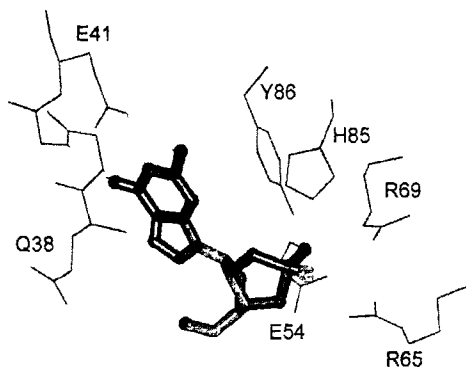


Рис. 1. Активный центр РНКазы Sa в комплексе с *exo* 2',3'-циклофосфотиоагом гуанозина. Возможные водородные связи обозначены пунктирными линиями (PDB идентификатор для структуры комплекса РНКазы Sa с указанным нуклеотидом 1RSN)

1.1. Роль остатков Gln38 и Glu41 в связывании субстрата

Результаты измерений кинетических параметров характеризующих реакцию гидролиза poly(I) РНКазой Sa и ее мутантами, представлены в табл 1. Активность мутанта Gln38Ala, выражаемая как отношение k_{cat}/K_M , в 13 раз ниже активности нативного фермента. По данным рентгеноструктурного анализа, амидная группа остатка Gln38 в комплексах РНКазы Sa с нуклеотидами связана водородной связью с N7 атомом гуанинового основания. Боковая цепь остатка Gln38 в нативном ферменте не образует водородных связей с другими белковыми группами и экспонирована в растворитель. При замене остатка Gln38 на остаток аланина из-за гидрофобных взаимодействий боковой цепи аланина с белковым окружением наиболее вероятно изменяется ориентация пептидной NII-группы относительно атома N7 гуанинового основания. В этом случае изменяется расположение сахарофосфатной группы субстрата относительно каталитических групп фермента, что и приводит к наблюдаемому снижению активности мутанта Glu38Ala РНКазы Sa. Таким образом, остаток Glu38 поддерживает наиболее эффективную для катализа ориентацию рибозного фрагмента субстрата.

Таблица 1. Кинетические параметры реакции гидролиза poly(I) и GpU РНКазой Sa и ее мутантами при 25°C и pH 6,5

РНКазы Sa	Субстрат	k_{cat}, c^{-1}	$K_M \times 10^4, M$	$k_{cat}/K_M \times 10^{-4}, M^{-1}c^{-1}$
Дикий тип	Poly(I)	178±10	1,51±0,15	117,9
	GpU	1,9±0,1	5,5±0,3	0,35
Gln38Ala	Poly(I)	23±2	2,5±0,2	9,2
Glu41Lys	Poly(I)	173±11	1,6±0,2	108
	GpU	1,8±0,1	10,0±0,5	0,18
Glu54Gln	Poly(I)	0,50±0,05	3,1±0,3	0,16
Arg65Ala	Poly(I)	0,21±0,03	2,0±0,2	0,11
Glu74Lys	Poly(I)	34±4	1,7±0,2	20
	GpU	0,50±0,05	5,7±0,3	0,09
His85Gln ^a	Poly(I)	-	-	<0,007

^a Активность не наблюдалась при концентрации фермента в растворе до $1 \cdot 10^{-6} M$, что превышает рабочую концентрацию фермента дикого типа в 1000 раз.

Согласно данным рентгеноструктурного анализа, в кристалле карбоксильная группа боковой цепи остатка Glu41 участвует в связывании основания субстрата, образуя водородную связь с атомом N1 гуанозина. Однако, мы обнаружили, что мутация Glu41Lys практически не влияет на кинетические характеристики РНКазы Sa (табл. 1). Поскольку карбоксильная группа остатка Glu41 является акцентором NH-протона, а аминогруппа остатка лизина может выступать только в качестве донора протона, то остаток лизина не может участвовать в связывании гуанинового основания субстрата. Поэтому неизменность кинетических параметров в случае мутации Glu41Lys означает, что в растворе, в отличие от кристалла, остаток Glu41 не участвует в связывании субстрата. Можно было предположить, что остаток лизина способен связываться с фосфатными группами полианионного субстрата, и это компенсирует отсутствие взаимодействий с остатком Glu41. Для проверки этого мы провели сравнение активностей мутанта Glu41Lys и РНКазы Sa дикого типа, используя в качестве субстрата динуклеозидфосфат GpU. При использовании этого субстрата активность мутанта Glu41Lys была только в два раза ниже, чем активность РНКазы Sa дикого типа (табл. 1). Это показывает, что взаимодействие остатка Lys41 с poly(I) не может определять высокую активность мутанта Glu41Lys на полимерном субстрате. Таким образом, очевидно, что остаток Glu41 РНКазы Sa не участвует в связывании субстрата. Этим РНКазы Sa отличается от других гуаниловых РНКаз, замена в которых остатка, гомологичного остатку Glu41 в РНКазе Sa, приводила к уменьшению активности в 300-600 раз. Можно заключить, что гуаниловая специфичность РНКазы Sa реализуется за счет образования водородной связи между белком и O6 атомом гуанинового основания.

1.2. Функциональная роль остатков Glu54, Arg65, His85 и Glu74

Замены остатков Glu54, Arg65, и His85, элиминирующие их возможные каталитические функции, приводят к резкому снижению активности РНКазы Sa (табл. 1). Уменьшение активности РНКазы Sa на три порядка величины при замене остатка Glu54 остатком глутамина позволяет считать, что этот остаток является каталитическим и выступает в роли общего основания в каталитическом механизме фермента. В случае замены His85Gln каталитическая активность мутанта практически отсутствовала (табл. 1). Это согласуется с тем, что имидазольное кольцо остатка His85 в протонированной форме играет роль общей кислоты в механизме действия РНКазы Sa. Замена остатка Arg65 на остаток аланина снижала скорость ферментативной

реакции на три порядка и практически не влияла на величину K_M . Это соответствует ожидаемому уменьшению молекулярной каталитической константы при элиминировании функции этого остатка в структуре РНКазы, которая состоит в облегчении образования переходного состояния субстрата во время ферментативной реакции.

Принятый механизм действия циклизирующих РНКаз предполагает, что катализируемая ферментом реакция трансэтерификации заключается в нуклеофильном замещении уходящей группы при атоме фосфора на 2' атом кислорода рибозы. Реакция протекает через образование промежуточного пентаковалентного состояния атома фосфора. В случае реализации этой реакции под действием РНКазы Sa можно считать, что боковая цепь остатка Glu54 акцептирует протон атакующей фосфат 2'ОН-группы рибозы, а имидазольное кольцо остатка His85 в протонированной форме является донором протона уходящей 5'О-группы. Положительный заряд боковой цепи остатка Arg65 снижает энергию образования переходного пентаковалентного состояния расщепляемой фосфатной группы. Образование переходного состояния сопровождается большими изменениями в геометрии фосфатной группы, так ее геометрия изменяется от тетраэдрической в основном состоянии до геометрии тригональной бипирамиды в переходном состоянии. В пентаковалентном состоянии на одном из экваториальных атомов кислорода появляется второй отрицательный заряд. Нейтрализация этого второго отрицательного заряда положительным зарядом одного из остатков белка уменьшает свободную энергию переходного состояния на величину энергии их электростатического взаимодействия.

Остаток Glu74 удален более чем на 15 Å от активного центра РНКазы Sa. Несмотря на это, его замена на остаток лизина приводит к шестикратному снижению активности фермента на poly(I) и к четырехкратному снижению активности на GrpU, в основном из-за уменьшения величины k_{cat} (табл. 1). Возможной причиной уменьшения величины k_{cat} для мутанта Glu74Lys могло быть изменение значений рК групп, участвующих в катализе. Для проверки этого предположения была исследована зависимость параметров k_{cat} и K_M от pH для реакции гидролиза poly(I) ферментом дикого типа и мутантом Glu74Lys (рис. 2).

Константы ионизации ионогенных групп в свободном состоянии фермента и субстрата приведены в табл. 2. Наиболее вероятно, что группы с рК 5,7 и 7,0 соответствуют остаткам Glu54 и His85 фермента. Аминокислотный остаток с pK_A^0 может соответствовать некоторому остатку дикарбоновой кислоты, ионизация которого

влияет на pK остатка Glu54 и/или His85. Группа с pK_D^0 , по-видимому, относится к остатку His53, поскольку найденное здесь значение pK_D^0 близко к pK остатка His53, измеренному методом ЯМР (Huyghues-Despointes et al, 2003).

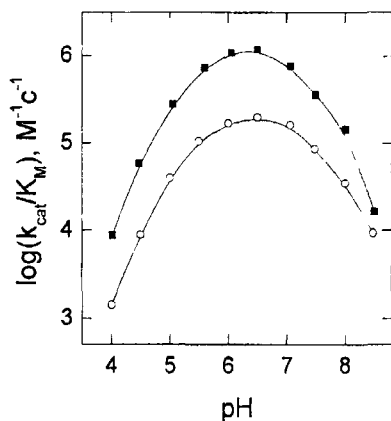


Рис. 2. Зависимость $\log(k_{cat}/K_M)$ от pH для реакции гидролиза poly(I) РНКазой Sa (■) и ее мутантом Glu74Lys (○). Измерения проводились при 25°C в буфере, содержащем 0,05 М Tris-HCl, 0,1 М NaCl и 0,05 М ацетата натрия.

Таблица 2. Кинетические параметры и константы ионизации ионогенных групп РНКазы Sa и ее Glu74Lys мутанта, определяющих pH-зависимость k_{cat}/K_M реакции гидролиза poly(I) (рис. 2)^a

Параметр	РНКазы Sa	
	Дикая тип	Glu74Lys
$\bar{k}_{cat}, c^{-1}$	207±12	38,1±1,5
$\bar{k}_{cat} / \bar{K}_M 10^5, M^{-1} c^{-1}$	17,0±1,5	2,7±0,2
pK_A^0	4,39±0,23	4,46±0,16
pK_B^0	5,68±0,09	5,66±0,06
pK_C^0	7,02±0,08	7,22±0,06
pK_D^0	8,35±0,24	8,78±0,26

^a $\bar{k}_{cat}$ и $\bar{K}_M$ – независимые от pH величины числа оборотов фермента и константы Михаэлиса, соответственно; K_A^0 , K_B^0 , K_C^0 и K_D^0 – макроскопические константы кислотной диссоциации, характеризующие группы на свободном ферменте/субстрате, pK – десятичный логарифм константы ионизации K .

Из таблицы 2 видно, что pK ионогенных групп практически не изменяются после замещения остатка Glu74 в РНКазе Sa на остаток лизина. Это свидетельствует о том, что изменение активности мутанта не связано с изменением степени ионизации.

каталитических групп белка. Поэтому можно полагать, что наблюдаемое изменение активности РНКазы Sa вследствие снижения k_{cat} после замены остатка Glu74 лизином обусловлено изменениями ориентации каталитических групп фермента относительно реакционных групп субстрата как результат структурных изменений, обусловленных мутацией Glu74Lys.

1.3. Влияние изменения общего заряда молекулы РНКазы Sa на ее ферментативную активность

РНКаза Sa дикого типа является кислым белком ($pI=3,5$), не содержащим остатков лизина и имеющим общий заряд молекулы -7 при pH 7. Заменяя остатки аспарагиновой и глутаминовой кислот на поверхности РНКазы Sa на остатки лизина мы получили мутанты 3K (Asp1Lys, Asp17Lys, Glu41Lys) с общим зарядом -1 ($pI=6,4$) при pH 7 и 5K (3K + Asp25Lys, Glu74Lys) с общим зарядом $+3$ ($pI=10,2$) при pH 7. Таким образом, путем обращения знака пяти зарядов на РНКазе Sa, мы превратили один из самых кислых белков в один из самых основных. Все заменяемые остатки хорошо экспонированы в растворитель и не образуют ионных пар или водородных связей (рис. 3).

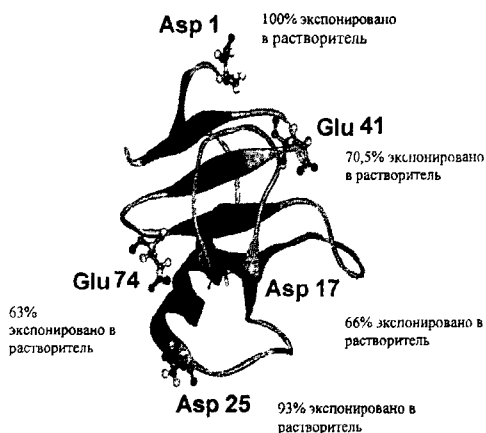


Рис 3. Третьичная структура РНКазы Sa. Аминокислотные остатки, замененные на остатки лизина, представлены в виде шариков и стержней. Около остатков указаны величины экспонированности их боковых цепей в растворитель (PDB идентификатор для структуры РНКазы Sa 1RGG).

Поскольку субстрат рибонуклеаз – РНК – является полианионом, то изменение общего заряда молекулы фермента может влиять на его сродство к субстрату, т.е. на величину K_M . Чтобы выяснить, как изменение общего заряда влияет на скорость ферментативной реакции, мы измеряли кинетические параметры реакции гидролиза poly(I) мутантами РНКазы Sa 3K и 5K в диапазоне pI от 4 до 8,5. Это позволило нам

определить pH-независимые значения кинетических параметров для этих белков (табл. 3).

Таблица 3. Независимые от pH кинетические параметры реакции гидролиза poly(I) РНКазой Sa и ее 3К и 5К мутантами

РНКазы Sa	$\bar{K}_M \times 10^5, M$	$\bar{k}_{cat}, c^{-1}$	$\bar{k}_{cat} / \bar{K}_M \times 10^5, M^{-1} c^{-1}$
Дикий тип	12±1	207±12	17,0±1,5
3К	9,4±0,8	139±9	14,8±2,9
5К	6,7±0,5	12,7±1,3	1,9±0,6

Из табл 3 видно, что активность мутанта 3К, выражаемая как отношение $\bar{k}_{cat} / \bar{K}_M$, мало отличается по величине от активности фермента дикого типа. Величина $\bar{k}_{cat} / \bar{K}_M$ для мутанта 5К РНКазы Sa по отношению к соответствующей величине для фермента дикого типа уменьшается в 9 раз. Замена в РНКазе Sa остатка Glu74 на лизин приводит к снижению активности фермента в 6,3 раза за счет структурных изменений в молекуле (табл. 2). Полагая, что в мутанте 5К замена Glu74Lys также приводит к снижению активности в 6,3 раза, можно считать, что уменьшение активности 5К мутанта, связанное только с изменением заряда молекулы белка, составляет 1,4 раза. Вместе с этим, для мутантов 3К и 5К наблюдается понижение величин как $\bar{K}_M$, так и $\bar{k}_{cat}$ по сравнению с соответствующими значениями для РНКазы Sa, что является характерным признаком непродуктивного связывания субстрата. Таким образом, можно заключить, что катионизация РНКазы Sa не влияет на каталитическую активность фермента, но сопровождается возрастанием непродуктивного связывания субстрата.

2. Конструирование ингибиторов РНКазы Sa и родственных ферментов

РНКазы Sa и биназа катализируют расщепление РНК без участия ионов металлов в качестве кофакторов. Анализ кристаллических структур этих РНКаз показывает, что остатки Glu54 и His85 в РНКазе Sa и Glu73 и His102 в биназе в каталитическом процессе расщепления РНК действуют как общая кислота и общее основание. Карбоксильная и имидазольная группы боковых цепей этих остатков могли бы служить лигандами для иона Zn^{2+} при наличии определенного заместителя в 3'-положении рибозы, связанного в активном центре нуклеотида.

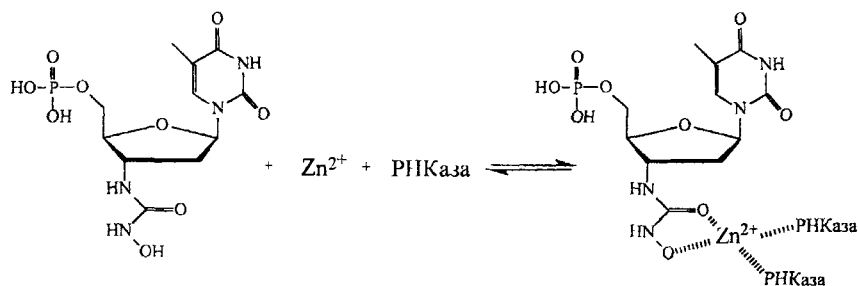


Схема 1. Предполагаемая схема цинк(II)-зависимого ингибирования рибонуклеазы 3'-N-гидроксиуреидо-3'-дезокситимидин 5'-фосфатом.

В качестве такого заместителя мы предложили использовать N-гидроксимочевину. Соответственно, в качестве ингибитора РНКаз, использующего хелатированный ион цинка, был предложен 3'-N-гидроксиуреидо-3'-дезокситимидин 5'-фосфат (pT-3'-N-гидроксимочевина). Выбор этого соединения был основан на следующих соображениях. Гидроксамовые кислоты хорошо связывают ионы Zn^{2+} . Нуклеозид как аналог субстрата должен специфично связываться с ферментом. Использование дезоксиинуклеозида позволяет иону Zn^{2+} образовывать две координационные связи с группами бета (схема 1).

Константы ингибирования активности РНКазы Sa и биназы pT-3'-N-гидроксимочевинной в отсутствие в растворе ионов цинка равны 0,95 и 1,30 мМ, соответственно. При отсутствии в растворе pT-3'-N-гидроксимочевинной ингибирования активности РНКазы Sa и биназы ионами Zn^{2+} не наблюдалось вплоть до концентрации ионов цинка $5 \cdot 10^{-3}$ М.

На рис. 4 показана зависимость скорости гидролиза poly(U) РНКазой Sa от концентрации субстрата в присутствии в растворе различных концентраций pT-3'-N-гидроксимочевинной и ионов Zn^{2+} (зависимость для биназы выглядит сходным образом). При увеличении концентрации ионов цинка в растворе pT-3'-N-гидроксимочевинной более эффективно ингибирует обе РНКазы. Характер ингибирования РНКаз - конкурентный. Для расчета констант ингибирования биназы и РНКазы Sa в присутствии ионов Zn^{2+} использовали уравнение (1), соответствующее схеме 2:

$$v = \frac{[E_0][S]k_{cat}}{[S] + K_M^{obs}}, \quad (1)$$

где $K_M^{obs} = K_M(1 + \frac{[I]}{K_i} + \frac{[I][Zn^{2+}]}{K_i})$; $[E_0]$, $[S]$, $[I]$ и $[Zn^{2+}]$ – концентрации фермента, субстрата, ингибитора и ионов цинка в растворе, соответственно; $[IZn^{2+}]$ – концентрация комплекса ингибитора и цинка в растворе, $[EI]$ и $[EIZn^{2+}]$ – концентрации комплекса фермента с ингибитором и тройного комплекса фермент-ингибитор-цинк; k_{cat} – константа скорости реакции гидролиза poly(I) РНКазой; K_M – константа Михаэлиса реакции гидролиза poly(I) РНКазой; K_i' – константа ингибирования активности фермента pT-3'-N-гидроксимочевьиной; K_i – константа ингибирования активности фермента комплексом IZn^{2+} , K_d – константа диссоциации комплекса IZn^{2+}

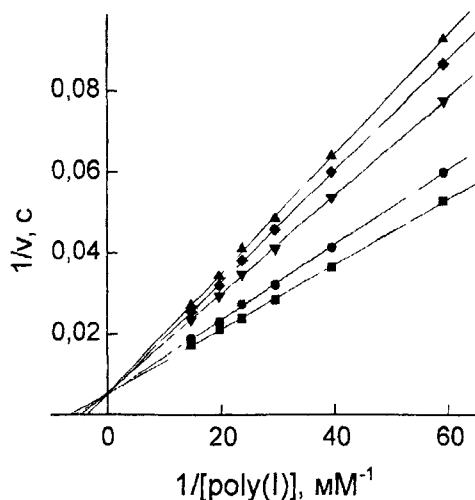


Рис. 4. График в координатах Лайнуивера-Берка для ингибирования РНКазы Sa pT-3'-N-гидроксимочевьиной в присутствии Zn^{2+} . Исследования проводились при 25°C, pH 6,2. ■, $[I]=0$, $[Zn^{2+}]=0$; ●, $[I]=1 \cdot 10^{-4}$ М, $[Zn^{2+}]=1$ мМ; ▲, $[I]=4 \cdot 10^{-4}$ М, $[Zn^{2+}]=1$ мМ; ▼, $[I]=1 \cdot 10^{-4}$ М, $[Zn^{2+}]=5$ мМ; ◆, $[I]=3 \cdot 10^{-4}$ М, $[Zn^{2+}]=5$ мМ.

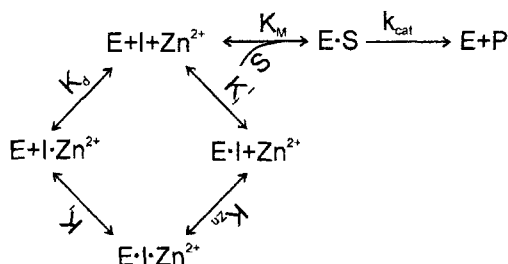


Схема 2. Опосредованное ионом Zn^{2+} ингибирование РНКазы pT-3'-N-гидроксимочевьиной

Схема 2 не учитывает образование комплекса между ингибитором и ионами Zn^{2+} , когда их ассоциация осуществляется за счет взаимодействия ионов Zn^{2+} с фосфатной группой ингибитора. Для расчета констант ингибирования по уравнению (1) использовали в качестве величин $[I]$ и $[Zn^{2+}]$ значения $[I_0]$ и $[Zn_0^{2+}]$, так как концентрация фермента $[E_0]$ была много меньше величин $[I_0]$ и $[Zn_0^{2+}]$. Концентрацию комплекса $I \cdot Zn^{2+}$ рассчитывали, используя оценочное значение K_d , равное 6,3 мМ.

Величина K_i для РНКазы Sa составляет около 0,12 мМ, что примерно на порядок ниже константы ингибирования без цинка. В случае биназы ингибирования рТ-3'-N-гидроксимочевинной в присутствии ионов цинка улучшается более чем в 25 раз, значение K_i составляет 0,05 мМ.

РНКазы Sa представляет собою кислую рибонуклеазу с изоэлектрической точкой $pI \sim 3,5$. При pH 6,2, при котором измерялись константы ингибирования, суммарный заряд молекулы фермента отрицательный. Биназа, напротив, является щелочной рибонуклеазой с $pI \sim 9,6$ и имеет положительный суммарный заряд при pH 6,2. Однако, константы ингибирования РНКазы Sa комплексом рТ-3'-N-гидроксимочевинны с ионом Zn^{2+} близки к соответствующим значениям для ингибирования биназы и составляют 0,05-0,10 мМ. Это показывает, что связывание ионов цинка с РНКазой в присутствии нуклеотидов с N-гидроксимочевинной в 3'-положении рибозы определяется структурой их активных центров, а не общим зарядом молекулы белка.

Схема 1 предполагает, что связывание иона цинка реализуется при участии в качестве лигандов двух групп белка. В случае РНКазы Sa ими должны быть карбоксильная группа боковой цепи остатка Glu54 и имидазольное кольцо остатка His85. Для подтверждения способа связывания ионов цинка в активном центре РНКазы мы исследовали ингибирование рТ-3'-N-гидроксимочевинной в присутствии ионов Zn^{2+} активности мутанта РНКазы Sa, в котором остаток Glu54 заменен на остаток глутамина.

В случае Glu54Gln мутанта РНКазы Sa константа ингибирования комплексом $I \cdot Zn^{2+}$ примерно на порядок хуже, чем для РНКазы Sa, и практически совпадает по величине с константой ингибирования рТ-3'-N-гидроксимочевинной в отсутствие цинка ($K_i^1 = 1,15$ мМ). Это свидетельствует о значительном снижении сродства комплекса ионов цинка с рТ-3'-N-гидроксимочевинной к активному центру РНКазы Sa при замене остатка Glu54 на остаток глутамина.

Таким образом, уменьшение связывания ионов цинка в присутствии рТ-3'-N-гидроксимочевины в активном центре мутанта Glu54Gln по сравнению с нативной РНКазой Sa подтверждает реализацию механизма хелатирования ионов цинка, представленного на схеме 1.

Сходство структур активных центров РНКаз позволяет считать, что производные нуклеотидов с N-гидроксимочевиной в 3'-положении рибозы являются универсальными ингибиторами РНКаз, эффективность действия которых усиливается в присутствии двухвалентных ионов цинка.

3. Изучение вклада остатков активного центра РНКазы Sa в конформационную стабильность фермента

Известно, что активный центр является местом инициации разворачивания белковой глобулы при денатурации, и замена аминокислотных остатков в нем может привести к изменению термостабильности молекулы (Tsou, 1993). Гипотеза о балансе между стабильностью и функцией фермента была сформулирована в следующем виде: остатки белка, которые отвечают за каталитическую активность или за связывание лиганда, не оптимальны для его стабильности. В соответствии с этой гипотезой, замена функционально важных остатков, которая уменьшает ферментативную активность, может приводить к увеличению стабильности белка. Такая корреляция между стабильностью и активностью была обнаружена, например, при заменах некоторых остатков в активных центрах лизоцима фага T4 и барназы.

Мы ставили задачу проверки этой гипотезы на примере РНКазы Sa. Для выявления остатков в активном центре РНКазы Sa, не являющихся оптимальными для стабильности, были измерены термодинамические параметры тепловой денатурации мутантов РНКазы Sa, содержащих замены остатков в активном центре – Gln38Ala, Glu41Lys, Glu54Gln, Arg65Ala и His85Gln, а также мутанта Glu74Lys.

На рис. 5 приведены температурные зависимости парциальной теплоемкости РНКазы Sa и ее мутантов, а в табл. 4 суммированы значения параметров тепловой денатурации этих ферментов. Замены Gln38Ala и Glu74Lys, приводящие к уменьшению активности РНКазы Sa (см. табл. 1), сопровождаются повышением ее температуры плавления на 3,5°C и 3,1°C, соответственно. Согласно данным рентгеноструктурного анализа, боковая цепь остатка Gln38 экспонирована в растворитель и не образует водородных связей. Замена Gln38 на остаток аланина приводит к возникновению

гидрофобных взаимодействий бокового радикала с белковым окружением, что определяет повышение температуры плавления мутанта Glu38Lys.

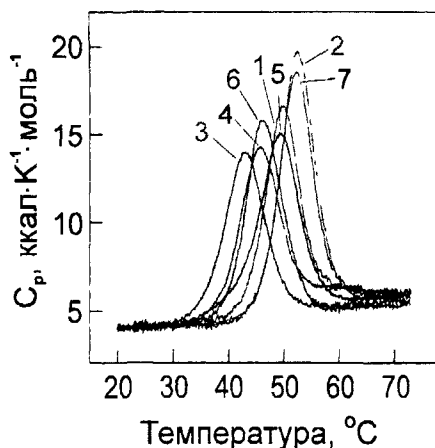


Рис. 5. Зависимость парциальной молярной теплоемкости РНКазы Sa (1) и ее мутантов Gln38Ala (2), Glu54Gln (3), Arg65Ala (4), His85Gln (5), Glu41Lys (6) и Glu74Lys (7) от температуры при pH 7,0

Боковая цепь остатка Glu74 в ферменте дикого типа также не имеет контактов с белковым окружением. Однако боковая цепь замещающего Glu74 лизина может образовывать солевой мостик с боковой цепью остатка Glu78, что, наиболее вероятно, и определяет заметное возрастание стабильности мутанта Glu74Lys. Температура плавления мутанта Glu41Lys по отношению к РНКазе Sa дикого типа понижается на 2,5°C. Понижение температуры плавления может

быть обусловлено электростатическим отталкиванием положительно заряженных боковых цепей замещающего Glu41 остатка лизина и остатка Arg40

Замены в РНКазе Sa каталитических остатков Glu54 на глутамин и Arg65 на аланин также сопровождаются понижением температуры и энтальпии плавления белка (табл. 4). Остатки Glu54 и Arg65 расположены во внутренней области молекулы белка и образуют между собой солевой мостик. Поэтому замены этих остатков, элиминирующие их электростатическое взаимодействие, приводят к дестабилизации РНКазы Sa.

Замена каталитического остатка His85 на глутамин существенно не меняет температуру и энтальпию плавления РНКазы Sa (табл. 4). Отсутствие влияния этой замены на термодинамические параметры плавления РНКазы Sa указывает на экспонированность боковой цепи остатка His85 в растворитель.

Таблица 4. Параметры тепловой денатурации РНКазы Sa и ее мутантов при pH 7,0

РНКазы Sa	T _d (°C)	ΔT_d^a (°C)	ΔH_{cal} (ккал/моль)	ΔH_{eff} (ккал/моль)	R ^b
Дикий тип	49,0	-	92	103	0,89
Gln38Ala	52,5	3,5	109	110	0,99
Glu41Lys	46,5	-2,5	90	100	0,90
Glu54Gln	43,1	-5,9	81	87	0,93
Arg65Ala	45,6	-3,4	81	90	0,90
Glu74Lys	52,1	3,1	101	113	0,89
His85Gln	49,1	0,1	90	89	1,01

^a $\Delta T_d = T_d$ (мутант) – T_d (дикий тип).

^b $R = \Delta H_{cal}/\Delta H_{eff}$

Таким образом, обнаружено, что среди аминокислотных остатков, определяющих каталитическую активность РНКазы Sa, два остатка не являются оптимальными для стабильности. Это остаток Glu38, участвующий в связывании субстрата, и остаток Glu74. С другой стороны, замена каталитических остатков Glu54 и Arg65 в РНКазе Sa приводит к понижению термостабильности белка, а замена каталитического остатка His85 не влияет на его температуру плавления. Из этого следует, что гипотеза, связывающая вклад отдельных остатков в стабильность и функцию белка, не является абсолютной. Остатки, входящие в состав активного центра, можно разделить на участвующие в каталитическом акте, в связывании субстрата и/или в структурной организации активного центра. Очевидно, что связывающие субстрат остатки не полностью комплементарны белковому окружению. Вследствие этого, можно ожидать, что замена таких остатков, элиминирующая их способность связывать лиганд, приведет к повышению стабильности белка, что мы и наблюдали для мутанта Glu38Ala РНКазы Sa. Аналогичные результаты получены нами для белкового ингибитора барназы, барстара А. Замена в барстаре А функциональных аминокислотных остатков Asp35, Asp39 и Glu76, необходимых для образования комплекса с барназой, на остатки аланина приводит к существенному увеличению термостабильности белка, но ухудшает его связывание с барназой.

Для ряда других белков также были получены результаты, показывающие, что замены аминокислотных остатков, элиминирующие их функцию связывания субстрата или лиганда, приводят к повышению стабильности белка.

Таким образом, можно заключить, что аминокислотные остатки в молекуле белка, участвующие в связывании лиганда, не являются оптимальными для стабильности глобулы.

4. Цитотоксические свойства РНКазы Sa, ее близких гомологов и мутантов с обращенным зарядом

Некоторые РНКазы токсичны для клеток млекопитающих, особенно для опухолевых клосток. Для проявления цитотоксического эффекта рибонуклеаза должна проникнуть в клетку-мишень и разрушить РНК. Токсичность РНКаз вызывается как нарушением регуляторной роли расщепляемого субстрата, так и регуляторными эффектами появляющихся продуктов его гидролиза. К настоящему времени показано, что (1) каталитическая активность существенна, но недостаточна для возникновения токсичности; (2) возможность избежать действия цитозольного ингибитора РНКаз – одно из условий цитотоксичности РНКазы, (3) цитотоксичность коррелирует как с конформационной стабильностью, так и с устойчивостью к протеолизу. Другие стороны механизма индуцированной РНКазой цитотоксичности не ясны.

В нашей работе мы исследовали цитотоксические свойства РНКазы Sa и ее мутантов с обращенным зарядом 3K и 5K, а также природных гомологов РНКазы Sa, РНКаз Sa2 и Sa3. Для выявления детерминант, обуславливающих цитотоксичность РНКаз, мы изучали и сравнивали молекулярные характеристики РНКаз, проявляющих различную цитотоксичность по отношению к клеткам млекопитающих.

4.1. Изменение общего заряда молекулы с отрицательного на положительный делает РНКазу Sa цитотоксичной

Интернализация является, вероятно, основной стадией, лимитирующей цитотоксичность РНКаз. Проникновению положительно заряженных молекул белка в клетку может способствовать связывание с отрицательно заряженными группами на внешней поверхности цитоплазматической мембраны. Известно, что неопластические клетки, в отличие от нетрансформированных аналогов, содержат на внешней поверхности значительно больше кислых фосфолипидов и гликопротеинов. Поэтому реальным путем усиления токсичности РНКаз по отношению к опухолевым клеткам является конструирование катионных мутантов.

На рис 6 представлены результаты токсического действия РНКазы Sa и ее мутантов 3К и 5К на клетки фибробластов NIH3T3 и фибробластов, трансформированных онкогеном *v-ras*. Выживаемость клеток оценивалась с

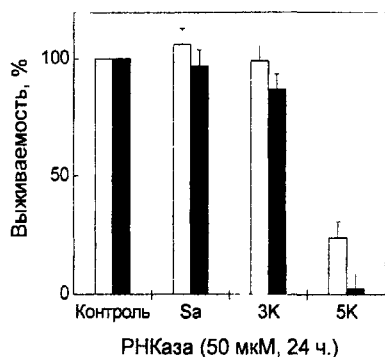


Рис. 6. Выживаемость нормальных фибробластов NIH3T3 (белые столбики) и фибробластов NIH3T3, трансформированных онкогеном *v-ras* (черные столбики), обработанных в течение 24 часов РНКазой Sa и ее 3К и 5К мутантами в концентрации 50 мкМ. Величины выражены в процентах от выживаемости контрольных клеток, выращенных в отсутствие РНКазы.

помощью WST-реактанта, позволяющего детектировать активность митохондриальных дегидрогеназ в цветной реакции. Из приведенных на рис. 6 данных видно, что 5К мутант РНКазы Sa значительно более токсичен для клеточных линий фибробластов, чем РНКазы Sa или мутант 3К. При концентрации 50 мкМ мутант 5К снижал жизнеспособность фибробластов NIH3T3 на 76%. В тех же условиях жизнеспособность фибробластов, трансформированных онкогеном *v-ras*, снижалась на 97%. Это говорит о том, что последние более чувствительны к действию мутанта 5К. Вариант 3К оказывал слабое токсическое действие на фибробласты, трансформированные онкогеном *v-ras*, и не влиял на жизнеспособность фибробластов NIH3T3. РНКазы Sa была нетоксична для обеих клеточных линий фибробластов (рис. 6).

Избирательность токсического действия по отношению к нормальным и опухолевым клеткам – важнейший параметр терапевтического использования РНКаз. Мы показали, что фибробласты, трансформированные онкогеном *v-ras*, оказались более чувствительны к действию 5К варианта РНКазы Sa, чем нормальные фибробласты. Сходные результаты были получены для биназы и онконазы (Smith et al, 1999). Избирательное действие РНКаз на клетки, трансформированные онкогеном

v-ras указывает на ключевую роль медиатора Ras для цитотоксического ответа в фибробластах. Таким образом, мы показали, что клстки теплокровных, экспрессирующие онкоген *ras*, являются мишенями цитотоксичных РНКаз

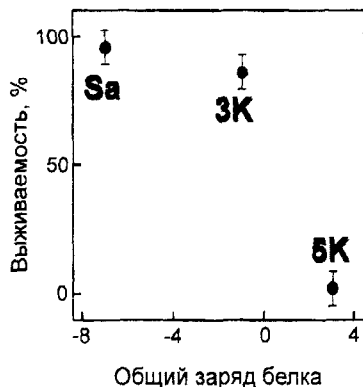


Рис. 7. Выживаемость фибробластов *v-ras*-N1H3T3, обработанных в течение 24 часов РНКазой Sa и ее 3K и 5K мутантами в концентрации 50 мкМ, в зависимости от общего заряда молекул ферментов при pH 7,0.

Наши результаты показывают, что цитотоксические свойства РНКазы Sa коррелируют с изменением общего заряда молекулы с отрицательного на положительный (рис 7). Катионизация позволяет РНКазе 5K более прочно связываться с отрицательно заряженными гликолипидами и гликопротеинами на внешней поверхности цитоплазматической мембраны по сравнению с РНКазой Sa и 3K. Это стимулирует проникновение фермента в клетку. Наши результаты согласуются с данными Futami et al (2001), показывающими, что цитотоксичность и способность связываться с клетками химически модифицированных РНКазы А и РНКазы 1 коррелируют с их общим положительным зарядом. Таким образом, получение мутантных рибонуклеаз с увеличенным положительным зарядом может повысить их цитотоксичность.

4.2. Роль активируемых кальцием калиевых (K_{Ca}) каналов в преодолении цитотоксичности, индуцированной РНКазой

Функциональная активность ионных каналов отличается в нормальных и трансформированных клетках. “Больные” клетки характеризуются дисфункцией ионных каналов: это либо нерегулируемый ток ионов в опухолевых клетках, либо блокирование ионных каналов в некротических клетках. Известно, что K_{Ca} -каналы в

фибробластах активируются митогенами, тогда как в клетках, трансформированных геном *ras*, они постоянно активны. Важно установить, какую роль играют ионные каналы в проявляемой РНКазой цитотоксичности. Мы изучили действие 5К и 3К мутантов РНКазы Sa, а также самой РНКазы Sa и ее близких гомологов РНКаз Sa2 и Sa3, на клетки эмбриональной почки человека (НЕК), в норме не содержащие K_{Ca} -каналов, и клетки НЕК, трансфицированные вектором, несущим ген K_{Ca} -каналов (НЕКhSK4). Разница в цитотоксической реакции данной пары линий клеток выявит роль K_{Ca} -каналов в механизме токсичности РНКаз.

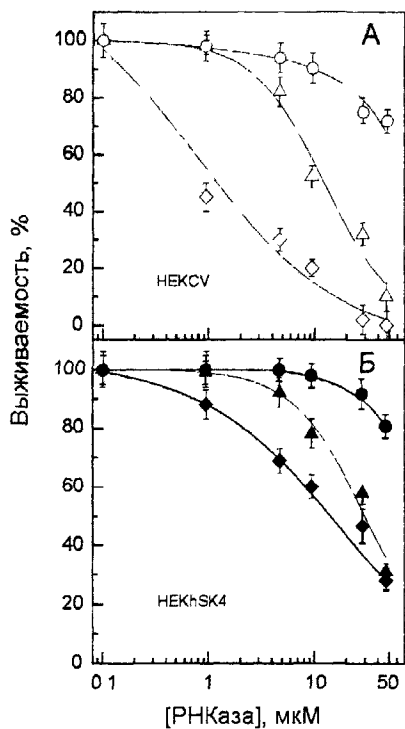


Рис. 8. Выживаемость клеток HEKCV (А) и HEKhsK4 (Б), обработанных в течение 72 часов при 37°C РНКазой Sa (кружочки) и ее мутантами 3К (треугольники) и 5К (ромбы). Величины выражены в процентах от выживаемости контрольных клеток, выращенных в отсутствие РНКазы.

Практически все клетки HEKCV (контрольные клетки НЕК, трансфицированные вектором не несущим ген K_{Ca} -каналов) погибают, если концентрация мутанта 5К РНКазы Sa в растворе больше 30 мкМ (рис. 8А). В то же время жизнеспособность клеток HEKhsK4, экспрессирующих K_{Ca} -каналы, в присутствии 50 мкМ мутанта 5К уменьшается только на 70% (рис. 8Б). Для мутанта 5К коэффициент IC_{50} (концентрация РНКазы, при которой погибает 50% клеток) составляет $1,2 \pm 0,3$ мкМ для клеток HEKCV, тогда как для клеток HEKhsK4 этот коэффициент почти в 12 раз выше (14 ± 3 мкМ). Это говорит о том, что клетки НЕК с K_{Ca} -каналами менее чувствительны к токсическому действию мутанта 5К РНКазы Sa.

РНКазы Sa нетоксична для клеток HEKhsK4 и HEKCV в концентрации ниже 50 мкМ. Значения IC_{50} для мутанта 3К

составляют 13 ± 2 мкМ для клеток HEKCV и 29 ± 5 мкМ для клеток HEKhSK4 РНКазы Sa2 в концентрации 50 мкМ слабо токсична, в ее присутствии выживаемость клеток HEKCV уменьшается приблизительно на 40%. В то же время, РНКазы Sa3 обладает значительной цитотоксичностью. Значения IC_{50} в случае РНКазы Sa3 составляют $3,7 \pm 0,6$ мкМ и 7 ± 1 мкМ для клеток HEKCV и HEKhSK4, соответственно

Поскольку клеточные линии HEKhSK4 и HEKCV различаются только наличием K_{Ca} -каналов, это позволяет определить их участие в процессе проявления цитотоксичности рибонуклеазами. Наши экспериментальные данные показывают существенно более низкую чувствительность к РНКазам клеток, экспрессирующих K_{Ca} -каналы, по сравнению с клетками, лишенными этих каналов. Таким образом, наличие функционально активных K_{Ca} -каналов связано с пониженной чувствительностью клеток к цитотоксичным микробным РНКазам. Результаты, полученные на клетках фибробластов, согласуются с этим выводом. Действительно, фибробласты NIH3T3 с хорошо регулируемыми K_{Ca} -каналами не чувствительны к мутанту 3K и менее чувствительны к высокотоксичному мутанту 5K по сравнению с трансформированными онкогеном *ras* фибробластами, содержащими разрегулированные K_{Ca} -каналы.

Эти данные говорят о том, что клетки без активности K_{Ca} -каналов или с разрегулированной активностью этих каналов не могут противодействовать токсическому действию РНКаз. Этим можно объяснить высокую почечную токсичность онкоказы, биназы и барназы и преобладающую чувствительность злокачественных клеток к цитотоксичным РНКазам

4.3. Положительный заряд является основной детерминантой цитотоксичности микробных РНКаз

Молекулярные характеристики исследованных РНКаз приведены в табл 5. РНКазы Sa не цитотоксичны для клеток эмбриональной почки человека. С другой стороны, катионный вариант 5K РНКазы Sa с замнами пяти остатков лизина на остатки аспарагиновой и глутаминовой аминокислот является одной из наиболее цитотоксичных прокариотических рибонуклеаз

Анализ данных табл 5 указывает на отсутствие корреляции между каталитической активностью или термостабильностью РНКаз и их цитотоксичностью. Идентичность трехмерных структур РНКазы Sa, Sa3 и мутанта 5K также не позволяет объяснить различия в их цитотоксичности

Таблица 5. Цитотоксичность РНКазы Sa, ее изозимов и мутантов в сравнении с молекулярными характеристиками РНКаз

РНКазы	Молекулярные характеристики РНКаз			IC ₅₀ ⁶ , мкМ	
	pI	T _d ^a (°C) при pH 7	Каталитическая активность при pH 7, %	HEKCV	HEKhSK4
Sa	3,5	47,2	100	не токсична	не токсична
Sa2	5,3	41,1	14	> 50	не определяли
3K	6,4	40,7	82	13±2	29±5
Sa3	7,2	47,2	13	3,7±0,6	7±1
5K	10,2	47,3	14	1,2±0,3	14±3

^a Температура денатурации.

⁶ Концентрация РНКазы, при которой погибает 50% клеток.

Из наших данных следует, что катионизация РНКазы является эффективной стратегией для придания ей цитотоксических свойств. Именно увеличение положительного заряда РНКазы Sa заметно повышает ее цитотоксичность (табл. 5). Наблюдается прямая корреляция между значением изоточки и величиной коэффициента цитотоксичности IC₅₀ на клетках HEK, лишенных K_{Ca}-каналов.

ВЫВОДЫ

- 1 Установлена функциональная роль остатков Gln38, Glu41, Glu54, Arg65 и His85, принадлежащих активному центру гуанилселецифичной РНКазы Sa, и определены вклады этих остатков в каталитическую активность фермента. Обнаружено, что в отличие от других гуанилселецифичных РНКаз специфичность РНКазы Sa реализуется без взаимодействия белка с иминогруппой гуанинового основания субстрата. Показано, что катионизация молекулы РНКазы Sa не приводит к существенным изменениям активности фермента
- 2 Предложен подход к созданию ингибиторов РНКаз на основе производных нуклеотидов, содержащих N-гидроксимочевину в 3'-положении рибозы. В присутствии ионов цинка связывание такого ингибитора в активном центре РНКазы Sa и биназы существенно возрастает за счет образования хелатных связей между ионом цинка, остатком гидроксимочевинны и каталитическими группами белка.
- 3 Установлено, что аминокислотные остатки, отвечающие за связывание лиганда, не оптимальны для стабильности белковой глобулы. Данное заключение основано на изучении термостабильности мутантов РНКазы Sa с заменами остатков в активном центре и мутантов внутриклеточного ингибитора РНКаз барстара с заменами в сайте связывания с РНКазой
- 4 Обнаружено, что повышение положительного заряда молекулы РНКазы Sa вызывает возрастание ее цитотоксичности. Показано, что преимущественной мишенью действия токсичного мутанта РНКазы Sa с обращенным зарядом являются клетки, экспрессирующие онкоген *ras*. Установлена существенно более низкая чувствительность к цитотоксичным РНКАзам клеток, экспрессирующих K_{Ca} -каналы, по сравнению с клетками, лишенными этих каналов

Список публикаций по теме диссертации

- 1 Ilinskaya O.N., Dreyer F., Mitkevich V.A., Shaw K.L., Pace C.N. and Makarov A.A. (2002) Changing the net charge from negative to positive makes ribonuclease Sa cytotoxic *Protein Sci*, 11, 2522-2525
2. Yakovlev G.I., Mitkevich V.A., Shaw K.L., Trevino S., Newsom S., Pace C.N. and Makarov A.A. (2003) Contribution of active site residues to the activity and thermal stability of ribonuclease Sa *Protein Sci*, 12, 2367-2373.
- 3 Mitkevich V.A., Schulga A.A., Ermolyuk Y.S., Lobachov V.A., Chekhov V.O., Yakovlev G.I., Hartley R.W., Pace C.N., Kirpichnikov M.P. and Makarov A.A. (2003) Thermodynamics of denaturation of complexes of barnase and binase with barstar *Biophys Chem*, 105, 383-390
4. Higgin J.J., Yakovlev G.I., Mitkevich V.A., Makarov A.A. and Raines R.T. (2003) Zinc-mediated inhibition of a ribonuclease by an N-hydroxyurea nucleotide *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 13, 409-412
5. Mitkevich V.A., Ilinskaya O.N., Dreyer F., Pace C.N. and Makarov A.A. (2004) How to create a cytotoxic ribonuclease? In *Advances in Molecular Cell Biology*. Moscow, Russia, 17-18 June, pp 137-148.
- 6 Ilinskaya O.N., Koschinski A., Mitkevich V.A., Repp H., Dreyer F., Pace C.N. and Makarov A.A. (2004) Cytotoxicity of RNases is increased by cationization and counteracted by K_{Ca} channels *Biochem Biophys Res Commun*, 314, 550-554
7. Makarov A.A., Yakovlev G.I., Mitkevich V.A., Higgin J.J. and Raines R.T. (2004) Zinc(II)-mediated inhibition of ribonuclease Sa by N-hydroxyurea nucleotide and its basis. *Biochem Biophys Res Commun*, 319, 152-156.
- 8 Корчуганов Д.С., Шульга А.А., Ермолюк Я.С., Митькевич В.А., Рейбарх М.Я., Нольде С.Б., Макаров А.А., Арсеньев А.С. и Кирпичников М.П. (2004) Мутация I87E препятствует димеризации барстара. *Биоорганическая химия*, 30, 638-644.
- 9 Mitkevich V.A., Ilinskaya O.N., Shaw K.L., Grimsley G.R., Dreyer F., Yakovlev G.I., Makarov A.A. and Pace C.N. (2002) The effect of net charge on the activity, stability, and cytotoxicity of ribonuclease Sa *Proceedings of the 6th International Conference on Ribonucleases* Bath, UK, 19-23 June, p.126.
- 10 Makarov A.A., Mitkevich V.A., Schulga A.A., Ermolyuk Y.S., Lobachov V.M., Yakovlev G.I., Hartley R.W., Pace C.N. and Kirpichnikov M.M. (2002) Stability of barnase and binase complexed with barstar mutants *Proceedings of the 6th International Conference on Ribonucleases*. Bath, UK, 19-23 June, p.37.
- 11 Yakovlev G.I., Mitkevich V.A., Shaw K.L., Trevino S., Newsom S., Pace C.N. and Makarov A.A. (2002) Contribution of active site residues to the enzyme activity and thermostability of ribonuclease Sa. *Proceedings of the 6th International Conference on Ribonucleases*. Bath, UK, 19-23 June, p.143.

Напечатано с готового оригинал-макета

Издательство ООО "МАКС Пресс"

Лицензия ИД N 00510 от 01.12.99 г.

Подписано к печати 25.05 2005 г.

Формат 60х90 1/16 Усл.печ л 1,5.Тираж 100 экз. Заказ 338

Тел 939-3890. Тел./Факс 939-3891.

119992, ГСП-2, Москва, Ленинские горы, МГУ им М В Ломоносова,
2-й учебный корпус, 627 к

№ 1 2 6 5 6

РНБ Русский фонд

2006-4

11532

