

УДК 577.112:57.012.5:577.151.6

КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА БИНАЗЫ НЕ ОТРАЖАЕТ ЕЕ НАТИВНУЮ КОНФОРМАЦИЮ

Е.В. Дудкина¹, В.В. Ульянова¹, Ю.В. Сурченко¹, Н.Т. Нгуен²,
А.И. Колпаков¹, О.Н. Ильинская¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

²Ханойский медицинский университет, г. Ханой, 116001, Вьетнам

Аннотация

Биназа, секретлируемая рибонуклеаза (РНКаза) *Bacillus pumilus*, известна как перспективный агент альтернативной химиотерапии рака, обладающий апоптоз-индуцирующим действием по отношению к клеткам, экспрессирующим онкогены *ras*, *kit*, AML-ETO. Кристаллическая структура мутанта биназы с двумя точечными заменами Glu43Ala/Phe81Ala свидетельствует об отсутствии димерных форм белка, характерных для биназы дикого типа. В настоящей работе с целью характеристики нативной структурной организации проведен электрофоретический и хроматографический анализ мутанта Glu43Ala/Phe81Ala. Показано, что мутантный фермент, как и биназа дикого типа, обладает каталитически активными димерами разного уровня стабильности, идентифицированными не только в денатурирующих, но и в нативных условиях. Установлено, что в биназе в преобладающем количестве представлена стабильная димерная форма, тогда как мутант Glu43Ala/Phe81Ala в большей степени представлен нестабильными димерами. Хотя каталитическая активность мутанта по отношению к природному субстрату – РНК – по сравнению с ферментом дикого типа была ниже, он проявил на 32–35% более высокую цитотоксичность в отношении клеток аденокарциномы легких человека. Полученные данные свидетельствуют о вкладе структурной организации РНКаз в их цитотоксичность и подтверждают значимость анализа нативной конформации цитотоксичных белков.

Ключевые слова: рибонуклеаза, биназа, мутант Glu43Ala/Phe81Ala, кристаллическая структура, нативная конформация, цитотоксичность

Введение

Секретлируемые бациллярные рибонуклеазы семейства T1 рассматривают как перспективные агенты альтернативной химиотерапии рака в связи с их биологической активностью, направленной на регуляцию экспрессии генов и индукцию апоптоза. Молекулярные характеристики этих ферментов определяют возможность индукции гибели опухолевых клеток под влиянием экзогенных микробных РНКаз. Известно, что каталитическая активность, величина положительного заряда и его локализация важны для проявления цитотоксичности РНКаз [1–3]. В то же время чувствительность опухолевых клеток к апоптоз-индуцирующему действию РНКаз связана и с собственно клеточными компонентами, в частности с экспрессией определенных онкогенов, таких как *ras*, *kit*, AML-ETO [4–6].

Ранее мы охарактеризовали этапы гибели опухолевых клеток под действием экзогенных цитотоксических РНКаз: это блокирование активности кальций-зависимых калиевых (K_{Ca}) каналов, падение мембранного потенциала митохондрий, появлением морфологических маркеров апоптоза (вакуолизация цитоплазмы, конденсация и фрагментация хроматина, апоптическое уменьшение объема клеток) [7, 8]. Двухфазная кинетика ингибирования K_{Ca} -каналов РНКазами, длительность и обратимость этого процесса указывают на то, что ингибирование происходит на уровне синтеза белков каналов. Результаты обработки мРНК РНКазами *in vitro* свидетельствуют о возможности образования продуктов гидролиза, сходных по свойствам с микроРНК и малыми интерферирующими РНК, что позволяет предполагать их вмешательство в процесс РНК интерференции [9].

В последнее время активно исследуется структура цитотоксичных РНКаз. Созданы мутантные и модифицированные варианты микробных РНКаз, обладающие избирательной токсичностью для раковых клеток [10]. Нами установлено, что биназа – гуанилспецифичная РНКазы, секретируемая штаммом *Bacillus pumilus*, – является природным димером [11]. Однако сопоставлению данных о структуре фермента в кристалле и в его нативном состоянии уделяется недостаточно внимания, хотя вклад нативной конформации РНКаз во взаимодействие с опухолевой клеткой может быть доминирующим для последующего проявления цитотоксичности. В связи с вышеизложенным целью настоящей работы было определение нативной структурной организации мутантной биназы с двумя точечными заменами в первичной структуре белка и выявление цитотоксичности этого фермента по отношению к опухолевым клеткам аденокарциномы легких человека.

Материалы

Биназа представляет собой катионный белок молекулярной массой около 12 кДа, состоящий из 109 аминокислотных остатков и полученный нами в гомогенном состоянии из культуральной жидкости продуцента по методике, описанной ранее [12]. Объектом исследования в настоящей работе стал препарат мутантной биназы с двумя точечными заменами исходных аминокислот в 43-м и 81-м положении на аланин (Glu43Ala/Phe81Ala), любезно предоставленный В.А. Митькевичем (Институт молекулярной биологии РАН, г. Москва). В качестве контрольных белков использованы коммерческие препараты панкреатической РНКазы А и лизоцима (Sigma-Aldrich, США).

Методы исследования

SDS-электрофорез в полиакриламидном геле. Электрофоретическое разделение белков проводили в 15%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии 0.1%-ного додецилсульфата натрия (SDS) по стандартной методике Лэммли [13].

Определение РНКазной активности методом зимографии. Оценку каталитической активности ферментов проводили путем разделения белков в 15%-ном ПААГ по модифицированной методике Лэммли [13]. В качестве субстрата

в разделяющий гель добавляли дрожжевую РНК (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 7 мг/мл. После электрофоретического разделения белков гель отмывали по 10 мин в буфере I (10 мМ трис-НСl, 20%-ный изопропанол, рН 7.5), буфере II (10 мМ трисНСl, рН 7.5) и буфере III (100 мМ трис-НСl, рН 7.5). Для окрашивания гелей использовали 0.2%-ный раствор толуидинового синего (Sigma-Aldrich, США). О наличии у белков РНКазной активности судили по зонам гидролиза РНК на геле.

Нативный электрофорез. Нативный электрофорез белков проводили в 15%-ном ПААГ согласно модифицированной методике Лэммли без добавления денатурирующих агентов [13]. 15%-ный разделяющий гель и 6%-ный концентрирующий гель были приготовлены на основе 1.5 М ацетатного буфера, (рН 4.8) и 0.25 М ацетатного буфера (рН 6.8) соответственно. Белки ресуспендировали в буфере для внесения (0.25 М CH_3COOK , 10%-ный глицерин, 0.02%-ный метиленовый зеленый, рН 6.8) и разгоняли в рабочем буфере (0.35 М β -аланин, 0.14 М CH_3COOK). Визуализацию белков проводили с использованием стандартных растворов, используемых для SDS-электрофореза.

Гель-фильтрация. Эксклюзионную хроматографию белков проводили на колонке Enrich SEC 70 (Bio-rad, США) в буфере I (25 мМ трис-НСl, 100 мМ КСl, рН 8.0) с использованием хроматографической системы среднего давления Biologic DuoFlow (Bio-Rad, США). Скорость потока составила 0.5 мл/мин. В качестве маркеров использовали: бычий сывороточный альбумин (молекулярная масса, ММ – 66.2 кДа), трипсин (ММ – 24 кДа) и лизоцим (ММ – 14.4 кДа) (Sigma-Aldrich, США).

Цитотоксичность. Оценку цитотоксичности исследуемых белков проводили с использованием МТТ-теста. Метод основан на способности митохондриального фермента сукцинатдегидрогеназы восстанавливать желтую соль МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид) до кристаллов формазана. Клеточную линию аденокарциномы легких человека (A549) инкубировали в стандартной среде DMEM (Thermo Fisher Scientific, США) в присутствии биназы или ее мутанта в концентрациях 100 мкг/мл при 37 °С в CO_2 -инкубаторе. Через 48 ч среду меняли на свежую, содержащую реагент МТТ. Оптическую плотность регистрировали при длине волны 540 нм на планшетном спектрофотометре Multiscan (Thermo Fisher Scientific, США).

Результаты и их обсуждение

Трехмерная структура биназы при разрешении 1.65 Å и структура ее мутанта Trp34Phe при разрешении 1.7 Å была определена К.М. Поляковым с соавторами [14]. В кристаллической форме и сама биназа, и данный мутант наряду с мономерной обнаружили наличие димерных структур. При этом в димерах для катализа был открыт только один каталитический центр. Авторы [14] предположили, что другой мутант биназы – Glu43Ala/Phe81Ala – не будет формировать димеры, поскольку глутаминовая кислота в положении 43 и фенилаланин в положении 81 участвуют в димеризации. Действительно, В.А. Митькевич с соавторами [10] показали, что в кристалле у мутанта Glu43Ala/Phe81Ala димеры отсутствуют, а каталитическая активность мутанта в 1.7 раз выше, чем у биназы дикого типа, что косвенно свидетельствует об открытии каталитиче-

ского центра парного мономера. Однако нами предположено, что каталитическая активность РНКазы, измеренная по отношению к полиинозиновой кислоте [poly(I)] не может адекватно отражать воздействие фермента на клетки: в естественных условиях РНКазы расщепляет доступную РНК, среди которой есть и двухцепочечная, активность к которой гидролиз [poly(I)] не фиксирует. В связи с этим в настоящей работе проведен электрофоретический анализ мутанта Glu43Ala/Phe81Ala в присутствии денатурирующего агента додецилсульфата натрия, а также выявление каталитической активности мутанта по отношению к высокополимерной РНК в сравнении с биназой дикого типа (рис. 1). Оказалось, что даже в денатурирующих условиях часть фермента сохраняет димерную структуру, о чем свидетельствует полоса в области 25 кДа (рис. 1, а). Более того, каталитическая активность мутанта по отношению к природному субстрату, РНК, заметно ниже, чем у фермента дикого типа (рис. 1, б). Отметим, что оба белка были нанесены на гель в равных количествах. Далее необходимо было определить, существуют ли димерные формы ферментов в неденатурирующих условиях. Нативный электрофорез показал, что в биназе в преобладающем количестве представлена димерная форма, тогда как мутант Glu43Ala/Phe81Ala в примерно равных долях представлен и мономером и димером (рис. 2, а). Отметим, что контрольные белки, РНКазы А и лизоцим, в нативных условиях димеров не образуют. Вероятно, мономеры в процессе электрофореза образуются при распаде нестабильных димеров.

Это предположение было подтверждено методом эксклюзионной хроматографии. Анализ белков методом гель-фильтрационной хроматографии, в ходе которой молекулы веществ разделяются по размеру за счёт их разной способности проникать в поры неподвижной фазы, показал, что и биназа, и ее мутант Glu43Ala/Phe81Ala имеют равное время выхода, что свидетельствует об их сходной димерной организации (рис. 2, б).

Таким образом, в условиях водных растворов Glu43Ala/Phe81Ala-мутант биназы, как и фермент дикого типа, представлен димерными формами. Часть димеров этих бациллярных РНКаз нестабильна, что и обуславливает появление даже в условиях неденатурирующего электрофореза полос, характерных для мономеров (рис. 2, а). Более высокое содержание нестабильных димеров у мутанта Glu43Ala/Phe81Ala по сравнению с биназой дикого типа, вероятно, определяет заключение об отсутствии таковых, сделанное в работе [10].

На основе молекулярного моделирования можно предполагать у данных РНКаз наличие двух форм димеров, одна из которых формируется ван-дер-ваальсовыми и электростатическими взаимодействиями, а другая сбалансирована различными нековалентными связями. Обе модели белков способны стабилизироваться за счет обмена N- или C-концов белковых молекул (swapping-механизм) [11]. Димеры, в которых мономеры связаны высокостабильными дисульфидными ковалентными связями, исключаются из рассмотрения вследствие отсутствия серосодержащих аминокислот в молекуле фермента. Вероятно, что более стабильные swapping-димеры в биназе дикого типа, в отличие от мутанта Glu43Ala/Phe81Ala, преобладают над димерами, образованными слабыми нековалентными связями. Мутант Glu43Ala/Phe81Ala показал по отношению к клеткам

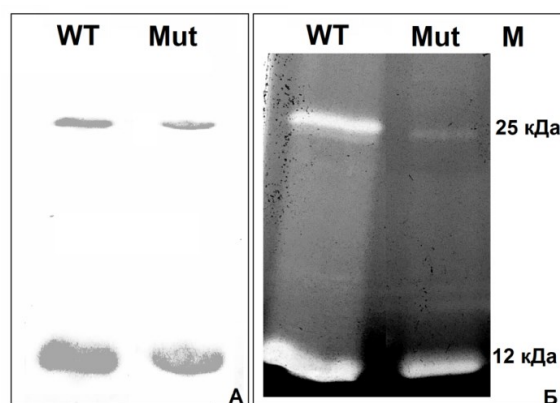


Рис. 1. SDS-электрофорез (а) и зимограмма (б) биназы и ее Glu43Ala/Phe81Ala-мутанта. WT – биназа дикого типа, Mut – Glu43Ala/Phe81Ala-мутант биназы, M – маркеры молекулярной массы. Концентрация белка в лунке – 10 мкг

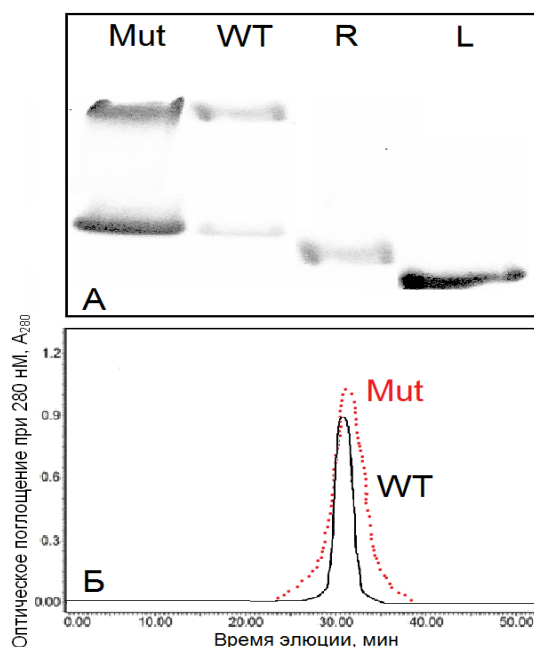


Рис. 2. Оценка структурной организации биназы и ее Glu43Ala/Phe81Ala-мутанта в нативных условиях: а) нативный электрофорез: WT – биназа дикого типа (pI 9.52), Mut – Glu43Ala/Phe81Ala-мутант биназы (pI 9.69), R – РНКза А (ММ – 13 кДа, pI 9.64), L – лизоцим (ММ – 14.4 кДа, pI 11.3); б) эксклюзионная хроматография биназы и ее мутанта (рН 8.0)

острого миелоидного лейкоза Касуми более высокую цитотоксичность по сравнению с биназой: его цитотоксическое действие превысило таковое у биназы на 27% [10]. Данные, полученные в отношении клеток аденокарциномы легких человека A549, также свидетельствуют, что мутант Glu43Ala/Phe81Ala обладает более высокой цитотоксичностью по сравнению с биназой дикого типа, превышая ее цитотоксическое действие на 32–35% (табл. 1).

Табл. 1

Жизнеспособность клеток аденокарциномы легких человека А549 после обработки РНКазами в течение 48 ч (%). За 100% принята жизнеспособность необработанных клеток, культивируемых равное время

Фермент	Концентрация белка, мкг/мл	
	100	300
Биназа	71 ± 1.0	62 ± 0.9
Мутант Glu43Ala/Phe81Ala	46 ± 1.7	42 ± 2.1

Онкогенные мутации в *ras*-гене характерны примерно для трети случаев всех опухолей человека [15]. Количество инцидентов мутаций *ras*-гена при аденокарциноме легких, а также при миелоидном лейкозе обнаружено в 30% случаев этих раковых заболеваний [16]. Учитывая, что именно онкоген *ras* является одной из мишеней действия экзогенных бациллярных РНКаз, можно предположить, что сходные показатели цитотоксичности Glu43Ala/Phe81Ala-мутанта на клетках Касуми и А549 связаны с экспрессией данного мутантного онкогена. Особенности структурной организации двух исследованных РНКаз определенно вносят свой вклад в их биологическое действие. Вероятно, низкостабильные димеры ферментов, диссоциирующие в водных растворах на мономеры, более активно индуцируют гибель опухолевых клеток.

Благодарности. Авторы благодарят В.М. Митькевича за предоставление мутантной биназы.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров, а также поддержана грантами РФФИ 18-74-00108 в части характеристики структуры РНКаз и РФФИ 17-00-00060 (КОМФИ) в части определения цитотоксических свойств ферментов.

Литература

1. Makarov A.A., Ilinskaya O.N. Cytotoxic ribonucleases: Molecular weapons and their targets // FEBS Lett. – 2003. – V. 540, No 1–3 – P. 15–20. – doi: 10.1016/S0014-5793(03)00225-4.
2. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents // BioEssays. – 2008. – V. 30, No 8. – P. 781–790. – doi: 10.1002/bies.20789.
3. 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, No 10. – P. 2522–2525. – doi: 10.1110/ps.0216702.
4. 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, Mol. Cell Res. – 2016. – V. 1863, No 7. – P. 1559–1567. – doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.04.005.
5. Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Kretova O.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, No 13. – P. 2674–2678. – doi: 10.4161/cc.9.13.12150.

6. *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, No 23. – P. 4090–4097. – doi: 10.4161/cc.10.23.18210.
7. *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, No 2–3. – P. 101–107. – doi: 10.1016/S0300-483X(00)00335-8.
8. *Ilinskaya O.N., Koschinski A., Repp H., Mitkevich V., Dreyer F., Scholtz J.M., Pace C.N., Makarov A.* RNase induced apoptosis: fate of calcium-activated potassium channels // *Biochemie*. – 2008. – V. 90, No 5. – P. 717–725. – doi: 10.1016/j.biochi.2008.01.010.
9. *Mitkevich V.A., Tchurikov N.A., Zelenikhin P.V., Petrushanko I.Yu., Makarov A.A., Ilinskaya O.N.* Binase cleaves cellular noncoding RNAs and affects coding mRNAs // *FEBS J.* – 2010. – V. 277, No 1. – P. 186–196. – doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07471.x.
10. *Mitkevich V.A., Schulga A.A., Trofimov A.A., Dorovatovskii P.V., Goncharuk D.A., Tkach E.N., Makarov A.A., Polyakov K.M.* Structure and functional studies of the ribonuclease binase Glu43Ala/Phe81Ala mutant // *Acta Cryst. Sect. D: Biol. Crystallogr.* – 2013. – V. 69, No 6. – P. 991–996. – doi: 10.1107/S0907444913004046.
11. *Dudkina E., Kayumov A., Ulyanova V., Ilinskaya O.* New insight into secreted ribonuclease structure: Binase is a natural dimer // *PLoS One*. – 2014. – V. 9, No 12. – Art. e115818, P. 1–14. – doi: 10.1371/journal.pone.0115818.
12. *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* ribonucleases // *FEBS Open Bio*. – 2016. – V. 6, No 1. – P. 24–32. – doi: 10.1002/2211-5463.12023.
13. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – V. 227, No 5259. – P. 680–685.
14. *Polyakov K.M., Goncharuk, D.A., Trofimov, A.A., Safonova, T.N., Mitkevich V.A., Tkach E.N., Makarov A.A., Shulga A.A.* X-ray diffraction and biochemical studies of W34F mutant ribonuclease binase // *Mol. Biol.* – 2010. – V. 44, No 5. – P. 817–822. – doi: 10.1134/S0026893310050195.
15. *Adjei A.A.* Ras signaling pathway proteins as therapeutic targets // *Curr. Pharm. Des.* – 2001. – V. 7, No 16. – P. 1581–1594. – doi: 10.2174/1381612013397258.
16. *Bos J.L.* *ras* Oncogenes in human cancer: A review // *Cancer Res.* – 1989. – V. 49, No 17. – P. 4682–4689.

Поступила в редакцию
26.06.18

Дудкина Елена Владимировна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник OpenLab «Маркеры патогенеза» кафедры микробиологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: lenatimonina@rambler.ru

Ульянова Вера Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник OpenLab «Маркеры патогенеза» кафедры микробиологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: ulyanova.vera@gmail.com

Сурченко Юлия Владимировна, аспирант кафедры микробиологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: sokurenko.yulia@gmail.com

Нгуен Тхи Нга, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

Ханойский медицинский университет
1-я ул. Тон Зат Тунг, округ Донг Да, г. Ханой, 116001, Вьетнам
E-mail: nn7189@gmail.com

Колпаков Алексей Иванович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
OpenLab «Маркеры патогенеза» кафедры микробиологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: ljoscha@mail.ru

Ильинская Ольга Николаевна, доктор биологических наук, заведующий кафедрой микробиологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: ilinskaya_kfu@mail.ru

ISSN 2542-064X (Print)
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2018, vol. 160, no. 4, pp. 591–600

Crystal Structure of Binase Does Not Reflect Its Native Conformation

E.V. Dudkina^{a*}, *V.V. Ulyanova*^{a**}, *Yu.V. Surchenko*^{a***},
N.T. Nguen^{b****}, *A.I. Kolpakov*^{a*****}, *O.N. Ilinskaya*^{a*****}

^aKazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

^bHanoi Medical University, Hanoi, 116001 Vietnam

E-mail: ^{*}lenatimonina@rambler.ru, ^{**}ulyanova.vera@gmail.com, ^{***}sokurenko.yulia@gmail.com,
^{****}nn7189@gmail.com, ^{*****}ljoscha@mail.ru, ^{*****}ilinskaya_kfu@mail.ru

Received June 26, 2018

Abstract

Cytotoxic ribonucleases (RNases) of the T1 family, including binase, the secreted guanyl-preferring RNase of *Bacillus pumilus*, are considered as promising agents of alternative anticancer chemotherapy. Binase has a selective apoptosis-inducing action against cells expressing oncogenes *ras*, *kit*, AML-ETO. The crystal structure of the binase mutant with two-point amino acid substitutions at positions 43 and 81 (Glu43Ala/Phe81Ala) indicates the absence of dimeric forms, which are characteristic for the wild-type binase. We studied the native structural organization of the Glu43Ala/Phe81Ala mutant. It was found that the mutant enzyme, similarly to the wild-type binase, possesses catalytically active dimers of different stability levels identified not only under denaturing gel electrophoresis, but also under native conditions. The results of the study show that binase exists predominantly in the dimeric form, whereas the Glu43Ala/Phe81Ala mutant approximately equally represented by both dimers and monomers formed as a result of the decomposition of unstable dimers. Although the catalytic activity of the mutant with respect to the natural substrate, RNA, was lower, as compared to the wild-type enzyme, it exhibited a 32–35% higher cytotoxicity against human adenocarcinoma cells. The data obtained indicate the contribution of the structural organization of RNases to their cytotoxicity and confirm the significance of the analysis of the native conformation of cytotoxic proteins.

Keywords: ribonuclease, binase, Glu43Ala/Phe81Ala mutant, crystal structure, native conformation, cytotoxicity

Acknowledgments. We are grateful to V.M. Mitkevich for providing us with mutant binase.

The work was performed according to the Russian Government Program of Competitive Growth of Kazan Federal University. Description of the structural organization of RNases was supported by the Russian Science Foundation (project no. 18-74-00108). Identification of the cytotoxic properties of enzymes was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 17-00-00060)

Figure Captions

Fig. 1. SDS electrophoresis (a) and zymogram (b) of binase and Glu43Ala/Phe81Ala mutant. WT – wild-type binase, Mut – Glu43Ala/Phe81Ala binase mutant, M – molecular mass markers. Proteins per well – 10 µg.

Fig. 2. Structural organization of binase and Glu43Ala/Phe81Ala mutant under native conditions: a) native electrophoresis: WT – wild-type binase (pI 9.52), Mut – Glu43Ala/Phe81Ala mutant of binase (pI 9.69), R – RNase A (MM – 13 kDa, pI 9.64), L – lysozyme (MM – 14.4 kDa, pI 11.3); b) size-exclusion chromatography of binase and its mutant (pH 8.0).

References

1. Makarov A.A., Ilinskaya O.N. Cytotoxic ribonucleases: Molecular weapons and their targets (review). *FEBS Lett.*, 2003, vol. 540, nos. 1–3, pp. 15–20. doi: 10.1016/S0014-5793(03)00225-4.
2. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents. *BioEssays*, 2008, vol. 30, no. 8, pp. 781–790. doi: 10.1002/bies.20789.
3. 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, vol. 11, no. 10, pp. 2522–2525. doi: 10.1110/ps.0216702.
4. 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, Mol. Cell Res.*, 2016, vol. 1863, no. 7, pp. 1559–1567. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.04.005.
5. Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Kretova O.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, vol. 9, no. 13, pp. 2674–2678. doi: 10.4161/cc.9.13.12150.
6. 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, vol. 10, no. 23, pp. 4090–4097. doi: 10.4161/cc.10.23.18210.
7. Ilinskaya O., Decker K., Koschinski A., Dreyer F., Repp H. *Bacillus intermedius* ribonuclease as inhibitor of cell proliferation and membrane current. *Toxicology*, 2001, vol. 156, nos. 2–3, pp. 101–107. doi: 10.1016/S0300-483X(00)00335-8.
8. Ilinskaya O.N., Koschinski A., Repp H., Mitkevich V., Dreyer F., Scholtz J.M., Pace C.N., Makarov A. RNase induced apoptosis: Fate of calcium-activated potassium channels. *Biochimie*, 2008, vol. 90, no. 5, pp. 717–725. doi: 10.1016/j.biochi.2008.01.010.
9. Mitkevich V.A., Tchurikov N.A., Zelenikhin P.V., Petrushanko I.Yu., Makarov A.A., Ilinskaya O.N. Binase cleaves cellular noncoding RNAs and affects coding mRNAs. *FEBS J.*, 2010, vol. 277, no. 1, pp. 186–196. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07471.x.
10. Mitkevich V.A., Schulga A.A., Trofimov A.A., Dorovatovskii P.V., Goncharuk D.A., Tkach E.N., Makarov A.A., Polyakov K.M. Structure and functional studies of the ribonuclease binase Glu43Ala/Phe81Ala mutant. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2013, vol. 69, no. 6, pp. 991–996. doi: 10.1107/S0907444913004046.
11. Dudkina E., Kayumov A., Ulyanova V., Ilinskaya O. New insight into secreted ribonuclease structure: Binase is a natural dimer. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 12, art. e115818, pp. 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0115818.

12. 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* ribonucleas. *FEBS Open Bio*, 2016, vol. 6, no. 1, pp. 24–32. doi: 10.1002/2211-5463.12023.
13. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685. doi: 10.1038/227680a0.
14. Polyakov K.M., Goncharuk, D.A., Trofimov, A.A., Safonova, T.N., Mitkevich V.A., Tkach E.N., Makarov A.A., Shulga A.A. X-ray diffraction and biochemical studies of W34F mutant ribonuclease binase. *Mol. Biol.*, 2010, vol. 44, no. 5, pp. 817–822. doi: 10.1134/S0026893310050195.
15. Adjei A.A. Ras signaling pathway proteins as therapeutic targets. *Curr. Pharm. Des.*, 2001, vol. 7, no. 16, pp. 1581–1594. doi: 10.2174/1381612013397258.
16. Bos J.L. *ras* oncogenes in human cancer: A review. *Cancer Res.*, 1989, vol. 49, no. 17, pp. 4682–4689.

Для цитирования: Дудкина Е.В., Ульянова В.В., Сурченко Ю.В., Нгуен Н.Т., Колпаков А.И., Ильинская О.Н. Кристаллическая структура биназы не отражает ее нативную конформацию // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2018. – Т. 160, кн. 4. – С. 591–600.

For citation: Dudkina E.V., Ulyanova V.V., Surchenko Yu.V., Nguen N.T., Kolpakov A.I., Ilinskaya O.N. Crystal structure of binase does not reflect its native conformation. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2018, vol. 160, no. 4, pp. 591–600. (In Russian)