

УДК 577.1+581.17

АПОПТОГЕННЫЕ И ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА РИБОНУКЛЕАЗЫ *BACILLUS INTERMEDIUS*

П.В. Зеленихин, Г.В. Черепнев, О.Н. Ильинская

Аннотация

Перспективными препаратами для лечения рака являются рибонуклеазы различных организмов, представляющие собой альтернативу общепринятой химиотерапии. Целесообразным представляется использование бактериальных рибонуклеаз в виду их низкой стоимости, широких возможностей биоинженерии, а также невозможности ингибирования этих ферментов цитозольным ингибитором рибонуклеаз млекопитающих. Изучена возможность индукции апоптоза клеток миелоидного лейкоза K562 и нормальных мононуклеарных клеток периферической крови здоровых доноров под действием рибонуклеазы *B. intermedius*, а также оценена способность биназы вызывать неспецифический иммунный ответ. Впервые установлено избирательное антипролиферативное и апоптозиндуцирующее действие биназы на злокачественные клетки крови. По отношению к лимфоцитам периферической крови здоровых доноров апоптогенного эффекта биназы выявлено не было. Под воздействием фермента не происходило усиления экспрессии активационных маркеров CD69 и интерферона- γ лимфоцитами, что указывает на отсутствие у биназы суперантигенных свойств. Обнаруженное селективное цитотоксическое действие биназы на малигнизированные клетки обосновывает перспективность разработки противоопухолевых средств на основе бактериальных рибонуклеаз.

Введение

Рибонуклеазы (РНКазы) играют основную роль в метаболизме РНК в живых организмах. Они вовлечены во многие внутри- и внеклеточные физиологические процессы и могут быть компонентами супрамолекулярных комплексов и функционировать совместно с другими ферментами [1]. На сегодняшний день активно изучаются биологические функции РНКаз, связанные с регуляцией экспрессии генов, роста и развития клеток, защитой от патогенов, индукцией апоптоза. Известны РНКазы, обладающие широким спектром антимикробной активности [2], а также противовирусным действием [3, 4]. В последнее время все большее внимание исследователей обращается на РНКазы различных организмов, проявляющие значительную противоопухолевую активность. Показано, что цитотоксичностью по отношению к клеткам опухолевых линий обладают РНКазы млекопитающих, земноводных и других организмов, в том числе бактерий и грибов. РНКазы семенников быка обладают противоопухолевой активностью по отношению к клеткам карциномы щитовидной железы и нейроblastомы [5]. Высокую апоптогенность и цитотоксичность по отношению ко многим опухолевым линиям проявляет рибонуклеаза ооцитов лягушки *Rana pipiens*, коммерческий препарат которой – онконаза – находится на III

стадии клинических испытаний против мезотелиомы легких [6]. Токсическое действие на злокачественные клетки оказывают РНКазы грибов, в частности α -сарцин [7]. Значительным цитотоксическим действием по отношению к клеткам миелоидного лейкоза обладает РНКаз СаЗ, секретируемая *Streptomyces aureofaciens* [8]. РНКаз *Bacillus intermedius* – биназа – оказывает преимущественное токсическое действие на клетки, трансформированные онкогеном *ras* [9], экспрессия которого характерна для многих типов опухолей человека и животных [10], однако возможность индукции апоптоза опухолевых клеток этой РНКазой до сих пор не была показана.

Для использования рибонуклеаз в качестве противоопухолевых агентов большое значение имеют два фактора: их высокая цитотоксичность по отношению к раковым клеткам и низкий иммуногенный эффект этих ферментов. Клетки млекопитающих содержат в цитозоле ингибитор РНКаз (РИ). Противоопухолевая активность РНКаз млекопитающих коррелирует с их устойчивостью к действию РИ. Онконаза обладает такой устойчивостью, что позволяет ей катализировать деградацию внутриклеточной РНК, тем самым вызывая смерть клетки [11]. Рибонуклеаза бычьих семенников обладает селективной цитотоксичностью в отношении различных опухолевых линий, поскольку она находится в состоянии димера, что делает ее нечувствительной к действию РИ [5]. Рибонуклеазы бактерий изначально не могут ингибироваться РИ, так как функция последнего состоит в защите клеточной РНК преимущественно от близкородственных рибонуклеаз млекопитающих. В связи с этим особенно интересным представляется изучение апоптогенных эффектов бактериальных рибонуклеаз, которые в силу своего происхождения не требуют больших затрат при получении. Для белковых препаратов, которые в перспективе могут быть использованы в терапии, необходима предварительная оценка их возможных иммунных эффектов [12].

Таким образом, представляется актуальным оценить апоптогенное действие биназы на клетки злокачественных опухолей, а также установить возможность инициации неспецифического иммунного ответа под действием препарата фермента, что позволит в первом приближении обосновать возможность его использования в терапии опухолевых заболеваний.

1. Условия эксперимента

В работе использовали биназу – рибонуклезу *Bacillus intermedius* 7P дикого типа (молекулярная масса 12.3 кДа, $pI = 9.5$) производства экспериментального завода органического синтеза АН Латвии, г. Рига, с описанными ранее каталитическими свойствами [13].

Апоптогенное действие биназы фиксировали цитометрически на линии клеток миелоидного лейкоза К562, полученной из коллекции Института медицинской иммунологии (Шарите, Берлин), и мононуклеарных клетках периферической крови здоровых доноров (КЗД), выделенных по классической методике центрифугированием в градиенте фиколверографина (Pharmacia, Швеция) [14]. Для культивирования клеточных культур применяли питательную среду RPMI 1640, содержащую 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma),

2 мМ глутамина и по 100 ед./мл пенициллина и стрептомицина. Культуры клеток выращивали при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Апоптотические клетки в экспериментах фиксировали с помощью проточного цитометра FACSCalibur (США) после инкубации культур клеток с биназой в течение 48 ч и последующего двойного окрашивания флуоресцентными красителями МС540 (Sigma), связывающимися с остатками фосфатидилсерина на внешней стороне мембраны апоптотических клеток [15] и 7-ААД (Sigma), взаимодействующими с деградирующей ДНК на участках между гуанином и цитозином [16].

В ходе апоптоза остатки фосфатидилсерина, в норме находящиеся только на внутренней стороне цитоплазматической мембраны, начинают переноситься на внешнюю. МС540 связывается с этими остатками и начинает флуоресцировать, что детектируется цитометром. Соответственно, клетки, окрашенные мерроцианином, можно подразделить на МС540-положительные (апоптотические) и МС540-отрицательные (нормальные) клетки.

На поздних стадиях апоптоза мембрана клетки компрометируется, а ее хромосомы начинают фрагментироваться. 7-ААД обладает способностью проникать через такую мембрану к ядру и связывается там с фрагментами ДНК. Таким образом, клетки, подвергнутые двойному окрашиванию МС540 и 7-ААД, можно разделить на три популяции, отражающие стадийность апоптоза: МС540-/7-ААД- – неапоптотические (нормальные) клетки; МС540+/7-ААД- – клетки в раннем апоптозе и МС540+/7-ААД+ – позднеапоптотические клетки (рис. 1).

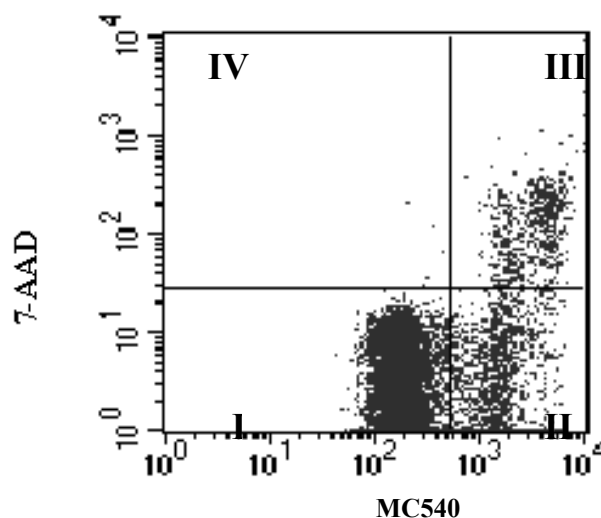


Рис. 1. Цитометрическое распределение клеток K562 по популяциям при двойном окрашивании МС540 и 7-ААД: квадрант I – нормальные неапоптотические клетки, II – клетки в раннем апоптозе, III – клетки в позднем апоптозе, IV – некротические клетки

В качестве позитивного контроля в экспериментах по индукции апоптоза применяли камптотецин (Sigma) в концентрации 50 мМ [17].

Индукцию неспецифического иммунного ответа под действием биназы определяли цитометрически на CD4⁺, CD8⁺ лимфоцитах, выделенных из пери-

ферической крови здоровых доноров. Активация Т-клеток в ходе развития иммунного ответа сопровождается экспрессированием на их внешней поверхности специфического активационного антигена CD69 [18], а также продуцированием такой клеткой ряда цитокинов, в частности интерферона-гамма [19]. Таким образом, измеряя количество клеток, начинающих экспрессию таких активационных маркеров под действием антигена, можно охарактеризовать его иммуногенные свойства.

Уровень экспрессии антигена CD69 и интерферона-гамма Т-клетками определяли после культивирования клеток в присутствии РНКазы, последующей обработки и окрашивания по специальному протоколу, как описано в [19]. Окрашивание клеток производилось комплексом антител, конъюгированных с флюоресцентными красителями: anti-IFN-g-FITC (BD-Science), anti-CD69-PE (BD- Science), anti-CD3-PerCP (BD- Science), anti-CD8-APC (BD- Science), anti-CD-4-APC (BD- Science).

В качестве позитивного контроля в экспериментах по индукции неспецифического иммунного ответа применялся стафилококковый энтеротоксин Б, обладающий суперантигенными свойствами [20], в концентрации 100 нг/мл.

Математическую обработку результатов проводили в программе Statistica 6.0 с использованием непараметрического критерия Манна – Уитни в качестве критерия достоверности. При этом $p \leq 0.05$ принимали за достоверный уровень значимости.

2. Результаты и обсуждение

Для биназы установлено концентрационнозависимое избирательное апоптоиндуцирующее и антипролиферативное действие в отношении клеток K562 в диапазоне концентраций от 30 до 750 мкг/мл (рис. 2). В первую очередь цитотоксическая активность РНКазы проявилась в уменьшении общего числа клеток. Общее количество клеток под действием биназы за 48 ч инкубирования уменьшилось по сравнению с контролем без фермента на 24, 37 и 42% для концентраций биназы 30, 150 и 750 мкг/мл, соответственно. Классический индуктор апоптоза камптотедин также обладал цитотоксическими свойствами, снижая общее количество клеток по сравнению с контролем на 47%. При инкубации клеток K562 с препаратом фермента уменьшалась доля жизнеспособных неапоптических клеток до 56% для концентрации биназы 750 мкг/мл, тогда как в контроле доля этих клеток составляла 94%, а в варианте с камптотецином – 83%. С увеличением концентрации фермента увеличивалась доля раннеапоптических клеток до 31% (750 мкг/мл) против 5% в контроле и 15% в варианте с камптотецином. Доля позднеапоптических клеток также увеличивалась и составляла величину от 5% при концентрации биназы 30 мкг/мл до 13% для 750 мкг/мл. В контрольном варианте доля клеток, находящихся на стадии позднего апоптоза, не превышала 1%, а в варианте с камптотецином – 2%. Таким образом, проведенное исследование позволяет говорить о высоком апоптогенном потенциале биназы в отношении клеток K562, превосходящем таковой у классического индуктора апоптоза – камптотецина.

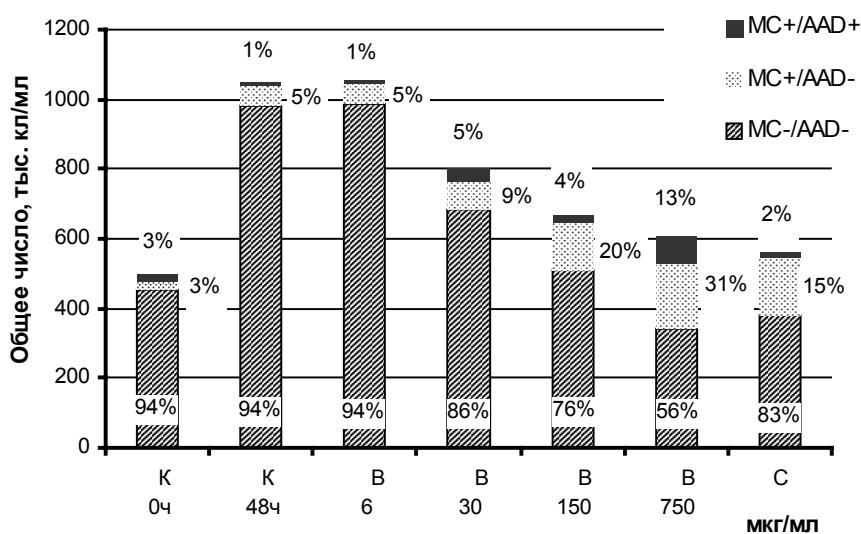


Рис. 2. Распределение клеток K562, обработанных РНКазой в течение 48 ч, по популяциям, отражающим стадийность апоптоза (MC+/AAD+ – поздний апоптоз, MC+/AAD- – ранний апоптоз, MC-/AAD- – неапоптотические клетки). Варианты: К – контрольные необработанные клетки в начале эксперимента и спустя 48 ч культивирования; В – обработка биназой; С – камптотецином

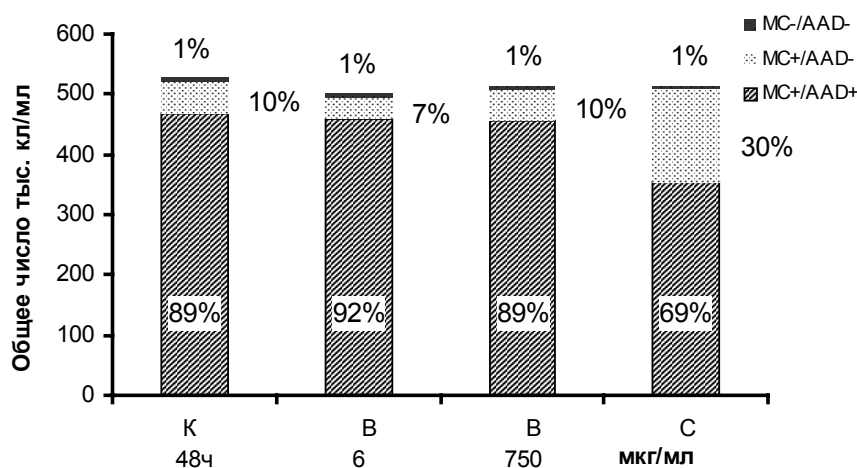


Рис. 3. Распределение лимфоцитов, обработанных РНКазой в течение 48 ч, по популяциям, отражающим стадийность апоптоза (MC+/AAD+ – поздний, MC+/AAD- – ранний апоптоз, MC-/AAD- – неапоптотические клетки). Варианты: К – контрольные необработанные клетки спустя 48 ч культивирования; В – обработка биназой; С – камптотецином (50мМ)

Для оценки возможности цитотоксического действия биназы на нормальные клетки человека исследовали влияние фермента на лимфоциты, выделенные из крови здоровых доноров. Во всем диапазоне исследованных концентраций (6–750 мкг/мл) биназа не оказала апоптозиндуцирующего действия на эти клетки (рис. 3), что позволяет сделать вывод об избирательном цитотоксиче-

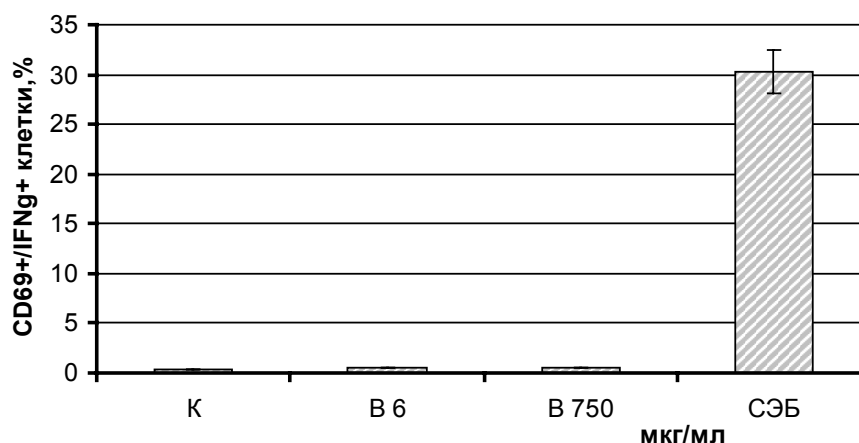


Рис. 4. Индукция экспрессии активационных маркеров CD69 и интерферона- γ CD4+, CD8+ лимфоцитами под действием биназы. Варианты: К – контрольные необработанные клетки спустя 48 ч культивирования, В – обработка биназой, СЭБ – стафилококковый энтеротоксин Б (100 нг/мл)

ском действии фермента на опухолевые клетки. Ранее было показано преимущественное угнетение роста *ras*-трансформированных фибробластов по сравнению с нормальными [21], что подтверждает возможность избирательного действия фермента на опухолевые клетки. Такое действие, по-видимому, обусловлено тем, что молекула этого фермента несет на своей поверхности значительный положительный заряд ($pI = 9.5$). Известно, что селективность действия РНКаз главным образом зависит от их катионности [22], поскольку злокачественные клетки по сравнению с нормальными экспрессируют на своей поверхности повышенное число отрицательно заряженных фосфолипидов, гликолипидов и гликопротеинов [23]. Таким образом, электростатическое взаимодействие молекулы фермента и поверхности опухолевой клетки повышает вероятность интернализации РНКазы.

При изучении индукции неспецифического иммунного ответа под действием биназы установлено, что в исследованном диапазоне концентраций (6–750 мкг/мл) фермент не вызывал повышения уровня экспрессии CD69-антигена и образования интерферона-гамма Т-клетками. В присутствии стафилококкового энтеротоксина Б происходило образование CD69 и интерферона-гамма у 30% CD4+, CD8+ лимфоцитов (рис. 4), т. е. по отсутствию у биназы возможности активировать CD4+, CD8+ Т-клетки можно сделать вывод об отсутствии у нее свойств индуктора поликлонального Т-клеточного ответа – суперантигена.

Отсутствие у биназы суперантигенных свойств является весьма интересным фактом. Преимущественный интерес исследователей в отношении цитотоксических РНКаз млекопитающих вполне обоснованно связан с ожиданием низких иммуногенных эффектов этих белков в организме человека. Однако показано, что и филогенетически далекие от человека РНКазы могут обладать минимальным воздействием на его иммунную систему. Так, установлено, что

онконаза – препарат РНКазы ооцитов лягушки – не обладает иммунотоксическим и иммуногенным действием [6].

В результате наших исследований установлено, что РНКазы *Bacillus intermedius* обладает достоверным избирательным антипролиферативным и апоптоз-индуцирующим действием в отношении клеток миелоидного лейкоза K562. Кроме того, полученные экспериментальные данные позволяют обосновать возможность применения препаратов биназы в терапии опухолей человека в связи с отсутствием у данного фермента иммунотоксических и суперантигенных свойств.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда палаты депутатов г. Берлина, РФФИ (проект № 04-04-49385), Фонда НИОКР Республики Татарстан (проект № 03-3.10-292) и ФцНТП ЖС-12.2/002.

Summary

P.V. Zelenikhin, G.V. Cherepnev, O.I. Ilinskaya. Apoptogenic and immunogenic effects of *Bacillus intermedius* ribonuclease.

Ribonucleases (RNAses), obtained from different organisms could be considered as new antitumor drugs. Bacterial RNAses are perspective as antitumor agents because they are resistant to mammal cytosolic RNase inhibitor and not expensive. The aim of the present study was to investigate the apoptogenic effects of *Bacillus intermedius* RNase (binase) and to determine immunogenic properties of the enzyme. The binase was shown to obtain the cytostatic and apoptogenic effects on K562 cells. To investigate binase cytotoxic effects on normal (nonmalignant) human cells we used the peripheral blood lymphocytes, obtained from healthy donors. The binase was not shown to possess the apoptogenic effects to the human blood lymphocytes. The absence of RNase's apoptotic effects toward human peripheral blood mononuclear cells confirms the selective antitumor action of enzyme. The induction of nonspecific immune response was determined by the expression level of CD69 and IFN-gamma in human peripheral blood lymphocytes under enzyme action. Neither CD69, nor IFN-gamma were not expressed by CD4⁺, CD8⁺ lymphocytes in the presence of binase. Thus, it should be noted, that binase does not induce the nonspecific immune response as superantigen or mitogen.

Литература

1. *Deutscher M.P., Li Z.* Exoribonucleases and their multiple roles in RNA metabolism // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* – 2001. – No 66. – P. 67–105.
2. *Harder J., Schroder J.M.* RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 29, No 277. – P. 46799–46784.
3. *Rosenberg H.F., Domachowske J.B.* Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens // *J. Leukoc. Biol.* – 2001. – V. 5, No 70. – P. 691–698.
4. *Yang D., Chen Q., Rosenberg H., Rybak S., Newton D., Wang Z., Fu Q., Tchernev V., Wang M., Schweitzer B., Kingsmore S., Patel D., Oppenheim J., Howard O.* Human ribonuclease A superfamily members, eosinophil-derived neurotoxin and pancreatic ribonuclease, induce dendritic cell maturation and activation // *J. Immunol.* – 2004. – V. 10, No 173. – P. 6134–6142.

5. *Antignani A., Naddo M., Cubellis M.V., Russo A., D'Alessio G.* Antitumor action of seminal ribonuclease, its dimeric structure, and its resistance to the cytosolic ribonuclease inhibitor // *Biochemistry*. – 2001. – V. 12, No 40. – P. 3492–3496.
6. *Saxena S.K., Shogen K., Ardeli W.* Onconase and its therapeutic potential // *Lab. Med.* – 2003. – No 34. – P. 380–387.
7. *Olmo N., Turnay J., Gonzalez de Butitrigo G., Lopez de Silanes I., Gavilanes J.G., Lizarbe M.A.* Cytotoxic mechanism of the ribotoxin alpha-sarcin. Induction cell death via apoptosis // *Eur. J. Biochem.* – 2001. – V. 7, No 268. – P. 2113–2123.
8. *Sevcik J., Urbanikova L., Leland P.A., Raines R.T.* X-Ray structure of two crystalline forms of a *Streptomyces* ribonuclease with cytotoxic activity // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 49, No 277. – P. 47325–47330.
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. 2–3, No 156. – P. 101–107.
10. *Scharovsky O.G., Rozados V.R., Gervasoni S.I., Matar P.* Inhibition of ras oncogene: a novel approach to antineoplastic therapy // *J. Biochem. Sci.* – 2000. – V. 4, No 7. – P. 292–298.
11. *Leland P., Raines R.* Cancer chemotherapy – ribonucleases to the rescue // *Chem. Biol.* – 2001. – No 8. – P. 405–413.
12. *Chirino A., Ary M., Marshall S.* Minimizing the immunogenicity of protein therapeutics // *Drug discovery today*. – 2004. – V. 2, No 9. – P. 82–90.
13. *Yakovlev G.I., Moiseyev G.P., Struminskaya N.K., Borzykh O.A., Kipenskaya L.V., Znamenskaya L.V., Leschinskaya I.B.* Mutational analysis of the active site of RNase of *Bacillus intermedius* (BINASE) // *FEBS Lett.* – 1994. – V. 3, No 354. – P. 305–306.
14. *Juan G., Gruenwald S., Darzynkiewicz Z.* Phosphorylation of retinoblastoma susceptibility gene protein assayed in individual lymphocytes during their mitogenic stimulation // *Exp. Cell Res.* – 1998. – V. 1, No 239. – P. 104–110.
15. *Laakko T., King L., Fraker P.* Versatility of merocyanine 540 for the flow cytometric detection of apoptosis in human and murine cells // *J. Immunol. Meth.* – 2002. – V. 1–2, No 261. – P. 129–139.
16. *Gaforio J., Serrano M., Algarra I., Ortega E., Alvarez de Cienfuegos G.* Phagocytosis of apoptotic cells assessed by flow cytometry using 7-Aminoactinomycin D // *Cytometry*. – 2002. – V. 1, No 49. – P. 8–11.
17. *Smolewski P., Grabarek J., Lee B., Johnson G., Darzynkiewicz Z.* Kinetics of HL-60 cell entry to apoptosis during treatment with TNF-alpha or camptothecin assayed by the stathmo-apoptosis method // *Cytometry*. – 2002. – V. 3, No 47. – P. 143–149.
18. *Simms P., Ellis T.* Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation // *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. – 1996. – V. 3, No 3. – P. 301–304.
19. *Cherepnev G., Volk H., Kern F.* The use of peptide and peptide libraries as T-cell stimulants in flow-cytometric studies // *Methods Cell Biol.* – 2004. – No 75. – P. 453–79.
20. *McCloskey T., Haridas V., Pontrelli L., Pahwa S.* Response to superantigen stimulation in peripheral blood mononuclear cells from children perinatally infected with human immunodeficiency virus and receiving highly active antiretroviral therapy // *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. – 2004. – V. 5, No 11. – P. 957–962.
21. *Ilinskaya O., Dreyer F., Mitkevich V., Shaw K., Pace C., Makarov A.* Changing the net charge from negative to positive makes ribonuclease Sa cytotoxic // *Protein Sci.* – 2002. – V. 10, No 11. – P. 2522–2525.

22. *Makarov A., Ilinskaya O.* Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets // FEBS Lett. – 2003. – V. 1–3, No 540. – P. 15–20.
23. *Ran S., Downes A., Thorpe P.* Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels // Cancer Res. – 2002. – V. 21, No 62. – P. 6132–6140.

Поступила в редакцию
15.07.05

Зеленихин Павел Валерьевич – аспирант кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

Черепнев Георгий Валентинович – доктор медицинских наук, научный сотрудник Института медицинской иммунологии Шарите, Берлин.

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

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