РНКаза с противоопухолевым действием (биназа) вызывает изменение клеточной проницаемости

Э.А. Кабрера-Фуентес, П.В. Зеленихин, А.И. Колпаков, О.Н. Ильинская
Казанский (Приволжский) Федеральный университет, Казань

Antitumor RNase (binase) induces the alteration of cellular permeability

H.A. Cabrera–Fuentes, P.V. Zelenikhin, A.I. Kolpakov, O.N. Ilinskaya
Kazan (Volga–Region) Federal University, Kazan

Ряд РНКаз, среди которых есть и микробные ферменты, обладает протовоопухолевым действием, механизм которого не ясен. В настоящей работе исследован начальный этап взаимодействия РНКаз с эукариотическими клетками, связанный с изменением их проницаемости для ионов и макромолекул.

На клеточных культурах карциномы легких A549, эмбриональной почки человека HEK и дрожжах Candida с использованием анализа поглощения изотопа $^{45}Ca^{2+}$ либо флуоресцентного красителя Fura-2/AM изучено влияние цитотоксичной РНКазы Bacillus intermedius (биназы) на накопление внутриклеточного кальция. Изменение проницаемости клеток A549, обработанных биназой, проанализировано по проникновению меченого трипановым синим альбумина через клеточный монослой. Выживаемость клеток A549 оценена по активности митохондриальных дегидрогеназ, восстанавливающих производные тетразолия, стабильность мембран эритроцитов оценена по выходу гемоглобина при осмотическом шоке.

Установлено, что биназа увеличивает проницаемость клеток высших и низших эукариот для ионов кальция. Клетки A549 под действием биназы также усиливают проницаемость для макромолекул. Обработка биназой защищает эритроциты от осмотического шока.

Следующее за увеличением проницаемости протекторное либо цитотоксическое действие биназы реализуется в зависимости от типа клеток, где ключевую роль играет экспрессия K_{Ca} каналов и определенных онкогенов, в частности, онкогенов семейства ras. Полученные данные подтверждают принципиальную важность увеличения клеточной проницаемости как первичного этапа в механизме проявления биологических эффектов биназы.

Ключевые слова. Биназа, цитотоксичность, проницаемость клеток, Ca^{2+}.

Some RNases including ones of microbial origin possess antitumor activity, which mechanisms remains unclear. Here we investigated the first step of RNase action towards eukaryotic cells which is connected with increase of cell permeability for ions and macromolecules.

Using radiological analysis of $^{45}Ca^{2+}$uptake by Candida yeast and fluorescence imaging of human embryo kidney cells HEK stained by Ca^{2+}-specific Fura-2/AM day the level of intracellular Ca^{2+} under treatment with the RNase of Bacillus intermedius (binase) was studied. Viability of lung carcinoma epithelial cells A549 treated by binase was measured by WST proliferation kit, stability of erythrocytes was tested by lysis assay.

We have shown that binase induces the permeability increase of lower and higher eukaryotic cells for Ca^{2+}as well as the increase of protein permeability of A549 cells. Binase treatment protects erythrocytes from osmotic shock.

The protective or cytotoxic binase effect followed by increase of cellular permeability is realized depending on the dell type, where the expression of K_{Ca} channels and of certain oncogens, particularly of ras family, is crucial. The obtained data supports the significance of the cell permeability increase as a primary step in the mechanisms of binase-induced biological effects.

Key words: Binase, cytotoxicity, cellular permeability, Ca^{2+}.

Биологические функции рибонуклеаз (РНКаз), связанные с регуляцией экспрессии генов, роста и развития клеток, защитой от патогенов и индукцией апоптоза, привлекают пристальное внимание исследователей. РНКазы семенников быка (BS-РНКаза), овоцитов лягушки *Rana pipiens* (онконаза), бактерий *Streptomyces aureofaciens* (РНКаза Sa3), *Bacillus intermedius* (биназа) рассматривают как перспективные агенты альтернативной химиотерапии злокачественных новообразований [1–5]. Целенаправленный поиск терапевтически значимых ферментов среди РНКаз млекопитающих не всегда тактически оправдан в связи с эволюционно сформировавшейся системой защиты клетки млекопитающих от излишней активности собственных РНКаз, опосредованной действием специфического цитозольного их ингибитора [3]. В связи с этим, особый интерес вызывают РНКазы, филогенетически далекие от своих аналогов у млекопитающих, такие как РНКазы амфибий, грибов и микроорганизмов, нечувствительные к действию ингибитора РНКаз млекопитающих [5]. Нами ранее показано, что селективность действия РНКаз по отношению к опухолевым клеткам определяется молекулярными характеристиками фермента, прежде всего катионностью [6, 7], а также экспрессионным профилем неопластической клетки, где маркерной для проявления избирательной цитотоксичности является экспрессия онкогенов *ras, kit* и AML-ETO [6, 8–10]. Вероятно, продукты гидролиза клеточной РНК могут принимать участие в процессе РНК-интерференции [11, 12], подавляя экспрессию маркерных онкогенов. Однако механизмы цитотоксического действия РНКаз до конца не ясны. Особенно мало сведений о первом этапе взаимодействия экзогенных РНКаз с опухолевой клеткой. Для BS-РНКазы зафиксированы адсорбция и последующая

e-mail: Olga.Ilinskaya@ksu.ru

интернализация фермента как нормальными, так и малигнизированными клетками щитовидной железы и фибробластами [13]. Для РНКазы-3 (катионный белок эозинофилов, ECP) установлено, что агрегация фермента на клеточной мембране индуцирует апоптоз без проникновения фермента внутрь клеток миелогенного лейкоза HL-60 и аденокарциномы HeLa [14]. Методом иммунофлуоресценции нами выявлено цитотоксическое действие биназы без ее интернализации пневмоцитами опухолевой линии MLE-12 [15]. В связи с вышеизложенным целью настоящей работы стало выявление функциональных изменений клеточной поверхности, а именно проницаемости клеток для ионов и макромолекул под действием биназы.

Материал и методы

Фермент. В работе использована биназа, гуанилспецифичная РНКаза *Bacillus intermedius* 7P дикого типа (EC 3.1.27.3, молекулярная масса 12.3 кДа, 109 аминокислотных остатков, pI = 9.5) [16]. Каталитическая активность биназы охарактеризована ранее по отношению к синтетическим субстратам [17] и высокополимерной дрожжевой РНК [18]. Современный метод выделения и очистки биназы основан на ее изоляции как гомогенного белка из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *Escherichia coli* BL21, несущей плазмиду pGEMGX1/ent/Bi [16]. Высокая степень очистки биназы подтверждена электрофоретически (рис. 1).

Клетки. Клетки аденокарциномы легких (A549) и эмбриональной почки человека (HEK293) из коллекции клеточных культур США (ACCC, CCL-185 и CRL-1573, соответственно) поддерживали при 37°C на стандартной среде DMEM (Invitrogen, США) с добавлением пенициллина/стрептомицина (по 100ед.) и 10% телячьей сыворотки в атмосфере 5% CO_2. Клетки засевали 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 24–72 ч проводили анализ цитотоксичности фермента и содержания внутриклеточного кальция. Для оценки динамики накопления кальция использовали модельные эукариотические клетки дрожжей *Candida tropicalis*, выращенные на среде Сабуро до плотности 10^7 кл/мл.

Выживаемость клеток. Цитотоксичность биназы определяли с использованием теста, основанного на ингибировании пролиферации клеток, измеренной по активности митохондриальных дегидрогеназ, восстанавливающих производные тетразолия [8]. Клетки инкубировали с реагентом WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim, Германия) в течение часа и измеряли поглощение культуральной жидкости обработанных и необработанных биназой клеток при 450 нм на планшетном ридере MRX ELISA (SLT Labinstruments, Crailsheim, Германия).

Гемолитический тест. Для анализа влияния биназы на стабильность клеточных мембран использовали эритроциты, полученные из дефибринированной крови барана. Суспензию отмытых бараньих эритроцитов в изотоническом растворе (на 1 л воды: 100 мл солевого буфера TBS, 500 мл 1M $MgCl_2$, 150 мл 1M $CaCl_2$, 1 г желатины, pH 7,4) лизировали 10-кратным разбавлением дистиллятом и сопоставляли стабильность эритроцитов, предварительно обработанных биназой в течение 20 мин, с таковой без обработки. Выход гемоглобина фиксировали спектрофотометрически при 412 нм.

Уровень внутриклеточного кальция. Содержание Ca^{2+} анализировали радиометрически, с использованием изотопа $^{45}Ca^{2+}$, либо флуоресцентного красителя Fura-2/AM (Calbiochem-Novabiochem, США) с последующей обработкой данных, визуализированных на инвертированном микроскопе Leica DM IRB с системой VisiChrome imaging (Visitron, Германия), в программе Metaflouor imading software. В первом случае к суспензии дрожжей (10^8 кл/мл), обработанных биназой в течение 5 мин, добавляли $^{45}Ca^{2+}$, инкубировали 10 мин и фильтровали (Synpor, диаметр 0,2–0,4 мкм) под давлением. Фильтры дважды промывали средой с $LaCl_3$ (1,5 мМ), высушивали и помещали в сцинтилляционную жидкость ЖС-8. Радиоактивность определяли на счетчике Delta-300 (США), количество поглощенного кальция выражали в нмоль/10^8 кл. Второй вариант метода включал обработку клеток 5 мкм Fura-2/AM в растворе (в мМ: 140 NaCl, 3 KCl, 2 $MgCl_2$, 2$CaCl_2$, 10 glucose, 10 HEPES; pH 7,4) в течение 30 мин, отмывку раствором и инкубацию (37°C, 10 мин) перед микроскопией [11].

Проницаемость клеток для макромолекул. Проницаемость эпителиальных клеток A549 исследовали в камере, разделенной на два компартмента проницаемым мембранным фильтром [19]. Клетки A549 были предварительно выращены на данном фильтре до монослоя и перенесены в камеру, оба компартмента которой содержали среду DMEM. После 20 мин инкубации для установления начального равновесия в условно внутренний «полостной» компартмент, содержащий монослой, был добавлен меченый трипановым синим альбумин (60 мкМ). За его концентрацией во внешнем, «внеполостном» компартменте следили по поглощению при 480 нм (Specord 10, Carl Zeiss, Германия). Поток альбумина через поверхность монослоя выражали в моль/(с×см^2), проницаемость представляли как коэффициент (в см/с), рассчитанный с учетом разницы концентраций альбумина в двух компартментах [19]. Для оценки влияния биназы на проницаемость клеток A549 последние выращивали с биназой в диапазоне концентраций 1–100 мкг/мл в течение 24 ч, а затем переносили в камеру.

Статистическая обработка результатов, полученных из трехкратных повторностей каждого эксперимента, проводилась стандартными методами в программе Microsoft Excel 2007 с использованием *t*-критерия Стьюдента (при уровне статистической значимости $p < 0,05$).

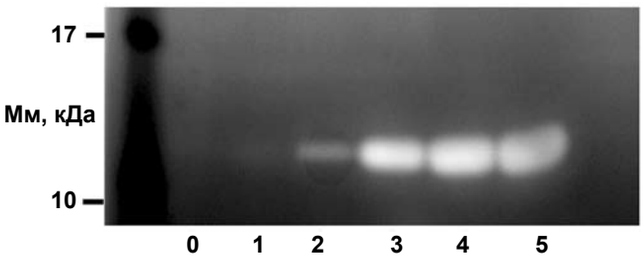

Рис. 1. Зимограмма высокоочищенного препарата биназы. Дорожки по оси X: 0 – без биназы; 1 – количество биназы 0,1 мкг; 2 – 1 мкг; 3 – 10 мкг; 4 – 100 мкг; 5 – 300 мкг. По оси Y – молекулярная масса, кДа

Результаты

Выживаемость клеток А549 под действием биназы. Анализ цитотоксичности биназы показал, что фермент снижает выживаемость клеток карциномы легких А549 пропорционально увеличению его концентрации. За 24 ч роста с биназой угнетение роста клеток не превышало 30%, однако за 48 ч. такое снижение выживаемость достигало 60% при максимальной из использованных концентраций биназы (300 мкг/мл) (рис. 2). Установленный факт усиления цитотоксического действия фермента при замене среды культивирования на новую, не содержащую биназу, после 24 ч роста в ее присутствии свидетельствует о том, что необратимые изменения клеток, приводящие в дальнейшем к их гибели, фермент наносит в первые часы своего воздействия на клетки.

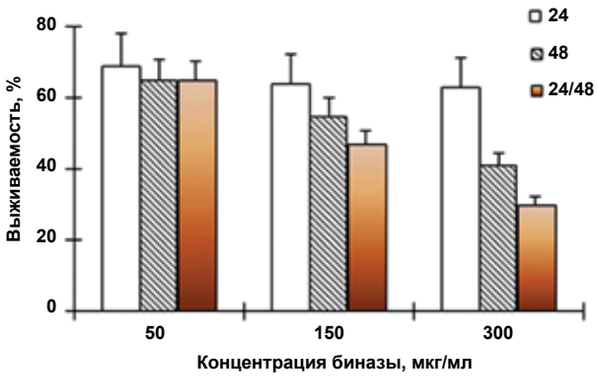

Рис. 2. Выживаемость клеток А549 под действием биназы в течение 24 ч (белые столбцы), 48 ч (заштрихованные столбцы) и в условиях замены среды с биназой после 24 ч на свежую среду, не содержащую биназу (цветные столбцы). За 100% принята выживаемость клеток, растущих без биназы

Гемолиз эритроцитов, обработанных биназой. Характер влияния биназы на стабильность мембраны эритроцитов был исследован нами в классическом тесте на гемолиз эритроцитов барана. Поскольку высокие концентрации биназы цитотоксичны, для обработки последних была выбрана концентрация 1мкг/мл. При непосредственном ее воздействии на эритроциты гемолиза не наблюдали (рис. 3). Более того, оказалось, что микроконцентрации фермента стабилизируют мембраны эритроцитов, и выход гемоглобина из обработанных биназой клеток в 2 раза меньше, чем из необработанных. Аналогично была испытана РНКаза-1 человека (коммерческий препарат Invitrogen Life Technologies, США), которая обладала сходным эффектом, однако меньшей величины: снижение интенсивности гемолиза у обработанных РНКазой-1 эритроцитов не превышало 25%.

Уровень внутриклеточного Ca^{2+} при действии биназы на клетки НЕК и клетки дрожжей. Установлено, что повышение уровня кальция в клетках НЕК происходит в части клеток популяции, причем только спустя 36 ч воздействия биназы. На более ранних этапах так же, как и в необработанных биназой клетках, обнаруживали лишь единичные клетки с повышенной концентрацией кальция (рис. 4). В дрожжевых клетках, напротив, зафиксировано кратковременное повышение содержания Ca^{2+}, которое после 40 мин воздействия биназы возвращается к исходному уровню (рис. 5).

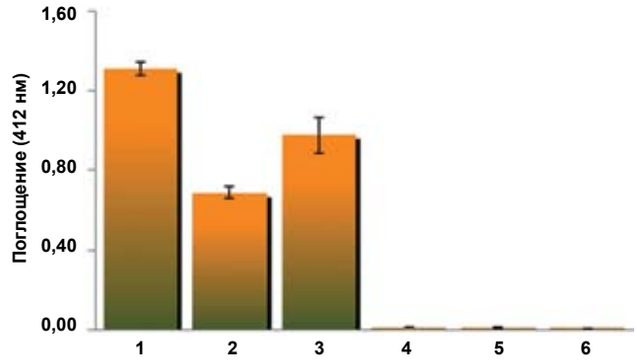

Рис. 3. Выход гемоглобина из эритроцитов барана в присутствии биназы и РНКазы-1:
1 – эритроциты (30 мкл суспензии) в дистиллированной воде; 2 – эритроциты, обработанные биназой (1 мкг/мл), в дистиллированной воде;
3 – эритроциты, обработанные РНКазой-1 (1 мкг/мл), в дистиллированной воде; 4 – эритроциты с биназой (1 мкг/мл); 5 – эритроциты с РНКазой-1 (1 мкг/мл);
6 – необработанные эритроциты

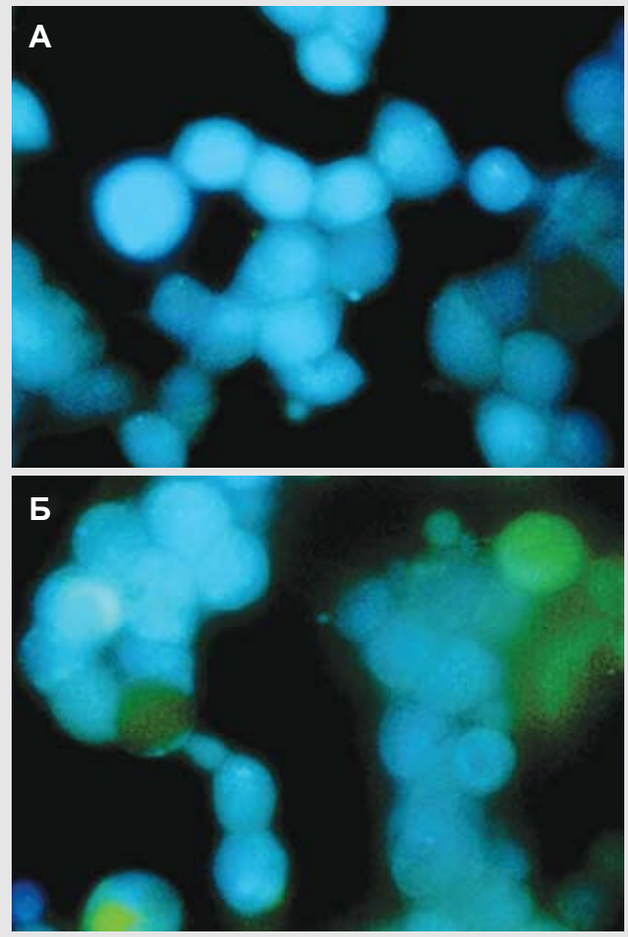

Рис. 4. Ca^{2+} в клетках НЕК, инкубирование в течение 36 ч:
А – без биназы;
Б – в присутствии 300 мкг/мл биназы.
Повышение концентрации кальция отражается в переходе цвета от голубого к зеленому.
Окраска: Fura-2/AM. Ув.: ×1500

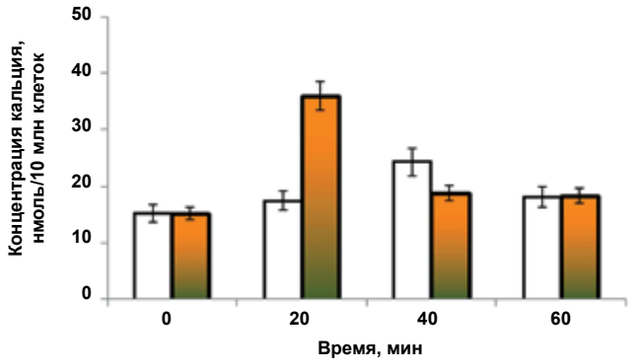

Рис. 5. Концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в клетках Candida tropicalis: первые столбцы – контроль без обработки биназой; вторые столбцы – после обработки биназой (0,1 мкг/мл)

Влияние биназы на проницаемость клеток А549 для белков. Выявлено, что рост клеток А549 с биназой в концентрациях до 100 мкг/мл не меняет проницаемость клеток для макромолекул. Обработка клеток биназой (100 мкг/мл) в течение 24 ч индуцирует увеличение проницаемости мембран эпителиальных клеток для альбумина, пик которой наблюдали на 6 час эксперимента. Хотя динамика изменений проницаемости клеток сходна с таковой для необработанных клеток, повышение величины проницаемости обработанных биназой клеток достигает 20% (рис. 6).

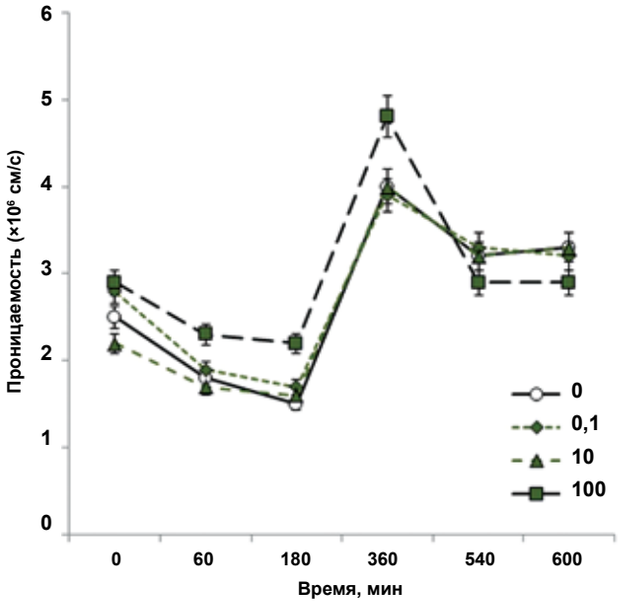

Рис. 6. Динамика изменения проницаемости для альбумина монослоя клеток А549, необработанных (сплошная линия, круг) и обработанных (пунктирные линии, ромб – 0,1 мкг/мл; треугольник – 10 мкг/мл; квадрат – 100 мкг/мл) биназой в течение 24 ч

Обсуждение

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что цитотоксическое действие биназы по отношению к опухолевым клеткам А549 проявляется в концентрациях свыше 100 мкг/мл, причем необратимые изменения происходят в первые часы роста клеток с биназой, поскольку смена среды спустя 24 ч на среду без фермента не приводит к восстановлению уровня выживаемости клеток (см. рис. 2). Ранее нами было показано, что клетки HEK также подвержены цитотоксическому действию биназы [11], в отличие от клеток дрожжей [20]. Различия в чувствительности клеток низших и высших эукариот выявлены и в динамике накопления внутриклеточного Ca^{2+}: кратковременная обработка дрожжей биназой увеличивает накопление радиоактивного Ca^{2+} уже после 20 мин. его внесения в инкубационную смесь (см. рис. 5), тогда как в клетках HEK повышение содержания Ca^{2+} выявлено лишь спустя 36 ч действия фермента (см. рис. 4). Несмотря на различное время действия РНКазы, она вызывает увеличение проницаемости для кальция во всех эукариотических клетках. Более того, биназа за 24 ч обработки клеток А549 индуцирует повышение их проницаемости и для макромолекул (см. рис. 6), что отчасти может объяснить эффект усиления действия доксорубицина другой РНКазой – онконазой – при комплексной терапии мезотелиомы легких [21]. Активация биназой поступления в клетки Ca^{2+} индуцирует работу калиевых Ca^{2+}-зависимых каналов, которая противостоит апоптическому действию биназы, как было показано нами ранее для клеток HEK с искусственно внесенными генами K_{Ca} каналов (HEKhSK4) [11, 22]. Клетки эпителия легких содержат K_{Ca} каналы [23], однако их выживаемость при 300 мкг/мл биназы составляет 40% (рис. 1), в отличие от клеток HEK без этих каналов, выживаемость которых в аналогичных условиях 70% [11]. Вероятно, экспрессия в клетках А549 онкогенов семейства *ras*, в частности, K-*ras* [24] и H-*ras* [25], снижает антиапоптический эффект активации биназой K_{Ca} каналов и повышает чувствительность клеток к ее цитотоксическому действию. Эффект усиления поступления в клетку Ca^{2+} биназой, вероятно, играет роль и в ее защите эритроцитов от лизиса (см. рис. 3), поскольку эритроциты также содержат K_{Ca} каналы [26], выход ионов K^+ через которые увеличивает осмотическую силу раствора. Отметим, что РНКаза-1 человека также обладает протекторным действием, однако его величина вдвое меньше по сравнению с биназой, что связано с вероятностью ингибирования РНКазы-1 цитозольным ингибитором.

Таким образом, биназа увеличивает проницаемость эукариотических клеток для ионов кальция, которая по времени у дрожжей происходит в течение минут, а для клеток HEK в течение нескольких часов. Клетки карциномы легких человека А549 под действием биназы также усиливают проницаемость для макромолекул. Итоговое протекторное либо цитотоксическое действие биназы реализуется в зависимости от типа клеток, где ключевую роль играет экспрессия K_{Ca} каналов и определенных онкогенов, в частности, онкогенов семейства *ras*.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке грантов International Graduate School PROMISE (DFG), Conacyt Mexico (CVU260952), РФФИ (12-04-01226а).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Spalletti-Cernia D., Sorrentino R., Di Gaetano S. et al. Antineoplastic ribonucleases selectively kill thyroid carcinoma cells via caspase-mediated induction of apoptosis. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2003; 88(6): 2900–7.

2. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents. BioEssays 2008; 30: 781–90.

3. Lee J.E., Raines R.T. Ribonucleases as novel chemotherapeutics: the ranpirnase example. BioDrugs 2008; 22(1): 53–8.

4. Ardelt W., Shogen K., Darzynkiewicz Z. Onconase and amphinase, the antitumor ribonucleases from Rana pipiens oocytes. Curr. Pharm. Biotechnol. 2008; 9(3): 215–25.

5. Sevcik J., Urbanikova L., Leland P.A. et al. X-ray structure of two crystalline forms of a streptomycete ribonuclease with cytotoxic activity. J. Biol. Chem. 2002; 277(49): 47325–30.

6. Ilinskaya O.N. Dreyer F., Mitkevich V.A. et al. Changing the net charge from negative to positive makes ribonuclease Sa cytotoxic. Protein Sci. 2002; 11(10): 2522–25.

7. Makarov A.A., Ilinskaya O.N. Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets. FEBS Lett. 2003; 540(1-3): 15–20.

8. Ilinskaya O., Decker K., Koschinski A. et al. Bacillus intermedius ribonuclease as inhibitor of cell proliferation and membrane current. Toxicology 2001; 156(2-3): 101–7.

9. Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Kretova O.V. et al. Oncogenic c-kit transcript is a target for binase. Cell Cycle 2010; 9(13): 2674–8.

10. Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Spirin P.V. 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): 4090–97.

11. Ilinskaya O.N., Koschinski A., Repp H. et al. RNase induced apoptosis: fate of calcium–activated potassium channels. Biochemie 2008; 90(5): 717–25.

12. Zhao H., Ardelt B., Ardelt W. et al. The cytotoxic ribonuclease onconase targets RNA interference (siRNA). Cell Cycle 2008; 7(20): 3258–61.

13. Bracale A., Spalletti-Cernia D., Mastronicola M. et al. Essential stations in the intracellular pathway of cytotoxic bovine seminal ribonuclease. Biochem. 2002; 362(Pt 3): 553–60.

14. Navarro S., Aleu J., Jiménez M. et al. The cytotoxicity of eosinophil cationic protein/ribonuclease 3 on eukaryotic cell lines takes place through its aggregation on the cell membrane. Cell Mol. Life Sci. 2008; 65(2): 324–37.

15. Кабрера-Фуентес Э.А., Калачева Н.В., Мухаметшина Р.Т. и др. Проникновение биназы в клетки альвеолярного эпителия не индуцирует их гибель. Биомед. Хим. 2012; 58(3): 272–80.

16. Schulga A., Kurbanov F., Kirpichnikov M. et al. Comparative study of binase and barnase: experience in chimeric ribonucleases. Protein Eng. 1998; 11(9): 773–80.

17. Yakovlev G.I., Moiseyev G.P., Struminskaya N.K. et al. Mutational analysis of the active site of RNase of Bacillus intermedius (BINASE). FEBS Lett. 1994; 354 (3): 305–6.

18. Ilinskaya O.N., Ivanchenko O.B., Karamova N.S. et al. SOS-inducing ability of native and mutant microbial ribonucleases. Mut. Res. 1996; 354(2): 203–9.

19. Noll T., Wozniak G., McCarson K. et al. Effect of factor XIII on endothelial barrier function. J. Exp. Med. 1999; 189(3): 1373–82.

20. Kolpakov A.I., Kupriianova F.G. Effect of exogenous ribonucleases on the propagation of Candida tropicalis yeast. Mikrobiologiia 1992; 61(6): 969–74.

21. Porta C., Paglino C., Mutti L. Ranpirnase and its potential for the treatment of unresectable malignant mesothelioma. Biologics 2008; 2(4): 601–9.

22. Ilinskaya O.N., Koschinski A., Mitkevich V.A. et al. Cytotoxicity of RNases is increased by cationization and counteracted by Kca channels. BBRC 2004; 314: 550–54.

23. Hollenhorst M.I., Richter K., Fronius M. Ion transport by pulmonary epithelia. J. Biomed. Biotechnol. 2011. Epub. 2011 Oct 27.

24. Rodenhuis S., van de Wetering M.L, Mooi W.J. et al. Mutational activation of the K-ras oncogene: a possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung. N. Engl. J. Med. 1987; 317(15): 929–35.

25. Xiao G.C., Otani S., Yan L. et al. Inhibition of Farnesyl Protein Transferase, H-ras Oncogene Expression and P21ras Membrane Association by Natural Products in Human Solid Tumor Cell Lines. J. Asian Nat. Prod. Res. 1998; 1: 29–51.

26. Lang F., Birka C., Myssina S. et al. Erythrocyte ion channels in regulation of apoptosis. Adv. Exp. Med. Biol. 2004; 559: 211–7.

Поступила 03.08.2012