

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.151.6:57.088.3:57.083.3

doi: 10.26907/2542-064X.2021.4.557-568

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К БИНАЗЕ: ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ

*В.И. Вершинина, Е.В. Дудкина, В.В. Ульянова, В.А. Калашиников,
О.Н. Ильинская*

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Аннотация

Секретируемая рибонуклеаза *Vacillus pumilus* (биназа) является перспективным противоопухолевым агентом с установленной избирательной цитотоксичностью по отношению к различным типам опухолевых клеток. Однако молекулярные механизмы апоптоз-индуцирующего действия фермента до сих пор не раскрыты. В настоящей работе для выявления детерминант противовирусной активности биназы в инфицированных клетках эукариот была получена специфическая поликлональная кроличья сыворотка и с помощью аффинной хроматографии выделены специфические антитела к рибонуклеазе. Специфичность сыворотки и антител была подтверждена иммунохимически, и показана возможность их использования для тестирования нативной и инактивированной биназы, биназы в составе клеточных лизатов и белковых комплексов. Полученные специфические антитела позволят выявлять локализацию биназы в эукариотических клетках, ее взаимодействия с поверхностными и внутриклеточными мишенями, в том числе вирусными компонентами.

Ключевые слова: рибонуклеаза, биназа, противоопухолевая активность, получение специфических антител

Введение

Разработка новых методов противоопухолевой терапии – одна из ведущих задач современной медицины. Несмотря на огромное количество проводимых в этой области исследований, проблема злокачественных новообразований, их своевременной диагностики и эффективной терапии до сих пор остается нерешенной. Причиной отсутствия значимых достижений в лечении онкологии является низкая селективность применяемых препаратов, развитие лекарственной устойчивости у раковых клеток, а также высокий уровень побочных эффектов химиотерапевтических средств [1].

Одними из перспективных противоопухолевых агентов, обладающих селективной цитотоксичностью по отношению к раковым клеткам, являются ферменты класса гидролаз – рибонуклеазы [2]. Наиболее известным ферментом среди РНКаз животного происхождения является РНКаз лягушки *Rana pipiens* – онконаза, в настоящее время проходящая третью стадию клинических испытаний против мезотелиомы легких человека в сочетанной терапии с доксорубицином [3, 4]. Противоопухолевую активность демонстрируют и бактериальные РНКазы. Обладая

рядом преимуществ перед эукариотическими ферментами, такими как филогенетическая отдаленность, нечувствительность к ингибитору РНКаз млекопитающих, простота наработки препарата, бактериальные РНКазы представляют перспективную альтернативу современным противоопухолевым препаратам [5]. Одним из наиболее изученных представителей секретируемых РНКаз бактерий является рибонуклеаза *Bacillus pumilus* – биназа (12 кДа, 109 аминокислотных остатков, рI 9.5). Исследованию противоопухолевой активности биназы в отношении различных линий раковых клеток посвящен ряд экспериментальных работ [6–11]. Показано, что фермент селективно ингибирует рост клеток аденокарциномы легких человека А549 и лейкоза Касуми [6], эмбриональных клеток почек НЕК и НЕКhSK4 [7], клеток миелоидной лейкемии K562, FDC-P1iR1171 трансгенных миелоидных клеток, экспрессирующих *kit* онкоген [8], и *ras*-экспрессирующих фибробластов NIH3T3 [9], но не влияет на нормальные фибробласты [9] и FDC-P1 миелоидные клетки без экспрессии онкогена *kit* [8]. Установлена селективная цитотоксичность биназы по отношению к раковым клеткам, экспрессирующим специфические онкогены *KIT*, *ras*, *AML/ETO*, *FLT3*, *E6* и *E7* [10]. Кроме того, достоверно доказано взаимодействие биназы с RAS белком, которое обуславливает ингибирование сигнального пути MAPK/ERK и приводит к гибели клеток [11].

Отсутствие выраженной иммуногенности у биназы подтверждает перспективу ее клинического применения как потенциального препарата в противоопухолевой терапии [12]. Вместе с тем детали механизма селективной цитотоксичности биназы по отношению к злокачественным клеткам, а также ее внутриклеточные мишени до сих пор не ясны. В связи с этим детекция биназы в эукариотических клетках является важным аспектом научных исследований. В подобных экспериментах для решения проблемы идентификации макромолекул наиболее часто применяют специфические антитела, так как в сложных биологических смесях антитела эффективно «распознают» соответствующий антиген на основе его структуры. Целью настоящей работы было получение специфических антител к бактериальной рибонуклеазе *B. pumilus* (биназе).

Материалы и методы

В работе были использованы препараты белков, представленные в табл. 1. Каталитически неактивную биназу (мутация Н101Е в активном центре фермента) выделяли из культуральной жидкости рекомбинантного штамма *Escherichia coli* BL21 рML163-Н101Е согласно методике, описанной в [13]. Периплазматическую фракцию, содержащую рекомбинантную биназу, получали осмотическим шоком, как описано в [14].

Поликлональную сыворотку к биназе получали иммунизацией кроликов коммерческим препаратом фермента (степень чистоты 95%). За весь курс иммунизации, который составил 66 дней, каждый кролик получил 25 мг белка. Курс иммунизации включал: четыре подкожные инъекции белка с адьювантом Фрейнда (интервал между инъекциями составлял 12 дней) и ревакцинацию (введение растворимого белка). В ходе иммунизации кроликов осуществляли контроль накопления антител к биназе. Проводили забор крови из краевой вены уха животных и получали сыворотку. Образцы сывороток использовали для постановки реакции двойной иммунодиффузии в агаровом геле. Через 10 дней

после ревакцинации на основании результатов иммунохимического анализа осуществляли тотальный забор крови у животных и получали иммунную сыворотку по стандартной методике.

Для получения аффинного сорбента лиганд (биназу) иммобилизовали на CNBr-активированной сефарозе 4 (CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare, США) по методике, описанной в инструкции производителя. 150 мг сухого сорбента промывали 0.1 N раствором HCl (10–15 объемов), затем для очистки от возможных остатков деградированной сефарозы и нормализации pH промывали рабочим буфером, содержащим 0.1 M NaHCO₃ (pH 8.3) и 0.5 M NaCl. Степень чистоты сорбента контролировали спектрофотометрически при длине волны 280 нм. Биназу (10 мг) растворяли в 4 мл дистиллированной воды, смешивали с рабочим буфером в соотношении 0.5 : 1 и инкубировали с сорбентом в течение 2 ч при комнатной температуре, слегка помешивая. Чтобы удалить не связавшийся лиганд, сорбент промывали рабочим буфером, контролируя наличие белка спектрофотометрически.

Для выделения специфических антител подготовленный сорбент (CNBr-сефароза 4-биназа) смешивали со специфической сывороткой (6 мл нативной сыворотки и 14 мл 0.01 M трис-HCl буфера, pH 7.5) и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре и слабом перемешивании. Затем конъюгат переносили в хроматографическую колонку Poly-Prep (Bio-Rad, США). Не связавшиеся с сорбентом белки сыворотки отмывали 0.1 M трис-HCl буфером, содержащим 0.5 M NaCl. Элюировали антитела 0.05 M глицин-HCl буфером, pH 2.8. Объем фракций элюата составлял 1.5 мл. Фракции, содержащие антитела, нейтрализовали раствором 0.1 N NaOH до pH 7.0–7.5. Очищенные антитела хранили при –20 °C.

Рибонуклеазную активность определяли модифицированным методом Анфинсена по количеству кислоторастворимых продуктов гидролиза РНК, как описано в [15].

Электрофоретическое разделение белков проводили в 16%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии 0.1% додецилсульфата натрия (SDS) по стандартной методике Лэммли.

Вестерн-блоттинг. После электрофоретического разделения белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США) в трансфер-буфере (трис – 2.43 г/л, глицин – 11.3 г/л, 96%-ный этанол – 200 мл) с помощью системы Mini-PROTEAN Tetra Cell и ячейки Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad, США). Время переноса составляло 90 мин, напряжение тока – 100 В. Центры связывания белков блокировали добавлением 5%-ного сухого молока в TBS-буфере (50 mM трис-HCl, pH 7.6; 150 mM NaCl). Несвязавшийся белок отмывали TBS-буфером с добавлением 0.05% Tween-20 (TBST-буфер). Затем мембрану инкубировали с антителами к биназе, очищенными с помощью аффинного сорбента. Несвязавшиеся антитела отмывали TBST-буфером. Далее мембрану инкубировали со вторичными антикроличьими антителами козы, конъюгированными с пероксидазой хрена (Life Technologies, США), в растворе 1%-ного сухого молока. Несвязавшиеся вторичные антитела отмывали TBST-буфером. Белковые комплексы визуализировали с помощью хемилюминисцентного субстрата ECL (Pierce, США) на гель-документаторе ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, США).

Табл. 1

Препараты белков, использованные в работе

Название	Происхождение	Описание	Продуцент	Источник
Биназа	РНКаза <i>B. pumilus</i>	Нативная	<i>Bacillus pumilus</i> 7P	Институт органического синтеза (Рига, Латвия)
Биназа	РНКаза <i>B. pumilus</i>	Неактивная (мутация H101E в активном центре), рекомбинантная	<i>Escherichia coli</i> BL21 pML163-H101E	НИЛ ББФ КФУ
Барстар	Внутриклеточный ингибитор барназы	Рекомбинантный	<i>Escherichia coli</i> BL21λDE3 pET15b-brst	НИЛ ББФ КФУ
Лизоцим	Коммерческий препарат	Нативный	–	Sigma-Aldrich, США

Результаты и их обсуждение

Получение поликлональной сыворотки к биназе и контроль динамики антителообразования. Поликлональную специфическую сыворотку получали иммунизацией кроликов биназой. За курс иммунизации каждое животное получало 25 мг белка. В ходе иммунизации кроликов осуществляли контроль накопления в сыворотке крови животных антител к биназе. Образцы полученных сывороток (после 3-й и 5-й инъекции) использовали для постановки реакции двойной иммунодиффузии в агаровом геле. Рис. 1 демонстрирует различия в количестве антител в сыворотках на разных стадиях иммунизации кроликов, что полностью согласуется с механизмом вторичного гуморального иммунного ответа. Повторное (или многократное) введение антигена приводит к появлению в иммунной системе В-клеток памяти, трансформирующихся в плазматические клетки, которые продуцируют специфические антитела.

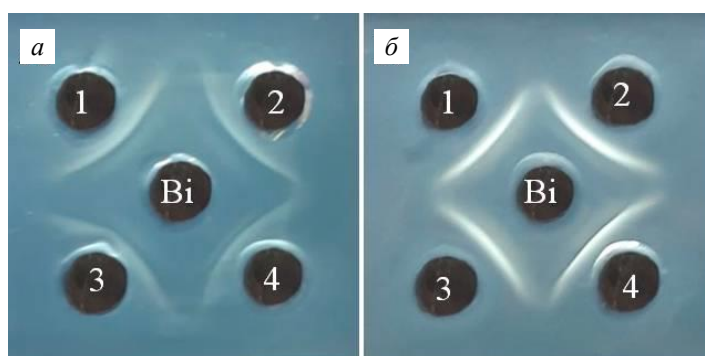


Рис. 1. Реакция двойной иммунодиффузии в агаровом геле. В периферических лунках – иммунные сыворотки от разных кроликов (1–4) после третьей (а) и пятой (б) инъекций, в центральных лунках (Vi) – раствор биназы (1 мг/мл)

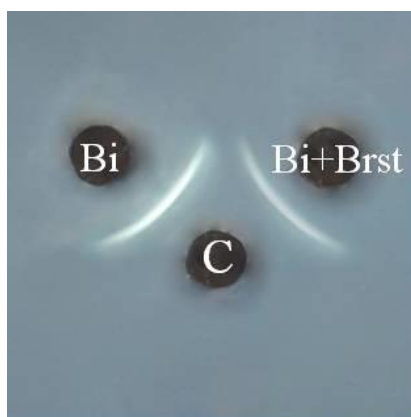


Рис. 2. Реакция преципитации белкового комплекса «биназа – барстар» специфическими антителами к биназе. Bi –биназа, Bi+Brst – биназа в комплексе со специфическим ингибитором барстаром, C – сыворотка к биназе. Реакция демонстрирует способность антител к биназе детектировать фермент в составе белкового комплекса

Идентификация биназы в составе белковых комплексов. Способность антител к биназе детектировать фермент в составе белкового комплекса оценивали в модельном эксперименте с использованием барстара. Барстар является внутриклеточным ингибитором РНКазы *Bacillus amyloliquefaciens*. В экспериментах *in vitro* показано, что активность биназы также ингибируется при добавлении в реакционную смесь барстара [16]. В настоящей работе эффективность образования комплекса оценивали по остаточной рибонуклеазной активности. При смешивании белков в эквимольной концентрации остаточная ферментативная активность, обусловленная наличием несвязанной биназы, составила 0.03%. Показано, что специфическая сыворотка образует линии преципитации как со «свободной» биназой, так и с биназой в составе белкового комплекса (рис. 2).

Результаты иммунохимического анализа позволяют сделать заключение о возможности использования полученной поликлональной сыворотки к биназе в качестве основного компонента гомологичной тест-системы для серологической идентификации, а также для выявления биназы в комплексе с другими белками. Однако необходимо отметить, что иммунные сыворотки, кроме пула специфических антител, содержат большое количество «балластных» белков и низкоаффинных антител, что может исказить картину при анализе сложных, многокомпонентных объектов. Это приводит к снижению специфичности подавляющего большинства иммунологических тестов. Но этого можно избежать, если выделить фракцию «чистых» антител с помощью аффинной хроматографии.

Выделение специфических антител из сыворотки с помощью метода аффинной хроматографии. Аффинная хроматография – это метод разделения биохимических растворов, основанный на высокоспецифичном взаимодействии между инертным веществом (сорбентом) и очищаемым веществом. Такие взаимодействия позволяют извлекать из смеси биологических веществ компоненты, представленные в относительно малых количествах.

Табл. 2

Выделение специфических антител к биназе из поликлональной сыворотки методом аффинной хроматографии

Стадия очистки	Содержание белка	
	A_{280} *	%
Сыворотка	1108.8 ± 1.12	100
Сорбция	28.71 ± 0.89	2.59
Элюция	27.35 ± 0.068	2.47

* Данные представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение.

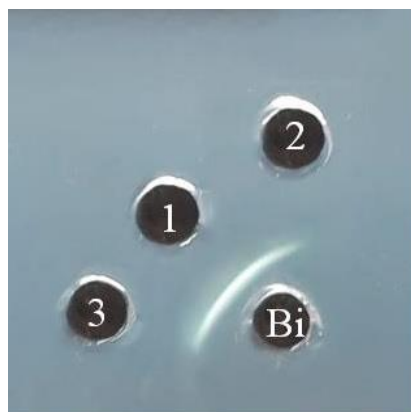


Рис. 3. Контроль извлечения антител из сыворотки в процессе хроматографии и в реакции преципитации: 1 – исходная сыворотка, 2 – сыворотка после сорбции антител, 3 – «промывка», содержащая несвязавшиеся антитела; Vi – биназа

Для выделения «чистых» антител к биназе из поликлональной сыворотки нами был получен аффинный сорбент CNBr-активированная сефароза 4-биназа. Сыворотку инкубировали с сорбентом при комнатной температуре в течение 2 ч в стационарных условиях, конъюгат переносили в хроматографическую колонку. В ходе очистки с сорбентом связалось 2.6% от общего количества белка, содержащегося в исходной сыворотке (табл. 2). Степень извлечения специфических антител из сыворотки контролировали иммунохимически (рис. 3). В реакции преципитации было показано отсутствие антител к биназе в «истощенной» сыворотке и в буфере, которым удаляли не связавшиеся с сорбентом антитела. Это позволяет полагать, что все специфические к биназе антитела сыворотки связались с сорбентом. Элюцию специфических антител проводили 0.05 М глицин-HCl буфером. Выход белка составил 95.3% от белка, связавшегося с сорбентом. В результате были получены антитела к биназе в количестве 27.35 ± 0.068 опт. ед.

Полученные результаты полностью соответствуют закономерностям выделения специфических антител из поликлональной сыворотки с помощью аффинной хроматографии. Данная технология представляет собой способ получения антител, очищенных не только от белков крови «хозяина», но и от иммуноглобулинов

иной специфичности. Известно, что гамма-глобулиновая фракция, в состав которой входят IgG, синтезирующиеся в ответ на чужеродные антигены, составляет примерно 35% от общего количества белка сыворотки [17], а уровень антиген-специфических антител предсказать невозможно. В нашем эксперименте он составил 2.5%.

Анализ специфичности полученных антител методом вестерн-блоттинга. Для подтверждения специфичности полученных антител методом иммуноблоттинга нами были взяты несколько образцов рибонуклеазы *B. pumilus*: нативная биназа (5 мкг на лунку), рекомбинантная биназа без ферментативной активности (5 мкг на лунку) и биназа в составе периплазматической фракции рекомбинантного штамма *E. coli* (10 мкг на лунку). В качестве негативного контроля использовали лизоцим (10 мкг на лунку). Лизоцим – белок с близкой к биназе (14 кДа) молекулярной массой, но не имеющий с ней антигенного родства. В качестве первичных антител использовали фракцию с исходным содержанием белка A_{280} 1.4 опт. ед., разведенную в 150 раз. В результате иммуноблоттинга было установлено, что все исследуемые препараты биназы дают четкие полосы преципитации с очищенными специфическими антителами к гомогенному белку и не реагируют с лизоцимом, что подтверждает специфичность полученных антител (рис. 4). Следует отметить, что в препарате биназы присутствует как мономерная форма, так и ее димер. Наличие димерных форм биназы ранее было установлено в [18].

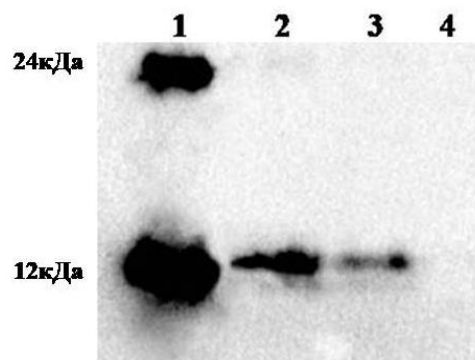


Рис. 4. Анализ специфичности полученных антител методом вестерн-блоттинга: 1 – нативная биназа; 2 – рекомбинантная неактивная биназа, выделенная из периплазмы *E. coli* BL21 рML163-H101E; 3 – рекомбинантная неактивная биназа в составе периплазматической фракции *E. coli* BL21 рML163-H101E; 4 – лизоцим

Результаты иммуноблоттинга подтвердили возможность тестирования инактивированной биназы – белка, лишённого ферментативной активности, как в форме гомогенного белка, так и в составе клеточного лизата. Это позволяет использовать полученные специфические антитела в процессе идентификации белка, а также в ходе получения гомогенного белка, лишённого ферментативной активности, для подтверждения его подлинности.

Заключение

Идентификация белков в сложных биологических смесях является одним из основных методологических подходов в современной биологии и медицине. Для решения данной проблемы широко применяются методы, основанные на специфических реакциях взаимодействия антиген – антитело: иммуноферментный, иммунофлюоресцентный, вестерн-блот-анализы. Используя специфические антитела, можно отследить и детектировать белок в «следовых» количествах. Это позволяет выявлять как поверхностные, так и внутриклеточные мишени, взаимодействующие с изучаемым белком, что чрезвычайно важно для исследования его биологической роли. В дальнейших экспериментах полученные антитела будут использованы для выяснения механизмов биологического действия биназы как важного этапа в исследовании ее противоопухолевой активности.

Благодарности. Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета и поддержана Российским научным фондом (проект № 21-74-10036).

Литература

1. *Marqus S., Pirogova E., Piva T.J.* Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment // *J. Biomed. Sci.* – 2017. – V. 24. – Art. 21, P. 1–15. – doi: 10.1186/s12929-017-0328-x.
2. *Ardelt W., Ardelt B., Darzynkiewicz Z.* Ribonucleases as potential modalities in anti-cancer therapy // *Eur. J. Pharmacol.* – 2009. – V. 625, No 1–3. – P. 181–189. – doi: 10.1016/j.ejphar.2009.06.067.
3. *Leland P.A., Raines R.T.* Cancer chemotherapy – ribonucleases to the rescue // *Chem. Biol.* – 2001. – V. 8, No 5. – P. 405–413. – doi: 10.1016/s1074-5521(01)00030-8.
4. *Reck M., Krzakowski M., Jassem J., Eschbach C., Kozielski J., Costanzi J.J., Gatzemeier U., Shogen K., Pawel J.* Randomized, multicenter phase III study of ranpirnase plus doxorubicin (DOX) versus DOX in patients with unresectable malignant mesothelioma (MM) // *J. Clin. Oncol.* – 2009. – V. 27, No 15_suppl. – Abstr. 7507. – doi: 10.1200/jco.2009.27.15_suppl.7507.
5. *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. – doi: 10.1002/bies.20789.
6. *Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Spirin P.V., Fedorova T.V., Kretova O.V., Tchurikov N.A., Prassolov V.S., Ilinskaya O.N., Makarov A.A.* 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. – V. 10, No 23. – P. 4090–4097. – doi: 10.4161/cc.10.23.18210.
7. *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, No 5. – P. 717–725. – doi: 10.1016/j.biochi.2008.01.010.
8. *Ilinskaya O.N., Zelenikhin P.V., Petrushanko I.Yu., 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, No 4. – P. 1000–1005. – doi: 10.1016/j.bbrc.2007.07.143.

9. *Ilinskaya O., Decker K., Koschinski A., Dreyer F., Repp H.* *Bacillus intermedius* ribonuclease as inhibitor of cell proliferation and membrane current // *Toxicology*. – 2001. – V. 156, No 2–3. – P. 101–107. – doi: 10.1016/s0300-483x(00)00335-8.
10. *Mitkevich V.A., Makarov A.A., Ilinskaya O.N.* Cellular targets of antitumor ribonucleases // *Mol. Biol.* – 2014. – V. 48, No 2. – P. 181–188. – doi: 10.1134/S0026893314020137.
11. *Ilinskaya O.N., Singh I., Dudkina E.V., Ulyanova V.V., Kayumov A., Barreto G.* Direct inhibition of oncogenic KRAS by *Bacillus pumilus* ribonuclease (binase) // *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* – 2016. – V. 1863, No 7, Pt. A. – P. 1559–1567. – doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.04.005.
12. *Mironova N.L., Petrushanko I.Y., Patutina O.A., Senkova A.V., Simonenko O.V., Mitkevich V.A., Markov O.V., Zenkova M.A., Makarov A.A.* Ribonuclease binase inhibits primary tumor growth and metastases via apoptosis induction in tumor cells // *Cell Cycle*. – 2013. – V. 12, No 13. – P. 2120–2131. – doi: 10.4161/cc.25164.
13. *Makarov A.A., Protasevich I.I., Kuznetsova N.V., Fedorov B.B., Korolev S.V., Struminskaya N.K., Bazhulina N.P., Leshchinskaya I.B., Hartley R.W., Kirpichnikov M.P., Yakovlev G.I., Esipova N.G.* Comparative study of thermostability and structure of close homologues – barnase and binase // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 1993. – V. 10, No 6. – P. 1047–1065. – doi: 10.1080/07391102.1993.10508695.
14. *Sockolosky J.T., Szoka F.C.* Periplasmic production via the pET expression system of soluble, bioactive human growth hormone // *Protein Expression Purif.* – 2013. – V. 87, No 2. – P. 129–135. – doi: 10.1016/j.pep.2012.11.002.
15. *Shah Mahmud R., Mostafa A., Müller C., Kanrai P., Ulyanova V., Sokurenko Yu., Dzieciolowski Ju., Kuznetsova I., Ilinskaya O., Pleschka S.* Bacterial ribonuclease binase exerts an intra-cellular anti-viral mode of action targeting viral RNAs in influenza a virus-infected MDCK-II cells // *Virology*. – 2018. – V. 15. – Art. 5, P. 1–12. – doi: 10.1186/s12985-017-0915-1.
16. *Yakovlev G.I., Moiseyev G.P., Protasevich I.I., Ranjbar B., Bocharov A.L., Kirpichnikov M.P., Gilli R.M., Briand C.M., Hartley R.W., Makarov A.A.* Dissociation constants and thermal stability of complexes of *Bacillus intermedius* RNase and the protein inhibitor of *Bacillus amyloliquefaciens* RNase // *FEBS Lett.* – 1995. – V. 366, No 2–3. – P. 156–158. – doi: 10.1016/0014-5793(95)00491-Q.
17. *Moini J.* *Phlebotomy: Principles and Practice*. – Burlington: Jones & Bartlett Learning, 2012. – 258 p.
18. *Dudkina E., Kayumov A., Ulyanova V., Ilinskaya O.* New insight into secreted ribonuclease structure: Binase is a natural dimer // *PLoS ONE*. – 2014. – V. 9, No 12. – Art. e115818, P. 1–14. – doi: 10.1371/journal.pone.0115818.

Поступила в редакцию
06.09.2021

Вершинина Валентина Ивановна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: valver1951@mail.ru

Дудкина Елена Владимировна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: lenatimonina@rambler.ru

Ульянова Вера Владимировна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии
Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: ulyanova.vera@gmail.com

Калашников Владимир Александрович, магистрант кафедры микробиологии
Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: icebuldogq@gmail.com

Ильинская Ольга Николаевна, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии
Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: Ilinskaya_kfu@mail.ru

ISSN 2542-064X (Print)
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2021, vol. 163, no. 4, pp. 557–568

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2021.4.557-568

Specific Antibodies against Binase: Preparation and Application

V.I. Vershinina^{*}, E.V. Dudkina^{**}, V.V. Ulyanova^{***}, V.A. Kalashnikov^{****}, O.N. Ilinskaya^{*****}

Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

E-mail: ^{*}valver1951@mail.ru, ^{**}lenatimonina@rambler.ru, ^{***}ulyanova.vera@gmail.com,
^{****}icebuldogq@gmail.com, ^{*****}Ilinskaya_kfu@mail.ru

Received September 6, 2021

Abstract

Secreted ribonuclease of *Bacillus pumilus* (binase) is a promising antitumor agent with established selective cytotoxicity against various types of cancer cells expressing specific oncogenes. However, molecular mechanisms behind the apoptosis-inducing action of binase remain unclear. It was shown that catalytic activity, protein charge, oligomerization, and interaction with RAS oncogene contribute to binase cytotoxicity. To identify the intracellular targets of binase antitumor activity, binase-specific molecular tools could be of great assistance. In this article, a specific polyclonal rabbit serum was obtained by rabbit immunization with the industrial binase preparation using four subcutaneous protein injections with Freund adjuvant and revaccination. Isolation and purification of antibodies against ribonuclease from the serum were performed using affinity chromatography. Affinity resin was prepared by the immobilization of binase in CNBr-activated Sepharose 4. The specificity of the serum and antibodies was confirmed by agar gel immunodiffusion assay and western blotting. It was demonstrated that the antibodies can be successfully applied for testing native and inactivated forms of binase, as well as binase within cell lysates and protein complexes. The obtained specific antibodies will help to reveal the localization of binase in eukaryotic cells. They will also be useful for determining binase interaction with surface and intracellular targets, including viral components.

Keywords: ribonuclease, binase, antitumor activity, obtaining of specific antibodies

Acknowledgements. This study was performed as part of the Kazan Federal University Strategic Academic Leadership Program and supported by the Russian Science Foundation (project no. 21-74-10036).

Figure Captions

- Fig. 1. The immunodiffusion reaction in agar gel. Peripheral wells – immune serum from different rabbits after the third (a) and fifth injection (b), central wells (Bi) – binase solution (1 mg/mL).
- Fig. 2. The precipitation reaction of the protein complex binase-barstar by specific antibodies against binase. Bi – binase, Bi+Brst – binase in a complex with a specific inhibitor barstar, C – serum to binase. The reaction demonstrates the ability of antibodies against binase to detect the enzyme in the protein complex.
- Fig. 3. Control of antibodies extraction from the serum during chromatography and in the precipitation reaction: 1 – initial serum, 2 – serum after the sorption of antibodies, 3 – flow-through containing unbound antibodies; Bi – binase.
- Fig. 4. Analysis of the specificity of the obtained antibodies by western blotting: 1 – native binase; 2 – recombinant inactive binase isolated from the periplasm of *E. coli* BL21 pML163-H101E; 3 – recombinant inactive binase in the periplasmic fraction of *E. coli* BL21 pML163-H101E; 4 – lysozyme.

References

1. Marqus S., Pirogova E., Piva T.J. Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment. *J. Biomed. Sci.*, 2017, vol. 24, art. 21, pp. 1–15. doi: 10.1186/s12929-017-0328-x.
2. Ardelt W., Ardelt B., Darzynkiewicz Z. Ribonucleases as potential modalities in anticancer therapy. *Eur. J. Pharmacol.*, 2009, vol. 625, nos. 1–3, pp. 181–189. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.06.067.
3. Leland P.A., Raines R.T. Cancer chemotherapy – ribonucleases to the rescue. *Chem. Biol.*, 2001, vol. 8, no. 5, pp. 405–413. doi: 10.1016/s1074-5521(01)00030-8.
4. Reck M., Krzakowski M., Jassem J., Eschbach C., Kozielski J., Costanzi J.J., Gatzemeier U., Shogen K., Pawel J. Randomized, multicenter phase III study of ranpirnase plus doxorubicin (DOX) versus DOX in patients with unresectable malignant mesothelioma (MM). *J. Clin. Oncol.*, 2009, vol. 27, no. 15_suppl, abstr. 7507. doi: 10.1200/jco.2009.27.15_suppl.7507.
5. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents. *Bioessays*, 2008, vol. 30, no. 8, pp. 781–790. doi: 10.1002/bies.20789.
6. Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Spirin P.V., Fedorova T.V., Kretova O.V., Tchurikov N.A., Prassolov V.S., Ilinskaya O.N., Makarov A.A. 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, vol. 10, no. 23, pp. 4090–4097. doi: 10.4161/cc.10.23.18210.
7. 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, vol. 90, no. 5, pp. 717–725. doi: 10.1016/j.biochi.2008.01.010.
8. Ilinskaya O.N., Zelenikhin P.V., Petrushanko I.Yu., 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, vol. 361, no. 4, pp. 1000–1005. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.07.143.
9. Ilinskaya O., Decker K., Koschinski A., Dreyer F., Repp H. *Bacillus intermedius* ribonuclease as inhibitor of cell proliferation and membrane current. *Toxicology*, 2001, vol. 156, nos. 2–3, pp. 101–107. doi: 10.1016/s0300-483x(00)00335-8.
10. Mitkevich V.A., Makarov A.A., Ilinskaya O.N. Cellular targets of antitumor ribonucleases. *Mol. Biol.*, 2014, vol. 48, no. 2, pp. 181–188. doi: 10.1134/S0026893314020137.
11. Ilinskaya O.N., Singh I., Dudkina E.V., Ulyanova V.V., Kayumov A., Barreto G. Direct inhibition of oncogenic KRAS by *Bacillus pumilus* ribonuclease (binase). *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.*, 2016, vol. 1863, no. 7, pt. A, pp. 1559–1567. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.04.005.
12. Mironova N.L., Petrushanko I.Y., Patutina O.A., Senkova A.V., Simonenko O.V., Mitkevich V.A., Markov O.V., Zenkova M.A., Makarov A.A. Ribonuclease binase inhibits primary tumor growth and metastases via apoptosis induction in tumor cells. *Cell Cycle*, 2013, vol. 12, no. 13, pp. 2120–2131. doi: 10.4161/cc.25164.
13. Makarov A.A., Protasevich I.I., Kuznetsova N.V., Fedorov B.B., Korolev S.V., Struminskaya N.K., Bazhulina N.P., Leshchinskaya I.B., Hartley R.W., Kirpichnikov M.P., Yakovlev G.I., Espipova N.G. Comparative study of thermostability and structure of close homologues – barnase and binase. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 1993, vol. 10, no. 6, pp. 1047–1065. doi: 10.1080/07391102.1993.10508695.

14. Sockolosky J.T., Szoka F.C. Periplasmic production via the pET expression system of soluble, bioactive human growth hormone. *Protein Expression Purif.*, 2013, vol. 87, no. 2, pp. 129–135. doi: 10.1016/j.pep.2012.11.002.
15. Shah Mahmud R., Mostafa A., Müller C., Kanrai P., Ulyanova V., Sokurenko Yu., Dzieciolowski Ju., Kuznetsova I., Ilinskaya O., Pleschka S. Bacterial ribonuclease binase exerts an intra-cellular anti-viral mode of action targeting viral RNAs in influenza a virus-infected MDCK-II cells. *Virology*, 2018, vol. 15, art. 5, pp. 1–12. doi: 10.1186/s12985-017-0915-1.
16. Yakovlev G.I., Moiseyev G.P., Protasevich I.I., Ranjbar B., Bocharov A.L., Kirpichnikov M.P., Gilli R.M., Briand C.M., Hartley R.W., Makarov A.A. Dissociation constants and thermal stability of complexes of *Bacillus intermedius* RNase and the protein inhibitor of *Bacillus amyloliquefaciens* RNase. *FEBS Lett.*, 1995, vol. 366, nos. 2–3, pp. 156–158. doi: 10.1016/0014-5793(95)00491-Q.
17. Moini J. *Phlebotomy: Principles and Practice*. Burlington, Jones & Bartlett Learn., 2012. 258 p.
18. Dudkina E., Kayumov A., Ulyanova V., Ilinskaya O. New insight into secreted ribonuclease structure: Binase is a natural dimer. *PLoS ONE*, 2014, vol. 9, no. 12, art. e115818, pp. 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0115818.

Для цитирования: Вершинина В.И., Дудкина Е.В., Ульянова В.В., Калашников В.А., Ильинская О.Н. Специфические антитела к биназе: получение и применение // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2021. – Т. 163, кн. 4. – С. 557–568. – doi: 10.26907/2542-064X.2021.4.557-568.

For citation: Vershinina V.I., Dudkina E.V., Ulyanova V.V., Kalashnikov V.A., Ilinskaya O.N. Specific antibodies against binase: Preparation and application. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2021, vol. 163, no. 4, pp. 557–568. doi: 10.26907/2542-064X.2021.4.557-568. (In Russian)