

UDC 577.113.6:577.322:543.51

## Дослідження взаємодії олігоаденілатів з білками *in vitro* методом мас-спектрометрії MALDI-TOF

С. М. Левченко<sup>1</sup>, А. В. Ребрів<sup>2</sup>, В. В. Ткачук<sup>1</sup>, Л. В. Дубей<sup>1</sup>,І. Я. Дубей<sup>1</sup>, З. Ю. Ткачук<sup>1</sup><sup>1</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03680<sup>2</sup>Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України  
Вул. Леонтовича, 9, Київ, Україна, 01601

sveta.levchenko@gmail.com

**Мета.** Дослідити здатність «корових» 2'-5'- і 3'-5'-олігоаденілатів взаємодіяти з  $\alpha$ -інтерфероном – ключовим білком системи 2'-5'-ОАС/РНКаз L, відповідальною за противірусний захист клітини. **Методи.** Для вивчення взаємодії білок-олігонуклеотид використано метод мас-спектрометрії MALDI-TOF. **Результати.** Встановлено здатність 2'-5'-А<sub>3</sub> та його епоксид-модифікованого аналога 2'-5'-А<sub>3</sub>-еро зв'язуватися з  $\alpha$ -інтерфероном *in vitro*. З цим білком може також взаємодіяти і 3'-5'-триаденілат. При цьому до молекули  $\alpha$ -інтерферону одночасно може присєднуватися від однієї до п'яти молекул ліганду. У той же час з інсуліном усі досліджені олігонуклеотиди не зв'язуються. **Висновки.** Показано, що «корові» 2'-5'- і 3'-5'-триаденілати множинно взаємодіють з  $\alpha$ -інтерфероном з утворенням стійких комплексів. Однак вони не зв'язуються з інсуліном, який не є компонентом системи 2'-5'-ОАС/РНКаз L.

**Ключові слова:** олігоаденілати, інсулін,  $\alpha$ -інтерферон, мас-спектрометрія MALDI-TOF.

**Вступ.** Олігорибоаденілати та їхні аналоги протягом довгого часу, а надто останніми роками, активно досліджують як перспективні сполуки для створення нових противірусних, протизапальних і протипухлинних засобів [1–6]. Вони відіграють ключову роль у механізмі противірусного захисту клітини, важливі для процесів клітинного росту і диференціації, апоптозу, патогенезу діабету, атеросклерозу тощо. У численних роботах з вивчення біологічної активності 2'-5'-олігоаденілатів (2-5А) показано, що їхній механізм противірусної дії пов'язаний зі здатністю впливати на білки системи 2'-5'-олігоаденілат-синтетази/ендорибонуклеази L (2'-5'-ОАС/РНКаз L), що в свою чергу призводить до руйнування вірусної РНК [1, 7–11].

На сьогодні досліджено низку білків, важливих для функціонування клітинної системи противірус-

ного захисту. Це, в першу чергу, РНКаз L, яка розщеплює одноланцюгові вірусні РНК [1, 7, 12], протеїназа R, що контролює синтез вірусних білків [13] і білок Мх, відповідальний за особливу дію проти вірусу грипу [14]. Та головна роль у противірусному захисті належить інтерферонам, які не лише індують експресію генів, залучених до противірусного дії клітини, але, як показано недавніми дослідженнями Сілвермана, самі можуть активуватися продуктами розщеплення РНК вірусу гепатиту С РНК азою L [15]. Ці олігорибонуклеотиди, зв'язуючися з білком RIG-I, стимулюють активність його АТФази і, як наслідок, гена  $\beta$ -інтерферону, продукт якого, в свою чергу, індуює 2'-5'-олігоаденілат-синтетази та синтез трифосфатів 2-5А.

Отже, продукти гідролізу вірусних РНК можуть активувати синтез інтерферону. Проте виникає запитання, чи здатні «корові» (нефосфорильовані) 2-5А, а також 3'-5'-олігоаденілати взаємодіяти безпо-

середньо з інтерфероном і таким чином впливати на його функції?

Одним із сучасних методів, який дозволяє дослідити цю проблему, є мас-спектрометрія MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight mass spectrometry – часопролітна мас-спектрометрія з матрично-активованою лазерною десорбцією/іонізацією). Метод успішно застосовують для дослідження біомолекул: амінокислот [16], пептидів і білків [17, 18], олігонуклеотидів і нуклеїнових кислот [19–22]. Зокрема, метод дає можливість дослідити їхні модифікації, шляхи фрагментації, структуру ковалентних і нековалентних комплексів тощо. Метод MALDI-TOF набуває все ширшого застосування для швидкого та якісного визначення як нуклеотидних, так і амінокислотних послідовностей, а також ідентифікації білків у РНК-білкових комплексах [21–23]. Так, мас-спектрометрію успішно використано для секвенування олігорибонуклеотидів, які містять до 22 нуклеотидів, низки білків і комплексів пептид–РНК, що входять до складу рибонуклеопротейнів [21, 24].

Аналіз мас-спектрометричних даних дозволяє з високою точністю визначити молекулярну масу речовини, чистоту досліджуваного зразка, ідентифікувати наявні в ньому домішки. За рахунок цього стає можливим виявлення білків у складних сумішах, вивчення модифікацій біополімерів (глікозилювання чи фосфорилювання білків, метилювання ДНК тощо) [18, 22, 23]. Принциповою для даної роботи особливістю мас-спектрометричних методів аналізу, у тому числі MALDI-TOF, є їхні широкі можливості для дослідження взаємодій нековалентної природи у комплексах біополімерів, наприклад, білково-білкових, білково-нуклеїнових та ін. [18, 22, 24–28].

Важливим кроком для з'ясування ймовірних механізмів противірусної дії олігоаденілатів є вивчення особливостей їхньої взаємодії з білками-мішенями, які беруть участь у противірусному захисті клітини, такими як інтерферон. Метою цієї роботи було дослідження зв'язування  $\alpha$ -інтерферону та інсуліну (контрольного білка, який не входить до системи 2'-5'-ОАС/РНКазы L) з низкою олігоаденілатів різної структури за умов *in vitro* методом MALDI-TOF.

**Матеріали і методи.** 2'-5'-Триаденілат 2'-5'- $A_3$  та його епоксид-аналог 2'-5'- $A_3$ -еро синтезували фосфотрифторидним методом у розчині, використовуючи як нуклеофільні каталізатори реакцій конденсації відповідно N-оксид 4-епоксипіридину [29] та N-метилімідазолу [30].

Тричленний 3'-5'-олігоаденілат 3'-5'- $A_3$  отримували стандартним твердофазним фосфітамідним методом на синтезаторі ASM-800 («Biosset», РФ). 2'-5'- $A_3$ : брутто-формула  $C_{30}H_{37}N_{15}O_{16}P_2$ ,  $M = 925,65$ , MALDI-мас-спектр –  $m/z = 928,12 [(M + H)^+]$ ,  $792,18 [(M - Ade + H)^+]$ ; 2'-5'- $A_3$ :  $C_{30}H_{37}N_{15}O_{16}P_2$ ,  $M = 925,65$ ,  $m/z = 926,66 [(M + H)^+]$ ; 2'-5'- $A_3$ -еро:  $C_{30}H_{35}N_{15}O_{15}P_2$ ,  $M = 907,64$ ,  $m/z = 913,27 [(M + H)^+]$ .

Рекомбінантний інтерферон  $\alpha$ -2b та інсулін людини вироблено відповідно фірмами «Інтерфармбіотек» і «Фармак» (Україна).

Використовували водні розчини препаратів. Розчини білків і олігонуклеотидів інкубували за температури 37 °C протягом 10 хв. Концентрація досліджуваних препаратів в індивідуальних розчинах і сумішах становила  $10^{-4}$  М для всіх олігоаденілатів,  $10^{-5}$  М – для інтерферону і  $3,5 \cdot 10^{-5}$  М – для інсуліну.

Мас-спектрометричний аналіз здійснювали на MALDI-TOF-спектрометрі Voyager DE PRO («Applied Biosystems», США). Паспортна точність вимірювання мас була на рівні 0,05 %, вимірювання проводили в діапазоні  $m/z$  700–50000. Білки та олігонуклеотиди іонізували за допомогою синапінової кислоти («Sigma-Aldrich», США). Молекулярну масу вираховували, віднімаючи від значення  $m/z$  однозарядного іона одиницю (маса протона = 1,007 Да). Прилад калібрували з використанням калібрувальної суміші calmix3 від виробника мас-спектрометра. Матричний реагент готували, розчиняючи синапінову кислоту (10 мг/мл) у суміші рівних об'ємів ацетонітрилу та 0,1 %-го водного розчину трифтороцтової кислоти («Sigma-Aldrich»). Для нанесення брали 1,5–2 мкл суміші розчинів досліджуваного зразка і реагенту (1:1). Використовували лінійний режим роботи часопролітного детектора, прикладена напруга становила 25 кВ, час затримки екстракції іонів – 500 нс [31].

Коливання значення молекулярної маси для однієї речовини в різних спектрах пояснюється змінною роздільною здатністю приладу залежно від пара-

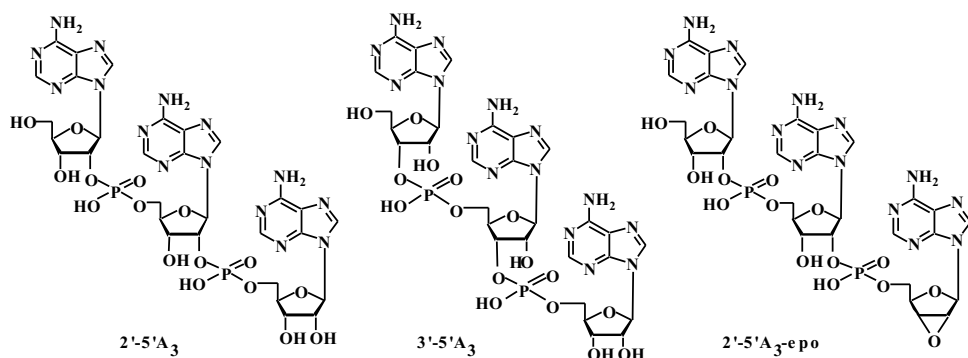
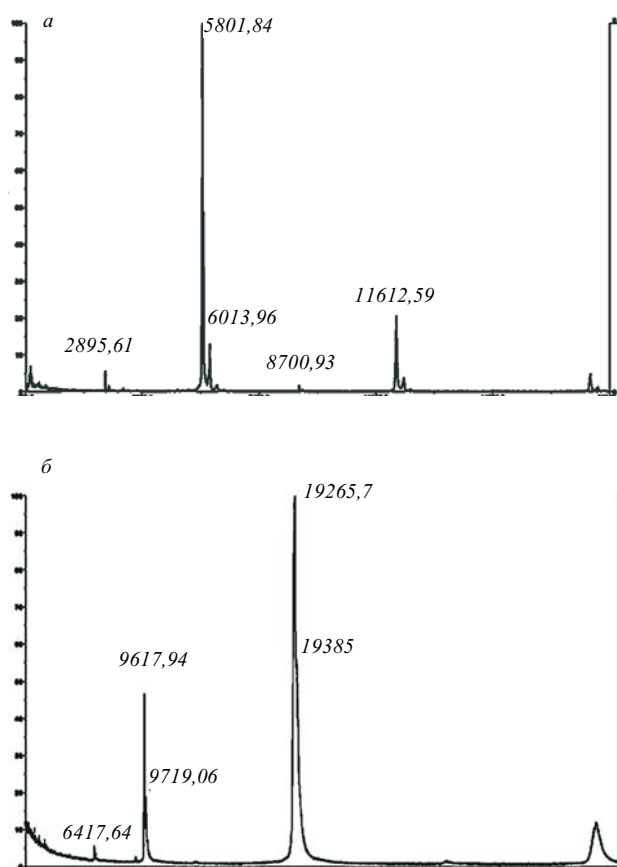


Рис. 1. Структурні формули досліджуваних олігоаденілатів

Рис. 2. MALDI-мас-спектри білків інсуліну (а) та  $\alpha$ -інтерферону (б)

метрів аналізу і неповною відтворюваністю геометрії піків.

Спектри обробляли за допомогою програми Data Explorer 4.0 («Applied Biosystems»).

**Результати і обговорення.** Методом мас-спектрометрії MALDI-TOF досліджували серію коротких 2'-5'- і 3'-5'-олігоаденілатів, а також білки інсулін і  $\alpha$ -інтерферон. На рис. 1 представлено струк-

турні формули олігоаденілатів. Мас-спектри білків наведено на рис. 2.

Першим кроком було дослідження взаємодії 2'-5'- $A_3$  з низькомолекулярним білком – інсуліном людини. Отримане з мас-спектра інсуліну (рис. 2, а) значення молекулярної маси становить 5800,8 Да, що наближається до теоретичного (5807,6 Да, похибка 0,12 %) і узгоджується з даними, одержаними в інших роботах [26]. Піки з  $m/z$  11613 і 17411 належать однозарядним комплексам, які складаються відповідно з двох і трьох молекул інсуліну (до агрегату з двох чи трьох молекул приєднується протон), 2896 – двозарядний (дипротонований) молекулі інсуліну. Пік з  $m/z = 6014$ , можливо, відповідає продукту взаємодії матриці з білком: у мас-спектрі синапінової кислоти  $m/z$  одного з основних піків, що належить фрагменту  $[(M - OH)^+]$ , дорівнює 207,07. Піки в цій ділянці спостерігаються і в спектрах сумішей інсуліну з олігонуклеотидами.

У мас-спектрі суміші інсуліну з 2'-5'- $A_3$  (рис. 3, а) присутні піки зі значеннями  $m/z$  929,1; 2908,6; 5801,3; 11649 і 17402, що відповідають (у межах точності інструмента) лише вільним компонентам суміші (олігонуклеотиду і білка). Отже, взаємодія інсуліну з 2'-5'- $A_3$  за умов *in vitro* не зафіксовано.

До наступної серії експериментів залучили білок  $\alpha$ -інтерферон, який широко застосовують при терапії вірусних захворювань, таких як гепатит С. На рис. 2, б, показано мас-спектр  $\alpha$ -інтерферону, у якому пік зі значенням  $m/z = 19265$  відповідає однозарядному іону білка. Теоретична молекулярна маса інтерферону  $\alpha$ -2b, отримана з амінокислотної послідовності, дорівнює 19271 Да (DrugBank: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00105>), тобто відхилення експериментальної величини становить 0,04 %.

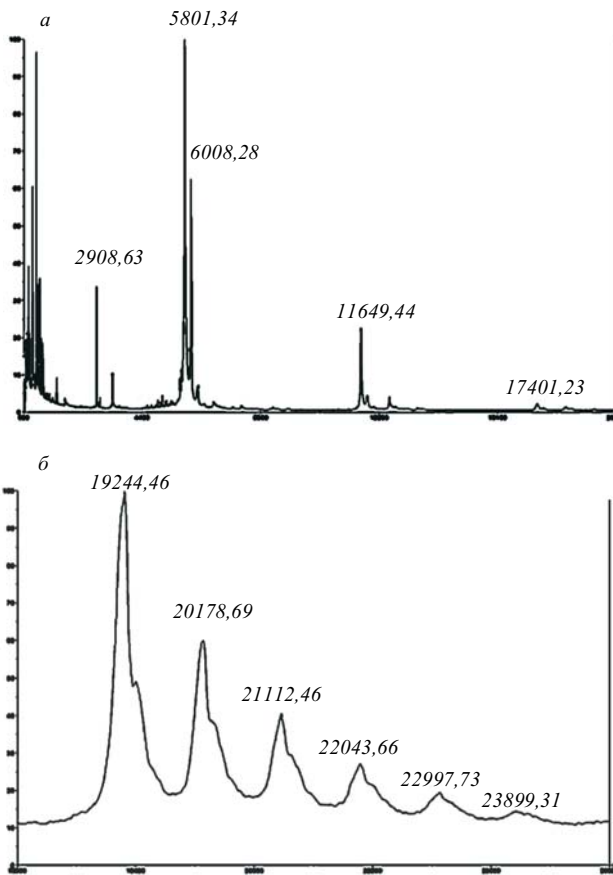


Рис. 3. MALDI-мас-спектри суміші інсуліну (а) та  $\alpha$ -інтерферону (б) з олігоаденілатом 2'-5'-A<sub>3</sub>

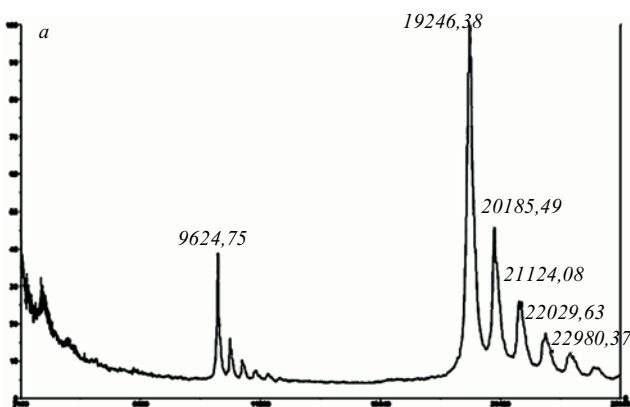


Рис. 4. MALDI-мас-спектр суміші  $\alpha$ -інтерферону з олігоаденілатом 3'-5'-A<sub>3</sub>

Піки зі значенням  $m/z$  9618 і 6417 належать дво- і тризарядним іонам  $\alpha$ -інтерферону (величини  $m/z$  відповідно в 2 і 3 рази менші, ніж для однозарядного іона). Пік із  $m/z$  38610 відповідає монопротонова-

ному комплексу двох молекул інтерферону. Мас-спектрометричні дані, отримані нами для  $\alpha$ -інтерферону, узгоджуються з літературними [32, 33].

На рис. 3, б, наведено фрагмент спектра суміші інтерферону та 2'-5'-A<sub>3</sub>, який демонструє утворення комплексів білка з однією і кількома молекулами олігонуклеотиду. На відміну від суміші інсулін–2'-5'-A<sub>3</sub>, спектр якої складається лише з піків, що належать її складовим компонентам, додавання до інтерферону 2'-5'-A<sub>3</sub> призвело до значних змін у мас-спектрі. Зокрема, у спектрі системи інтерферон–2'-5'-A<sub>3</sub> з'являються піки зі значеннями  $m/z$  20179, 21112, 22044, 22998 і 23899. Вони відповідають комплексам, які складаються з однієї молекули  $\alpha$ -інтерферону та від однієї до п'яти молекул 2'-5'-A<sub>3</sub>. Одержані молекулярні маси узгоджуються з теоретично розрахованими. Так, відхилення експериментального значення  $m/z$  від обчисленого теоретично для комплексів білка з однією і двома молекулами 2'-5'-A<sub>3</sub> становить відповідно 0,09 і 0,06 %.

Оскільки комплекси детектуються після впливу іонізуючого лазерного випромінювання, то їхня фіксація в мас-спектрах свідчить про достатньо сильну взаємодію між молекулами білка і олігоаденілату. Слід зазначити, що комплекс білка з кількома молекулами ліганду утворюється важче, ніж з однією, та легше розпадається ще на етапі іонізації (до ресстрації його приладом). Тому множинне утворення стабільних агрегатів свідчить про досить міцне зв'язування  $\alpha$ -інтерферону з лігандом.

На наступному етапі вивчали взаємодію  $\alpha$ -інтерферону з природним 3'-5'-триаденілатом, що відрізняється від 2'-5'-A<sub>3</sub> лише за типом міжнуклеотидних зв'язків. У мас-спектрі суміші інтерферону з 3'-5'-A<sub>3</sub> (рис. 4) зафіксовано множинну взаємодію молекули білка з однією і кількома молекулами олігонуклеотиду. Як і в разі 2'-5'-A<sub>3</sub>, виявлено формування стійких комплексів, що містять від однієї до п'яти молекул триаденілату на молекулу білка. У спектрі суміші фіксується й група менш інтенсивних піків, які відповідають дипротонованим комплексам (в області значень  $m/z$  9600–11300).

Для подальших дослідів обрано 3'-епокси-модифікований олігоаденілат 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро. Як показано в попередніх роботах багатьох авторів, навіть незначна зміна в структурі 2-5A здатна призводити

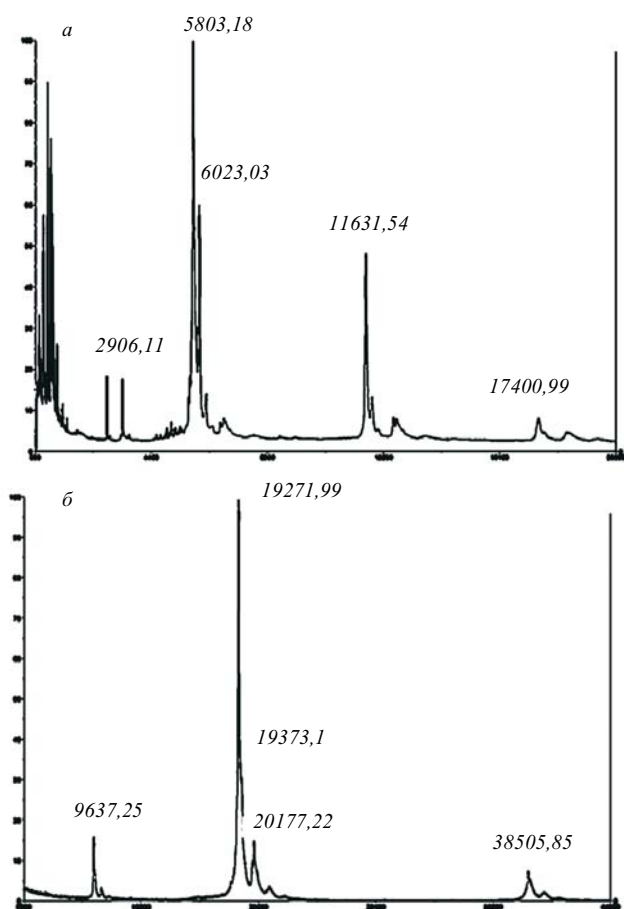


Рис. 5. MALDI-мас-спектри суміші інсуліну (а) та  $\alpha$ -інтерферону (б) з олігоаденілатом 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро

до радикальних порушень його біологічної активності [1, 3, 5, 6]. Вказаний аналог 2'-5'-триаденілату теж виявляє цікаву і різноманітну біологічну дію [30, 34–36].

Мас-спектр суміші інсуліну з 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро складається лише з піків, які належать олігонуклеотиду і білку (рис. 5, а). Появи додаткових піків не відмічено, тобто мас-спектр суміші є фактично суперпозицією спектрів її компонентів. Пік з  $m/z = 6023$  може бути продуктом приєднання до білка синапінової кислоти ( $M = 224,21$ ). Отже, як і в разі немодифікованих тримерів, взаємодії аналога 2'-5'-A<sub>3</sub> з інсуліном *in vitro* не зафіксовано.

У мас-спектрі суміші  $\alpha$ -інтерферону й 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро (рис. 5, б) з'являється новий пік з  $m/z = 20177$ , що свідчить про зв'язування  $\alpha$ -інтерферону з молекулою 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро (відхилення від теоретичного значення молекулярної маси комплексу 0,06 %). У спектрі присутні також два менш інтенсивних піки,

що відповідають комплексам молекули інтерферону та двох і трьох молекул олігонуклеотиду. Отже, 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро також зв'язується з інтерфероном.

Прийнято вважати, що противірусні властивості фосфорильованих 2-5А пов'язані з їхньою здатністю активувати РНКазу L, яка в свою чергу руйнує вірусні мРНК [1, 8–11, 37–39]. Проте «коровим» 2-5А та їхнім аналогам притаманні й інші властивості, які не можна пояснити вищевказаним механізмом. Зокрема, до таких властивостей належать запобігання відторгненню тканин після трансплантації, вплив на проліферацію та апоптоз стовбурових клітин, кардіопротекторна дія та ін. [30, 34, 35]. Тому необхідно шукати нові підходи, використання яких дозволило б встановити механізми прояву незвичних біологічних властивостей «корових» олігоаденілатів. Одним із можливих пояснень може бути здатність олігоаденілатів взаємодіяти з певними білками, що й визначає їхню біологічну активність.

У наших попередніх роботах методом флуоресцентної спектроскопії показано взаємодію 2'-5'-олігоаденілатів і серії їхніх аналогів з білками альбуміном та інтерфероном за відсутності зв'язування з імуноглобуліном G [36]. Результати численних досліджень механізмів противірусної дії 2-5А вказують на те, що вона безпосередньо пов'язана з дією інтерферону [1, 3, 8–10, 38, 39]. У свою чергу, аналіз систем олігоаденілат–інтерферон, проведений нами методом мас-спектрометрії, дозволив встановити наявність досить стійких взаємодій між цим білком та олігонуклеотидами. Зазначимо, що мас-спектри сумішей, інкубованих протягом доби за температури 4 °С, були ідентичними отриманим після 10 хв інкубації за температури 37 °С.

**Висновки.** Отже, в нашій роботі вперше досліджено взаємодію олігоаденілатів із білками *in vitro* методом MALDI-TOF.

Показано, що за умов проведених експериментів природний 2'-5'-A<sub>3</sub>, його епоксид-аналог 2'-5'-A<sub>3</sub>-еро та 3'-5'-триаденілат не здатні зв'язуватися з інсуліном. У той же час усі досліджені 2'-5'- і 3'-5'-олігоаденілати можуть приєднуватися до  $\alpha$ -інтерферону, який входить до системи 2'-5'-ОАС/РНКазу L, у кількості від однієї до п'яти молекул ліганду на молекулу білка, утворюючи стійкі комплекси.

S. M. Levchenko<sup>1</sup>, A. V. Rebriv<sup>2</sup>, V. V. Tkachuk<sup>1</sup>, L. V. Dubey<sup>1</sup>,  
I. Ya. Dubey<sup>1</sup>, Z. Yu. Tkachuk<sup>1</sup>

Studies on interaction of oligoadenylates with proteins *in vitro* by  
MALDI-TOF mass spectrometry

<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine  
150, Akademika Zabolotnoho Str., Kyiv, Ukraine, 03680

<sup>2</sup>Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine  
9, Leontovicha Str., Kyiv, Ukraine, 01601

#### Summary

**Aim.** To investigate the ability of «core» 2'-5'- and 3'-5'-oligoadenylates (OA) to interact with  $\alpha$ -interferon – a key protein of the 2'-5'-OAS/RNase L system responsible for antiviral cell defense. **Methods.** MALDI-TOF mass spectrometry was used in the studies on protein-ligand interactions. **Results.** It was shown that 2'-5'-A<sub>3</sub> and its epoxy-modified analog 2'-5'-A<sub>3</sub>-epo can bind to  $\alpha$ -interferon *in vitro*. 3'-5'-triadenylate is also capable of binding to this protein. One to five ligand molecules can bind simultaneously to the molecule of  $\alpha$ -interferon. At the same time, all studied oligonucleotides do not bind to insulin. **Conclusions.** It was established that «core» 2'-5'- and 3'-5'-triadenylates are capable of multiple interaction with  $\alpha$ -interferon to form stable complexes. However, they do not bind to insulin which is not involved in the 2'-5'-OAS/RNase L system.

**Keywords:** oligoadenylates, insulin,  $\alpha$ -interferon, MALDI-TOF mass spectrometry.

C. M. Левченко, А. В. Ребриев, В. В. Ткачук, Л. В. Дубей,  
И. Я. Дубей, З. Ю. Ткачук

Исследование взаимодействия олигоаденилатов с белками *in vitro*  
методом масс-спектрометрии MALDI-TOF

#### Резюме

**Цель.** Исследовать способность «коровых» 2'-5'- и 3'-5'-олигоаденилатов взаимодействовать с  $\alpha$ -интерфероном – ключевым белком системы 2'-5'-ОАС/РНКаза L, ответственной за противовирусную защиту клетки. **Методы.** Для изучения взаимодействий белок-олигонуклеотид использован метод масс-спектрометрии MALDI-TOF. **Результаты.** Установлена способность 2'-5'-A<sub>3</sub> и его эпокси-модифицированного аналога 2'-5'-A<sub>3</sub>-epo связываться с  $\alpha$ -интерфероном *in vitro*. С этим белком может также взаимодействовать и 3'-5'-триаденилат. При этом к молекуле  $\alpha$ -интерферона одновременно может присоединяться от одной до пяти молекул лиганда. В то же время с инсулином все изученные олигонуклеотиды не связываются. **Выводы.** Показано, что «коровые» 2'-5'- и 3'-5'-триаденилаты способны к множественному взаимодействию с  $\alpha$ -интерфероном с образованием устойчивых комплексов. Однако они не связываются с инсулином, не являющемся компонентом системы 2'-5'-ОАС/РНКаза L.

**Ключевые слова:** олигоаденилаты, инсулин,  $\alpha$ -интерферон, масс-спектрометрия MALDI-TOF.

#### REFERENCES

1. Player M. R., Torrence P. F. The 2-5A system: modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation // *Pharmacol. Ther.*–1998.–**78**, N 2.–P. 55–113.
2. Morin B., Rabah N., Boretto-Soler J., Tolou H., Alvarez K., Canard B. High yield synthesis, purification and characterization of the RNase L activators 5'-triphosphate 2'-5'-oligoadenylates // *Antiviral Res.*–2010.–**87**, N 3.–P. 345–352.
3. Nagaoka K., Kitamura Y., Ueno Y., Kitade Y. 5'-O-dephosphorylated 2',5'-oligoadenylate (2-5A) with 8-methyladenosine at the 2'-terminus activates human RNase L // *Bioorg. Med. Chem. Lett.*–2010.–**20**, N 3.–P. 1186–1188.
4. Lopp A., Reintamm T., Kuusksalu A., Tammiste I., Pihlak A., Kelve M. Natural occurrence of 2',5'-linked heteronucleotides in marine sponges // *Mar. Drugs.*–2010.–**8**, N 2.–P. 235–254.
5. Kiuru E., Ora M., Beigelman L., Blatt L., Lonnberg H. Synthesis and enzymatic deprotection of fully protected 2'-5' oligoadenylates (2-5A): towards a prodrug strategy for short 2-5A // *Chem. Biodivers.*–2012.–**9**, N 4.–P. 669–688.
6. Wang X., Tian H., Lee Z., Heston W. D. Structure-activity relationships of 2',5'-oligoadenylate analogue modifications of prostate-specific membrane antigen (PSMA) antagonists // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.*–2012.–**31**, N 5.–P. 432–444.
7. Tanaka N., Nakanishi M., Kusakabe Y., Goto Y., Kitade Y., Nakamura K. T. Structural basis for recognition of 2'-5'-linked oligoadenylates by human ribonuclease L // *EMBO J.*–2004.–**23**, N 20.–P. 3929–3938.
8. Tsai S. C. Biomacromolecules. Introduction to structure, function and informatics.–New Jersey: Wiley-Liss, 2007.–740 p.
9. Silverman R. H. A scientific journey through the 2-5A/RNase L system // *Cytokine Growth Factor Rev.*–2007.–**18**, N 5.–P. 381–388.
10. Kristiansen H., Gad H. H., Eskildsen-Larsen S., Despres P., Hartmann R. The oligoadenylate synthetase family: an ancient protein family with multiple antiviral activities // *J. Interferon Cytokine Res.*–2011.–**31**, N 1.–P. 41–47.
11. Chakrabarti A., Ghosh P. K., Banerjee S., Gaughan C., Silverman R. H. RNase L triggers autophagy in response to viral infections // *J. Virol.*–2012.–**86**, N 20.–P. 11311–11321.
12. Clemens M. J., Vaquero C. M. Inhibitor of protein synthesis by double-stranded RNA in reticulocyte lysates: evidence for activation of an endoribonuclease // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*–1978.–**83**, N 1.–P. 59–68.
13. Meurers E., Chong K., Galabru J., Thomas N. S., Kerr I. M., Williams B. R., Hovanessian A. G. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon // *Cell.*–1990.–**62**, N 2.–P. 379–390.
14. Pavlovic J., Staeheli P. The antiviral potentials of Mx proteins // *J. Interferon Res.*–1991.–**11**, N 4.–P. 215–219.
15. Malathi K., Saito T., Crochet N., Barton D. J., Gale M. Jr., Silverman R. H. RNase L releases a small RNA from HCV RNA that refolds into a potent PAMP // *RNA.*–2010.–**16**, N 11.–P. 2108–2119.
16. Gogichaeva N. V., Williams T., Alterman M. A. MALDI-TOF tandem mass spectrometry as a new tool for amino acid analysis // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*–2007.–**18**, N 2.–P. 279–284.
17. McIver R. T. Jr., Li Y., Hunter R. L. High-resolution laser desorption mass spectrometry of peptides and small proteins // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*–1994.–**91**, N 11.–P. 4801–4805.
18. Mass spectrometry of proteins and peptides / Ed. Chapman J. R.–Totowa: Humana Press, 2000.–544 p.
19. Hettich R., Buchanan M. Structural characterization of normal and modified oligonucleotides by matrix-assisted laser desorption fourier transform mass spectrometry // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*–1991.–**2**, N 5.–P. 402–412.
20. Kuusksalu A., Subbi J., Pehk T., Reintamm T., Muller W. E., Kelve M. Identification of the reaction products of (2'-5')oligoadenylate synthetase in the marine sponge // *Eur. J. Biochem.*–1998.–**257**, N 2.–P. 420–426.

21. Faulstich K., Worner K., Brill H., Engels J. W. A sequencing method for RNA oligonucleotides based on mass spectrometry // *Anal. Chem.*—1997.—**69**, N 21.—P. 4349–4353.
22. Banoub J. H., Newton R. P., Esmans E., Ewing D.E., Mackenzie G. Recent developments in mass spectrometry for the characterization of nucleosides, nucleotides, oligonucleotides, and nucleic acids // *Chem. Rev.*—2005.—**105**, N 5.—P. 1869–1915.
23. Liebler D. C. Introduction to proteomics: tools for the new biology.—Totowa: Humana Press, 2002.—198 p.
24. Kuhn-Holsken E., Lenz C., Sander B., Luhrmann R., Urlaub H. Complete MALDI-ToF MS analysis of cross-linked peptide-RNA oligonucleotides derived from nonlabeled UV-irradiated ribonucleoprotein // *RNA*.—2005.—**11**, N 12.—P. 1915–1930.
25. Tang X., Callahan J. H., Zhou P., Vertes A. Noncovalent protein-oligonucleotide interactions monitored by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // *Anal. Chem.*—1995.—**67**, N 24.—P. 4542–4548.
26. Salih B. Determination of high molecular weight biomolecules and their non-covalent complexes in MALDI-TOF-MS // 4<sup>th</sup> AACD Congress (29 Sept.–3 Oct. 2004, Aydin, Turkey): Proceedings Book.—Aydin, 2004.—P. 352–354.
27. Luo Y., Li T., Yu F., Kramer T., Cristea I. M. Resolving the composition of protein complexes using a MALDI LTQ Orbitrap // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*—2010.—**21**, N 1.—P. 34–46.
28. Chiang C. K., Yang Z., Lin Y. W., Chen W. T., Lin H. J., Chang H. T. Detection of proteins and protein-ligand complexes using HgTe nanostructure matrixes in surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry // *Anal. Chem.*—2010.—**82**, N 11.—P. 4543–4550.
29. Dubey I. Ya., Dubey L. V. Synthesis of (2'-5')-triadenylates and their analogues using O-nucleophilic catalysis of internucleotide coupling reaction // *Biopolym. Cell.*—2007.—**23**, N 6.—P. 538–544.
30. Tkachuk Z. Yu., Dubey I. Ya., Yakovenko T. G., Semernikova L. I., Shapoval S. O., Artemenko V. S., Dubey L. V. Synthesis of 2'-5'-oligoadenylates and study of their effect on proliferation and migration of bone marrow stem cells of mice *in vitro* and *in vivo* // *Biopolym. Cell.*—2007.—**23**, N 1.—P. 14–20.
31. Voyager™ Biospectrometry™ workstation with delayed Extraction® technology. User guide, version 5.1 // Foster City: Applied Biosystems, 2001.—P. 738.
32. Zhou G. H., Luo G. A., Sun G.-Q., Cao Y. C., Zhu M. S. Study on the quality of recombinant proteins using matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry // *World J. Gastroenterol.*—1999.—**5**, N 3.—P. 235–240.
33. Pokholenko Ya. A., Porubleva L. V., Dubey I. Ya., Rebriv A. V., Sutugina L. P., Gromovoy T. Yu., Pokrovskiy V. O., Obolenskaya M. Yu., Chernykh S. I. Obtaining and characteristics of national preparation interferon  $\alpha$ -2b with prolonged effect // *Ukr. Biochem. J.*—2008.—**80**, N 6.—P. 92–100.
34. Sidorik L. L., Dubey I. Ya., Bobyk V. I., Kozlov A. V., Fedorkova O. M., Kovenya T. V., Ryabenko D. V., Sergienko O. V., Trunina I. V., Pogrebnoy P. V., Matsuka G. H. Therapeutic effects of various doses of 2'-5'-oligoadenylates in experimental myosin-induced myocardial damage // *Dop. NAN Ukrainy.*—2001.—N 9.—P. 161–165.
35. Filippov I. B., Tkachuk Z. Yu., Dubey I. Ya. Mechanisms of vessel tone regulation by 2'-5'-oligoadenylates // *Dop. NAN Ukrainy.*—2010.—N 6.—P. 152–157.
36. Tkachuk Z. Yu., Dubey L. V., Tkachuk V. V., Tkachuk L. V., Losytskyy M. Yu., Yashchuk V. M., Dubey I. Ya. Studying the interaction of 2'-5'-oligoadenylates and their analogues with proteins by fluorescence spectroscopy // *Ukr. Biochem. J.*—2011.—**83**, N 1.—P. 45–53.
37. Silverman R. H. Viral encounters with 2'-5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response // *J. Virol.*—2007.—**81**, N 23.—P. 12720–12729.
38. Chakrabarti A., Jha B., Silverman R. H. New insights into the role of RNase L in innate immunity // *J. Interferon Cytokine Res.*—2011.—**31**, N 1.—P. 49–57.
39. Anderson B. R., Muramatsu H., Jha B. K., Silverman R. H., Weissman D., Kariko K. Nucleoside modifications in RNA limit activation of 2'-5'-oligoadenylate synthetase and increase resistance to cleavage by RNase L // *Nucleic Acids Res.*—2011.—**39**, N 21.—P. 9329–9338.

Received 03.11.12