

УДК 577.29+615.015+616.006

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ БИНАЗЫ ПО ОТНОШЕНИЮ К ОПУХОЛЕВЫМ И НОРМАЛЬНЫМ КЛЕТКАМ

Э.А. Кабрера Фуентес, П.В. Зеленихин, А.И. Колтаков,  
К.Т. Прайсснер, О.Н. Ильинская

### Аннотация

Благодаря своей биологической активности рибонуклеазы способны стать основой для разработки новых препаратов, предназначенных к использованию в терапии злокачественных новообразований. В настоящей работе охарактеризовано цитотоксическое действие рибонуклеазы *Bacillus intermedius* по отношению к клеткам линий солидных опухолей: аденокарциномы легких (A549), фибросаркомы человека (HT1080) и глиомы мышей С6 [АТСС]. Фермент обладает выраженным цитотоксическим действием в отношении клеток линий А549 и С6, в то же время не подавляет пролиферацию клеток HT1080, что, вероятно, связано с разным уровнем экспрессии *ras*-онкогенов клетками данных линий. Во всем диапазоне исследованных концентраций (0.1–300 мкг/мл) рибонуклеаза не проявляла выраженной цитотоксичности по отношению к линии клеток эпителия пуповинной вены человека (HUVEC). Полученные данные свидетельствуют о перспективности работ, направленных на выявление в опухолевых клетках определенных онкогенов как маркеров их подверженности цитотоксическому действию биназы.

**Ключевые слова:** биназа, цитотоксичность, онкоген *ras*, линии клеток А549, С6, HT1080, HUVEC.

### Введение

Рибонуклеазы, кроме своих непосредственных каталитических функций, обладают широчайшим спектром биологических эффектов. Это участие в регуляторных системах клетки, контроль роста кровеносных сосудов, токсичность по отношению к клеткам опухолей, противовирусная активность. Выявлено 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], которая успешно проходит III стадию клинических испытаний как противоопухолевый препарат, предназначенный к использованию в терапии злокачественных новообразований легких. Особое внимание обращают на себя РНКазы, филогенетически далекие от своих аналогов у млекопитающих, такие, как РНКазы амфибий, грибов и микроорганизмов, нечувствительные к действию присутствующего в клетках млекопитающих ингибитора РНКаз [5]. Отсутствие возможности у бактериальных рибонуклеаз быть инактивированными ингибитором РНКаз, а также широкие возможности для биоинженерии этих ферментов делает их привлекательными для разработки новых терапевтических

средств [6]. В связи с вышеизложенным целью настоящей работы стал сравнительный анализ цитотоксичности рибонуклеазы *Bacillus intermedius* (биназы) для обнаружения ее избирательного действия по отношению к опухолевым клеткам. Важнейшим аспектом для обоснования практического применения рибонуклеаз является выявление их селективного действия на раковые клетки, которое, как показано нами ранее, связано с экспрессией определенных онкогенов [7–9]. Установлено, что экспрессия мутантного гена *ras* увеличивает чувствительность *ras*-трансформированных фибробластов к действию рибонуклеазы *Bacillus intermedius* (биназы) [9], рибонуклеазы ооцитов лягушки *Rana pipiens* (онконазе) [10] и катионного мутанта РНКазы *Streptomyces aureofaciens* (катионной РНКазе Sa) [11] по сравнению с нетрансформированными клетками. Поскольку активирующие мутации в семействе генов *ras* обнаружены в 20–25% всех опухолей и в 90% случаев специфических опухолей человека [12], в настоящей работе мы обсуждаем возможность взаимосвязи чувствительности опухолевых клеток к биназе с экспрессией мутантных *ras*-генов

### 1. Материалы и методы исследования

В работе использовали биназу – гуанилспецифичную РНКазу *Bacillus intermedius* 7Р дикого типа (молекулярная масса 12.3 кДа, 109 аминокислотных остатков, pI = 9.5) [13]. Каталитическая активность биназы охарактеризована ранее по отношению к синтетическим субстратам [14] и высокополимерной дрожжевой РНК [15]. Биназа была изолирована как гомогенный белок из культуральной жидкости *Escherichia coli* BL21, несущей плазмиду pGEMGX1/ent/Bi. Очистка фермента проведена согласно процедуре, описанной Шульгой с соавторами. [13]. Чистота препарата подтверждена электрофоретически (рис. 1).

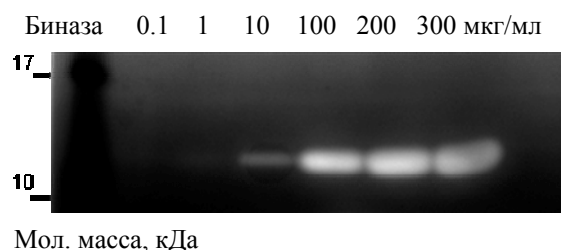


Рис. 1. Электрофореграмма препарата биназы высокой степени очистки

Клеточные линии эпителия пуповинной вены человека (HUVEC), аденокарциномы легких (A549), фибросаркомы человека (HT1080) и клетки глиомы мышей С6 [АТСС] из коллекции клеточных культур США (АССС) выращивали соответственно на стандартных средах ECGM (Endothelial Cell Growth Medium, PromoCell) для HUVEC; DMEM для A549, HT1080; M199 (Invitrogen) для С6 с добавлением пенициллина/стрептомицина (по 10000 ед.) и 10%-ной телячьей сыворотки в атмосфере 5%-ного CO<sub>2</sub>.

Анализ цитотоксичности биназы проводили с использованием теста, основанного на ингибировании пролиферации клеток, измеренной по активности митохондриальных дегидрогеназ, восстанавливающих производные формазана

(The CellTiter 96R AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega) и теста, основанного на увеличении выхода в среду внутриклеточной лактатдегидрогеназы при токсическом действии на клетки исследуемой РНКзы (Cytotoxicity Detection Kit LDH, Roche). Клетки засеивали с плотностью 5–10 тыс./мл, выращивали до образования монослоя и заменяли среду на аналогичную, содержащую концентрации биназы до 300 мкг/мл. После роста в течение 48 ч проводили анализ цитотоксичности.

Статистическая обработка результатов, полученных из трехкратных повторностей каждого эксперимента, проводилась стандартными методами в программе Microsoft Excel 2007.

## 2. Результаты и их обсуждение

В течение 48 ч биназа в концентрациях от 0.1 до 300 мкг/мл среды не ингибировала пролиферацию нормальных клеток эпителия HUVES. В максимальной из использованных концентраций снижение активности пролиферации не превышало 5% (рис. 2, *а*). В то же время биназа на 20% снижала пролиферацию онкотрансформированных клеток A549, начиная с концентрации более 100 мкг/мл, а при концентрации 300 мкг/мл это снижение составило 35% от уровня пролиферации необработанных РНКазой клеток. За 72 ч обработки клеток биназа вызывала снижение уровня пролиферации линии опухолевых клеток на 60% при концентрации 300 мкг/мл, действие фермента на нормальные клетки эпителия оставалось незначительным (данные не представлены). Результаты, полученные в тесте по активации выхода лактат дегидрогеназы из клеток после токсического действия биназы, оказались схожими, хотя показатели токсичности имели более высокое значение, что позволяет говорить о более высокой чувствительности теста по сравнению с тестом по ингибированию пролиферации. Установлено, что цитотоксичность биназы в максимальной из использованных концентраций достигала 42% по отношению к клеткам карциномы легких A549 и не проявлялась по отношению к нормальным эпителиальным клеткам HUVES (рис. 2, *б*). Более того, если время обработки биназой продлевали до 72 ч, выход лактат дегидрогеназы из клеток A549 на 50% превышал таковой в контрольном варианте под действием Тритона X-100 и лишь незначительно возрастал у клеток HUVES. Полученные данные однозначно свидетельствуют о том, что биназа избирательно ингибирует пролиферацию раковых клеток эпителиального происхождения.

Для других опухолевых клеток, использованных в работе, выявлены различающиеся эффекты биназы. Так, клетки глиомы мышей нейроэпителиального происхождения С6 так же, как и линия клеток A549, проявили чувствительность к токсическому действию фермента: активация выхода лактатдегидрогеназы составила 24% при концентрации биназы 300 мкг/мл. В то же время клетки фибросаркомы человека мезенхимного происхождения НТ1080 не были подвержены влиянию РНКазы (рис. 2, *в*). Мы предположили, что на чувствительность клеток к действию РНКаз оказывает влияние экспрессия активированных онкогенов, в частности семейства *ras*. Выявление связи спектра экспрессируемых онкогенов с подверженностью опухолевых клеток цитотоксическому действию РНКаз представляет собой важную задачу, решение которой может определить

перспективы применения РНКаз как противоопухолевых агентов. Известно, что семейство генов *ras* у млекопитающих состоит из основных генов Харви (*H-ras*), Кирстена (*K-ras*) и нейробластомного (*N-ras*), которые различаются только по 40 С-терминальным аминокислотам. В нормальных клетках эпителия активированные гены *ras* не экспрессируются, для нечувствительных к биназе клеток HT1080 показана экспрессия *N-ras* [16], для клеток С6 – *H-ras* [17], а для наиболее чувствительной линии клеток А549 – экспрессия *K-ras* [18] и *H-ras* [19]. С учетом того, что опухолевые клетки мезенхимального происхождения оказались нечувствительными к биназе, в отличие от опухолей эпителиального происхождения, можно предполагать определенную роль экспрессии активированных *H-ras* и *K-ras* генов в восприимчивости к РНКазам эпителиальных раковых клеток. Известно, что именно мутантный *K-ras* причастен к инициации многих опухолей [20], поэтому связь между поражением опухолевых клеток биназой и его экспрессией заслуживает пристального внимания и дальнейшего изучения.

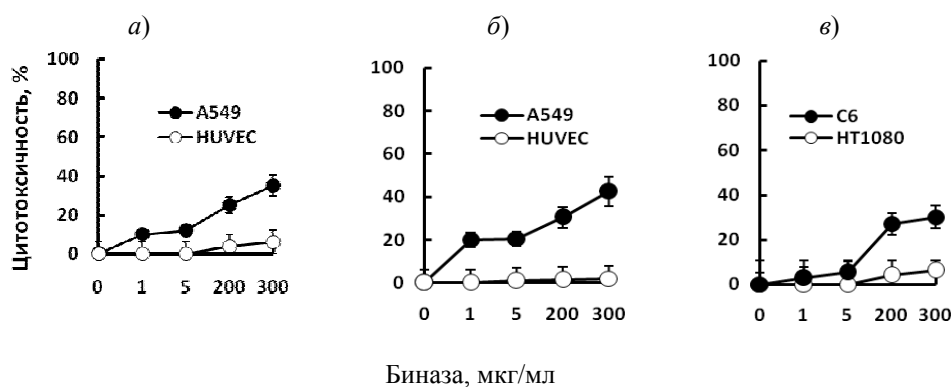


Рис. 2. Цитотоксичность биназы за 48 ч действия по отношению к линиям клеток А549, HUVEC, HT1080 и С6 в тесте по ингибированию уровня пролиферации (а) и по активации выхода лактат дегидрогеназы (б, в). За 100% цитотоксичности принят вариант с отсутствием пролиферирующих клеток (а) и вариант, где выход лактатдегидрогеназы индуцирован Тритоном Х-100 (б, в)

Работа выполнена при поддержке International Graduate School PROMISE (DFG – German Research Foundation), Conacyt Mexico (CVU260952), Российских федеральных программ (№ 2.1.1./920, № 02.740.11.0391).

### Summary

*H.A. Cabrera Fuentes, P.V. Zelenikhin, A.I. Kolpakov, K.T. Preissner, O.N. Ilinskaya.*  
Comparative Toxicity of Binase towards Tumor and Normal Cells.

Due to their biological activity ribonucleases are able to become the basis for the development of novel drugs in malignant neoplasms therapy. The work characterizes cytotoxic activity of *Bacillus intermedius* ribonuclease towards solid tumor cells: pulmonary adenocarcinoma (A549), human fibrosarcoma (HT1080) and murine glioma C6 (ATCC). The enzyme possesses high cytotoxic effect on A549 and C6 cells and does not at the same time inhibit proliferation of HT1080 cells. This fact could be explained by the different expression levels

of *ras*-oncogenes by the tested cell lines. Ribonuclease did not show cytotoxicity towards human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in concentration range of 0.1–300 µg/ml. The data obtained indicate that detection of certain oncogenes in tumor cell as markers of their susceptibility to binase cytotoxic action is very promising.

**Key words:** binase, cytotoxicity, *ras*-oncogenes, A549, C6, HT1080, HUVEC cell lines.

### Литература

1. Leland P., Raines R. Cancer chemotherapy – ribonucleases to the rescue // *Chem. Biol.* – 2001. – V. 8, No 5. – 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, No 1. – 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. Ardelit W., Shogen K., Darzynkiewicz Z. Onconase and amphinase, the antitumor ribonucleases from *Rana pipiens* oocytes // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2008. – V. 9, No 3. – P. 215–225.
5. Sevcik J., Urbanikova L., Leland P.A., Raines R.T. X-Ray structure of two crystalline forms of a Streptomycete ribonuclease with cytotoxic activity // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277, No 49. – P. 47325–47330.
6. 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.
7. Ilinskaya O.N., Zelenikhin P.V., Petrushanko I.Yu., Mitkevich V.A., Prasolov V.S., Makaro A.A. Binase induces apoptosis of transformed myeloid cells and does not induce T-cell immune response // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – V. 361, No 4. – P. 1000–1005.
8. Mitkevich V.A., Petrushanko I.Yu., Kretova O.V., Spirin P.V., Zelenikhin P.V., Prasolov 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.
9. Ilinskaya O.N., Decker K., Koschinski A., Dreyer F., Repp H. *Bacillus intermedius* ribonuclease as inhibitor of cell proliferation and membrane current // *Toxicol.* – 2001. – V. 156, No 2–3. – P. 101–107.
10. Smith M.R., Newton D.L., Mikulski S.M., Rybak S.M. Cell cycle-related differences in susceptibility of NIH/3T3 cells to ribonucleases // *Exper. Cell. Res.* – 1999. – V. 247, No 1. – P. 220–232.
11. 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.
12. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy // *Nat. Rev. Cancer.* – 2003. – V. 3, No 1. – P. 11–22.
13. 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, No 9. – P. 773–780.
14. 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, No 3. – P. 305–306.

15. *Ilinskaya O.N., Ivanchenko O.B., Karamova N.S., Kipenskaya L.V.* SOS-inducing ability of native and mutant microbial ribonucleases // *Mut. Res.* – 1996. – V. 354, No 2. – P. 203–209.
16. *Paterson H., Reeves B., Brown R., Hall A., Furth M., Bos J., Jones P., Marshall C.* Activated N-ras controls the transformed phenotype of HT1080 human fibrosarcoma cells // *Cell.* – 1987. – V. 51, No 5. – P. 803–812.
17. *Perkins E., Calvert J., Lancon J.A., Parent A.D., Zhang J.* Inhibition of H-ras as a treatment for experimental brain C6 glioma // *Mol. Brain Res.* – 2003. – V. 111, No 1–2. – P. 42–51.
18. *Rodenhuis S., van de Wetering M.L., Mooi W.J., Evers S.G., van Zandwijk N., Bos J.L.* Mutational activation of the K-ras oncogene: a possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung // *N. Engl. J. Med.* – 1987. – V. 317, No 15. – P. 929–935.
19. *Xiao Guang Chen, Otani Shuzo, Yan Li, Rui Han.* Inhibition of Farnesyl Protein Transferase, H-ras Oncogene Expression and P21<sup>ras</sup> Membrane Association by Natural Products in Human Solid Tumor Cell Lines // *J. Asian Nat. Prod. Res.* – 1998. – V. 1. – P. 29–51.
20. *Quinlan M.P., Quatela S.E., Philips M.R., Settleman J.* Activated Kras, but not Hras or Nras, may initiate tumors of endodermal origin via stem cell expansion // *Mol. Cellul. Biol.* – 2008. – V. 28, No 8. – P. 2659–2674.

Поступила в редакцию  
28.06.10

---

**Кабрера Фуентес Эктор Александро** – аспирант кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [alexcafu3001@gmail.com](mailto:alexcafu3001@gmail.com)

**Зеленихин Павел Валерьевич** – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [pasha\\_mic@mail.ru](mailto:pasha_mic@mail.ru)

**Колпаков Алексей Иванович** – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией биосинтеза и биоинженерии ферментов кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [Alexei.Kolpakov@ksu.ru](mailto:Alexei.Kolpakov@ksu.ru)

**Прайсснер Клаус** – доктор медицинских наук, директор Института биохимии медицинской школы Университета Гиссена, Германия.

E-mail: [Klaus.T.Preissner@biochemie.med.uni-giessen.de](mailto:Klaus.T.Preissner@biochemie.med.uni-giessen.de)

**Ильинская Ольга Николаевна** – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [Olga.Ilinskaya@ksu.ru](mailto:Olga.Ilinskaya@ksu.ru)