

УДК 577.152.277:578

## РИБОНУКЛЕАЗЫ КАК ПРОТИВОВИРУСНЫЕ АГЕНТЫ

© 2014 г. О. Н. Ильинская\*, Р. Шах Махмуд

Институт фундаментальной медицины и биологии,  
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008

Поступила в редакцию 04.02.2014 г.

Принята к печати 11.03.2014 г.

Многие рибонуклеазы (РНКазаы) способны подавлять репродукцию РНК-содержащих вирусов в культурах инфицированных клеток и лабораторных животных, однако молекулярные механизмы противовирусного действия РНКаз изучены недостаточно. В представленном обзоре рассмотрены наиболее изученные внутриклеточные РНКазы, обладающие противовирусной активностью (РНКаза L, белок МСРІР1, РНКазы эозинофилов), а также РНКазы, применяемые экзогенно (РНКаза А, BS-РНКаза, онконаза, биназа, синтетические РНКазы). Особое внимание уделено двум важным, хотя и не всегда обязательным свойствам этих РНКаз: каталитической активности и способности к димеризации. Предложена схема элиминации вируса экзогенными РНКазами, отражающая возможные типы взаимодействия РНКаз с вирусом и клеткой. Приведены доказательства того, что РНКазы, как классические компоненты иммунной защиты, представляют значительный интерес для разработки новых противовирусных препаратов.

**Ключевые слова:** вирусы, противовирусное действие, РНКазы L, белок МСРІР1, РНКазы эозинофилов, РНКазы А, BS-РНКаза, онконаза, биназа, синтетические РНКазы.

**RIBONUCLEASES AS ANTIVIRAL AGENTS, by O. N. Ilinskaya\*, R. Shah Mahmud** (Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, 420008 Russia; \*e-mail: ilinskaya\_kfu@mail.ru). Many ribonucleases (RNases) are able to inhibit the reproduction of viruses in infected cell cultures and laboratory animals, but molecular mechanisms of their antiviral activity remain unclear. The review observes the most known RNases which possess established antiviral effects, actually intracellular RNases (RNase L, МСРІР1 protein, eosinophilic RNases) as well as exogenously applied ones (RNase A, BS-RNase, onconase, binase, synthetic RNases). Attention is given on two important but not always obligatory aspects in molecule of RNases, which have antiviral properties: catalytic activity and ability to the dimerization. The hypothetic scheme of virus elimination by exogenous RNases, that reflects possible types of interaction of viruses and RNases with a cell, is proposed. The evidence for RNases as classical components of immune defense which are perspective agents for development of new antiviral therapeutics is produced.

**Keywords:** viruses, antiviral activity, RNase L, МСРІР1 protein, eosinophilic RNases, RNase A, BS-RNase, onconase, binase, synthetic RNases.

DOI: 10.7868/S0026898414040053

Рибонуклеазы (РНКазаы), катализирующие расщепление РНК, играют ключевую роль в регуляции жизнедеятельности любого организма, от вирусов до человека. Без реакций деградации РНК невозможно созревание мРНК и некодирующих РНК, функционирование глобальных систем РНК-интерференции и эпигенетической регуляции экспрессии генов, а также процессов роста и дифференцировки клеток, индукции апоптоза и защиты организма от вирусной инфекции. В клетке насчи-

тывается примерно 20 экзо- и эндорибонуклеаз, проявляющих различную специфичность в отношении нуклеотидных последовательностей и структур [1]. Наряду с внутриклеточными РНКазами существуют и РНКазы, способные секретироваться в культуральную или тканевую жидкость. Особый интерес вызывают биологические эффекты РНКаз, действующих на клетку извне. Контроль роста кровеносных сосудов, токсичность в отношении опухолевых клеток и противо-

Принятые сокращения: МСРІР1 – белок, индуцируемый белком-хемоаттрактантом моноцитов; ЕСР – цитотоксический белок эозинофилов; EDN – эозинофильный нейротоксин; оцРНК – одноцепочечная РНК; дцРНК – двухцепочечная РНК; миРНК – малые интерферирующие РНК; ФОЕ – фокусобразующие единицы.

\* Эл. почта: ilinskaya\_kfu@mail.ru



**Рис. 1.** Трехмерные структуры противовирусных РНКаз разного происхождения, полученные с использованием программы Jmol и базы данных белков ([www.jmol.org](http://www.jmol.org) и [www.pdb.org](http://www.pdb.org)). 1 – биназа, 2 – онконаза, 3 – РНКазы *Rana catesbeiana*, 4 – РНКазы А, 5 – BS-РНКазы, 6 – белок МСР1Р1, 7 – ЕСР, 8 – EDN, 9 – РНКазы L.

вирусная активность относится к свойствам РНКаз, потенциально применимым в медицине и определяющим современные “точки роста” в исследовании этих ферментов. В настоящем обзоре

кратко рассмотрены наиболее известные РНКазы, обладающие противовирусным действием. Молекулярные структуры этих РНКаз представлены на рис. 1. Видно, что они не обладают значимой гомо-

логией. Следовательно, структурное сходство этих каталитически активных белков не является определяющим для их противовирусных свойств.

В 60-х годах прошлого века в Институте цитологии и генетики Сибирского отделения РАН группа ученых под руководством Р.И. Салганика показала, что в крови и спинномозговой жидкости больных клещевым энцефалитом возрастает активность ферментов, расщепляющих РНК [2]. Было высказано предположение, что РНКазы принимают непосредственное участие в биологических механизмах противовирусной защиты. Активацию внутриклеточных РНКаз в присутствии противовирусных препаратов позднее выявили и у растений [3]. В частности, трансгенные растения табака с повышенной активностью внеклеточной рибонуклеазы ZRNaseII *Zinnia elegans* обладают повышенной устойчивостью к вирусу табачной мозаики [4]. Бактериальные эндорибонуклеазы, специфичные к определенным нуклеотидным последовательностям, например РНКазы ToxN, обеспечивают устойчивость популяции к фагам, вызывая гибель клеток за счет расщепления фаговой и клеточной РНК [5]. Расщепление тРНК антикодоновой нуклеазой PrrC *Escherichia coli* является механизмом защиты бактерии от заражения фагом T4 [6].

Участие РНКаз в защите клеток и организма от вируса подтверждено многочисленными фактами. Накоплен значительный массив данных, позволяющих рассматривать РНКазы не только как компоненты иммунной защиты, но и как основу для разработки новых противовирусных препаратов.

### РНКазы L

Противовирусное действие РНКаз наиболее хорошо изучено на примере сигнальной системы с участием РНКазы L, которая опосредует действие интерферона, индуцируемого вирусной инфекцией. Ключевой фермент этой системы – 2',5'-олигоаденилатсинтетаза, полимеризующая АТФ с образованием активатора РНКазы L – 2',5'-олигоаденилата с общей формулой ppp2',5'-An, где  $n = 2-10$  адениловых остатков. Механизм действия РНКазы L хорошо изучен: активная форма РНКазы L образует димер, обладающий эндорибонуклеолитической активностью в отношении как вирусной, так и клеточной РНК [7, 8]. Продукты расщепления РНК длиной менее 200 н. распознаются белковыми факторами RIG-I и MDA5. Таким образом, усиленное РНКазой L образование фрагментов РНК после их взаимодействия с RIG-I и MDA5 активирует фактор транскрипции NF- $\kappa$ B и запускает транскрипцию гена интерферона- $\beta$ , препятствующего репликации вирусов и стимулирующего клетки иммунной системы [9]. Однако

данная система не может полностью защитить клетки от вирусов. Установлено, что у энтеровирусов группы С внутри открытой рамки считывания находится филогенетически консервативная структура РНК, устойчивая к расщеплению РНКазой L, которая избирательно ингибирует активность ее эндорибонуклеазного домена [10]. Нейротропный пикорнавирус Тайлера, вызывающий хроническую инфекцию центральной нервной системы и демиелинизацию нервного волокна, продуцирует видоспецифичный вспомогательный белок L\*, который ингибирует РНКазу L, взаимодействуя с ее анкириновым доменом [11]. Эти вирусы обладают механизмами, которые обеспечивают устойчивость к действию РНКазы L, поскольку способны блокировать либо ее рибонуклеолитическую активность, либо способность образовывать димеры. Обращает на себя внимание тот факт, что кроме каталитической активности, априори необходимой для расщепления вирусной РНК, димеризация определенно вносит вклад в противовирусную активность РНКазы L.

### БЕЛОК MCP1

Известно, что белки группы “цинковых пальцев” обладают противовирусным действием за счет индуцированного ими отщепления poly(A)-конца от мРНК и усиления оборота РНК в клетке [12, 13]. Введение в такие белки доменов с высокой каталитической нуклеазной активностью способствует усилению противовирусных свойств. Так, на основе синтетического белка этой группы и стафилококковой нуклеазы получена гибридная конструкция, препятствующая репликации ДНК-содержащего вируса папилломы человека [14].

В группу белков с цинковыми пальцами входит также белок MCP1 (monocyte chemoattractant protein induced protein 1). Этот белок содержит два консервативных домена: последовательность CCH (цинковые пальцы) и домен NYN нуклеазы. MCP1 вовлечен в регуляцию воспалительного ответа клетки, причем именно нуклеазный домен связывает и разрушает вирусную РНК [15]. Для этого необходима РНКазная активность белка и его димеризация. MCP1 расщепляет вирусную РНК, клеточную мРНК, а также предшественники микроРНК в  $Mg^{2+}$ -зависимой реакции [16]. Повышенный уровень этого белка, индуцируемый провоспалительными цитокинами (такими, как фактор некроза опухоли  $\alpha$ , интерлейкин-1 $\beta$ , липополисахариды), ингибирует репликацию вирусов лихорадки Денге и японского энцефалита. Однако три других белка группы MCP1, которые содержат и последовательность CCH, и нуклеазный домен, но не имеют обогащенного пролином домена и, как следствие,

не способны к образованию димеров, не обладают противовирусной активностью [15]. Эти данные подчеркивают необходимость димеризации белков группы МСРР для проявления ими противовирусной активности независимо от присутствия в молекуле домена “цинковых пальцев”.

### РНКазы ЭОЗИНОФИЛОВ

Основные РНКазы, ассоциированные с эозинофилами — цитотоксический белок эозинофилов (ЕСР) и эозинофильный нейротоксин (EDN) — обладают антимикробной, антигельминтной и противовирусной активностью, обусловленной каталитическим расщеплением оцРНК. Эти РНКазы рассматривают в качестве потенциальных препаратов, направленных против вирусных инфекций легких [16]. На уровне аминокислотных последовательностей они обладают определенной гомологией с панкреатической рибонуклеазой крупного рогатого скота и принадлежат к обширному суперсемейству РНКазы А, члены которого содержат в своей структуре дисульфидные связи. ЕСР, или РНКазы 3 — наиболее катионный ( $pI = 11$ ) и наименее каталитически активный белок этого семейства, EDN (РНКаза 2) примерно в 100 раз более активная РНКазы с  $pI = 9$  [16]. Только EDN, на С-конце молекулы которого находится уникальная петля из 9 аминокислотных остатков (L7), отличная по аминокислотной последовательности от сходной петли в ЕСР, обладает высокой активностью против респираторного синцитиального вируса, связанной с вкладом данной структуры во взаимодействие РНКазы с вирусным капсидом и проникновением в вирион [17]. Х. Розенберг [18], изучающий РНКазы эозинофилов, полагает, что респираторные вирусы, содержащие оцРНК, представляют собой эволюционно сложившиеся мобильные мишени для EDN, который прямо использует в своем противовирусном действии рибонуклеолитическую активность. Кроме того, в опытах *in vitro* EDN снижал инфицирующую способность другого оцРНК-содержащего вируса вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) [19, 20].

### РНКазы АМФИБИЙ

Ранее считали, что онконаза, РНКазы ооцитов леопардовой лягушки *Rana pipiens*, эффективно подавляет репликацию ВИЧ-1 за счет селективной деградации вирусной РНК, не оказывая выраженного цитотоксического действия на инфицированные клетки человека [21]. Позже было установлено, что онконаза способна деградировать клеточные тРНК, но не действует на защищенные белками рРНК и мРНК. Вследствие этого цикл деградации/синтеза тРНК ускоряется, и продукты деградации, способные, вероятно, вы-

ступать в роли праймеров вирусной репликации, также разрушаются онконазой, приводя к ингибированию репликации вируса [22]. Гомологичная онконаза РНКазы ооцитов лягушки *R. catesbeiana* эффективно блокирует репликацию РНК-содержащего вируса японского энцефалита и стимулирует активацию каспаз 3, 8 и 9, индуцируя апоптоз в инфицированных клетках ВНК-21 [23]. Современные исследования показали, что как онконаза, так и РНКазы А неэффективны в отношении респираторного синцитиального вируса [17]. В то же время онконаза и рамфиназа 2 (рекомбинантный белок, аналогичный онконазе), не вызывая гибели зараженных клеток, ингибируют репликацию таких ДНК-содержащих вирусов, как вирусы простого герпеса первого и второго типа, вируса Эпштейна-Барр, вируса герпеса, ассоциированного с саркомой Капоши, цитомегаловируса и розеолювируса, причем вирусы двух последних типов были наиболее чувствительны к действию данных РНКаз [24]. Таким образом, противовирусное действие даже близкородственных РНКаз амфибий не распространяется на все вирусы: конкретные РНКазы активны в отношении определенных вирусов. Это связано с особенностями строения различных вирусов, разнообразием организации и свойств поражаемых ими клеток, а также с вариативностью молекулярных структур и уровнем каталитической активности РНКаз.

### РНКаза А

Самые ранние исследования противовирусной активности РНКаз были выполнены с использованием панкреатической РНКазы как агента, быстро нормализующего состояние и снижающего симптомы менингита и цереброспинального плеоцистоза у больных клещевым энцефалитом [25]. Первый препарат был зарегистрирован как “Рибонуклеаза аморфная” (регистрационный номер 68/333/22, дата регистрации 30.04.1968). Теперь рибонуклеаза из поджелудочной железы крупного рогатого скота (РНКаза А) выпускается в России объединением “Самсон-Мед” как препарат “Рибонуклеаза” (регистрационный номер ЛС-000391, дата регистрации 10.04.2010) в виде таблеток и лиофилизата для приготовления растворов для инъекций и местного применения. Препарат рекомендован при воспалительных заболеваниях дыхательных путей (трахеит, бронхит, пневмония, бронхоэктатическая болезнь, синусит), при пародонтозе, остеомиелите, тромбофлебите, абсцессах, вирусном менингите и клещевом энцефалите [26]. Таким образом, единственный официально разрешенный к использованию противовирусный препарат на основе РНКаз — это препарат из поджелудочной железы крупного рогатого скота.

Совершенствование разработок противовирусных средств, основанных на РНКазе А, продолжается и сегодня. Созданы ее конъюгаты с безлигандным сывороточным альбумином человека, которые проявляют, в отличие от исходного фермента, активность в отношении дцРНК и обладают высокой активностью против вирусов гриппа А и В [27]. РНКазы А вошла в состав комплекса с наночастицами золота и олигонуклеотидами, комплементарными к последовательности РНК (нуклеотиды в позиции 322–339) вируса гепатита В. Такой комплекс снижал содержание вирусной РНК у зараженных гепатитом В мышей на 99% [28]. Невзирая на высокую вероятность подавления каталитической активности РНКазы А клеточным цитозольным ингибитором [29, 30], ее функции как основного представителя обширного семейства РНКаз млекопитающих в эволюционно сложившейся системе неспецифического иммунитета несомненны [31].

### BS-РНКазы

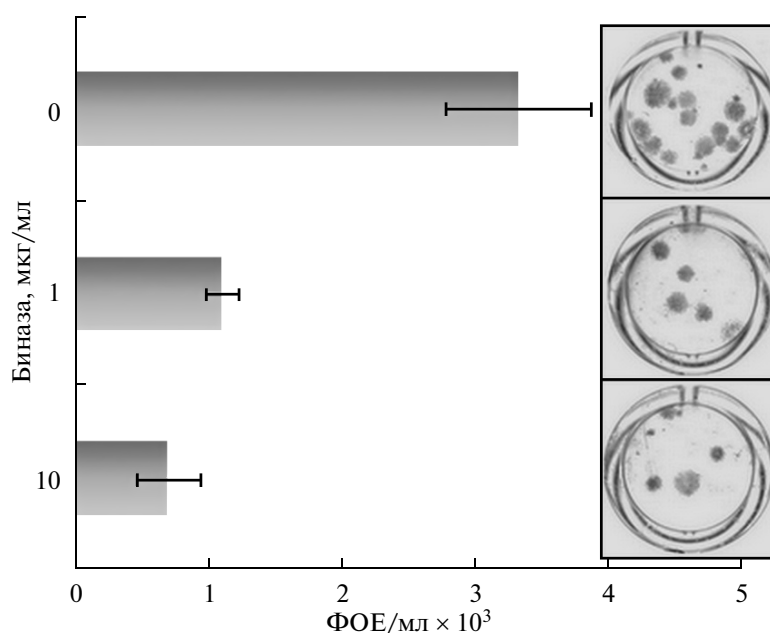
РНКазы А не обладала значительной активностью в отношении ВИЧ-1, в то время как РНКазы из семенников быка (BS-РНКазы) ингибировала репликацию этого вируса в лейкозных клетках Н9 [32]. Показано, что расщепление дцРНК BS-РНКазой усиливалось в присутствии  $\gamma$ -интерферона, что, вероятно, может вносить вклад в механизмы иммунной защиты от вирусов [33]. Отметим, что BS-РНКазы – это природный димер, мономеры которого связаны двумя внутримолекулярными дисульфидными связями. Подобная структура делает молекулу устойчивой к действию цитозольного ингибитора РНКаз и снижает ее токсические свойства по сравнению с мономерной формой [34]. Стоит заметить, что многие РНКазы склонны к образованию олигомерных структур: РНКазы А, лиофилизированная из 40%-ного раствора уксусной кислоты, образует димеры, тримеры, тетрамеры и мультимеры более высокого порядка [35]. Димеры образуются путем обмена концевыми доменами между мономерами (С-концевые либо N-концевые димеры). Важным фактором, способствующим олигомеризации, считается гидрофобный характер С-концевой и гидрофильный характер N-концевой частей молекулы [36]. Во всех изученных кристаллических структурах микробной РНКазы биназы присутствуют характеристики, свидетельствующие об образовании димера, в котором активный центр одной субъединицы перекрыт за счет взаимодействия субъединиц [37]. В  $\alpha$ -спирали молекул BS-РНКазы, РНКазы А, панкреатической РНКазы Н человека и биназы содержатся гидрофобные сегменты, способные участвовать как во взаимодействии с липидным бислоем, так и в димеризации [38]. Среди

рассмотренных нами РНКаз только BS-РНКазы представляет собой известный природный димер, однако данные о необходимости превращения мономерных форм РНКазы L и белка МСРР1 в димерные [7, 8, 15, 16] для приобретения ими способности разрушать генетический материал вирусов свидетельствуют о еще недостаточно изученном вкладе надмолекулярной организации РНКаз в их противовирусную активность.

### МИКРОБНЫЕ РНКазы

Клиническое применение РНКаз млекопитающих не всегда эффективно, поскольку их каталитическая активность блокируется специфическим ингибитором, представленным практически во всех тканях и клетках и необходимым для защиты клетки от собственных РНКаз [30]. Бактериальные РНКазы этим ингибитором не инактивируются, а огромные возможности создания на их основе простых биоинженерных конструкций делают их особо привлекательными для разработки новых терапевтических средств.

Ряд экспериментальных работ конца XX века посвящен сравнению противовирусной активности панкреатической и микробной РНКаз, в частности, РНКазы *Actinomyces rimosus*. Как нативная, так и модифицированная декстраном микробная РНКазы оказывали более эффективное и пролонгированное действие на ДНК-содержащий вирус болезни Ауэски, чем РНКазы А [39]. Хорошо изученная к настоящему времени биназа – РНКазы *Bacillus intermedius* (современное название *B. pumilus* [40]) – проявила высокую активность против РНК-содержащего вируса бешенства на морских свинках, кроликах и мышах, зараженных вирусом, места введения которого обкалывали биназой [41, 42]. Лечебный эффект биназы зафиксирован как через 2–3 ч после заражения, так и через 1 сут после него (защита животных 57–67%), при этом фермент не влиял на формирование вакцинального иммунитета. Однократное внутрибрюшинное введение биназы кроликам, инфицированным вирусом ящура типов О и А22-550, втрое снижало смертность животных [43]. Биназа также обладает активностью против вирусов гриппа А/Бетезда/10/63, А/Одесса/2882/82 и В/Ленинград/369/76, сопоставимой с активностью классического противовирусного препарата ремантадина. Установлено, что биназа активна в отношении вирусов гриппа А и В, тогда как ремантадин неактивен против вируса гриппа типа В [44]. Недавно нами показано, что в диапазоне концентраций, нетоксичных для эпителиальных клеток, биназа проявляет противовирусную активность по отношению к вирусу пандемического гриппа А/Hamburg/04/09 (H1N1), возбудителя эпидемии 2009 года, как при одноцикловой,



**Рис. 2.** Диаграмма снижения числа вирусных частиц (фокусобразующих единиц, ФОЕ) в клетках А549, зараженных вирусом гриппа А/Н1N1, после обработки различными концентрациями биназы (слева), и визуализация этого процесса (справа). Вирус преинкубировали с биназой в течение 45 мин, клетки А549 заражали вирусом при множественности инфекции 0.01 и выращивали в течение 24 ч. Экспериментальная процедура подробно описана нами ранее [45].

так и при многоцикловой репродукции вируса. Кратковременная обработка вирусных частиц (15–30 мин) биназой в возрастающих концентрациях пропорционально снижает жизнеспособность вируса, что выражается в ослаблении его способности инфицировать клетки аденокарциномы легкого А549 почти на порядок (рис. 2) [45]. Важно, что биназа не индуцирует экспрессию специфических маркеров иммунного ответа – антигена CD69, и синтез  $\gamma$ -интерферона в популяции Т-лимфоцитов CD8+ и CD4+, что свидетельствует об отсутствии у фермента свойств индуктора поликлонального Т-клеточного ответа по типу суперантигена [46].

Скрининг бактериальных РНКаз, обладающих новыми противовирусными свойствами продолжается. Ведутся работы по выделению и характеристике секретируемых РНКаз бактерий рода *Pseudomonas* [47]. Выявлено, что внеклеточная рибонуклеаза *B. cereus* эффективна против вируса табачной мозаики [48]. Культуральная жидкость штамма *B. pumilus*, выделенного из морской губки *Petromica citrine*, обладает противовирусной активностью в отношении вируса диареи крупного рогатого скота [49]. Штамм *B. pumilus* var. "Pashkov" из почв средней полосы проявил широкий спектр антагонистической активности, включая противозентеровирусную [50]. Вероятно, противовирусные свойства культуральной жидкости бацилл этого вида во многом обусловлены

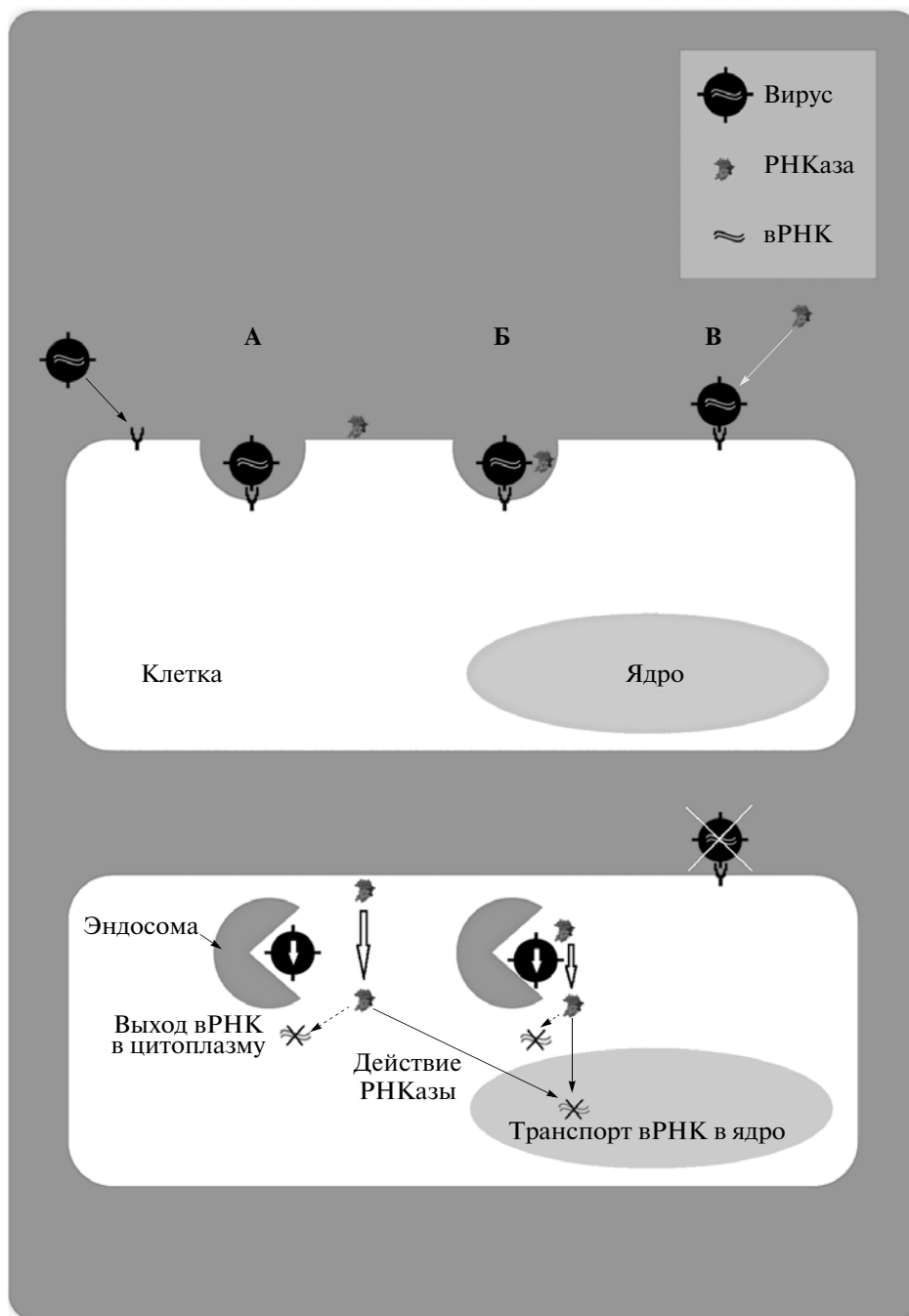
секретируемыми РНКазами, соответствующими или аналогичными биназе.

### СИНТЕТИЧЕСКИЕ РНКазы

С конца 90-х годов XX века известны синтетические РНК-гидролизующие молекулы, созданные на основе пептидов, содержащих остатки *L*-лизина, гистамина или метилового эфира гистидина [51]. Химические конъюгаты остатков лизина с имидазолом моделируют активный центр РНКазы А, содержат РНК-связывающий и РНК-гидролизующий домены и могут найти применение для инактивации РНК в ген-направленной терапии [51]. Миметики РНКаз другого класса созданы на базе конъюгатов диазабицикло-[2.2.2]-октана с имидазолом, скорость гидролиза РНК которыми повышается пропорционально числу положительных зарядов в конструкции [52]. Недавно было установлено, что синтетические РНКазы действуют не только на РНК-содержащие вирусы, РНК которых они гидролизуют [53], но и на ДНК-содержащие вирусы, в частности, к вирусу коровьей оспы, оболочку которого они разрушают [54].

### МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВОВИРУСНЫХ РНКаз

Современные противовирусные препараты должны применяться с учетом данных о механизмах их действия на конкретные мишени, пораже-



**Рис. 3.** Гипотезы противовирусного действия РНКаз. А – Независимое друг от друга проникновение РНКазы и вирусной нуклеиновой кислоты (в РНК) в цитоплазму/ядро и ее расщепление РНКазой в ядре; Б – совместное проникновение вируса с РНКазой в эндосому, освобождение РНКазы и вирусной нуклеиновой кислоты в цитоплазму с последующим расщеплением РНКазой в ядре; В – прямое воздействие рибонуклеазы на вирус до его проникновения в клетку.

ние которых приводит к элиминации вируса. Наиболее общим действием обладают препараты, содержащие интерфероны как стимуляторы природной защитной системы клетки от вирусной инфекции, либо синтетические аналоги нуклеозидов, блокирующие синтез вирусной нуклеиновой кислоты. Действие других агентов избирательно направлено на разные стадии развития вирусной ин-

фекции и жизненного цикла вирусов: адсорбцию, проникновение, синтез вирусных компонентов и выход дочерних вирионов из клетки. Особый интерес представляют препараты, действующие на геном вирусов – антисмысловые олигонуклеотиды [55], рибозимы [56] и рассмотренные в настоящем обзоре РНКазы. Такие препараты должны подавлять репродукцию вируса, но, возможно, они спо-

способны уничтожить и латентную вирусную инфекцию. Мы рассматриваем здесь три возможных механизма действия биназы на РНК-содержащие вирусы, которое может проявляться на любом этапе инфицирования клетки. На первом этапе встречи с вирусом вне клетки биназа, каталитическая активность которой не ингибируется природным ингибитором РНКаз, может разрушать вирусную РНК (рис. 3, В). Механизм проникновения биназы в вирион неясен, однако доказано, что инфекционность вируса гриппа снижается при его прямой обработке биназой [45]. На следующем этапе биназа может взаимодействовать с вирусом в составе эндосомы, поскольку такой тип интернализации характерен для экзогенных РНКаз —  $\alpha$ -сарцина [57], РНКазы А [58], BS-РНКазы [59], биназы [60] (рис. 1). И, наконец, особенно важно проникновение биназы в ядро клетки: здесь фермент может непосредственно разрушать вирусную РНК (рис. 3, А, Б). На сегодняшний день локализация экзогенных РНКаз в клеточном ядре убедительно показана только для BS-РНКазы [59] и биназы [60]. Необходимо отметить, что биназа проникает не во все клетки: так, в клетки альвеолярного эпителия MLE-12, экспрессирующие на поверхности вирусный Т-антиген, фермент не поступает, но вызывает их гибель [61]. Поскольку накоплен ряд фактов, свидетельствующих о взаимодействии РНКаз с поверхностными структурами клеток [62], необходимо учитывать вклад этих структур в интернализацию РНКаз инфицированными клетками. Таким образом, для разработки высокоэффективных противовирусных средств на основе РНКаз важно обладать знаниями о конкретном этапе, на котором фермент действует на вирус.

Кроме того, пристальное внимание привлекает возможность вмешательства экзогенных РНКаз в процесс РНК-интерференции, участвующей в защите от вирусов [63, 64]. Ведущую роль здесь играет РНКазы Dicer, продуцирующая малые интерферирующие РНК (миРНК) и использующая в качестве субстрата дцРНК — промежуточный продукт репликации вируса [63]. Кроме того, установлено, что специфичные к консервативной области РНК вируса гриппа миРНК, искусственно внедренные в клетку, снижают его титр [64]. Их противовирусный потенциал усиливается при использовании в комплексе с поликатионным носителем [64, 66]. Использование миРНК в противовирусной терапии не ограничивается воздействием на вирус гриппа. Положительные результаты получены на лабораторных мышах, зараженных коронавирусом, вызывающим тяжелый острый респираторный синдром, и синцитиальным вирусом [63]. Конкретных данных об участии экзогенных РНКаз в формировании и разрушении миРНК пока очень мало. Показано, что онконаза изменяет профиль экспрессии миРНК в нескольких линиях клеток мезотелиомы плевры, разрушая предшественни-

ки этих молекул и уменьшая тем самым количество субстрата для РНКазы Dicer [67]. Таким образом, механизмы противовирусной активности РНКаз включают как прямое воздействие на нуклеокапсид и нуклеиновую кислоту, так и опосредованные эффекты — вмешательство в процесс РНК-интерференции, иммуномодуляцию, индукцию апоптоза инфицированных клеток. На рис. 3 представлены гипотетические модели элиминации вирусной инфекции экзогенной РНКазой в зависимости от типа их взаимодействия с клеткой: независимого проникновения (А), совместной интернализации (Б), либо вне клетки (В).

Значительные экономические потери от ежегодных эпидемий обуславливают постоянный поиск новых противовирусных средств, которые из-за высокой варибельности вирусов со временем становятся бесполезными. Изучение молекулярного механизма действия противовирусных РНКаз несомненно является актуальной задачей, решение которой может способствовать разработке новых препаратов, способных защитить организм независимо от изменений генома вируса.

Работа выполнена в рамках Программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета Министерства образования и науки РФ и поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (2-04-01226а) и грантом Российского научного фонда (14-14-00522).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Deutscher M.P., Li Z. 2001. Exoribonucleases and their multiple roles in RNA metabolism. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **66**, 67–105.
2. Salganik R.I., Batalina T.A., Berdichevskaja L.S., Mosolov A.N. 1968. Inhibition of RNA synthesis and reproduction of tick-encephalitis virus under the influence of ribonuclease. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.* **180**, 1473–1475.
3. Reunov A.V., Lapshina L.A., Nagorskaya V.P., Elyakova L.A. 1996. Effect of 1,3;1,6- $\beta$ -D-glucan on infection of detached tobacco leaves with tobacco mosaic virus. *J. Phytopathol.* **144**, 247–249.
4. Сангаев С.С., Трифонова Е.А., Титов С.Е., Романова А.В., Колодяжная Я.С., Комарова М.Л., Сапоцкий М.В., Малиновский В.И., Кочетов А.В., Шумный В.К. 2007. Эффективная экспрессия гена экстраклеточной рибонуклеазы *Zinnia elegans* в растениях табака *Nicotiana tabacum* SR1. *Генетика.* **43**, 1002–1005.
5. Cook G.M., Robson J.R., Frampton R.A., McKenzie J., Przybilski R., Fineran P.C., Arcus V.L. 2013. Ribonucleases in bacterial toxin-antitoxin systems. *Biochim. Biophys. Acta.* **1829**, 523–531.
6. Meineke B., Shuman S. 2012. Structure-function relations in the NTPase domain of the antiviral tRNA ribotoxin *Escherichia coli* PrrC. *Virology.* **427**, 144–150.



7. Malathi K., Dong B., Gale M. Jr., Silverman R.H. 2007. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nat. Lett.* **448**, 816–819.
8. Garvie C.W., Vasanthavada K., Xiang Q. 2013. Mechanistic insights into RNase L through use of an MDMX-derived multi-functional protein domain. *Biochim. Biophys. Acta.* **1834**, 1562–1571.
9. Michael P., Brabant D., Bleiblo F., Ramana C.V., Rutherford M., Khurana S., Tail T.C., Kumar A., Kumar A. 2013. Influenza A induced cellular signal transduction pathways. *J. Thorac. Dis.* **5**, S132–S141. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.07.42.
10. Townsend H.L., Jha B.K., Han J.Q., Maluf N.K., Silverman R.H., Barton D.J. 2008. A viral RNA competitively inhibits the antiviral endoribonuclease domain of RNase L. *RNA.* **14**, 1026–1036.
11. Sorgeloos F., Jha B.K., Silverman R.H., Michiels T. 2013. Evasion of antiviral innate immunity by Theiler's virus L\* protein through direct inhibition of RNase L. *PLoS Pathog.* **9**: e1003474. doi: 10.1371/journal.ppat.1003474.
12. Hall T.M. 2005. Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 367–373.
13. Muller S., Moller P., Bick M.J., Wurr S., Becker S., Gunther S., Kummerer B.M. 2007. Inhibition of filovirus replication by the zinc finger antiviral protein. *J. Virol.* **81**, 2391–2400.
14. Mino T., Mori T., Aoyama Y., Sera T. 2013. Gene- and protein-delivered zinc finger-staphylococcal nuclease hybrid for inhibition of DNA replication of human papillomavirus. *PLoS One.* **8**: e56633. doi:10.1371/journal.pone.0056633.
15. Lin R.J., Chien H.L., Lin S.Y., Chang B.L., Yu H.P., Tang W.C., Lin Y.L. 2013. MCP1P1 ribonuclease exhibits broad-spectrum antiviral effects through viral RNA binding and degradation. *Nucl. Acids Res.* **41**, 3314–3326.
16. Suzuki H.I., Arase M., Matsuyama H., Choi Y.L., Ueno T., Mano H., Sugimoto K., Miyazono K. 2011. MCP1P1 ribonuclease antagonizes dicer and terminates microRNA biogenesis through precursor microRNA degradation. *Mol. Cell.* **44**, 424–436.
16. Rosenberg H.F., Domachowske J.B. 2001. Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens. *J. Leukoc. Biol.* **70**, 691–698.
17. Sikriwal D., Seth D., Parveen S., Malik A., Broor S., Batra J.K. 2012. An insertion in loop L7 of human eosinophil-derived neurotoxin is crucial for its antiviral activity. *J. Cell Biochem.* **113**, 3104–3112.
18. Rosenberg H.F. 2011. Ribonucleases, nucleic acids and molecular biology. Germany, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag
19. Rugeles M.T., Trubey C.M., Bedoya V.I., Pinto L.A., Oppenheim J.J., Rybak S.M., Shearer G.M. 2003. Ribonuclease is partly responsible for the HIV-1 inhibitory effect activated by HLA alloantigen recognition. *AIDS.* **17**, 481–486.
20. Bedoya V.I., Boasso A., Hardy A.W., Rybak S., Shearer G.M., Rugeles M.T. 2006. 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.* **22**, 897–907.
21. Saxena S.K., Gravel M., Wu Y.N., Mikulski S.M., Shogen K., Ardel W., Youle R.J. 1996. Inhibition of HIV-1 production and selective degradation of viral RNA by an amphibian ribonuclease. *J. Biol. Chem.* **271**, 20783–20788.
22. Saxena S.K., Sirdeshmukh R., Ardel W., Mikulski S.M., Shogen K., Youle R.J. 2002. Entry into cells and selective degradation of tRNA by a cytotoxic member of the RNase A family. *J. Biol. Chem.* **277**, 15142–15146.
23. Lee Y.H., Wei C.W., Wang J.J., Chiou C.T. 2011. *Rana catesbeiana* ribonuclease inhibits Japanese encephalitis virus (JEV) replication and enhances apoptosis of JEV-infected BHK-21 cells. *Antiviral Res.* **89**, 193–198.
24. Ardel W., Saxena S.K. 2012. Methods of treating infections originating from viruses in the herpesviridae family. *US Patent*, 20120121569 A1.
25. Glukhov B.N., Jerusalemsky A.P., Canter V.M., Salganik R.I. 1976. Ribonuclease treatment of tick-borne encephalitis. *Arch. Neurol.* **33**, 598–603.
26. Ключева М.А. 2001. Лекарственные средства: 5000 наименований препаратов и их форм (Свойства, применение, взаимодействие, противопоказания). М.: Книжный Дом ЛОКУС.
27. Зелепуга Е.А., Пономарева Р.Б., Коликов В.М., Паутов В.Д., Шевелева Т.В., Медведев М.Л., Третьяк Т.М., Терпеловская О.Н. 2003. Конъюгаты панкреатической рибонуклеазы с безлигандным сывороточным альбумином человека *Биомед. химия.* **6**, 588–596.
28. Wang Z., Liu H., Yang S.H., Wang T., Liu C., Cao Y.C. 2012. Nanoparticle-based artificial RNA silencing machinery for antiviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109**, 12387–12392.
29. Makarov A.A., Ilinskaya O.N. 2003. Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets. *FEBS Lett.* **540**, 15–20.
30. Sevcik J., Urbanikova L., Leland P.A., Raines R.T. 2002. X-ray structure of two crystalline forms of a streptomycete ribonuclease with cytotoxic activity. *J. Biol. Chem.* **277**, 47325–47330.
31. Абатуров А.Е. 2011. Рибонуклеазы А – древнейшие компоненты неспецифической защиты респираторного тракта. *Теоретична Медицина.* **5**, 136–142.
32. Youle R.J., Wu Y.N., Mikulski S.M., Shogen K., Hamilton R.S., Newton D., D'Alessio G., Gravel M. 1994. RNase inhibition of human immunodeficiency virus infection of H9 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 6012–6016.
33. Schein C.H., Haugg M., Benner S.A. 1990. Interferon-gamma activates the cleavage of double-stranded RNA by bovine seminal ribonuclease. *FEBS Lett.* **270**, 229–232.

34. Lee J.E., Raines R.T. 2005. Cytotoxicity of bovine seminal ribonuclease: monomer versus dimer. *Biochemistry*. **44**, 15760–15767.
35. Gotte G., Libonati M. 2004. Oligomerization of ribonuclease A: two novel three-dimensional domain-swapped tetramers. *J. Biol. Chem.* **279**, 36670–36679.
36. Gotte G., Donadelli M., Laurents D.V., Vottariello F., Morbio M., Libonati M. 2006. Increase of RNase A N-terminus polarity or C-terminus apolarity changes the two domains' propensity to swap and form the two dimeric conformers of the protein. *Biochemistry*. **45**, 10795–10806.
37. Mitkevich V.A., Schulga A.A., Trofimov A.A., Dorovatskii P.V., Goncharuk D.A., Tkach E.N., Makarov A.A., Polyakov K.M. 2013. Structure and functional studies of the ribonuclease binase Glu43Ala/Phe81Ala mutant. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **69**, 991–996. doi: 10.1107/S0907444913004046.
38. Shirshikov F.V., Cherepnev G.V., Ilinskaya O.N., Kalacheva N.V. 2013. A hydrophobic segment of some cytotoxic ribonucleases. *Med. Hypotheses*. **81**, 328–334.
39. Алексеева И.И., Куриненко Б.М., Пензикова Г.А., Орешина М.Г. 1982. Противовирусная активность модифицированных РНКаз. *Антибиотики*. **4**, 21–28.
40. Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O. 2011. Barnase and binase: twins with distinct fates. *FEBS J.* **278**, 3633–3643.
41. Грибенча С.В., Поцелуева Л.А., Баринский И.Ф., Деев С.М., Баландин Т.Г., Лещинская И.Б. 2004. Противовирусная активность РНКазы *Bacillus intermedius* в экспериментах на мышцах линии СВА, предварительно зараженных уличным вирусом бешенства. *Вопросы вирусологии*. **49**, 38–41.
42. Грибенча С.В., Поцелуева Л.А., Баринский И.Ф., Деев С.М., Баландин Т.Г., Лещинская И.Б. 2006. Защитная активность РНКазы *Bacillus intermedius* у морских свинок и кроликов, зараженных уличным вирусом бешенства. *Вопросы вирусологии*. **51**, 41–43.
43. Алексеева И.И., Куриненко Б.М., Клейнер Г.И., Скуя А.Ж., Пензикова Г.А., Орешина М.Г. 1981. Сравнительное изучение противовирусной активности панкреатической и микробной РНКаз. *Антибиот. и мед. технол.* **26**, 527–532.
44. Шнейдер М.А., Штильбанс Е.Б., Куприянов-Ашин Э.Г., Поцелуева Л.А., Заиконникова И.В., Куриненко Б.М. 1990. Противогриппозное действие бактериальной РНКазы в эксперименте и фармакокинетическое обоснование способа введения ее в организм. *Антибиотики и химиотерапия*. **35**, 27–33.
45. Шах Махмуд Р., Ильинская О.Н. 2013. Противовирусная активность биназы в отношении вируса пандемического гриппа А (H1N1). *Acta Naturae*. **5**, 49–56. (Shah Mahmud R., Ilinskaya O.N. 2013. Antiviral Activity of Binase against the Pandemic Influenza A (H1N1) Virus. *Acta Naturae*. **5**, 44–51.)
46. Ilinskaya O.N., Zelenikhin P.V., Petrushanko I.Y., Mitkevich V.A., Prassolov V.S., Makarov A.A. 2007. Binase induces apoptosis of transformed myeloid cells and does not induce T-cell immune response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **361**, 1000–1005.
47. Kamble K.D., Pinjare V.S. 2012. Extra cellular ribonuclease production from *Pseudomonas* species *Asian J. Exp. Biol. Sci.* **3**, 810–815.
48. Zhou W.W., Niu T.G. 2009. Purification and some properties of an extracellular ribonuclease with antiviral activity against tobacco mosaic virus from *Bacillus cereus*. *Biotechnol. Lett.* **31**, 101–105.
49. Bastos J.C., Kohn L.K., Fantinatti-Garboggini F., Paddilla M.A., Flores E.F., da Silva B.P., de Menezes C.B., Arns C.W. 2013. Antiviral activity of *Bacillus* sp. isolated from the marine sponge *Petromica citrina* against bovine viral diarrhoea virus, a surrogate model of the hepatitis C virus. *Viruses*. **5**, 1219–1230.
50. Михайлова Н.А., Нагиева Ф.Г., Гринько О.М., Зверев В.В. 2010. Экспериментальное изучение противовирусной активности спорообразующих бактерий *Bacillus pumilus* “Пашков”. *Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол.* **2**, 69–74.
51. Ждан Н.С., Кузнецова И.Л., Власов А.В., Сильников В.Н., Зенкова М.А., Власов В.В. 1999. Синтетические рибонуклеазы. 1. Синтез и свойства конъюгатов, содержащих РНК-связывающий фрагмент на основе остатков лизина и РНК-связывающий фрагмент, несущий остаток имидазола. *Биоорган. химия*. **25**, 723–732.
52. Зенкова М.А., Власов А.В., Коневец Д.А., Сильников В.Н., Жиге Р., Власов В.В. 2000. Химические рибонуклеазы. 2. Дизайн и гидролитические свойства РНКаз-миметиков на основе диазабицикло[2.2.2]октана с различным числом положительных зарядов. *Биоорган. химия*. **26**, 679–685.
53. Fedorova A.A., Azzami K., Ryabchikova E.I., Spitsyna Y.E., Silnikov V.N., Ritter W., Gross H.J., Tautz J., Vlassov V.V., Beier H., Zenkova M.A. 2011. Inactivation of a non-enveloped RNA virus by artificial ribonucleases: honey bees and acute bee paralysis virus as a new experimental model for *in vivo* antiviral activity assessment. *Antiviral Res.* **91**, 267–277.
54. Fedorova A.A., Goncharova E.P., Ryabchikova E.I., Vlasov V.V., Zenkova M.A. 2012. Novel amphiphilic compounds effectively inactivate the vaccinia virus. *FEBS Lett.* **586**, 1669–1673.
55. Niittymäki T., Kaukinen U., Virta P., Mikkola S., Lönberg H. 2004. Preparation of azacrown-functionalized 2'-O-methyl oligoribonucleotides, potential artificial RNases. *Bioconjug Chem.* **15**, 174–184.
56. Bai Y., Sunkara N., Liu F. 2012. Targeting mRNAs by engineered sequence-specific RNase P ribozymes. *Methods Mol. Biol.* **848**, 357–368.
57. Olmo N., Turnay J., Gonzalez de Butirago G., Lopez de Silanes I., Gavilanes J.G., Lizarbe M.A. 2001. Cytotoxic mechanism of the ribotoxin alpha-sarcin. Induction cell death via apoptosis. *Eur. J. Biochem.* **268**, 2113–2123.
58. Haigis M.C., Raines R.T. 2002. Secretory ribonucleases are internalized by a dynamin-independent endocytic pathway. *J. Cell Sci.* **116**, 313–324.

59. Bracale A., Spalletti-Cernia D., Mastronicola M., Castaldi F., Mannucci R., Nitsch L., D'Alessio G. 2002. Essential stations in the intracellular pathway of cytotoxic bovine seminal ribonuclease. *Biochem. J.* **362**, 553–560.
60. Cabrera-Fuentes H.A., Aslam M., Saffarzadeh M., Kolpakov A., Zelenikhin P., Preissner K.T., Ilinskaya O.N. 2013. Internalization of *Bacillus intermedius* ribonuclease (BINASE) induces human alveolar adenocarcinoma cell death. *Toxicon.* **69**, 219–226.
61. Кабрера-Фуентес Э.А., Калачева Н.В., Мухаметшина Р.Т., Зеленихин П.В., Колпаков А.И., Баррето Г., Прайсснер К.Т., Ильинская О.Н. 2012. Проникновение биназы в клетки альвеолярного эпителия легких не индуцирует их гибель. *Биомед. химия.* **58**, 272–280.
62. Митькевич В.А., Макаров А.А., Ильинская О.Н. 2014. Клеточные мишени противоопухолевых рибонуклеаз. *Молекуляр. биология.* **48**, 214–222.
63. Haasnoot J., Westerhout E.M., Berkhout B. 2007. RNA interference against viruses: strike and counter-strike. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1435–1443.
64. Ge Q., Filip L., Bai A., Nguyen T., Eisen H.N., Chen J. 2004. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 8676–8681.
65. Barik S. 2010. siRNA for influenza therapy. *Viruses.* **2**, 1448–1457.
66. Truong N.P., Gu W., Prasadam I., Jia Z., Crawford R., Xiao Y., Monteiro M.J. 2013. An influenza virus-inspired polymer system for the timed release of siRNA. *Nat. Commun.* **4**. doi: 10.1038/ncomms2905.
67. Qiao M., Zu L.D., He X.H., Shen R.L., Wang Q.C., Liu M.F. 2012. Onconase downregulates microRNA expression through targeting microRNA precursors. *Cell Res.* **22**, 1199–1202.