

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc687285>

EDN: GPZSMN



# Рецептор эпидермального фактора роста как мишень противоопухолевого действия мутантных форм биназы

А.И. Надырова, Е.В. Дудкина, Э.М. Хафизова, А.Д. Пестов, А.С. Коснырев, В.В. Ульянова, О.Н. Ильинская

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

## АННОТАЦИЯ

**Обоснование.** Рецептор эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR) — один из ключевых белков клеточного сигналинга, контролирующего каскады митоген-активируемых протеинкиназ (mitogen-activated protein kinase, MAPK). Нарушение функционирования EGFR ассоциировано с развитием различных опухолевых заболеваний, что указывает на актуальность разработки таргетных анти-EGFR-препараторов. Одним из перспективных противоопухолевых агентов, способных взаимодействовать с EGFR, является рибонуклеаза (РНКаза) *Bacillus pumilus* — биназа, цитотоксический потенциал которой в первую очередь обусловлен её активностью в отношении внутриклеточной РНК. При этом мутантные формы биназы K26A и H101E со сниженной каталитической активностью также обладают противоопухолевыми свойствами.

**Цель.** Оценить вклад взаимодействия мутантных форм биназы с EGFR в их цитотоксический потенциал.

**Методы.** Характеристику антитролиферативной активности биназы и её мутантных форм — K26A и H101E с остаточной каталитической активностью в размере 11,0 и 0,02% соответственно — проводили методом МТТ-теста на линии клеток эпидермоидной карциномы A431 с повышенным уровнем экспрессии EGFR дикого типа. Взаимодействие РНКаз с EGFR и их способность модулировать MAPK/ERK-каскад исследовали с помощью иммунофлуоресцентного анализа. Гипотетические модели белок-белкового взаимодействия конструировали с использованием средств компьютерного моделирования. Антимиграционную активность РНКаз оценивали в стандартном тесте на зарастание царапины.

**Результаты.** Установлено, что биназа и её мутанты снижают пролиферативную активность опухолевых клеток A431 на 40%. Предварительная обработка клеток моноклональным антителом к EGFR цетуксимабом приводит к ослаблению цитотоксического потенциала мутантов биназы. С помощью средств компьютерного моделирования показано, что исследуемые РНКазы способны взаимодействовать с EGFR, при этом предсказано, что биназа обладает большей аффинностью к АТФ-связывающему сайту тирозинкиназного домена, а мутантные производные — к области, отвечающей за эндоцитоз рецептора. Это может опосредовать наблюдаемые различия в скорости интернализации EGFR. В отличие от биназы и мутанта K26A, каталитически неактивный мутант H101E не обладает антимиграционной активностью, что указывает на важность наличия определённого уровня ферментативной активности.

**Заключение.** EGFR является мишенью цитотоксического действия мутантных форм биназы, взаимодействие с ним приводит к ингибиции сигнального пути MAPK/ERK и гибели опухолевых клеток.

**Ключевые слова:** рецептор эпидермального фактора роста; рибонуклеаза; биназа; каталитическая активность; белок-белковое взаимодействие; антимиграционная активность.

## Как цитировать:

Надырова А.И., Дудкина Е.В., Хафизова Э.М., Пестов А.Д., Коснырев А.С., Ульянова В.В., Ильинская О.Н. Рецептор эпидермального фактора роста как мишень противоопухолевого действия мутантных форм биназы // Гены и клетки. 2025. Т. 20, № 4. С. 347–358. DOI: 10.17816/gc687285 EDN: GPZSMN

# Epidermal Growth Factor Receptor as a Target of Antitumor Activity of Binase Mutants

Alsou I. Nadyrova, Elena V. Dudkina, Elvira M. Khafizova, Alexander D. Pestov,  
Alexander S. Kosnyrev, Vera V. Ulyanova, Olga N. Ilinskaya

Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** The epidermal growth factor receptor (EGFR) is one of the key proteins in cell signaling that regulates mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways. EGFR dysregulation is associated with various neoplasms, highlighting the importance of developing targeted EGFR inhibitors. Binase, a ribonuclease (RNase) from *Bacillus pumilus*, is a promising antitumor agent capable of interacting with EGFR. Its cytotoxic potential is primarily determined by its activity against intracellular RNA. Binase mutants with reduced catalytic activity, K26A and H101E, also demonstrate antitumor properties.

**AIM:** This study aimed to assess the effect of interactions between binase mutants and EGFR on their cytotoxic potential.

**METHODS:** The antiproliferative activity of binase and its mutants K26A and H101E, with residual catalytic activity of 11.0% and 0.02%, respectively, was evaluated using the MTT assay in A431 epidermoid carcinoma cells, which overexpress wild-type EGFR. Immunofluorescence analysis was used to examine the interactions of RNases with EGFR and their ability to modulate the MAPK/ERK pathway. Hypothetical protein–protein interaction models were generated using computational modeling. The antimigratory activity of RNases was assessed using the standard scratch assay.

**RESULTS:** Binase and its mutants reduced the proliferative activity of A431 tumor cells by 40%. Pretreatment of cells with the monoclonal anti-EGFR antibody cetuximab attenuated the cytotoxic potential of binase mutants. Computational modeling indicated that the tested RNases may interact with EGFR, with binase having a higher affinity for the ATP-binding site of the tyrosine kinase domain and the mutant derivatives binding preferentially to regions involved in receptor endocytosis. This may underlie the observed differences in EGFR internalization rates. Unlike binase and the K26A mutant, the catalytically inactive H101E mutant lacks antimigratory activity, indicating the importance of maintaining a certain level of enzymatic activity.

**CONCLUSION:** EGFR is a target of the cytotoxic activity of binase mutants, and their interaction inhibits the MAPK/ERK signaling pathway and causes tumor cell death.

**Keywords:** epidermal growth factor receptor; ribonuclease; binase; catalytic activity; protein–protein interaction; antimigratory activity.

## To cite this article:

Nadyrova AI, Dudkina EV, Khafizova EM, Pestov AD, Kosnyrev AS, Ulyanova VV, Ilinskaya ON. Epidermal Growth Factor Receptor as a Target of Antitumor Activity of Binase Mutants. *Genes & cells*. 2025;20(4):347–358. DOI: 10.17816/gc687285 EDN: GPZSMN

## ОБОСНОВАНИЕ

Известно, что ферменты, участвующие в метаболизме РНК, способны индуцировать гибель опухолевых клеток. Противоопухолевые свойства обнаружены у рибонуклеаз (РНКаз) различного происхождения, включая РНКазы млекопитающих (BS-РНКаза, РНКаза А) [1, 2], амфибий (онконаза) [3], грибов (альфа-сарцин) [4] и бактерий (биназа, барназа и др.) [5, 6]. Молекулярные механизмы онкологического действия РНКаз сильно разнятся, однако первостепенная роль в проявлении их цитотоксичности обусловлена способностью ферментов гидролизовать внутриклеточную РНК. Для инициации апоптоза в опухолевых клетках достаточно наличия минимального уровня каталитической активности. Так, РНКаза *Rana pipiens* (онконаза) теряла цитотоксический эффект при остаточной активности 2%, а катионные мутанты РНКазы А и РНКазы 1 человека — при 0,01% [7, 8]. Для РНКазы *Bacillus pumilus* (биназы) цитотоксичность остаётся неизменной при остаточной активности 11,0%, полученной при точечной замене K26A, и пропадает при активности 0,02% в случае мутантной формы H101E [9]. Снижение РНКазной активности ослабляет генотоксические [10] и нефротоксические [11] эффекты нативного фермента, что является несомненным преимуществом для разработки потенциальных противоопухолевых препаратов на основе мутантов биназы.

Помимо каталитической активности вклад в антипролиферативные свойства биназы вносят заряд молекулы, способность к белок-белковому взаимодействию с клеточными компонентами, отсутствие чувствительности к ингибитору РНКазы млекопитающих RI, а также олигомерная структура белков [12–15]. Показано, что значимую роль в апоптоз-индуцирующем действии биназы играет её способность модулировать активность сигнального пути митоген-активируемых протеинкиназ (mitogen-activated protein kinase, MAPK) посредством взаимодействия с рецептором эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR) и онкогеном RAS [15, 16].

Сигнальный каскад MAPK, регулируемый EGFR, включает три основных сигнальных пути RAS/RAF/MAPK, PI3K/Akt/mTOR, JAK/STAT и контролирует жизненно-важные процессы в клетке, такие как пролиферация, дифференцировка, выживаемость и апоптоз [17]. Генетические нарушения в компонентах сигнальных путей приводят к злокачественной трансформации клеток. Поиск агентов, способных модулировать MAPK-какад за счёт прямого взаимодействия с EGFR, — одно из многообещающих направлений в противоопухолевой терапии.

## ЦЕЛЬ

Целью данной работы стала оценка вклада взаимодействия мутантных форм биназы с EGFR в их цитотоксический потенциал.

## МЕТОДЫ

### Условия культивирования опухолевых клеток

Культуру клеток эпидермоидной карциномы человека A431 (ATCC CRL 1555) растили на среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина, пенициллина–стрептомицина и канамицина (по 100 ед./мл) при температуре 37 °C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

### Цитотоксические агенты

Клетки обрабатывали РНКазой *B. pumilus* — биназой (12,2 кДа, рI 9,5) — и её мутантными производными со сниженной каталитической активностью K26A и H101E, полученными ранее [9]. Ферменты использовали в диапазоне концентраций 10–300 мкг/мл. Моноклональное антитело к рецептору EGFR — цетуксимаб (Merck, Германия) — использовали в концентрации 100 мкг/мл.

### Оценка пролиферативной способности клеток

Пролиферативную активность клеток оценивали в МТТ-тесте. Клетки засевали в 96-луночные плоскодонные планшеты в количестве 1,5·10<sup>4</sup> на лунку и растили до образования 60% монослоя. Среду заменяли на свежую с добавлением РНКаз (10–300 мкг/мл) и/или цетуксимаба (100 мкг/мл), клетки инкубировали в течение 48 ч. Последовательную обработку клеток проводили, инкубируя их с цетуксимабом в течение 24 ч, затем среду заменяли на свежую с РНКазами и инкубировали еще 48 ч. Далее среду отбирали, добавляли 0,5 мг/мл 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромида (МТТ; «Диаэм», Россия) и инкубировали до образования кристаллов формазана, которые затем растворяли в диметилсульфоксиде («Татхимфармпрепараты», Россия). Оптическую плотность раствора измеряли по разности поглощения при длинах волн Δ(A570–A630) на спектрофотометре xMark (Bio-Rad, США). Жизнеспособность необработанных клеток принимали за 100%. Долю жизнеспособных клеток рассчитывали по формуле: Доля жизнепоспособных клеток (%) = (ОП обработанной группы – ОП среды) / (ОП контрольной группы – ОП среды) × 100.

### Оценка миграционной активности клеток

Миграционную активность клеток оценивали в стандартном тесте на зарастание царапины. Клетки засевали в 24-луночные плоскодонные планшеты по 3,5·10<sup>5</sup> на лунку и растили до образования монослоя. По поверхности монослоя с помощью наконечника для автоматической пипетки (200 мкл) проводили прямые линии шириной ~1,2 мм. Далее клетки промывали фосфатно-солевым буфером (NaCl — 8,0 г/л; KCl — 0,2 г/л; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> — 1,44 г/л; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 0,24 г/л; pH 7,4) для удаления открепившихся и инкубировали в бессывороточной среде с РНКазами в диапазоне концентраций 10–100 мкг/мл в течение 48 ч.

Степень зарастания «царапины» оценивали в нулевой временной точке и после культивирования в течение 24 и 48 ч, изображения фиксировали с помощью микроскопа Axio Imager 2 (Carl Zeiss, Япония). Площадь царапины измеряли с использованием сервисной опции free hand selection программного пакета ImageJ [18]. Степень зарастания царапины ( $d$ ) рассчитывали по формуле:  $d = (1 - S_t/S_0) \times 100\%$ , где  $S_t$  — площадь царапины через 24 и 48 ч после нанесения царапины;  $S_0$  — площадь царапины в нулевой временной точке.

## Иммунофлуоресцентный анализ

Клетки засевали в количестве  $1,8 \cdot 10^4$  на стерильные покровные стекла, помещённые в лунки 48-луночного плоскодонного планшета, и растягивали РНКазами (100 мкг/мл) в течение 1 мин, 5 мин, 15 мин, 1 ч и 6 ч или цетуксимабом (100 мкг/мл) в течение 24 ч. Для определения уровня фосфорилирования киназы ERK1/2 клетки последовательно обрабатывали цитотоксическими агентами, промывали фосфатно-солевым буфером и инкубировали с эпидермальным фактором роста (epidermal growth factor, EGF; Sigma-Aldrich, США) в концентрации 100 нг/мл в течение 30 мин. Подготовку клеток к иммуноокрашиванию проводили по методике, описанной ранее [14]. Клетки инкубировали с первичными кроличьими антителами к биназе (1:25, получены ранее [19]) и p-ERK1/2 (1:75; Abclonal, Китай), мышиными антителами к EGFR (1:50; Santa Cruz, США) при 4 °C в течение ночи. Затем клетки инкубировали со вторичными антимышьяшными антителами козы, коньюгированными с Alexa Fluor 555 (1:200; Abcam, США) и антикроличьими антителами козы, коньюгированными с Alexa Fluor 647 (0,1 мкг/10<sup>6</sup> клеток; Abcam, США) в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте. Для окраски ядер клетки инкубировали в течение 15 мин с 4,6-диамино-2-фенилиндолом (Servicebio, Китай) при 37 °C. Клетки консервировали в среде для фиксации биологического материала (Servicebio, Китай). Визуализацию белков проводили с помощью лазерного сканирующего микроскопа Olympus IX83 (Olympus, Япония), оснащённого модулем STEDYCON (Abberior Instruments, Германия) для конфокальной визуализации, при длине волны возбуждения лазера 405 нм для 4,6-диамино-2-фенилиндола, 647 нм — для Alexa Fluor 647 и 488 нм — для Alexa Fluor 555.

## Моделирование

Для моделирования использовали кристаллическую структуру биназы дикого типа из базы данных Protein Data Bank (1GOU). Трёхмерные структуры тирозинкиназного домена EGFR и мутантных форм биназы K26A и H101E моделировали с использованием алгоритма AlphaFold 3 [20]. Затем на веб-сервере ClusPro [21] предсказывали возможные конфигурации гетеродимеров тирозинкиназного домена EGFR и одной из форм биназы. Потенциальные

взаимодействия между аминокислотными остатками исследуемых белков и значения псевдоэнергии димеризации определяли с помощью инструмента PPCheck [22]. Отбирали модели с наиболее низкими значениями псевдоэнергии, отражающими наибольшую вероятность самоизвестного образования белок-белкового комплекса. Визуализацию гетеродимеров выполняли в программе Swiss-PdbViewer.

## Статистическая обработка результатов

Эксперименты проводили в трёх технических и трёх биологических повторностях. Для статистической обработки результатов использовали программный пакет Prism 10 (GraphPad, США). Данные представляли в виде средних значений (M) со стандартным отклонением (SD). Статистическую значимость различий значений между группами оценивали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA и post-hoc теста Тьюки. Различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Антипролиферативный потенциал биназы и её мутантных форм

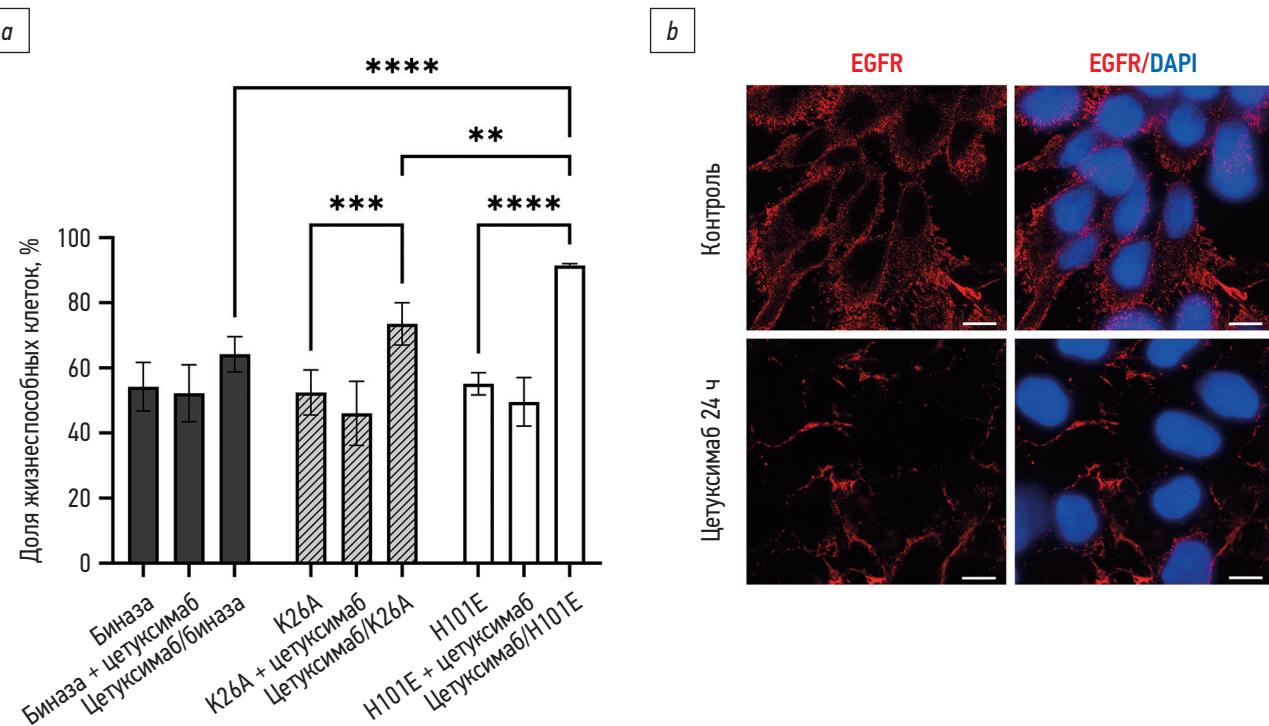
Для оценки антипролиферативного потенциала биназы и её мутантных форм опухолевые клетки A431 обрабатывали РНКазами в течение 48 ч в концентрации 300 мкг/мл. Для подтверждения EGFR-опосредованной цитотоксичности РНКаз проводили комбинированную и ступенчатую обработку клеток A431 исследуемыми ферментами и известным анти-EGFR-агентом цетуксимабом в концентрации 100 мкг/мл.

Показано, что РНКазы снижают жизнеспособность клеток примерно на 40%, их комбинация с цетуксимабом не приводит к усилению противоопухолевого эффекта. Блокировка EGFR цетуксимабом не оказывает значимого влияния на цитотоксичность биназы, но снижает пролиферативную активность клеток под действием мутантов K26A и H101E на 20 и 10% соответственно (рис. 1, a), что обусловлено элиминацией EGFR с клеточной мембраны (рис. 1, b).

Таким образом, при снижении каталитической активности доминирующую роль для проявления антипролиферативного эффекта играет способность мутантов взаимодействовать с рецептором.

### Оценка способности биназы и её мутантных форм взаимодействовать с EGFR

Для оценки способности мутантов биназы со сниженной каталитической активностью взаимодействовать с EGFR проведён иммунофлуоресцентный анализ на линии клеток A431 эпидермоидной карциномы, характеризующейся высоким уровнем экспрессии EGFR. Опухолевые клетки обрабатывали биназой и её мутантными



**Рис. 1.** Влияние цетуксимаба на цитотоксичность биназы и её производных по отношению к клеткам A431: а — оценка жизнеспособности клеток, обработанных биназой, мутантами K26A и H101E, при совместной (+цетуксимаб) или предварительной (цетуксимаб/) обработке цетуксимабом. Жизнеспособность необработанных клеток принята за 100%; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; б — детекция рецептора эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR) в клетках, обработанных цетуксимабом, в течение 24 ч. Контроль — клетки без обработки. Красное окрашивание — EGFR, синее — ядра клеток. Бар 10 мкм.

**Fig. 1.** Effect of cetuximab on the cytotoxicity of binase and its derivatives against A431 cells: а, assessment of cell viability after treatment with binase and K26A and H101E mutants, either simultaneously with cetuximab (+cetuximab) or after pretreatment with cetuximab (cetuximab/). Viability of untreated cells was set as 100%; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; б, epidermal growth factor receptor (EGFR) detection in cells treated with cetuximab for 24 hours. Control: untreated cells. Red staining, EGFR; blue staining, cell nuclei. Scale bar = 10  $\mu$ m.

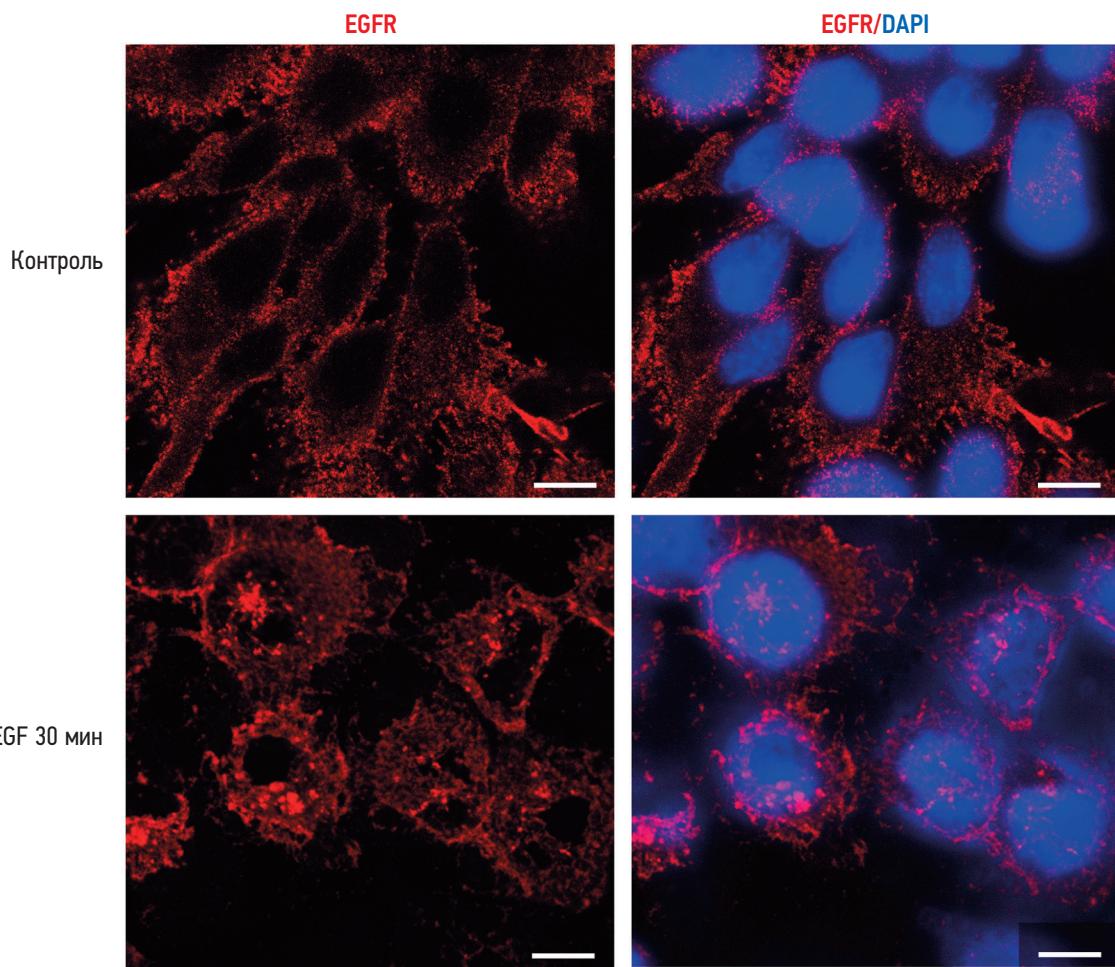
производными в концентрации 100 мкг/мл в течение 24 ч. Установлено, что биназа спустя 5 мин инкубации находится в приядерной зоне, а на 15-й минуте визуализируется в ядре; выход фермента в цитоплазму регистрируется на 6-й час. При этом на начальном этапе инкубации (5 мин) биназа колокализуется с EGFR на клеточной мембране (приложение 1, а). Взаимодействие РНКазы с рецептором запускает его интернализацию (15 мин), спустя час EGFR частично визуализируется вокруг ядра, а его рециркуляция на мембрану происходит на 6-й час. В это же время вновь детектируется колокализация биназы и EGFR на мембране (см. приложение 1, а).

Локализация мутантов биназы K26A и H101E в клетках A431 была аналогичной нативному ферменту (приложение 1, б, с). Колокализация EGFR и РНКаз также детектировалась на мембране на 5-й минуте и на 6-й час инкубации. При этом производные биназы вызывали менее активную интернализацию рецептора, в отличие от природного лиганда EGFR — EGF, обработка клеток которым (100 нг/мл) в течение 30 мин приводила к быстрой интернализации рецептора: EGFR полностью локализовался вокруг ядра (рис. 2).

Характер белок-белковых взаимодействий РНКаз с тирозинкиназным доменом EGFR оценивали с помощью

средств молекулярного моделирования. Предсказано, что биназа способна взаимодействовать С-концевым доменом с каталитическим АТФ-связывающим сайтом EGFR за счет ван-дер-ваальсовых сил (рис. 3, а). При этом аминокислотные остатки активного центра биназы и С-конца EGFR могут вступать в электростатическое взаимодействие: H101 — с D1072, а K26 — с E1079 и D1080. Псевдоэнергия образованного гетеродимера составила  $-306$  кДж/моль, что может говорить о самопроизвольном формировании комплекса и высоком сродстве белков друг к другу. Подобное взаимодействие способно подавить активируемое EGF аутофосфорилирование и, как следствие, ингибиовать нижестоящие сигнальные каскады.

Для мутантной формы биназы K26A связывание с рецептором, вероятно, происходит вблизи остатков S991 и Y998 (рис. 3, б). В образовании контактов могут участвовать как N-концевые, так и С-концевые аминокислотные остатки, при этом взаимодействие имеет преимущественно электростатическую природу. Псевдоэнергия комплекса составила  $-330$  кДж/моль, что отражает высокую устойчивость гетеродимера. Известно, что остатки EGFR S991 и Y998 принимают участие в эндоцитозе рецептора [23] для его последующей убиквитин-зависимой деградации. Следовательно, биназа с мутацией K26A,



**Рис. 2.** Иммунофлуоресцентный анализ распределения рецептора эпидерmalного фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR) в клетках A431, обработанных EGF в дозе 100 нг/мл в течение 30 мин. Контроль — клетки без обработки. Красное окрашивание — EGFR, синее — ядра клеток. Бар 10 мкм.

**Fig. 2.** Immunofluorescence analysis of epidermal growth factor receptor (EGFR) distribution in A431 cells treated with epidermal growth factor (EGF) 100 ng/mL for 30 minutes. Control: untreated cells. Red staining, EGFR; blue staining, cell nuclei. Scale bar = 10  $\mu$ m.

по всей вероятности, предотвращая фосфорилирование этих остатков, блокирует деградацию рецептора, сохранив при этом его рециркуляцию. Взаимодействие мутанта биназы H101E с рецептором может происходить аналогичным образом (рис. 3, c), однако стыковка будет осуществляться за счёт электростатических и ван-дер-ваальсовых сил преимущественно в N-концевой области РНКазы. Псевдоэнергия образованного комплекса (~322 кДж/моль) указывает на высокую степень сродства мутанта H101E к рецептору.

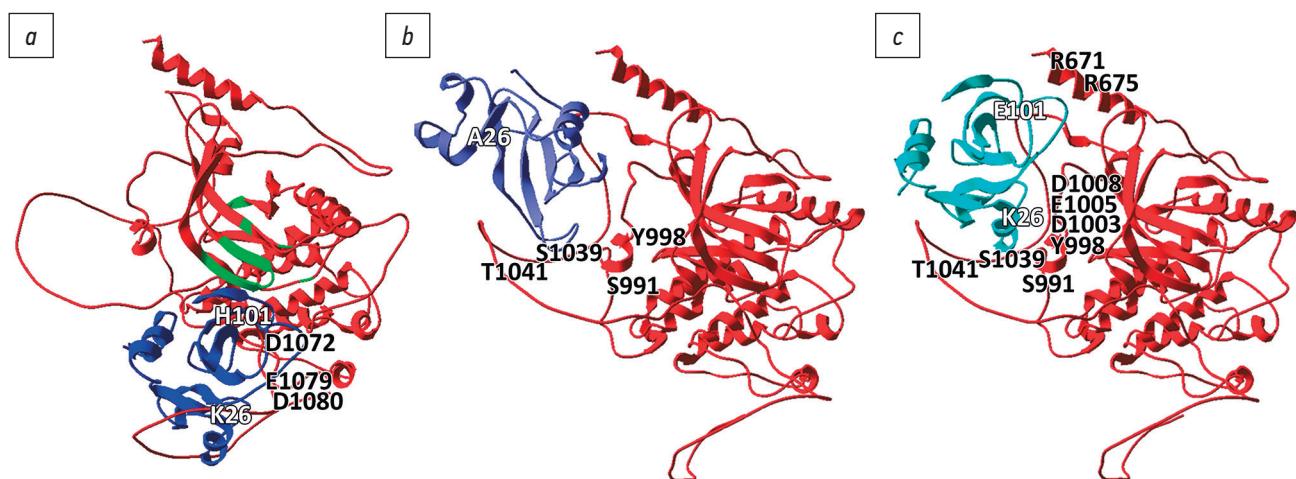
### Оценка способности биназы и её мутантных форм модулировать MAPK-каскад

Несмотря на способность РНКаз и EGF взаимодействовать с EGFR, их влияние на модуляцию MAPK-каскада различается. Для оценки влияния РНКаз на активацию киназы ERK1/2 клетки A431 последовательно обрабатывали биназой и её производными в течение 5 мин, 15 мин и 1 ч, а затем EGF — в течение 30 мин. Показано, что EGF вызывает активацию пути MAPK/ERK, что подтверждается

детекцией фосфорилированной формы киназы ERK1/2 через 30 мин инкубации (рис. 4). Предварительная обработка клеток РНКазами снижает уровень фосфорилирования киназы ERK1/2, блокируя EGF-опосредованную трансдукцию сигнала, при этом максимальное ингибирование регистрировалось через 15 мин инкубации (см. рис. 4). Обработка клеток моноклональным антителом против EGFR цетуксимабом в течение 1 ч приводила к полному блокированию активации киназы ERK (см. рис. 4).

### Оценка antimиграционной активности биназы и её мутантных форм

Оценку antimиграционной активности биназы и её мутантов проводили в teste на зарастание царапины. Клетки обрабатывали РНКазами в нетоксичных концентрациях 10, 50 и 100 мкг/мл, что было подтверждено в MTT-тесте (рис. 5, b). Показано, что биназа через 48 ч инкубации в концентрации 10 мкг/мл снижает миграционную активность клеток A431 на 40%, в концентрациях 50 и 100 мкг/мл — на 50% (рис. 5, a, d). Мутант биназы K26A



**Рис. 3.** Трёхмерные модели взаимодействия биназы и её мутантных форм K26A и H101E с тирозинкиназным доменом рецептора эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR): *a* — гипотетическая модель взаимодействия биназы дикого типа с каталитическим АТФ-связывающим сайтом рецептора, осуществляющим лиганд-индукцируемое фосфорилирование; *b* и *c* — гипотетические модели взаимодействия мутантов биназы K26A и H101E соответственно с аминокислотными остатками S991 и Y998 EGFR, вовлечёнными в деградацию EGFR. Биназа окрашена синим, мутант биназы K26A — светло-фиолетовым, мутант биназы H101E — голубым. EGFR окрашен красным, зелёным выделен каталитический сайт рецептора. Буквенно-числовыми символами отмечены фосфорилируемые аминокислотные остатки EGFR S991, Y998, S1039 и T1041; остатки R671, R675, D1003, E1005, D1008, D1072, E1079 и D1080, вступающие в электростатическое взаимодействие с аминокислотами активного центра биназы в положениях 26 и 101; а также локализация мутаций A26 и E101 в молекуле биназы.

**Fig. 3.** Three-dimensional models of binase and its mutants K26A and H101E interacting with the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor (EGFR): *a*, hypothetical model of wild-type binase binding to the catalytic ATP-binding site of the receptor responsible for ligand-induced phosphorylation; *b*, *c*, hypothetical models of binase mutants K26A and H101E, respectively, interacting with EGFR amino acid residues S991 and Y998 involved in EGFR degradation. Binase is shown in blue, the K26A mutant in light purple, and the H101E mutant in light blue. EGFR is shown in red, with the catalytic site of the receptor highlighted in green. Alphanumeric labels indicate phosphorylated EGFR amino acid residues S991, Y998, S1039, and T1041; residues R671, R675, D1003, E1005, D1008, D1072, E1079, and D1080 that form electrostatic interactions with the amino acids of the binase active site at positions 26 and 101; and locations of mutations A26 and E101 in the binase molecule.

проявлял свой антимиграционный потенциал во всех исследуемых концентрациях, снижая скорость миграции клеток на 30% (см. рис. 5, *a*, *d*). При этом мутант биназы H101E не обладал способностью блокировать миграцию опухолевых клеток A431.

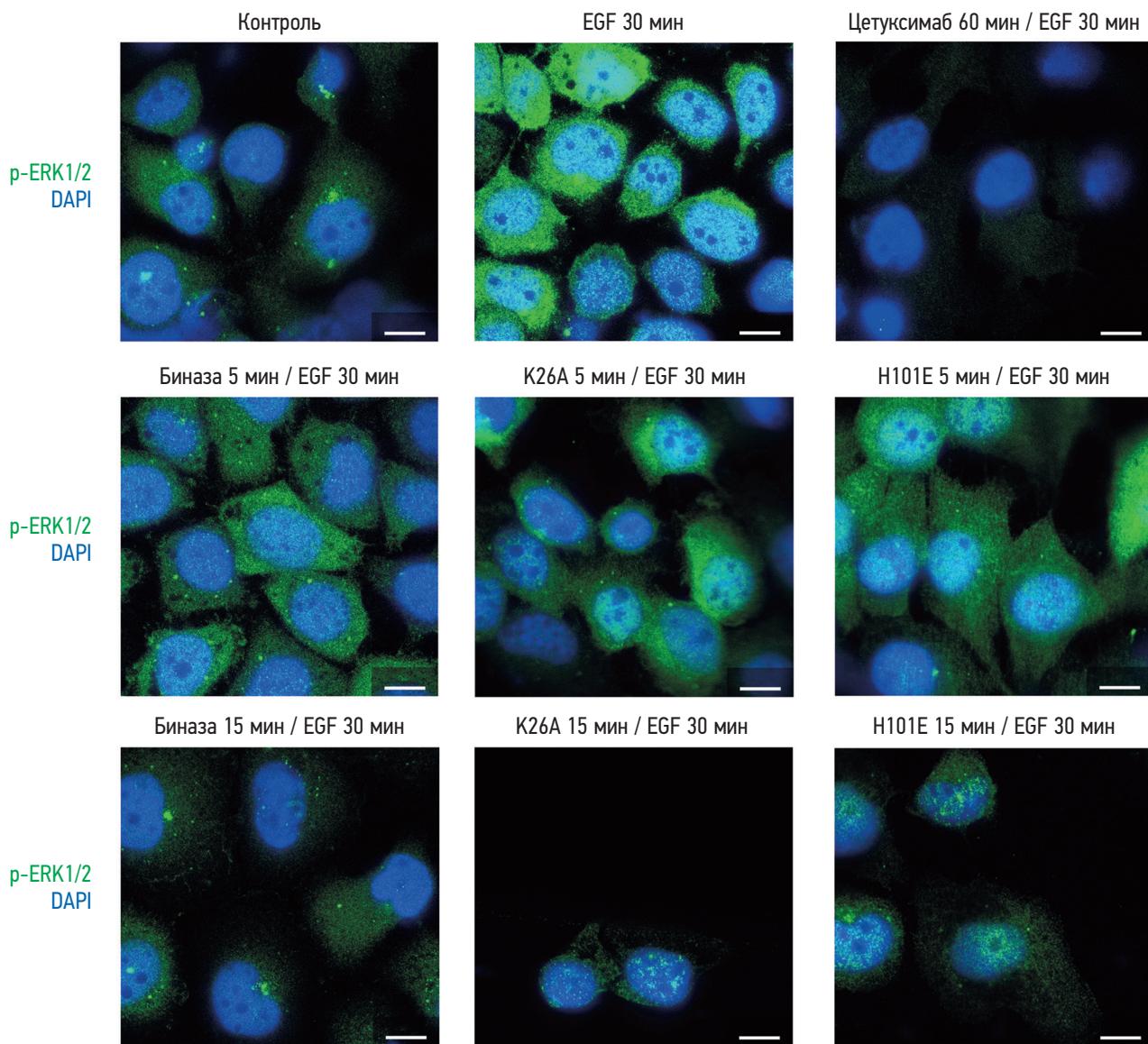
## ОБСУЖДЕНИЕ

Среди представителей семейства рецепторных тирозинкиназ ErbB наиболее изучен EGFR. Он регулирует сигнальные пути, отвечающие за пролиферацию, дифференцировку, миграцию, выживаемость и апоптоз клеток. Нарушение EGFR-опосредованного сигналинга является одной из наиболее частых причин развития злокачественной трансформации клеток [24], в связи с чем EGFR представляет собой привлекательную мишень для разработки таргетных препаратов в противоопухолевой терапии. Так, первые анти-EGFR-препараты — моноклональные антитела цетуксимаб и панитумумаб — были созданы для лечения метастатического колоректального рака, экспрессирующего EGFR дикого типа, однако их эффективность значительно снижается при возникновении мутаций во внеклеточном домене рецептора и нижележащих компонентах путей [25, 26]. Для преодоления данной проблемы были разработаны малые ингибиторы тирозинкиназ, активных в отношении EGFR с мутациями ex19del и ex21 (L858R). При этом возникновение мутаций EGFR T790M/C797S ограничивает

применение подавляющего большинства ингибиторов тирозинкиназ [27]. В связи с этим проблема разработки альтернативных терапевтических стратегий и поиска новых анти-EGFR-агентов стоит наиболее остро.

Ранее было показано, что РНКаза *B. pumilus* (биназа) способна взаимодействовать с EGFR в клетках трижды-негативного рака молочной железы BT-20, что приводило к блокированию MAPK-каскада и гибели опухолевых клеток [15]. Для уменьшения нефротоксичности биназы были получены её мутантные формы K26A и H101E со сниженной каталитической активностью, цитотоксический потенциал которых варьировал в зависимости от линии опухолевых клеток [10, 11]. Так, показано, что мутант биназы H101E в отличие от K26A не обладает антипrolиферативным потенциалом по отношению к линиям клеток аденокарциномы лёгких A549, аденокарциномы двенадцатиперстной кишки HuTu80, трижды-негативного рака молочной железы BT-20 [9]. Нами обнаружено, что оба мутанта проявляют схожее с нативным ферментом цитотоксическое действие в отношении клеток эпидермоидной карциномы A431, характеризующихся гиперэкспрессией EGFR дикого типа (см. рис. 1, *a*). Мы предположили, что EGFR также является мишенью цитотоксического действия мутантных РНКаз.

Методом иммунофлуоресцентного анализа было подтверждено, что биназа и её производные способны взаимодействовать с EGFR в клетках A431 (см. приложение 1).

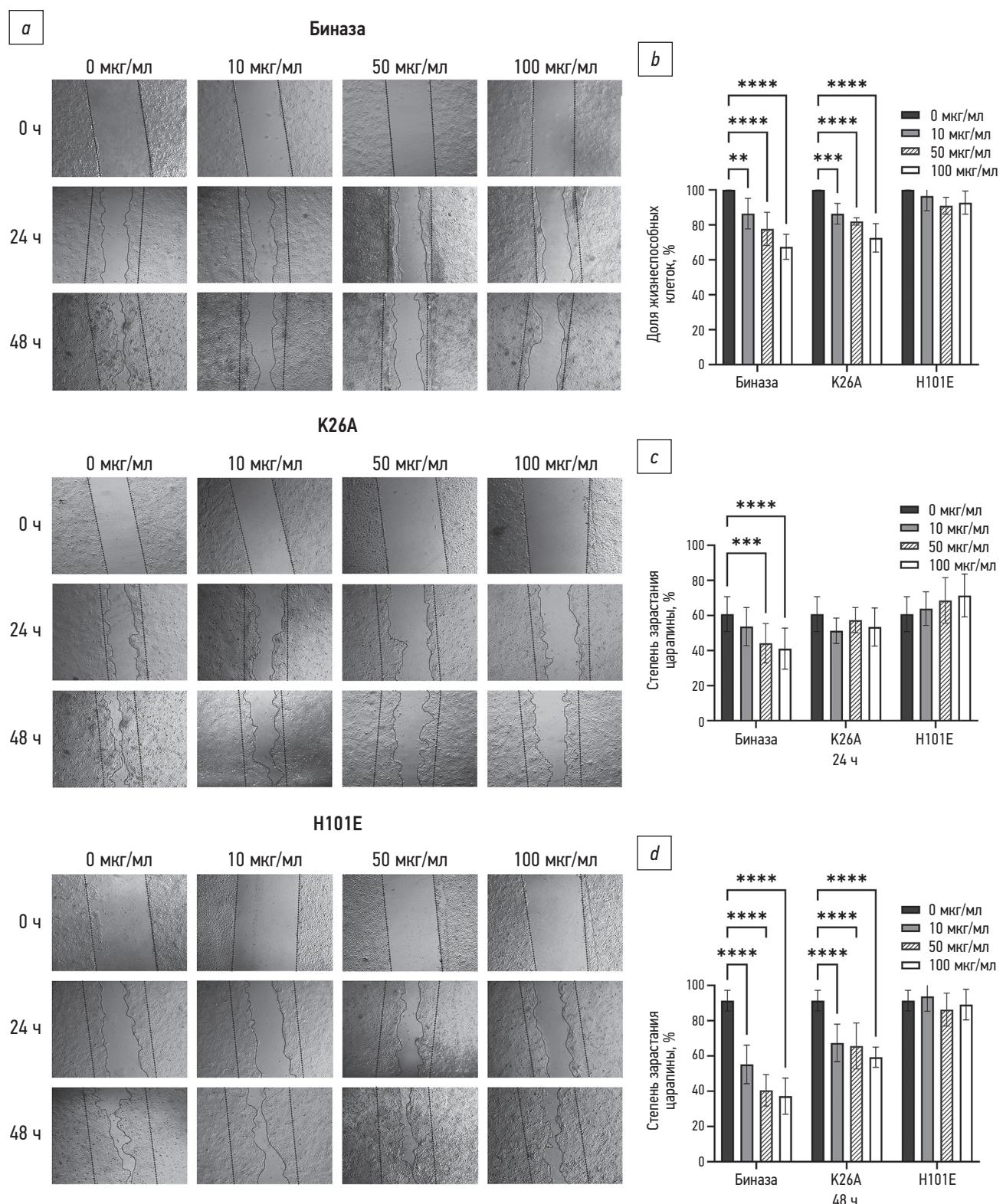


**Рис. 4.** Иммунофлуоресцентный анализ уровня фосфорилирования киназы ERK1/2 в клетках A431 после обработки биназой, мутантными формами K26A и H101E в дозе 100 мкг/мл в течение 5 и 15 минут, эпидермальным фактором роста (growth factor receptor, EGF) в дозе 100 нг/мл в течение 30 минут и цетуксимабом в дозе 100 мкг/мл в течение 60 минут. Контроль — клетки без обработки. Бар 10 мкм.

**Fig. 4.** Immunofluorescence analysis of ERK1/2 phosphorylation in A431 cells after treatment with binase and its mutants K26A and H101E (100 µg/mL, 5 and 15 minutes), epidermal growth factor (EGF, 100 ng/mL, 30 minutes), and cetuximab (100 µg/mL, 60 minutes). Control: untreated cells. Scale bar = 10 µm.

РНКазы уже на первой минуте инкубации проникают и полностью распределяются внутри клетки, при этом их взаимодействие с рецептором не регистрируется. Колокализация с EGFR детектируется на мембране лишь на 5-й минуте (см. приложение 1). Вероятно, РНКазы взаимодействуют с внутриклеточным тирозинкиназным доменом рецептора, что вызывает его интернализацию. В случае мутантных форм биназы трафик EGFR внутрь клетки происходит менее активно по сравнению с биназой дикого типа (см. приложение 1). В ходе молекулярного моделирования предсказано, что биназа способна полностью закрывать АТФ-связывающий карман тирозинкиназного домена EGFR, в то время как мутантные формы, вероятно, блокируют области, отвечающие за эндоцитоз рецептора, что может

объяснить менее активную интернализацию EGFR после обработки мутантными РНКазами (см. рис. 3). Связывание РНКаз с рецептором приводит к снижению уровня фосфорилирования ERK и ингибированию сигналинга MAPK-ERK (см. рис. 4). Подобное действие схоже с активностью обратимых ингибиторов тирозинкиназ, блокирующих аутофосфорилирование рецептора и последующую передачу сигнала, а также вызывающих интернализацию рецептора [28]. Роль EGFR как мишени противоопухолевого действия мутантов биназы была подтверждена в МТТ-тесте с использованием моно克лонального анти-EGFR антитела цетуксимаба. Показано, что предобработка клеток цетуксимабом в течение 24 ч приводит к исчезновению флуоресцентного сигнала EGFR (см. рис. 1, b), и это свидетельствует о его



**Рис. 5.** Влияние биназы и мутантных форм K26A и H101E на миграцию и жизнеспособность клеток A431: а — зарастание царапины в монослое клеток A431, культивируемых в присутствии РНКаз в диапазоне концентраций 0–100 мкг/мл в течение 48 ч. Точками обозначены границы изначального повреждения монослоя, сплошными линиями — границы монослоя после инкубации с РНКазами;  $\times 200$ ; б — жизнеспособность клеток A431, обработанных РНКазами в течение 48 ч; в и д — степень зарастания царапины после обработки РНКазами в течение 24 и 48 ч соответственно; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

**Fig. 5.** Effect of binase and its mutants K26A and H101E on migration and viability of A431 cells: а, scratch closure in A431 cell monolayers cultured with RNases at concentrations of 0–100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 48 hours. Dotted lines indicate the boundaries of the initial scratch in the monolayer; solid lines indicate the monolayer boundaries after incubation with RNases;  $\times 200$ ; б, viability of A431 cells treated with RNases for 48 hours; в and д, degree of scratch closure after RNase treatment for 24 hours and 48 hours, respectively; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

деградации [29]. Элиминация EGFR с поверхности клеток ослабляет антитрополиферативный эффект мутантных РНКаз, практически полностью нивелируя цитотоксичность катализически неактивного мутанта биназы H101E (см. рис. 1, а).

Известно, что процессы миграции и инвазии злокачественных клеток регулируются сигнальными каскадами MAPK/ERK и P13K/AKT, находящимися под контролем EGFR [30]. При этом оценка антимиграционной активности РНКаз показала, что биназа обладает наиболее выраженным антиметастатическим эффектом среди исследуемых РНКаз, а мутант H101E не способен блокировать миграционную активность опухолевых клеток. Вероятно, антиметастатический потенциал исследуемых РНКаз обусловлен в первую очередь их катализической активностью. При гидролизе внутриклеточной РНК каталитически активными РНКазами могут образовываться малые интерферирующие РНК (миРНК), способные включаться в процессы посттранскрипционной регуляции экспрессии генов и влиять на миграцию опухолевых клеток. Ранее было показано, что биназа снижает уровень экспрессии онкогенных миРНК миР-21а, миР-10b, миР-155а, миР-31 в сыворотке крови ксеногraftных моделей мышей с лимфосаркомой RLS<sub>40</sub> [31]. При этом активирующую роль в процессах инвазии и метастазирования опухолевых клеток доказана для миР-21а и миР-31 [32].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе охарактеризована способность мутантов биназы со сниженной катализической активностью взаимодействовать с EGFR, а также оценён вклад этого взаимодействия в антитрополиферативное и антиметастатическое действие РНКаз. Установлено, что оба мутанта биназы, также, как и нативный фермент, проявляют цитотоксические свойства в отношении линии клеток A431 эпидермоидной карциномы, характеризующейся высоким уровнем экспрессии EGFR. Показано, что их цитотоксичность обусловлена способностью белков взаимодействовать с EGFR. Блокирование сайта связывания мутантов с EGFR монокlonальным антителом цетуксимабом приводило к снижению цитотоксического потенциала мутантных производных биназы, в особенности катализически неактивного варианта H101E. Связывание РНКаз с рецептором, вероятно, происходит в области тирозин-киназного домена EGFR, вызывая его медленную интернализацию и блокирование активации нижестоящего компонента MAPK-каскада — киназы ERK1/2, что приводит к ингибированию передачи сигнала и гибели опухолевых клеток. Оценка способности мутантов биназы ингибировать метастазирование опухолевых клеток показала, что мутант H101E не обладает антиметастатическими свойствами ввиду отсутствия необходимого уровня катализической активности.

Таким образом, установлено, что цитотоксичность мутантных форм биназы обусловлена их взаимодействием с EGFR, которое приводит к блокированию сигналинга

MAPK/ERK и гибели опухолевых клеток. При этом доказана важность катализической активности для проявления антиметастатического потенциала РНКаз. Особенно перспективной представляется разработка противоопухолевых препаратов на основе мутанта биназы K26A, обладающего схожим с нативным ферментом противоопухолевым эффектом, но с меньшей гено- и нефротоксичностью.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Вклад авторов.** А.И. Надырова — обзор и анализ литературных источников, участие в проведение экспериментов, обработка и анализ полученных результатов, подготовка статьи к публикации; Е.В. Дудкина — участие в проведение экспериментов, обработка и анализ полученных результатов, подготовка статьи к публикации; Э.М. Хафизова, А.Д. Пестов — участие в проведении экспериментов; А.С. Коснырев — участие в проведении экспериментов, подготовка статьи к публикации; В.В. Ульянова, О.Н. Ильинская — общее руководство, подготовка статьи к публикации. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность доктору биологических наук, заведующему кафедрой генетики Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета А.Р. Каюмову за предоставленную возможность работы на инвертированном конфокальном микроскопе Olympus IX83.

**Этическая экспертиза.** Неприменимо.

**Согласие на публикацию.** Неприменимо.

**Источники финансирования.** Работа выполнена за счёт предоставленного в 2024 году Академии наук Республики Татарстан гранта на осуществление фундаментальных и прикладных научных работ на научных и образовательных организациях, предприятиях и организациях реального сектора экономики Республики Татарстан.

**Раскрытие интересов.** Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (комерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

**Оригинальность.** При создании настоящей работы авторы не использовали ранее опубликованные сведения (текст, иллюстрации, данные).

**Доступ к данным.** Все данные, полученные в настоящем исследовании, доступны в статье и приложении к ней.

  
Приложение 1. Иммунофлуоресцентный анализ взаимодействия биназы (а) и её мутантных форм K26A (б) и H101E (в) с рецептором эпидермально-го фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR) в опухолевых клетках A431 после обработки РНКазами в течение 1 мин, 5 мин, 15 мин, 1 ч и 6 ч.  
DOI: 10.17816/gc687285-4377350

**Генеративный искусственный интеллект.** При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

**Рассмотрение и рецензирование.** Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовали два внешних рецензента, один член редакционной коллегии и научный редактор издания.

## ADDITIONAL INFORMATION

**Author contributions:** А.И. Надырова: investigation, formal analysis, writing—original draft, writing—review & editing; Е.В. Дудкина: investigation, formal analysis, writing—original draft, writing—review & editing; Э.М. Хафизова, А.Д. Пестов: investigation; А.С. Коснырев: investigation, writing—original draft, writing—review & editing;

V.V. Ulyanova, O.N. Ilinskaya: supervision, writing—original draft, writing—review & editing. All the authors approved the version of the manuscript to be published and agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

**Acknowledgments:** The authors express their gratitude to Dr. A.R. Kayumov, Doctor of Sciences in Biology, Head of the Department of Genetics at the Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, for providing access to the inverted confocal microscope (Olympus IX83).

**Ethics approval:** Not applicable.

**Consent for publication:** Not applicable.

**Funding sources:** This work was supported by a 2024 grant from the Academy of Sciences of the Republic of Tatarstan for conducting fundamental and applied research in scientific and educational institutions, enterprises, and organizations of the real economy of the Republic of Tatarstan.

**Disclosure of interests:** The authors have no relationships, activities, or interests for the last three years related to for-profit or not-for-profit

third parties whose interests may be affected by the content of the article. Statement of originality. No previously published material (text, images, or data) was used in this work.

**Statement of originality:** No previously obtained or published material (text, images, or data) was used in this study or article.

**Data availability statement:** All data generated during this study are available in the article and its supplementary material.



**Supplement 1.** Immunofluorescence analysis of the interaction of binase (*a*) and its mutants K26A (*b*) and H101E (*c*) with the epidermal growth factor receptor (EGFR) in A431 tumor cells after RNase treatment for 1 minute, 5 minutes, 15 minutes, 1 hour, and 6 hours. DOI: 10.17816/gc687285-4377350

**Generative AI.** No generative artificial intelligence technologies were used to prepare this article.

**Provenance and peer review:** This paper was submitted unsolicited and reviewed following the standard procedure. The review process involved two external reviewers, one member of the editorial board, and the in-house scientific editor.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Patutina O, Mironova N, Ryabchikova E, et al. Inhibition of metastasis development by daily administration of ultralow doses of RNase A and DNase I. *Biochimie*. 2011;93(4):689–696. doi: 10.1016/j.biochi.2010.12.011 EDN: OAEGFP
- Fiorini C, Cordani M, Gotte G, et al. Onconase induces autophagy sensitizing pancreatic cancer cells to gemcitabine and activates Akt/mTOR pathway in a ROS-dependent manner. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1853(3):549–560. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.12.016
- Wang Z, Lin F, Liu J, Qiu F. A novel ribonuclease from rana chensinensis and its potential for the treatment of human breast cancer. *Cancer Biother Radiopharm*. 2015;30(9):380–385. doi: 10.1089/cbr.2015.1891
- Olmo N, Turnay J, González de Buitrago G, et al. Cytotoxic mechanism of the ribotoxin alpha-sarcin. Induction of cell death via apoptosis. *Eur J Biochem*. 2001;268(7):2113–2123. doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.02086.x EDN: BAHIET
- Surchenko YV, Dudkina EV, Nadyrova AI, et al. Cytotoxic potential of novel bacillary ribonucleases bahnase and balifase. *BioNanoSci*. 2020;10:409–415. doi: 10.1007/s12668-020-00720-6 EDN: HRFZKF
- Edelweiss E, Balandin TG, Ivanova JL, et al. Barnase as a new therapeutic agent triggering apoptosis in human cancer cells. *PLoS ONE* 2008;3(6):e2434. doi: 10.1371/journal.pone.0002434 EDN: MNOCFD
- Smith MR, Newton DL, Mikulski SM, Rybak SM. Cell cycle-related differences in susceptibility of NIH/3T3 cells to ribonucleases. *Exp Cell Res*. 1999;247(1):220–32. doi: 10.1006/excr.1998.4317
- Futami J, Maeda T, Kitazoe M, et al. Preparation of potent cytotoxic ribonucleases by cationization: enhanced cellular uptake and decreased interaction with ribonuclease inhibitor by chemical modification of carboxyl groups. *Biochemistry*. 2001;40(25): 7518–7524. doi: 10.1021/bi010248g EDN: YIKIYO
- Nadyrova AI, Kosnyrev AS, Ulyanova VV, et al. Efficiency of Escherichia coli and Bacillus subtilis expression systems for production of binase mutants. *Mol Biol*. 2023;57: 825–835. doi: 10.1134/S002689332305014x EDN: KSMOBT
- Ilinskaya ON, Karamova NS, Ivanchenko OB, Kipenskaya LV. SOS-inducing ability of native and mutant microbial ribonucleases. *Mutat Res*. 1996;354(2):203–209. doi: 10.1016/0027-5107(96)00012-7 EDN: LDTISF
- Ilinskaya ON, Vamvakas S. Nephrotoxic effects of bacterial ribonucleases in the isolated perfused rat kidney. *Toxicology*. 1997;120(1):55–63. doi: 10.1016/s0300-483x(97)03639-1 EDN: LECWCX
- Mitkevich VA, Petrushanko IY, Spirin PV, et al. 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;10(23):4090–4097. doi: 10.4161/cc.10.23.18210 EDN: PEGOXR
- Mitkevich VA, Burnysheva KM, Petrushanko IY, et al. Binase treatment increases interferon sensitivity and apoptosis in SiHa cervical carcinoma cells by downregulating E6 and E7 human papilloma virus oncoproteins. *Oncotarget*. 2017;8(42):72666–72675. doi: 10.18632/oncotarget.20199 EDN: BXLHXZ
- Dudkina E, Ulyanova V, Asmandiyarova V, et al. Two main cancer biomarkers as molecular targets of binase antitumor activity. *Biomed Res Int*. 2024;2024:8159893. doi: 10.1155/2024/8159893 EDN: XSDCEI
- Dudkina EV, Ulyanova VV, Ilinskaya ON. Supramolecular organization as a factor of ribonuclease cytotoxicity. *Acta Naturae*. 2020;12(3):24–33. doi: 10.32607/actanaturae.11000 EDN: NYODHM
- Ilinskaya ON, Singh I, Dudkina E, et al. Direct inhibition of oncogenic KRAS by *Bacillus pumilus* ribonuclease (binase). *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(7 Pt A):1559–1567. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.04.005 EDN: SMENQQ
- Wee P, Wang Z. Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. *Cancers (Basel)*. 2017;9(5):52. doi: 10.3390/cancers9050052 EDN: YENNNG
- Collins TJ. ImageJ for microscopy. *Biotechniques*. 2007;43(1 Suppl.):25–30. doi: 10.2144/000112517
- Vershinina VI, Dudkina EV, Ulyanova VV, et al. Specific antibodies against binase: Preparation and application. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*. 2021;163(4):557–568. doi: 10.26907/2542-064X.2021.4.557-568 EDN: ELQZOP
- Abramson J, Adler J, Dunger J, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*. 2024;630(8016):493–500. doi: 10.1038/s41586-024-07487-w EDN: XBTLYU
- Kozakov D, Hall DR, Xia B, et al. The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nat Protoc*. 2017;12(2):255–278. doi: 10.1038/nprot.2016.169 EDN: YWVTYJ
- Sukhwal A, Sowdhamini R. Oligomerisation status and evolutionary conservation of interfaces of protein structural domain superfamilies. *Mol Biosyst*. 2013;9(7):1652–1661. doi: 10.1039/c3mb25484d
- Tong J, Taylor P, Peterman SM, et al. Epidermal growth factor receptor phosphorylation sites Ser991 and Tyr998 are implicated in the regulation of receptor endocytosis and phosphorylations at Ser1039 and Thr1041. *Mol Cell Proteomics*. 2009;8(9):2131–2144. doi: 10.1074/mcp.M900148-MCP200
- Cheng WL, Feng PH, Lee KY, et al. The role of EREG/EGFR pathway in tumor progression. *Int J Mol Sci*. 2021;22(23):12828. doi: 10.3390/ijms222312828 EDN: MIUMNV
- Saoudi Gonzalez N, Ros J, Baraibar I, et al. Cetuximab as a key partner in personalized targeted therapy for metastatic colorectal cancer. *Cancers (Basel)*. 2024;16(2):412. doi: 10.3390/cancers16020412 EDN: ZDZGZA

- 26.** Price T, Ang A, Boedigheimer M, et al. Frequency of S492R mutations in the epidermal growth factor receptor: analysis of plasma DNA from patients with metastatic colorectal cancer treated with panitumumab or cetuximab monotherapy. *Cancer Biol Ther.* 2020;21(10):891–898. doi: 10.1080/15384047.2020.1798695 EDN: MMMBMR
- 27.** Zhang D, Zhao J, Yang Y, et al. Fourth-generation EGFR-TKI to overcome C797S mutation: past, present, and future. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2025;40(1):2481392. doi: 10.1080/14756366.2025.2481392
- 28.** Blandin AF, Cruz Da Silva E, Mercier MC, et al. Gefitinib induces EGFR and α5β1 integrin co-endocytosis in glioblastoma cells. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(6):2949–2962. doi: 10.1007/s00018-020-03686-6 EDN: UCCMGP
- 29.** Okada Y, Kimura T, Nakagawa T, et al. EGFR downregulation after anti-EGFR therapy predicts the antitumor effect in colorectal cancer. *Mol Cancer Res.* 2017;15(10):1445–1454. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0383 EDN: YHMLAI
- 30.** Ren Y, Hong Y, He W, et al. EGF/EGFR promotes salivary adenoid cystic carcinoma cell malignant neural invasion via activation of PI3K/AKT and MEK/ERK signaling. *Curr Cancer Drug Targets.* 2022;22(7): 603–616. doi: 10.2174/15680096226622041112312 EDN: OISHZY
- 31.** Mohamed ISE, Sen'kova AV, Nadyrova AI, et al. Antitumour activity of the ribonuclease binase from *Bacillus pumilus* in the RLS40 tumour model is associated with the reorganisation of the miRNA network and reversion of cancer-related cascades to normal functioning. *Biomolecules.* 2020;10(11):1509. doi: 10.3390/biom10111509 EDN: QGHAKP
- 32.** Tamas T, Baciu M, Nutu A, et al. Is miRNA regulation the key to controlling non-melanoma skin cancer evolution? *Genes (Basel).* 2021;12(12):1929. doi: 10.3390/genes12121929 EDN: NVMYWA

## ОБ АВТОРАХ

\* Надырова Алсу Ильдаровна;

адрес: Россия, 420008, Казань, ул. Кремлёвская, 18;

ORCID: 0000-0002-1312-0605;

eLibrary SPIN: 9618-7816;

e-mail: alsu.nadyrova@yandex.ru

Дудкина Елена Владимировна, канд. биол. наук, доцент;

ORCID: 0000-0002-2817-1384;

eLibrary SPIN: 5874-7417;

e-mail: ElVDudkina@kpfu.ru

Хафизова Эльвира Маратовна;

ORCID: 0009-0004-3408-9493;

e-mail: elvirra.khafizova@yandex.ru

Пестов Александр Дмитриевич;

ORCID: 0009-0000-5189-8111;

e-mail: alexander.p3stov@yandex.ru

Коснырев Александр Сергеевич;

ORCID: 0009-0008-4341-5181;

eLibrary SPIN: 8593-7837;

e-mail: AleSKosnyrev@kpfu.ru

Ульянова Вера Владимировна, канд. биол. наук, доцент;

ORCID: 0000-0003-1768-3314;

eLibrary SPIN: 8479-4593;

e-mail: Vera.Uljanova@kpfu.ru

Ильинская Ольга Николаевна, д-р биол. наук, профессор;

ORCID: 0000-0001-6936-2032;

eLibrary SPIN: 7972-5807;

e-mail: Olga.Ilinskaya@kpfu.ru

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

## AUTHORS' INFO

\* Alsu I. Nadyrova;

address: 18 Kremlyovskaya st, Kazan, Russia, 420008;

ORCID: 0000-0002-1312-0605;

eLibrary SPIN: 9618-7816;

e-mail: alsu.nadyrova@yandex.ru

Elena V. Dudkina, Cand. Sci. (Biology), Associate Professor;

ORCID: 0000-0002-2817-1384;

eLibrary SPIN: 5874-7417;

e-mail: ElVDudkina@kpfu.ru

Elvira M. Khafizova;

ORCID: 0009-0004-3408-9493;

e-mail: elvirra.khafizova@yandex.ru

Alexander D. Pestov;

ORCID: 0009-0000-5189-8111;

e-mail: alexander.p3stov@yandex.ru

Alexander S. Kosnyrev;

ORCID: 0009-0008-4341-5181;

eLibrary SPIN: 8593-7837;

e-mail: AleSKosnyrev@kpfu.ru

Vera V. Ulyanova, Cand. Sci. (Biology), Associate Professor;

ORCID: 0000-0003-1768-3314;

eLibrary SPIN: 8479-4593;

e-mail: Vera.Uljanova@kpfu.ru

Olga N. Ilinskaya, Doc. Sci. (Biology), Professor;

ORCID: 0000-0001-6936-2032;

eLibrary SPIN: 7972-5807;

e-mail: Olga.Ilinskaya@kpfu.ru