

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

УДК 579.22;577.35

ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗМЕНЕНИЙ ПАРАМАГНИТНЫХ
ЦЕНТРОВ МИКРОБНОЙ КЛЕТКИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ
РИБОНУКЛЕАЗЫ *BACILLUS PUMILUS*© 2014 г. П. В. Зеленихин¹, А. В. Макеева, А. П. Ложкин,
А. А. Родионов, Т. Н. Нгуен, О. Н. Ильинская

Казанский (Приволжский) федеральный университет

Поступила в редакцию 06.06.2013 г.

Перспектива использования цитотоксичной рибонуклеазы *Bacillus pumilus* (биназы), индуцирующей избирательную гибель опухолевых клеток, обуславливает интерес к ее биологическим эффектам в отношении нормальной микрофлоры человека. С помощью проточной цитометрии установлено, что биназа в концентрации, вызывающей апоптоз раковых клеток, не влияет на жизнеспособность *Escherichia coli* K12. Впервые методом ЭПР-спектроскопии зарегистрированы изменения парамагнитных центров клеток *E. coli* K12 под действием биназы в нетоксичных концентрациях: повышение интенсивности ЭПР-сигналов, характерных для железосодержащих белков, в том числе, Fe–S кластеров, усиление интенсивности спектра сверхтонкой структуры двухвалентного марганца. С применением спинного зонда ТМТН (N-(1-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-4-ил)-2-метилпропанамид гидрохлорида) зафиксировано двукратное повышение уровня активных форм кислорода (АФК) в клетках, провоцирующее окислительный стресс у бактерий, обработанных ферментом. Методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой продемонстрировано увеличение содержания в клетках щелочных (Li, Na, K), щелочноземельных (Mg, Ca), переходных (Cr, Mn, Fe, Cu, Zn) и постпереходных (Bi, Pb) металлов. Особого внимания заслуживают данные по возрастанию содержания Cu и Zn, нарушающих функции ферментов дыхательной цепи, и Mn, известного как кофактор супероксид дисмутазы, подтверждающие развитие окислительного стресса у бактерий.

Ключевые слова: цитотоксичные рибонуклеазы, *Bacillus pumilus*, биназа, кишечная микрофлора, ЭПР, АФК, окислительный стресс, переходные металлы.

DOI: 10.7868/S0026365614010170

Рибонуклеазы (РНКазаы) бактерий обладают широким спектром биологической активности [1]. Секретируемые РНКазаы бактерий влияют на метаболизм самих прокариотических организмов [2] и опосредуют ряд реакций у эукариот [3]. Известна способность микробных РНКаза, в частности РНКаза *Bacillus pumilis* 3-19 (биназа), индуцировать избирательную апоптотическую гибель опухолевых клеток, не оказывая воздействия на немалигнизированные клетки [4]. Потенциал биназы как средства химиотерапии злокачественных новообразований, в том числе и опухолей разных отделов кишечника, ставит вопрос о ее биологических эффектах в отношении микрофлоры желудочно-кишечного тракта. Ранее показано, что биназа в отношении микроорганизмов способна в низких концентрациях проявлять стимулирующее, а в высоких, порядка 1 мг/мл, — ингибирующее действие [5]. Диапазон концентраций, эффективно индуцирующих апоптоз опухо-

левых клеток, лежит в интервале 0.10–0.75 мг/мл [6, 7]. Эти концентрации не влияют на рост бактерий, но могут вызывать скрытые до определенного момента изменения различных параметров жизнедеятельности микробных клеток. Ферментные комплексы электрон-транспортных цепей, расположенные в цитоплазматической мембране бактерий, способны откликаться на самые незначительные изменения окружающей среды [8]. Эффективно характеризовать состояние этих комплексов позволяет ЭПР-спектроскопия, детектирующая качественный и количественный состав парамагнитных центров в составе электрон-транспортных цепей как в цитоплазматической мембране бактерий, так и в мембранах хлоропластов и митохондрий эукариот [9].

Цель настоящей работы — выявить изменения функционального состояния клеток *Escherichia coli* K12 под действием рибонуклеазы *Bacillus pumilis* 3-19 в концентрациях, не вызывающих токсического и рост-стимулирующего эффектов у

¹ Автор для корреспонденции (e-mail: Pavel.Zelenikhin@kpfu.ru).

бактерий, с помощью ряда методов физико-химического анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Фермент. В работе использована биназа, гуанил-специфичная РНКаза *Bacillus pumilus* 3-19 дикого типа (ЕС 3.1.27.3, молекулярная масса 12.3 кДа, 109 аминокислотных остатков, $pI = 9.5$), изолированная как гомогенный белок из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *Escherichia coli* BL21, несущего плазмиду pGEMGX1/ent/Bi [10].

Среды и условия культивирования. В качестве тест-объекта использовали стрептомициноустойчивый штамм *E. coli* K-12 (ВКПМ-3254), который культивировали в LB-бульоне в присутствии стрептомицина (100 мкг/мл) при 37°C в течение 18 ч. Затем культуру использовали как инокулят, перенося в свежую питательную среду (конечная концентрация клеток 1×10^6), инкубировали 24 ч при 37°C в присутствии биназы (100 и 300 мкг/мл) либо без нее, клетки осаждали центрифугированием (2600 g, 20 мин), затем ресуспендировали в натрий-фосфатном буфере (PBS, “Sigma”, США), доводили их концентрацию до 3×10^9 КОЕ/мл и использовали для подготовки проб для ЭПР-анализа.

Цитофлуориметрический анализ жизнеспособности *E. coli* K12. 24-часовые культуры *E. coli* K12, выросшие в LB-бульоне, содержащем биназу, либо без нее, как описано выше, центрифугировали (2600 g, 20 мин). Затем клетки отмывали охлажденным натрий-фосфатным буфером (“Sigma”, США) и анализировали с помощью проточного цитофлуориметра FACSCanto II (BD, США), определяя изменение жизнеспособности клеток *E. coli* K12 при их окрашивании йодидом пропидия (PI), согласно [11].

ЭПР характеристика парамагнитных центров в клетках *E. coli* K12. ЭПР характеристики клеток, инкубированных с биназой, определяли на стационарном спектрометре ESP-300 (“Bruker”, Германия) с рабочей частотой 9.4–9.9 ГГц, при напряженности магнитного поля 20–1600 мТ (погрешность — не более 0.01 мТ), частоте модуляции 100 кГц при мощности СВЧ-излучения 2–20 мВт, с использованием капилляров объемом 25 мкл (“Sigma”, США). Образцы для эксперимента подготавливали в двух видах — замороженные при 77 К и лиофилизированные. Клетки лиофилизировали на сушке Martin Christ (Германия) при температуре –76°C и давлении 0.001 Бар до полного высушивания. В качестве контролей использовали биомассу бактерий, выращенных на среде без добавления биназы, надосадочную жидкость и натрий-фосфатный буфер (“Sigma”, США). Спектры замороженных образцов регистрировали при 77 К. Лيوфилизированные образцы исследовали при 15 К с помощью гелиевого

проточного криостата Oxford-9 (Великобритания), контроль температуры осуществляли с применением прибора ITS 4 Oxford (Великобритания).

Для определения активных форм кислорода (АФК) использовали спиновый зонд — циклический гидроксилламин N-(1-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-4-ил)-2-метилпропанамид гидрохлорид (ТМТН) (Институт органической химии, Новосибирск), аналогичный широко применяющимся зондам для определения супероксида по генерации стабильного нитроксильного радикала [12]. В 1 мл суспензии *E. coli* K12 (1×10^7 кл/мл) вносили 1 мМ ТМТН, спектры ЭПР регистрировали при комнатной температуре (25°C), мощности СВЧ излучения 1 мВт, на частоте 9.72 ГГц, амплитуде высокочастотной модуляции 0.3 Гаусс, с использованием капилляров объемом 25 мкл.

Определение содержания металлов в клетках *E. coli* K12. Количественное определение металлов проводили в соответствии со стандартами РФ согласно методическим указаниям [13]. Измерения осуществляли на масс-спектрометре Elan DRC II (“Perkin Elmer”, США), образцы предварительно подвергали микроволновой подготовке в системе MWS-3 (“Berghof”, Германия) при температуре 150°C, в присутствии азотной кислоты и бидистиллированной воды.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитофлуориметрическая оценка жизнеспособности клеток *E. coli* K12. Анализ жизнеспособности *E. coli* K12 показал, что биназа в концентрации, цитотоксической для малигнизированных клеток эукариот, не приводила к гибели бактерий. Доля нежизнеспособных клеток с компрометированной мембраной в вариантах с обработкой биназой составила 5.9 и 5.4% для концентраций РНКазы 100 и 300 мкг/мл соответственно, и не имела достоверных различий с вариантом без внесения фермента.

ЭПР-спектроскопия образцов клеток *E. coli* K12. В препаратах клеток *E. coli* K12 было обнаружено несколько различных типов ЭПР-сигналов. Первый тип зарегистрирован в замороженных образцах при $g = 2.00$, причем интенсивность данного сигнала в клетках, обработанных биназой, была выше, чем в необработанных клетках (рис. 1, I, II). Этот же сигнал, но большей интенсивности наблюдали в образцах лиофилизированных клеток, с той же тенденцией к росту интенсивности после обработки ферментом (рис. 1, III). Значения g и форма линии сигнала позволяют предположить, что источником сигнала является радикал, содержащий серу [14].

Второй тип сигнала зарегистрирован при $g = 3.00$, его интенсивность не зависела от обработки клеток *E. coli* K12 биназой (рис. 1, I).

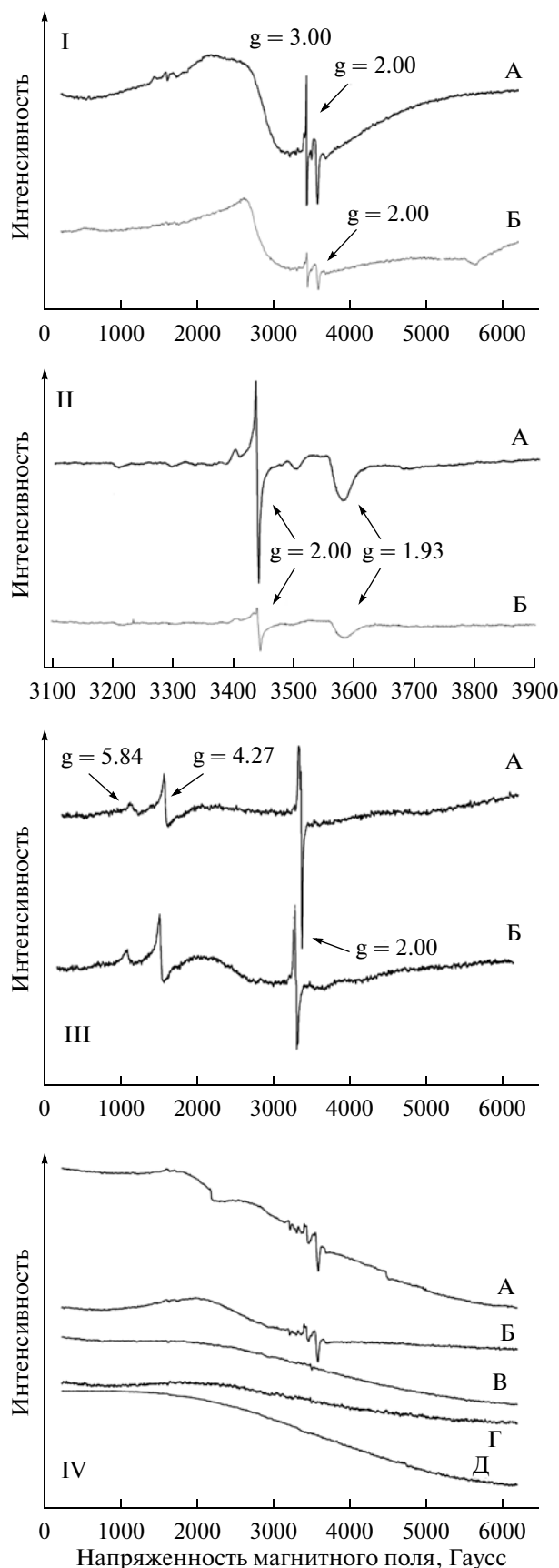


Рис. 1. Спектры ЭПР клеток *E. coli* K12 (СВ частота 9.63 ГГц, мощность СВЧ 20 мВт): I – спектры ЭПР замороженных клеток в широком диапазоне магнитных полей при 77 К, II – спектры ЭПР замороженных клеток в области магнитных полей вблизи $g = 2$ при 77 К, III – спектры ЭПР лиофилизированных клеток в широком диапазоне магнитных полей при 15 К, IV – спектры ЭПР клеток, отрицательного контроля и супернатантов. А – клетки бактерий, обработанные биназой (300 мкг/мл, 24 ч), Б – клетки бактерий без обработки, В – натрий-фосфатный буфер, Г – супернатант после осаждения клеток, инкубированных с биназой, Д – супернатант после осаждения необработанных клеток.

Третий тип сигнала, присутствующий в спектрах, характеризовался $g = 1.93$. Сигнал хорошо различим при малой развертке магнитного поля (рис. 1, II). Его интенсивность не коррелировала с первым типом сигнала, но также возрастала в образцах, подвергшихся воздействию биназы. Источником наблюдаемого сигнала может быть железосодержащий белок [14]. Для лиофилизированных образцов этот сигнал не характерен.

Четвертый тип сигнала – шесть линий одинаковой интенсивности в области $g = 2.00$ (рис. 1, II), соответствующие спектру ЭПР сверхтонкой структуры (СТС) ионов двухвалентного марганца Mn^{2+} [15]. С увеличением магнитного поля происходило уширение компонент линий спектра, из-за чего три сильнополевые линии СТС детектировались с трудом. Спектр марганца хорошо различим в образцах, обработанных РНКазой, в то время как в необработанных клетках его интенсивность значительно ниже (рис. 1, II).

Помимо перечисленных, мы обнаружили еще два типа сигналов с g -факторами 4.27 и 5.84, характерных исключительно для лиофилизированных образцов (рис. 1, III). Схожие сигналы, обнаруженные в биологических объектах ранее, были отнесены к парамагнитным комплексам железосодержащих белков [14].

Для доказательства внутриклеточной локализации источников ЭПР сигналов были проанализированы используемый в работе буфер и супернатанты опытных и контрольных культур. Установлено, что все вышеперечисленные типы сигналов наблюдались исключительно в клетках (рис. 1, IV).

Элементный анализ клеток *E. coli* K12. Обработка клеток *E. coli* K12 суб-бактерицидной концентрацией биназы влияла на функциональное состояние бактерий, изменяя их биохимические параметры. Для оценки изменения под действием биназы содержания в клетках *E. coli* K12 ряда элементов нами был применен метод масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой. Установлено, что обработка микроорганизмов биназой в концентрациях 100 и 300 мкг/мл приводит к увеличению содержания в клетках щелочных (Li,

Изменение внутриклеточного содержания металлов при обработке культуры *E. coli* K12 биназой (100 и 300 мкг/мл)

Элементы	Содержание металлов, нг/1000 клеток		
	без обработки РНКазой	биназа, 100 мкг/мл	биназа, 300 мкг/мл
Li	0.003 ± 0.0002	0.008 ± 0.0009	0.006 ± 0.0006
Na	0.13 ± 0.0005	0.69 ± 0.001	0.78 ± 0.02
K	0.36 ± 0.007	0.61 ± 0.02	0.63 ± 0.007
Mg	0.414 ± 0.001	1.03 ± 0.07	0.48 ± 0.05
Ca	13.87 ± 0.02	19.97 ± 0.1	21.55 ± 0.06
Cr	0.015 ± 0.0006	0.024 ± 0.001	0.032 ± 0.002
Mn	0.022 ± 0.001	0.11 ± 0.02	0.13 ± 0.005
Fe	0.98 ± 0.01	1.10 ± 0.09	1.19 ± 0.02
Cu	0.096 ± 0.0005	0.25 ± 0.06	0.47 ± 0.05
Zn	0.039 ± 0.0014	0.089 ± 0.007	0.115 ± 0.07
Bi	0.00024 ± 0.00005	0.001 ± 0.0001	0.00099 ± 0.0001
Pb	0.013 ± 0.002	0.16 ± 0.005	0.18 ± 0.009

Na, K), щелочноземельных (Mg, Ca), переходных (Cr, Mn, Fe, Cu, Zn) и постпереходных (Bi, Pb) металлов (таблица). Наиболее значимое увеличение уровня переходных металлов в клетках наблюдалось при обработке клеток биназой в концентрации 300 мкг/мл: количество марганца увеличилось в 5.9, меди — в 4.8, цинка — в 2.9 раза.

Генерация активных форм кислорода клетками *E. coli* K12 под действием биназы. Одну из важнейших ролей в жизнедеятельности клетки играют активные формы кислорода. Обработка бактерий биназой приводила к значительному увеличению (на 100%) интенсивности сигнала ЭПР зонда ТМТН по сравнению с необработанными клетками (рис. 2), что свидетельствует об усилении генерации АФК. Таким образом, фермент способен провоцировать окислительный стресс у *E. coli* K12.

ОБСУЖДЕНИЕ

Биназа в концентрациях, вызывающих гибель малагнизированных клеток эвкариот, не приводит к гибели бактерий. Однако анализ спектров, полученных при ЭПР-спектроскопии замороженных и лиофильно высушенных клеток *E. coli* K12 после действия фермента, позволяет предположить, что биназа влияет на энергетические процессы клетки. Спектры ЭПР, детектированные вблизи $g = 2$ (рис. 1), принадлежат радикалам, содержащим серу, а сигналы с величиной g -фактора, равной 1.93, 4.27 и 5.84, соответствуют железосодержащим белкам [14]. Таким образом, источником наблюдаемых нами сигналов могут быть Fe—S белки — основные компоненты электрон-транспортных цепей (ЭТЦ) прокариот, а также ЭТЦ митохондрий и хлоропластов эукариот.

В норме в клетке постоянно обнаруживаются несколько парамагнитных железо-серных кластеров, качественные и количественные изменения в которых отражают энергетическое состояние биологической системы [16]. Так, воздействие супероксид-аниона на *E. coli* K12 приводит к значительному усилению интенсивности ЭПР-сигналов от железа, которое, в свою очередь, высвобождается из [4Fe—4S]-кластеров [17]. В клетках эукариот наблюдается схожая картина: в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*, находящихся в стрессовом состоянии, индуцированном су-

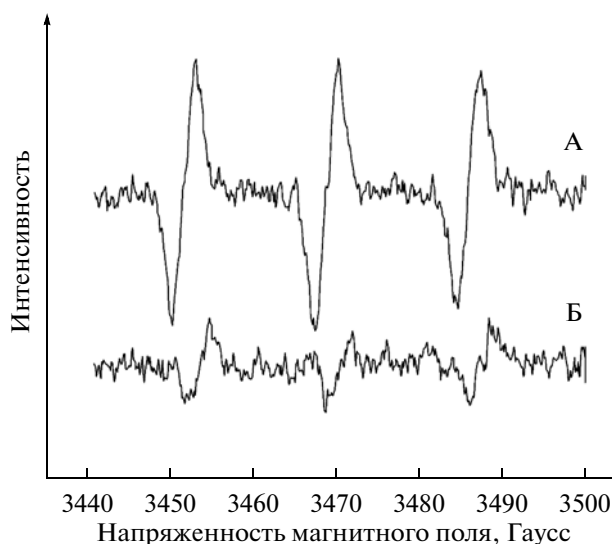


Рис. 2. Спектры ЭПР-аддуктов спиновой ловушки ТМТН при обработке клеток *E. coli* K12 биназой (300 мкг/мл, А) и в варианте без обработки ферментом (Б).

пероксид-анионом, уровень свободного железа повышается [18].

Биназа в концентрации, приводящей к гибели опухолевых клеток, приводит к двукратному повышению уровня АФК в клетках *E. coli* K12 (рис. 2) и последующему развитию окислительного стресса. Известно, что ряд противоопухолевых агентов обуславливает образование АФК в митохондриях. Так, усиленная продукция АФК в клетках карциномы легкого человека A549 под действием 5-фторурацила инициирует высвобождение цитохрома *c* из митохондрий и включает каспазо-зависимый апоптоз [19]. Другой противоопухолевый агент — апигенин (5,7,4-тригидроксифлавонол) — также проявляет цитотоксическое свойства по отношению к карциноме A549. Воздействуя непосредственно на митохондрии он запускает фрагментацию ДНК, аккумуляцию АФК, высвобождение цитохрома *c*, деполяризацию мембран митохондрий и апоптоз [20].

Ранее нами было показано, что биназа приводит к снижению мембранного потенциала митохондрий малигнизированных клеток [21]. Принимая во внимание признанную теорию происхождения митохондрий эукариот путем эндосимбиоза с аэробными бактериями [22], можно предположить, что, как и в случае с митохондриями, биназа воздействует на ЭТЦ мембраны прокариот. Механизм такого воздействия, вероятно, включает нарушение структуры компонентов ЭТЦ — железо-серных белков, что подтверждено полученными результатами (рис. 1).

Митохондриальная ЭТЦ — основной источник АФК в клетках млекопитающих [23]. ЭТЦ митохондрий включает четыре ферментных комплекса, каждый из которых в той или иной степени способен к генерации супероксида. НАДН дегидрогеназа и убихинон-цитохром оксидоредуктаза генерируют наибольшую часть супероксида, при этом первый комплекс высвобождает супероксид только в митохондриальный матрикс, а супероксид, образуемый вторым комплексом, оказывается по обе стороны внутренней мембраны митохондрий [24]. Исследование молекулярных механизмов продукции супероксида ферментными комплексами прокариот и митохондрий показало, что существует значительная степень схожести данного процесса у этих эволюционно близких систем [25].

Вышеизложенное позволяет предположить, что детектируемый нами окислительный стресс, спровоцированный действием биназы на *E. coli* K12, представляет собой результат нарушения функционирования ЭТЦ. Кроме того, зарегистрированное нами повышение содержания переходных металлов в клетках *E. coli* K12 после обработки биназой, также вносит вклад в окисли-

тельный стресс вследствие активации реакции Фентона, в которой взаимодействуют пероксид водорода и переходные металлы [26].

Наравне с остальными переходными металлами медь, входящая в состав ферментов-катализаторов одноэлектронных переносов, играет важнейшую роль в жизнедеятельности клеток. Способность атома меди претерпевать редокс-изменения $[Cu(I) \leftrightarrow Cu(II)]$ и провоцировать образование АФК в результате реакций, подобных реакции Фентона, обуславливает опасность, связанную с повышением внутриклеточного содержания данного металла. Причиной возникновения окислительного стресса также является высвобождение железа из железо-серных белков, атакуемых $Cu(I)$ [27]. В грамотрицательных бактериях медьсодержащие белки локализованы в цитоплазматической мембране со стороны периплазмы, либо секретируются в окружающую среду, лимитируя аккумуляцию металла в цитоплазме. Кроме того, во избежание повреждений при избытке меди, у бактерий и архей развились специфические системы детоксикации [27]. Повышение уровня меди в клетках *E. coli* K12 под действием биназы (таблица), вероятно, связано с нарушением функционирования подобных систем и последующим накоплением меди в клетке. Увеличение количества внутриклеточного цинка также представляет для клетки потенциальную опасность. $Zn(II)$ — важнейший микроэлемент, принимающий участие во многих физиологических процессах, однако в избытке он способен приводить к нарушению структуры биологических макромолекул и их комплексов [28].

Гомеостаз еще одного переходного металла — марганца — в клетках бактерий поддерживается путем регуляции ионного транспорта [29]. Прокариотические организмы используют марганец в составе Mn-содержащей супероксиддисмутазы для детоксикации АФК. Некоторые группы микроорганизмов способны использовать повышение концентрации внутриклеточного марганца, не входящего в состав супероксиддисмутазы, для защиты от супероксид-аниона, однако лежащие в основе подобной элиминации АФК механизмы остаются малоизученными [29, 30]. С учетом вышесказанного, повышение уровня Mn в клетках *E. coli* K12 под действием биназы, показанное как с помощью ЭПР, так и при элементном анализе (таблица, рис. 1, II), связано с активацией клеточных систем защиты от окислительного стресса, сопровождаемого увеличением содержания меди и цинка в клетках.

Таким образом, нами впервые было выявлено влияние рибонуклеазы *B. pumilus* 3-13 на парамагнитные центры микробной клетки. Показано, что биназа в диапазоне концентраций, индуцирующих апоптоз опухолевых клеток, вызывает изменения

ЭПР сигналов в клетках *E. coli* K12, приводя к увеличению интенсивности сигналов от железо- и селеносодержащих белков, что свидетельствует о структурных изменениях ферментов ЭТЦ и нарушении их функционирования. Выявленное нами двукратное повышение уровня генерации АФК микробными клетками после воздействия на них биназой сопровождается значительным увеличением содержания в клетках переходных металлов Zn и Cu, способных активировать окислительный стресс, а также повышением уровня внутриклеточного Mn(II), который, напротив, участвует в работе систем защиты против окислительного стресса.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 12-04-31022 мол_а и 12-04-01226 а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Deutscher M.P., Li Z.* Exoribonucleases and their multiple roles in RNA metabolism // *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 2001. V. 66. P. 67–105.
2. *Rittmann D., Sorger-Herrmann U., Wendisch V.F.* Phosphate starvation-inducible gene *ushA* encodes a 5' nucleotidase required for growth of *Corynebacterium glutamicum* on media with nucleotides as the phosphorus source // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. № 8. P. 4339–4344.
3. *Колтаков А.И., Куприянова Ф.Г.* Влияние экзогенных рибонуклеаз на размножение дрожжей *Candida tropicalis* // *Микробиология.* 1992. Т. 61. Вып. 6. С. 969–973.
Kolpakov A.I., Kupriyanova F.G. Effect exogenous ribonucleases on the growth of *Candida tropicalis* // *Microbiology.* 1992. V. 61. P. 680–683.
4. *Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N.* Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents // *Bioessays.* 2008. V. 30. № 8. P. 781–790.
5. *Колтаков А.И., Куприянова-Ашина Ф.Г.* Внеклеточные факторы регуляции развития микроорганизмов. LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012. С. 36–38.
6. *Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Kretova O.V., Zelenikhin P.V., Prassolov 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. № 13. P. 2674–2678.
7. *Ilinskaya O.N., Zelenikhin P.V., 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 // *BBRC.* 2007. V. 361. № 4. P. 1000–1005.
8. *Beinert H., Kiley P.J.* Fe–S proteins in sensing and regulatory functions // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1999. V. 3. № 2. P. 152–157.
9. *Swartz H.M., Khan N., Buckey J., Comi R., Gould L., Grinberg O., Hartford A., Hopf H., Hou H., Hug E., Iwasaki A., Lesniewski P., Salikhov I., Walczak T.* Clinical applications of EPR: Overview and perspectives // *NMR Biomed.* 2004. V. 17. № 5. P. 335–351.
10. *Schulga A., Kurbanov F., Kirpichnikov M., Protasevich I., Lobachov V., Ranjbar B., Chekhov V., Polyakov K., Engelborghs Y., Makarov A.* Comparative study of binase and barnase: experience in chimeric ribonucleases // *Protein Eng.* 1998. V. 11. № 9. P. 773–780.
11. *Shi L., Günther S., Hübschmann T., Wick L.Y., Harms H., Müller S.* Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria // *Cytometry.* 2007. V. 71. № 8. P. 592–598.
12. *Kozlov A.V., Szalay L., Umar F., Fink B., Kropik K., Nohl H., Redl H., Bahrami S.* Epr analysis reveals three tissues responding to endotoxin by increased formation of reactive oxygen and nitrogen species // *Free Rad. Biol. Med.* 2003. V. 34. № 12. P. 1555–1562.
13. *Иванов С.И., Подунова Л.Г., Скачков В.Б., Тутельян В.А., Скальный А.В., Демидов В.А., Скальная М.Г., Серебрянский Е.П., Грабеклис А.Р., Кузнецов В.В.* Определение химических элементов в биологических средах методами атомноэмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой и масспектрометрией: Методические указания (МУК 4.1.1482-03, МУК 4.1.1483-03) М.: ФЦГСЭН МЗ РФ, 2003. 56 с.
14. *Ажипа Я.И.* Медико-биологические аспекты применения метода электронного парамагнитного резонанса. М.: Наука, 1983. 528 с.
15. *Коваленко О.А., Анфалова Т.В., Соколов В.С., Чибрикин В.М.* Количественное изучение спектров ЭПР замороженных препаратов тканей животных // *Биофизика.* 1971. Т. 16. Вып. 4. С. 663–666.
Kovalenko O.A., Anfalova T.V., Sokolov V.S., Chibrikov V.M. Quantitative study of EPR spectra of frozen preparations of animal tissues // *Biofizika.* 1971. V. 16. № 4. P. 663–666.
16. *Cammack R., MacMillan F.* Electron magnetic resonance of iron–sulfur proteins in electron-transfer chains: Resolving complexity // *Metals in Biology: Applications of High-Resolution EPR to Metalloenzymes* / Ed. Hanson G., Berliner L.L. Springer Science, 2010. P. 11–44.
17. *Keyer K., Imlay J.* Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels // *Biochemistry.* 1996. V. 35. № 24. P. 13635–13640.
18. *Srinivasan C., Liba A., Imlay J.A., Valentine J.S., Gralla E.B.* Yeast lacking superoxide dismutase(s) show elevated levels of “free iron” as measured by whole cell electron paramagnetic resonance // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 38. P. 29187–29192.
19. *Pan X., Zhang X., Sun H., Zhang J., Yan M., Zhang H.* Autophagy inhibition promotes 5-fluorouracil-induced apoptosis by stimulating ROS formation in human non-small cell lung cancer A549 cells // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 2. e56679.
20. *Das S., Das J., Samadder A., Boujedaini N., Khuda-Bukhsh A.R.* Apigenin-induced apoptosis in A375 and A549 cells through selective action and dysfunction of mitochondria // *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 2012. V. 237. № 12. P. 1433–1448.
21. *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. 90. № 5. P. 717–725.
22. Kurland C.G., Andersson S.G. Origin and evolution of the mitochondrial proteome // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000. V. 64. № 4. P. 786–820.
 23. Cadenas E., Davies K.J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging // *Free Radic Biol Med.* 2000. V. 29. № 3–4. P. 222–230.
 24. Zhang D.X., Gutterman D.D. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007. V. 292. № 5. P. 2023–2031.
 25. Lanciano P., Khalfaoui-Hassani B., Selamoglu N., Ghelli A., Rugolo M., Daldal F. Molecular mechanisms of superoxide production by complex III: A bacterial versus human mitochondrial comparative case study // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. (in press).
 26. Benov L. How superoxide radical damages the cell // *Protoplasma*. 2001. V. 217. № 1–3. P. 33–36.
 27. Rensing C., McDevitt S.F. The copper metallome in prokaryotic cells // *Met. Ions Life Sci.* 2013. V. 12. P. 417–450.
 28. Blencowe D.K., Morby A.P. Zn(II) metabolism in prokaryotes // *FEMS Microbiol. Rev.* 2003. V. 27. P. 91–311.
 29. Jakubovics N.S., Jenkinson H.F. Out of the iron age: new insights into the critical role of manganese homeostasis in bacteria // *Microbiology (UK)*. 2001. V. 147. P. 1709–1718.
 30. Inaoka T., Matsumura Y., Tsuchido T. SodA and manganese are essential for resistance to oxidative stress in growing and sporulating cells of *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.* 1999. V. 181. № 6. P. 1939–1943.

Effect of *Bacillus pumilus* Ribonuclease on the Paramagnetic Centers of Microbial Cells

P. V. Zelenikhin¹, A. V. Makeeva, A. P. Lozhkin, A. A. Rodionov, N. Nguen, and O. N. Ilinskaya

Kazan (Volga Region) Federal University, ul. Kremlevskaya 18, Kazan, 420008 Russia

¹*e-mail: Pavel.Zelenikhin@Kpfu.ru*

Received June 6, 2013

Abstract—Potential clinical application of *Bacillus pumilus* cytotoxic ribonuclease (binase) selectively inducing the death of tumor cells makes it imperative to investigate its effect on the normal human microflora. Flow cytometry was used to determine that binase concentration causing the apoptosis of cancer cells had no effect of the viability of *Escherichia coli* K12. The changes in the paramagnetic centers of *E. coli* K12 cells in the presence of nontoxic binase concentrations revealed by EPR spectroscopy included higher EPR signals from iron-containing proteins (including those from the Fe–S clusters) and of the Mn(II) hyperfine structure. The TMTH spin probe (N-(1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-4-yl)-2-methylpropanamide hydrochloride) was used to reveal a twofold increase in the levels of reactive oxygen species (ROS) in the cells, which induced oxidative stress in the enzyme-treated bacteria. Inductively coupled plasma mass spectrometry revealed elevated contents of alkaline (Li, Na, K), alkali earth (Mg, Ca), transition (Cr, Mn, Fe, Cu, Zn), and post-transition metals (Bi, Pb) in the cells. Elevated levels of Cu and Zn (which impair the activity of the respiratory chain enzymes) and of Mn, which is known as a superoxide dismutase cofactor, confirmed development of the oxidative stress in bacteria.

Keywords: cytotoxic ribonucleases, *Bacillus pumilus*, binase, intestinal microflora, EPR, ROS, oxidative stress, transition metals.