

Цитофлуориметрическая характеристика влияния РНКаз на клетки про- и эукариот

П.В. Зеленихин, К.Р. Мамедзаде, О.Н. Ильинская
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

The cytofluorimetric characteristics of RNase influence towards pro- and eucariotic cells

P.V. Zelenikhin, K.R. Mamedzade, O.N. Ilinskaya
Kazan (Volga region) Federal University, Kazan

Цитотоксичные рибонуклеазы (РНКазы) — перспективные препараты для терапии злокачественных новообразований. Расширение спектра модельных объектов, по отношению к которым охарактеризовано действие РНКаз, позволит дать точную оценку селективности действия данных препаратов.

С помощью проточной цитометрии оценивали действие рибонуклеазы *Bacillus intermedius* (биназы) и РНКазы А быка на клетки эпителия легкого эмбриона коровы (ЛЭК) и *Escherichia coli* K12. Апоптоз клеток ЛЭК выявляли с помощью двойного окрашивания Аннексином-FITC и йодидом пропидия (PI). Жизнеспособность клеток *E. coli* оценивали с помощью окрашивания PI.

Ни в одной из исследованных концентраций (100 и 300 мкг/мл) биназа и РНКазы А не проявили цитотоксических свойств в отношении клеток ЛЭК и *E. coli* K12.

Низкая токсичность исследованных РНКаз в отношении *E. coli* позволяет предположить, что присутствие биназы и РНКазы А в концентрациях, способных проявлять противоопухолевую активность, не будет иметь значительного влияния на микробную флору тканей в перспективных исследованиях *in vivo*. Продемонстрированное отсутствие апоптоз-индуцирующей активности биназы в отношении клеток ЛЭК подтверждает селективность действия данной РНКазы на опухолевые клетки.

Ключевые слова: биназа, РНКазы А, цитотоксичные РНКазы, апоптоз, селективность, ЛЭК.

Рибонуклеазы (РНКазы) — важнейшие ферменты метаболизма РНК, функции которых заключаются в расщеплении мРНК, превращении предшественников РНК в зрелые формы, продукции малых регуляторных РНК, деградации определенных типов РНК. Клетка содержит около 20 видов экзо- и эндорибонуклеаз, которые могут входить в состав надмолекулярных комплексов и проявлять высокую специфичность к определенным нуклеотидным последовательностям и структурам [1]. В последние годы особое внимание уделяется биологическим эффектам рибонуклеаз, таким как контроль роста кровеносных сосудов, токсичность по отношению к клеткам опухолей, противовирусная активность. Современные представления о роли и функциях РНКаз в клетках позволяют рассматривать эти ферменты как перспективную альтернативу традиционным химиотерапевтическим средствам в щадящей терапии злокачественных новообразований. На сегодняшний день известно значительное количество РНКаз, обладающих селективным цитотоксическим действием по отношению к клеткам опухолей [2–4]. Наиболее известным ферментом этого ряда явля-

Cytotoxic ribonucleases (RNases) are known to be perspective drugs for cancer therapy. The extension of model object's range will give possibility to assess the cytotoxic RNase's selectivity.

*We estimated the effect of *Bacillus intermedius* ribonuclease (binase) and bovine RNase A to *E. coli* K 12 and lung epithelia of cow embryo (LEC) cells. LEC cells apoptosis was characterized with a double staining with annexin-FITC and propidium iodide (PI). *E. coli* K12 cell's vitality was estimate via PI staining.*

*Binase and RNase A were not cytotoxic to LEC and *E. coli* K12 cells in investigated concentrations (100 and 300 µg/ml).*

*Low RNase's toxicity for *E. coli* allows to suppose the binase and RNase A in concentrations, capable to display antitumor activity, will not to effect the tissue's microbial flora during in vivo tests. The lack of apoptosis inducing activity of binase for LEC cells confirms this RNase selectivity for tumor cells.*

Key words: binase, RNase A, cytotoxic RNases, apoptosis, selectivity, LEC.

ется РНКазы лягушки *Rana pipiens* — онконаза [4], успешно проходящая клинические испытания как противоопухолевый препарат в терапии злокачественных новообразований почек, поджелудочной железы и легких. Для РНКаз, как агентов противоопухолевой терапии, основное значение имеет фактор избирательного действия по отношению к опухолевым клеткам. От деструктивного действия РНКаз млекопитающих клетку защищает эволюционно сложившаяся система защиты, опосредованная действием специфического цитозольного ингибитора РНКаз (ИР) [5]. Поэтому для разработки потенциальных противоопухолевых средств весьма перспективны РНКазы, не относящиеся к РНКазам млекопитающих и нечувствительные к действию ИР [6]. К таковым относятся микробные РНКазы. Кроме того, широкие возможности для биоинженерии и практической наработки этих ферментов делает их особо привлекательными для разработки новых терапевтических средств.

Определение молекулярных детерминант РНКаз, ответственных за проявление их цитотоксических свойств по отношению к злокачественным и нормаль-

e-mail: pasha_mic@mai.ru

ным клеткам человека, а также изучение их иммунной активности позволит обосновать возможность применения микробных РНКаз и биоинженерных конструкций на их основе в лечении злокачественных новообразований и наметить технологические подходы к решению проблемы получения функционально активных терапевтических белков. Ранее мы показали, что РНКазы *Bacillus intermedius* – биназа – обладает избирательным цитотоксическим действием в отношении клеток ряда опухолевых линий [7, 8], однако без расширения спектра приложения ферментного препарата невозможно дать точную оценку селективности его действия.

Целью настоящей работы явилась цитофлуориметрическая оценка действия биназы на клетки нормального эпителия легкого эмбриона коровы, как «модели» клеток эпителия легких млекопитающих, и бактерий *Escherichia coli* K12, как «модели» прокариотических клеток, в сравнении с воздействием панкреатической РНКазы А.

Материал и методы

Для экспериментальных исследований использовали две различные РНКазы: биназу – гуанилспецифичную РНКазу *Bacillus intermedius* 7Р дикого типа (молекулярная масса 12,3 кДа, 109 аминокислотных остатков, $pI = 9,5$) [9] и панкреатическую РНКазу А быка (Вектор, Россия). Высокая каталитическая активность биназы подтверждена как в отношении синтетических субстратов [10], так и природной высокополимерной РНК дрожжей рода *Candida* [11]. Уровень гидролизующей РНК активности РНКазы А (k_{cat}/K_M около $10^9/M \times c$) [12] сопоставим с активностью биназы.

Оценку цитотоксического действия РНКаз осуществляли с помощью клеточной линии эпителия легких эмбриона коровы (ЛЭК) (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, Россия) и клеток *Escherichia coli* K12 (Коллекция кафедры микробиологии КФУ).

Клетки ЛЭК культивировали в питательной среде DMEM (Sigma), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma, США), 2 мМ глутамина (Sigma, США) и по 100 единиц/мл пенициллина и стрептомицина, при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Культивирование *Escherichia coli* K12 осуществляли на среде Луриа-Бертани (LB-бульон) следующего состава: дрожжевой экстракт (Difco, США) – 5 г, триптон (Difco, США) – 10 г, NaCl – 10 г, H₂O – 1000 мл, pH 7,0. Суспензию клеток ЛЭК засеивали в 6-луночные планшеты для клеточных культур 3×10^5 кл./луночку и культивировали до образования 60% монослоя. Затем среду заменяли на свежую, содержащую РНКазы (100 и 300 мкг/мл), либо без РНКаз (контрольный вариант). Через 24 ч клетки диспергировали с помощью 0,25% раствора трипсина (Sigma, США), ресуспендировали осторожным пипетированием, дважды отмывали охлажденным натрий-фосфатным буфером (PBS, Sigma, США) и полученную суспензию использовали для цитофлуориметрического анализа. Ночную культуру *Escherichia coli* K12 ресуспендировали в свежем LB-бульоне (контрольный вариант), либо в среде, содержащей 100 и 300 мкг/мл биназы или РНКазы А, (конечная концентрация 10^6 кл./мл), инкубировали 24 ч при 37°C. Затем клетки отмывали охлажденным PBS и использовали для цитофлуориметрического анализа.

Изменение характеристик клеток фиксировали с помощью проточного цитофлуориметра FACSCanto II (BD, США).

Апоптогенное действие ферментных препаратов на клетки ЛЭК характеризовали с помощью FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen, США) [13], в качестве позитивного контроля использовали классический индуктор апоптоза камптотецин в концентрации 50 мМ [14]. Изменение жизнеспособности клеток *E. coli* K12 под действием РНКаз определяли с помощью окрашивания йодидом пропидия (PI), как описано в работе L. Shi с соавт. (2007) [15].

Статистическую обработку результатов проводили в программе Statistica 6.0 с использованием непараметрического U-критерия Манна – Уитни (уровень статистической значимости $p < 0,05$).

Результаты

Цитометрическая оценка жизнеспособности клеток бактерий в присутствии биназы и РНКазы А показала, что ни в одной из исследованных концентраций (100 и 300 мкг/мл) ферментные препараты не оказывали достоверного токсического воздействия на культуру микроорганизмов (рис. 1). Жизнеспособность бактерий после 24 ч культивирования, определенная по числу PI-негативных клеток, составила 94,1%, 94,6%, 94,8%, 93,8% для вариантов с содержанием биназы 100 мкг/мл, 300 мкг/мл, РНКазы А 100 мкг/мл и 300 мкг/мл, соответственно, в то время как в варианте без добавления ферментов доля живых клеток составила 93,3%.

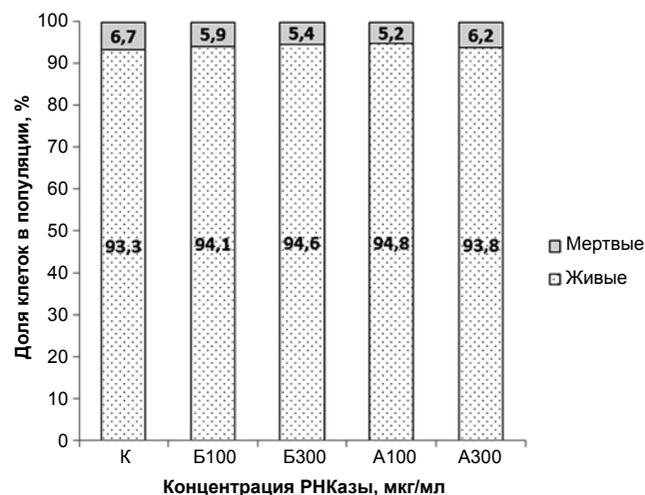


Рис. 1. Выживаемость *Escherichia coli* K12 под действием РНКаз: РНКазы А (А) и биназы (Б): К – контрольный вариант без внесения РНКаз в среду культивирования

Анализ апоптозинуцирующей активности биназы и РНКазы А в отношении клеток ЛЭК выявил сходный характер действия данных препаратов. Ни в одной из использованных концентраций биназа и РНКазы А не индуцировали апоптоз клеток эпителия легких эмбриона коровы (рис. 2). Доля клеток, находящихся в состоянии апоптоза, через 25 ч. культивирования составляла 6,5% и 7,2%, 6,4% и 6,8% для вариантов с концентрациями биназы 100 мкг/мл и 300 мкг/мл, РНКазы А 100 мкг/мл и 300 мкг/мл, соответственно,

что не имело достоверных отличий от контрольного варианта, в котором доля апоптотических клеток составляла 6%. В то же время, известный индуктор апоптоза камптотедин обладал выраженной апоптоз-индуцирующей активностью в отношении данных клеток, вызывая апоптоз у 31,7% клеток.

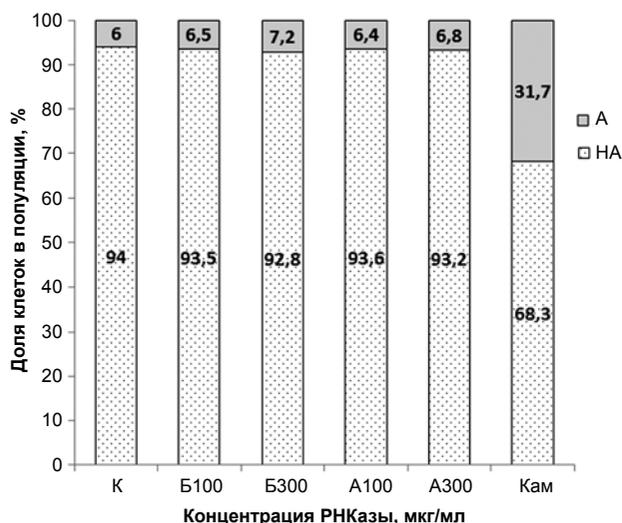


Рис. 2. Апоптоз клеток ЛЭК под действием РНКаз: РНКазы А (А) и биназы (Б): К – контрольный вариант без внесения РНКаз в среду культивирования; Кам – обработка индуктором апоптоза камптотедином (50 мМ)

Обсуждение

Угнетающее рост бактерий действие определенных микробных РНКаз в высоких концентрациях установлено [16], однако, в отличие от биназы, токсичность непосредственно РНКазы А в отношении бактерий не изучалась. В то же время, для катионной РНКазы из эозинофильных гранул человека – члена семейства РНКазы А – известно, что она обладает антистафилококковой активностью [17]. Кожа человека обладает РНКазной активностью, что объясняется секрецией кератиноцитами РНКазы 7, проявляющей антимикробное действие в отношении широкого спектра патогенов [18]. Биназа способна оказывать токсическое действие на клетки бакте-

рий, но лишь в значительно более высоких концентрациях (выше 1000 мкг/мл), чем использовалась в настоящем исследовании, также известны ростостимулирующие эффекты этого фермента в низких концентрациях 0,001–1 мкг/мл [16]. Таким образом, можно предположить, что присутствие биназы и РНКазы А в концентрациях, способных проявлять противоопухолевую активность [7], не будет иметь значительного влияния на микробную флору тканей в перспективных исследованиях *in vivo*.

Известно, что некоторые цитотоксичные РНКазы, такие как онконаза [19], BS-РНКазы [20], избирательно индуцируют апоптоз опухолевых клеток. Однако механизм относительной избирательности их действия не установлен. Выдвигаются предположения, что селективность действия цитотоксичных РНКаз связана с высокой катионностью молекул ферментов и их нечувствительностью к действию ИР [19, 20]. Частично данная гипотеза подтверждается установленной возможностью приобретения цитотоксических свойств нецитотоксичной РНКазой А при ее димеризации [21], что позволяет ей избежать действия ИР. В то же время, нами ранее показано, что в реализации избирательности действия цитотоксичных бактериальных РНКаз, помимо каталитической активности и катионности, имеют значение экспрессирующиеся опухолевой клеткой определенные онкогены, такие, как *kit* [8], *AML1-ETO* [22] или *gas* [23]. Отмечается также, что селективность цитотоксических РНКаз в отдельных случаях может быть невысокой [4], что приводит к индукции апоптоза не только малигнизированных, но и нормальных клеток в результате действия этих ферментов. Вышесказанное подчеркивает необходимость расширения спектра линий опухолевых и нормальных клеток, в отношении которых охарактеризовано действие данных потенциальных терапевтических агентов. Выявленное нами отсутствие цитотоксического действия биназы в отношении клеток нетрансформированного эпителия эмбрионального легкого является еще одним шагом в этом направлении, позволяющем в перспективе конструировать противоопухолевые агенты на основе РНКаз с максимальной селективностью действия.

Благодарности

Работа поддержана грантом РФФИ (12-04-01226а).

ЛИТЕРАТУРА:

- Deutscher M.P., Li Z. Exoribonucleases and their multiple roles in RNA metabolism. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 2001; 66: 67–105.
- Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O. Barnase and binase: twins with distinct fates. *FEBS J.* 2011; 278(19): 3633–43.
- Fang E.F., Ng T.B. Ribonucleases of different origins with a wide spectrum of medicinal applications. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011; 1815(1): 65–74.
- Ardelt W., Ardel B., Darzynkiewicz Z. Ribonucleases as potential modalities in anticancer therapy. *Eur. J. Pharmacol.* 2009; 625(1-3): 181–9.
- Leland P., Raines R. Cancer chemotherapy – ribonucleases to the rescue. *Chemistry and Biology* 2001; 8: 405–13.
- Arnold U. Aspects of the cytotoxic action of ribonucleases. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2008; 9(3): 161–8.
- Зеленихин П.В., Колпаков А.И., Черепнев Г.В. и др. Индукция апоптоза опухолевых клеток биназой. *Молекулярная биология* 2005; 39(3): 457–63.

- 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.
- Schulga A., Kurbanov F., Kirpichnikov M. et al. Comparative study of binase and barnase: experience in chimeric ribonucleases. *Protein Engineering* 1998; 11: 773–80.
- 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: 305–6.
- Ilinskaya O.N., Ivanchenko O.B., Karamova N.S. et al. SOS-inducing ability of native and mutant microbial ribonucleases. *Mut. Res.* 1996; 354: 203–9.
- Park C., Raines R.T. Catalysis by ribonuclease A is limited by the rate of substrate association. *Biochemistry* 2003; 42: 3509–18.
- FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, <http://researcher.nsc.gov.tw/public/woody/Data/98611333871.pdf>
- Smolewski P., Grabarek J., Lee B. et al. Kinetics of HL-60 cell entry to apoptosis during treatment with TNF-alpha or camptothecin assayed by the stathmo-apoptosis method. *Cytometry* 2002; 47: 143–9.

15. Shi L., Günther S., Hübschmann T. et al. Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. *Cytometry* 2007; 71(8): 592–8.

16. Ilinskaya O.N., Ivanchenko O.B., Karamova N.S. Bacterial ribonuclease: mutagenic effect in microbial test-systems. *Mutagenesis* 1995; 10(3): 165–70.

17. Rosenberg H.F. Recombinant human eosinophil cationic protein. Ribonuclease activity is not essential for cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 7876–81.

18. Harder J., Schroder J.M. RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 46779–84.

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

20. Spalletti-Cernia D., Sorrentino S., Di Gaetano S. et al. Highly selective toxic and proapoptotic effects of two dimeric ribonucleases on thyroid cancer cells compared to the effects of doxorubicin. *Brit. J. Cancer. Res.* 2004; 90: 270–7.

21. Di Donato A., Cafaro V., D'Alessio G. Ribonuclease A can be transformed into a dimeric ribonuclease with antitumor activity. *J. Biol. Chem.* 1994; 269(26): 17394–6.

22. 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): 4090–7.

23. 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): 2522–5.

Поступила 15.08.2012

Система для проведения экстракорпорального фотофереза – UVAR XTS («Therakos», США)
 Экстракорпоральный фотоферез представляет собой метод, основанный на сочетании лейкофереза и облучения лейкоцитов, предварительно обработанных фотосенсибилизатором (8-метоксипсораленом), ультрафиолетовым светом диапазона А (320–400 нм).

Область применения:
 Лечение онкологических, аутоиммунных, дерматологических и пролиферативных заболеваний:

- Токсическая злокачественная лимфома кожи,
- atopический дерматит,
- склеродермия,
- псориаз,
- ревматоидный артрит,
- отторжение органов после
- уменьшение реакции трансплантат против хозяина (РТПХ).

Особенности системы:
Безопасность для пациента:

- одноразовая система расходных материалов,
- исключение риска воздушной эмболии,
- исключение риска заражения,
- осуществление контроля поступления антикоагулянта,
- контроль давления в системе,
- контроль скорости забора и возврата крови пациенту,
- возможность изменения параметров процесса в течение процедуры,
- при необходимости автоматическая блокировка системы магистралей.

Простота в работе и обслуживании:

- удобное использование для оператора,
- конструкция аппарата и расходных материалов исключают возможность ошибки при загрузке,
- одноразовая беспелуничная,
- полная автоматизация процедуры,
- быстрое и безопасное извлечение компонентов процедурного набора после завершения процедуры,
- наличие ключа данных, на котором фиксируется вся информация о протекании процесса.

biosafe
 SYSTEMS IN BIO. PROTECTION

Система для выделения стволовых клеток – Serax («BioSafe», Швейцария)

- Самая современная, компактная система, позволяющая выделять стволовые клетки из пуповинной и периферической крови, а также из костного мозга.
- Идеальная система для быстрой автоматической обработки крови с высоким уровнем жизнеспособности клеток после процедуры.
- Serax позволяет проводить обработку крови в рамках 8 протоколов.
- Принцип действия Serax основан на сепарации центрифугированием, позволяющем разделять компоненты крови в соответствии с их плотностью и размерами.
- Система предназначена для применения в клеточной терапии, где необходимо получение определенных компонентов крови.
- Обработка крови или ее компонентов происходит в закрытой стерильной системе.
- Компоненты крови собираются в стандартные мешки и готовы для дальнейшего использования (криоконсервация, наращивание in vitro, переливание пациенту и др.).

Эксклюзивный представитель ООО «Инновационные Медицинские Технологии»
 Москва, ул. Ивана Франко, д. 4, корп. 15, тел./факс: +7(495)380-36-62
 E-mail:
 dr_fedorov@haemoline.ru, gerasimenkody@haemoline.ru, neulybovamy@delrus.org

Автоматизированная система для хранения стволовых клеток в жидком азоте – BioArchive («Thermogenesis», США).
 Система рассчитана на 3626 образцов стволовых клеток.

- Низкая стоимость операционного процесса
- Низкий расход жидкого азота на один образец во время хранения и программного замораживания
- Полностью автоматизированный процесс сокращает время работы персонала
- Снижение затрат на оборудование
- Не требуется большого количества дьюаров для хранения (одна система BioArchive заменяет 6-7 дьюаров)
- Наличие двух встроенных программных замораживателей
- Безопасность и защита
- Полузакрытая система сокращает воздействие азота на оператора
- Источник бесперебойного питания позволяет разместить/извлечь образец в случае отключения электричества
- Параметры 24-х часового контроля и управления доступом включают в себя: Мониторинг уровня жидкого азота. Пароль для доступа

Интегрированный программный замораживатель.

- Минимизирует температурные колебания
- Отсутствует этап ручного переноса образца из программного замораживателя в дьюар для хранения

Криоконтейнер на 25 мл

- Постоянный геометрический размер образца
- Воспроизводимый процесс заморозки для каждой единицы
- Возможность роботизированной закладки на хранение и извлечение образцов
- Снижается вероятность ошибки, связанной с человеческим фактором

Система управления образцом

- Использование штрих-кода исключает ошибки при перемещении образца
- Отчет по образцу
- История образца
- Инвентаризация
- График замораживания

www.thermogenesis.ru

Расходные материалы для культивирования стволовых клеток «CellGenix» (Германия):

- **CellGro HPC** для культивирования клеток в закрытых системах.
- **CellGro DC** для культивирования гемопоэтических кластков, NK-клеток, Т-клеток
- **CellGro DC** для культивирования дендритных клеток

Бесывороточные среды CellGro:

- **SCGM** для культивирования гемопоэтических прогениторных кластков, NK-клеток, Т-клеток
- **DC** для культивирования дендритных клеток

Культуральные мешки VueLife
 (сделаны из FEP Teflon)
CellGro питокины
 Для увеличения гемопоэтических прогениторных кластков, NK-клеток, Т-клеток и дендритных клеток.

Все продукты зарегистрированы и сертифицированы в России