

УДК 577.29+615.015+616.006

**ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ РНКаз  
НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫХ  
КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ В КЛЕТКАХ  
ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ПОЧКИ ЧЕЛОВЕКА**

*П.В. Зеленихин, А.И. Колпаков, В.А. Митькевич,  
А.А. Макаров, О.Н. Ильинская*

**Аннотация**

Исследована связь между активностью  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых калиевых каналов ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ -каналов), искусственно внесенных в клетки эмбриональной почки человека, и подверженностью данных клеток цитотоксическому действию катионных микробных РНКаз. Показано, что внесение экзогенной РНКазы в среду через 24 ч культивирования приводило к увеличению мембранного тока через  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -каналы. Дальнейшее культивирование приводило к угнетению функций канальных белков. Удаление из среды культивирования РНКаз приводило к восстановлению активности  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -каналов. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о возможной регуляции функций  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -каналов катионными экзогенными РНКазами на трансляционном и транскрипционном уровнях.

**Ключевые слова:** бактериальные РНКазы, цитотоксичность,  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые калиевые каналы.

**Введение**

Токсическое действие экзогенных РНКаз на раковые клетки послужило толчком к изучению этих ферментов в качестве противоопухолевых препаратов. Значительный объем экспериментальных и теоретических данных, полученных в разных лабораториях и исследовательских центрах мира, существенно расширил представления о свойствах и механизмах действия цитотоксичных РНКаз. Тем не менее в силу многих причин говорить о массовом практическом применении противораковых препаратов на основе РНКаз пока преждевременно. На сегодняшний день известно значительное количество РНКаз, обладающих селективным цитотоксическим действием по отношению к клеткам опухолей [1–3]. Наиболее известным ферментом этого ряда является РНКаз лягушки *Rana pipiens* – онконаза [4] – перспективный препарат для терапии злокачественной мезотелиомы легких, которая индуцирует апоптоз опухолевых клеток преимущественно по митохондриальному пути. РНКаз бычьих семенников (BS-РНКаз) индуцирует апоптоз клеток миелоидного лейкоза, нейробластомы [5] и агрессивных субтипов опухолей щитовидной железы [6]. Рибонуклеаза *Bacillus intermedius* (биназа) индуцирует апоптоз клеток миелогенного лейкоза K562, не оказывая негативного влияния на нормальные лимфоциты периферической крови [7].

Несмотря на то что основной эффект взаимодействия клетки с экзогенной РНКазой состоит в деградации доступных клеточных РНК, необходимо отметить регуляторные эффекты продуктов этой деградации. Последние могут относиться к различным типам малых некодирующих РНК, способных влиять на процессы РНК-интерференции. На сегодняшний день многие описанные регуляторные эффекты экзогенных РНКаз объясняются именно их воздействием на образование или разрушение малых некодирующих РНК [8].

Известно, что антипролиферативное действие биназы на фибробласты, трансформированные онкогеном *ras*, ассоциировано с угнетением в них тока ионов через  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые калиевые каналы [9], в то время как в нормальных клетках тесной связи между функционированием  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -каналов и степенью токсического действия РНКазы на клетки не наблюдалось. В то же время показано, что  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -каналы играют важную роль в реализации механизмов начальной стадии апоптоза [10]. Таким образом,  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -каналы могут быть объектами направленного воздействия в терапии опухолевых заболеваний цитотоксичными РНКазами.

В настоящей работе исследованы изменения физиологической активности  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -каналов, инициированные воздействием микробных РНКаз: биназы, РНКазы *Streptomyces aureofaciens* (РНКазы Sa) и ее катионного мутанта 5К.

### 1. Материалы и методы исследования

В работе использовали биназу – гуанилспецифичную РНКазу *Bacillus intermedius* 7P дикого типа (молекулярная масса 12.3 кДа, 109 аминокислотных остатков, pI 9.5) [6], а также нативную РНКазу Sa (молекулярная масса 10.2 кДа, 96 аминокислотных остатков, pI 3.5) и ее мутантный вариант 5К (pI 9.1). Физико-химические и каталитические свойства биназы и РНКаз Sa и 5К охарактеризованы в [11–13].

Исследование эффектов РНКаз проводили на клетках эмбриональной почки человека (НЕК293), в норме лишенных  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -каналов. Клетки были трансфицированы геном кальций-зависимых калиевых каналов hSK4, как это описано ранее [14]. Клетки выращивали в питательной среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma), 2 мМ глутамин, по 100 ед./мл пенициллина и стрептомицина и 400 мкг/мл гентамицина при 37 °С в атмосфере 6%  $\text{CO}_2$ .

Мембранный ток отдельных клеток измеряли с помощью патч-кламп технологии, как это описано в [15]. Для определения значения тока измерения проводили для 9–15 клеток в серии.

Математическую обработку результатов цитометрии проводили с помощью Statistica 6.0, используя непараметрический критерий Манна – Уитни в качестве критерия достоверности. При этом  $p \leq 0.05$  принимали за достоверный уровень значимости.

### 2. Результаты и обсуждение

При культивировании с биназой (300 мкг/мл) в течение 24 и 48 ч в популяции клеток НЕКhSK4 происходило снижение количества клеток с активными  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимыми калиевыми каналами. После 24 и 48 ч инкубации число клеток с активными  $\text{K}_{\text{Ca}}$ -каналами снизилось до 55% и 45% соответственно (рис. 1).

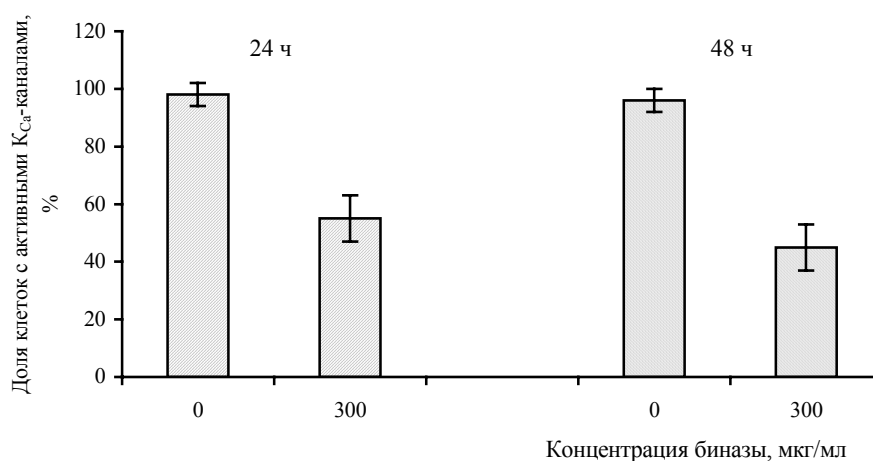


Рис. 1. Изменение доли клеток с активными  $K_{Ca}$ -каналами под действием биназы (300 мкг/мл) после 24 и 48 ч инкубирования. За 100% принято количество клеток с активными  $K_{Ca}$ -каналами в пробах необработанных биназой

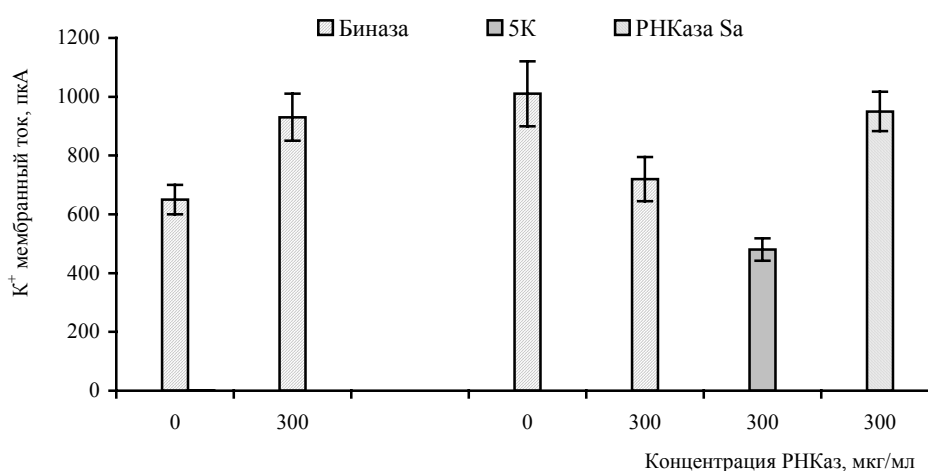


Рис. 2. Изменение  $K^+$  тока через  $K_{Ca}$ -каналы клеток HEK293 под действием РНКаз (300 мкг/мл) после 24 и 48 ч инкубирования

Одновременно со снижением доли клеток, несущих активные  $K_{Ca}$ -каналы, в течение первых 24 часов культивирования с биназой происходило увеличение калиевого мембранного тока через эти каналы у клеток, их сохранивших. Значение  $K^+$ -тока у клеток, обработанных биназой, возрастало на 40% по сравнению с контролем. Через 48 ч культивирования значение  $K^+$ -мембранного тока у клеток, имеющих активные  $K_{Ca}$ -каналы, в опытных пробах снижалось по сравнению с контролем на 25% (рис. 2). РНКазы 5К сходным образом изменяла калиевый ток через каналы клеток HEK293 через 48 ч культивирования, снижая его на 54%. Нецитотоксичная РНКаз Sa не вызывала снижения активности  $K_{Ca}$ -каналов после 48 ч совместного инкубирования (рис. 2). Поскольку ингибирование активности каналов было немгновенным и требовало времени, это

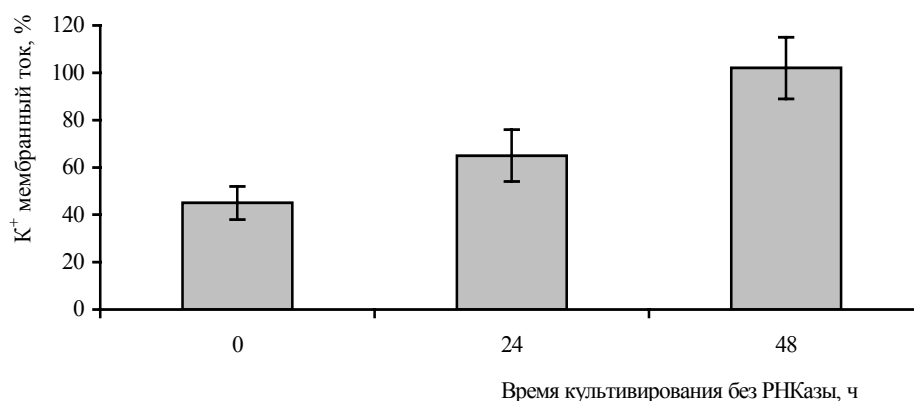


Рис. 3. Восстановления функций  $K_{Ca}$ -каналов клеток HEK293 после инкубации с РНКазой. Клетки культивировали с РНКазой 5К (300 мкг/мл) 96 ч, затем переносили в среду без РНКазы. За 100% принято значение мембранного тока контрольных клеток, не подвергавшихся обработке РНКазой

косвенно свидетельствует не о прямом ингибировании активности каналов РНКазой, а об опосредованном действии этих ферментов, возможно влияющих на экспрессию генов канального белка.

Данное предположение подтвердили результаты эксперимента по восстановлению функций  $K_{Ca}$ -каналов после инкубации с РНКазой. После инкубации с РНКазой 5К (300 мкг/мл) в течение 96 ч клетки HEK293 переносили в среду без РНКазы и регистрировали восстановление кальций-зависимого калиевого тока отдельных клеток. Полное восстановление функций  $K_{Ca}$ -каналов таких клеток происходило за 48 ч (рис. 3).

Полученные результаты свидетельствуют о принципиальной роли  $K_{Ca}$ -каналов в проявлении цитотоксических эффектов РНКаз и должны быть учтены при разработке лекарственных препаратов на их основе.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» (ГК № 02.512.12.2014), «Развитие научного потенциала высшей школы (РНП.2.1.1.1005), РФФИ (проект № 07-04-01051) и НИОКР АН РТ ГК 03-3.5.2/2008 (ФП).

### Summary

*P.V. Zelenikhin, A.I. Kolpakov, V.A. Mitkevich, A.A. Makarov, O.N. Ilinskaya.* The Effect of the Exogenous Bacterial RNase on Calcium-activated Potassium Channels in Human Embryo Kidney Cells Functioning.

The connection between the action of cationic microbial RNases and  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel was investigated in human embryo kidney cells HEK293 artificially expressing the channels. After 24 hours potassium current of RNase-treated cells increased, whereas after 48 hours the  $K^+$  membrane current significantly decreased. Removing the RNases from culture medium led to potassium channels reactivation. Basing on this pattern, we hypothesize that RNases downregulate  $K_{Ca}$ -channels at the level of transcription and translation.

**Key words:** bacterial RNases, cytotoxicity,  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels.

## Литература

1. *Leland P., Raines R.* Cancer chemotherapy – ribonucleases to the rescue // *Chem. Biol.* – 2001. – V. 8. – P. 405–413.
2. *Spalletti-Cernia D., Sorrentino S., Gaetano S. Di, Piccoli R., Santoro V., D'Alessio G., Laccetti P., Vacchio G.* Highly selective toxic and proapoptotic effects of two dimeric ribonucleases on thyroid cancer cells compared to the effects of doxorubicin // *Brit. J. Cancer. Res.* – 2004. – V. 90. – P. 270–277.
3. *Ильинская О.Н., Макаров А.А.* Почему рибонуклеазы вызывают гибель раковых клеток // *Мол. биол.* – 2005. – Т. 39, № 1. – С. 3–13.
4. *Saxena S.K., Shogen K., Ardelt W.* Onconase and its therapeutic potential // *Lab. Med.* – 2003. – V. 34. – P. 380–387.
5. *Marinov I, Soucek J.* Bovine seminal ribonuclease induces in vitro concentration dependent apoptosis in stimulated human lymphocytes and cells from tumor cell lines // *Neoplasma.* – 2000. – V. 47. – P. 294–298.
6. *Kochetkov R., Cinatl J., Krivtchik A.A., Vogel J.U., Matousek J., Pouckova P., Kornhuber B., Schwabe D., Cinatl Jr.* Selective activity of BS-Rnase against anaplastic thyroid cancer // *Anticancer Res.* – 2001. – V. 21. – P. 1035–1042.
7. *Zelenikhin P.V., Ilinskaya O.N., Petrushanko I.Y., Mitkevich V.A., Prassolov V.S., Makarov A.A.* Binase induces apoptosis of transformed myeloid cells and does not induce T-cell immune response // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – V. 361. – P. 1000–1005.
8. *Ardelt B., Ardelt W., Darzynkiewicz Z.* Cytotoxic ribonucleases and RNA interference (RNAi) // *Cell Cycle.* – 2003. – No 2. – P. 22–24.
9. *Ilinskaya O.N., Koschinsky A., Mitkevich V.A., Repp H., Dreyer F., Pace C.N., Makarov A.A.* Cytotoxicity of RNases is increased by cationization and counteracted by K(Ca) channels // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – V. 314. – P. 550–554.
10. *Lang F., Shumilina E., Ritter M., Gulbins E., Vereninov A., Huber S.M.* Ion channels and cell volume in regulation of cell proliferation and apoptotic cell death // *Contrib. Nephrol.* – 2006. – V. 152. – P. 142–160.
11. *Sevcik J., Urbanikova L., Leland P.A., Raines R.T.* X-Ray structure of two crystalline forms of a Streptomyces ribonuclease with cytotoxic activity // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – P. 47325–47330.
12. *Schulga A., Kurbanov F., Kirpichnikov M., Protasevich I., Lobachev V., Ranjbar B., Chekhov V., Polyakov K., Engelborghs Y., Makarov A.* Comparative study of binase and barnase: experience in chimeric ribonucleases // *Protein Engin.* – 1998. – V. 11. – P. 773–780.
13. *Yakovlev G.I., Moiseyev G.P., Struminskaya N.K., Borzykh O.A., Kipenskaya L.V., Znamenskaya L.V., Leschinskaya I.B.* Mutational analysis of the active site of RNase of *Bacillus intermedius* (BINASE) // *FEBS Lett.* – 1994. – V. 354. – P. 305–306.
14. *Ilinskaya O.N., Koschinski A., Repp H., Mitkevich V.A., Dreyer F., Scholtz J.M., Pace C.N., Makarov A.A.* RNase-induced apoptosis: fate of calcium-activated potassium channels // *Biochimie.* – 2008. – V. 5. – P. 717–725.
15. *Repp H., Birringer J., Koschinski A., Dreyer F.* Activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> current in mouse fibroblasts by sphingosine-1-phosphate involves the protein tyrosine kinase c-Src // *Arch. Pharmacol.* – 2001. – V. 363. – P. 295–301.

**Зеленихин Павел Валерьевич** – кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: *pasha\_mic@mail.ru*

**Колпаков Алексей Иванович** – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией Биосинтеза и биоинженерии ферментов кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: *Alexei.Kolpakov@ksu.ru*

**Митькевич Владимир Александрович** – кандидат химических наук, старший научный сотрудник Института молекулярной биологии РАН, г. Москва.

E-mail: *vmitkevich@eimb.ru*

**Макаров Александр Александрович** – доктор биологических наук, профессор, академик РАН, директор Института молекулярной биологии РАН, г. Москва.

E-mail: *aamakarov@genome.eimb.relarn.ru*

**Ильинская Ольга Николаевна** – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: *Olga.Ilinskaya@ksu.ru*