

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.1+577.29+616.006

ИНДУЦИРОВАННЫЕ БИНАЗОЙ ИЗМЕНЕНИЯ МЕМБРАН
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОКП.В. Зеленихин¹, А.С. Горбунова¹, К. Бойерлайн², А.В. Макеева^{1,*}, О.Н. Ильинская¹¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18;²Институт фармакологии им. Рудольфа Буххайма, университет Гиссена, Германия, 35392, г. Гиссен, Шубертштрассе, д.81

*e-mail: avmakeeva.kpfu@gmail.com

Экзогенные рибонуклеазы бацилл могут селективно индуцировать апоптоз злокачественных клеток. В работе проведен анализ способности рибонуклеазы *Bacillus pumilus* – биназы – индуцировать процессы, приводящие к динамическому нарушению целостности мембран клеток аденокарциномы легких человека линии A549. Охарактеризовано влияние фермента в различных концентрациях на состояние цитоплазматической мембраны клеток и мембран митохондрий. При помощи методов проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии установлено, что воздействие биназы приводит к нарушению нормального функционирования мембран обоих типов, причем вначале нарушения затрагивают мембраны митохондрий. Проведенное исследование позволило выявить и визуализировать этапы влияния биназы на мембранные структуры клеток-мишеней и подтвердить, что бактериальная РНКаза индуцирует апоптоз клеток-мишеней преимущественно по “внутреннему” (митохондриальному) пути.

Ключевые слова: РНКаза, *Bacillus pumilus*, биназа, противоопухолевая активность, повреждение мембран, аденокарцинома легкого A549

В настоящее время пристальное внимание уделяется биологическим эффектам ферментов-рибонуклеаз (РНКаз), которые могут не зависеть от их непосредственных каталитических функций: таким, как участие в регуляторных системах клетки, контроль роста кровеносных сосудов, токсичность по отношению к клеткам опухолей, защита от вирусных и микробных патогенов. Особый интерес представляют РНКазы организмов, филогенетически далеких от человека и вследствие этого не подверженных действию ингибитора РНКаз в клетках млекопитающих – РНКазы хладнокровных позвоночных [1], грибов [2] и бактерий [3]. Благодаря наличию селективного цитотоксического действия по отношению к злокачественным клеткам РНКаза *Bacillus pumilus* (биназа) может рассматриваться в качестве потенциального противоопухолевого агента. Установлено селективное действие биназы на клетки карциномы легкого человека линии A549 [4], фибробласты, экспрессирующие онкоген *v-Ras* [5], клетки миелоидного лейкоза [6], клетки рака молочной железы, в том числе и трижды негативные [7]. РНКазы в высоких концентрациях оказывают цитотоксическое [8, 9] и генотоксическое действие [10], а также ингибируют активность Са-зависимых калиевых каналов (K_{Ca} -каналов), приводя к апоптозу [11]. Ингибирование активности K_{Ca} -каналов сопровождается появлением морфологических маркеров апоптоза (вакуолизация цитоплазмы, конденсация и фрагментация хроматина, уменьшение объема клеток). Однако в имеющемся массиве данных от-

сутствуют сведения о динамике изменений функционального состояния клеточных мембран опухолевых клеток при действии биназы.

Целью настоящей работы стало выявление этапных изменений состояния цитоплазматической мембраны (ЦПМ) и мембран митохондрий клеток аденокарциномы легкого линии A549 при обработке биназой.

Материалы и методы

Фермент. В работе использовали биназу – гуанил-специфичную РНКазу *Bacillus pumilus* (молекулярная масса 12,3 кДа, $pI=9,5$, 109 аминокислотных остатков) в высоких концентрациях (100–500 мкг/мл), для которых ранее было установлено апоптоз-индуцирующее действие на ряде линий раковых клеток [4, 6, 7]. Биназа была изолирована как гомогенный белок из культуральной жидкости продуцента по методике, описанной Дудкиной с соавт. [12]. Каталитическая активность биназы охарактеризована ранее по отношению к синтетическим субстратам [13] и высокополимерной дрожжевой РНК [10].

Клеточная линия и условия культивирования. Клетки карциномы легких человека линии A549 (Американская коллекция клеточных культур, Манассас, США) культивировали в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Sigma, Германия) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 2 мМ глутамин, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина в атмосфере 5% CO_2 при температуре 37°C. Клетки с культуральных сосудов

собирали согласно описанной ранее методике [14], засеивали в 96-луночные планшеты (ibidi, Германия) по 30 мкл суспензии (10^6 /мл) клеток в лунку. По достижении клетками 70% сомкнутого монослоя в каждую лунку планшета добавляли по 100 мкл свежей среды DMEM, затем через определенные интервалы времени (0, 4, 8, 24, 48 и 72 ч) добавляли биназу до конечной концентрации 500 мкг/мл.

Характеристика повреждений ЦПМ при помощи флуоресцентной микроскопии. С целью выявления мембрано-повреждающего действия биназы монослои клеток в пробах окрашивали реактивом LIVE/DEAD (Reduced Biohazard Viability/Cytotoxicity, L-7013) по инструкции фирмы-производителя (Invitrogen, США). Микроскопические исследования проводили на флуоресцентном микроскопе Leica DM 6000B (Германия); интенсивность флуоресцентного сигнала рассчитывали с использованием компьютерной программы Leica FW4000.

Цитофлуориметрическая детекция повреждений ЦПМ и мембран митохондрий. Параллельно осуществляли детекцию изменения доли клеток с поврежденной ЦПМ и низким мембранным потенциалом митохондрий в популяции с помощью двойного окрашивания йодидом пропидия (PI) (Sigma, США) и потенциал-зависимым красителем йодидом 3,3'-дигексилосакарбодиазин (DiOC₆) (Molecular Probes, США) на проточном цитофлуориметре BD FACS-Canto II (Becton Dickinson, США). РНКазу вносили в среду культивирования в конечных концентрациях 100 и 300 мкг/мл, клетки инкубировали с ферментом в течение 24 и 48 ч. По окончании срока инкубации среду культивирования отбирали и вносили в центрифужные пробирки для предотвращения потерь клеток, сохранивших целостность, но уже потерявших способность к адгезии. Снятие клеток с культуральных планшетов осуществляли трипсинизацией (0,25% трипсин-ЭДТА; ПанЭко, Россия). Объединенные образцы центрифугировали 5 мин (300g, комнатная температура), осадок ресуспендировали в 1 мл 0,01 М фосфатно-солевого буфера (рН 7,2). Затем вносили в суспензию клеток DiOC₆ в конечной концентрации 50 нМ и выдерживали ее 20 мин в темноте при температуре 37°C. PI до конечной концентрации 5 мкг/мл добавляли за 2 мин до начала измерений. При анализе цитометрических данных обсчитывали характеристики флуоресцентного сигнала для не менее чем $2 \cdot 10^4$ клеток для каждого образца в пяти повторах в каждом из трех независимых экспериментов.

Конфокальная лазерная микроскопия. Для более подробной визуализации мембранных компарментов обработанных биназой клеток использовали конфокальную лазерную микроскопию с применением комбинации флуоресцентных красителей CellVue Claret Dye (Sigma-Aldrich, США), которые позволяют детектировать цитоплазматическую мембрану, и DiOC₆. Окрашивание осуществляли согласно рекомендациям производителя, исследование

проводили на лазерном конфокальном микроскопе LSM 780 (Zeiss, Германия).

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 7.0. Все эксперименты были проведены не менее чем в трех повторах. В качестве критерия достоверности различий использовали критерий Манна-Уитни ($p \leq 0,05$).

Результаты и обсуждение

Для выявления этапных изменений состояния мембран клеток аденокарциномы легкого линии A549 мы применили флуоресцентные красители LIVE/DEAD (Invitrogen, США) и PI, дифференциально окрашивающие клетки с поврежденной цитоплазматической мембраной, а также потенциал-зависимый краситель DiOC₆, выявляющий повреждение мембран митохондрий. Биназа, воздействующая на клетки в течение 8 ч, не оказывала повреждающего действия на мембраны (табл. 1). Целостность монослоя не нарушалась, количество клеток, окрашиваемых красителем LIVE/DEAD, было минимально и в варианте с биназой достоверно не отличалось от такового в варианте без обработки. Однако известно, что в этот временной промежуток биназа интернализуется клетками и проникает в ядро [4]. Установлено, что у ЦПМ клеток A549 между 6-м и 8-м ч действия биназы на 14% возрастает проницаемость для макромолекул, измеренная по проникновению в клетки альбумина, меченного трипановым синим [4], причем после 8 ч проницаемость ЦПМ возвращается к уровню таковой в необработанных клетках. Можно предположить, что эти изменения проницаемости ЦПМ связаны с временной активацией эндоцитоза, поскольку доля клеток с нарушенной ЦПМ в монослое на 8-й ч культивирования в присутствии фермента не возрастает по сравнению с вариантом без обработки ферментом (табл. 1, рис. 1, А–Е).

С увеличением времени культивирования происходило увеличение числа клеток с поврежденной ЦПМ. Через 24, 48 и 72 ч роста в монослое наблюдали незначительное возрастание числа таких клеток (1,3; 1,7; 2,2% от общего числа в соответствующее время). Обработка биназой усиливала этот эффект – доля клеток с поврежденной мембраной составила 2,3; 3,4; 8,4%, соответственно, и при действии биназы в течение 72 ч превысила контрольный показатель в 4 раза (табл. 1). Ранее нами было показано, что под действием биназы не просто возрастает количество клеток с поврежденной мембраной, но и фиксируется нарушение функций мембранных белков. Так, известно, что половина клеток популяции через 24 ч действия биназы теряют способность реагировать на активирующее действие ионов Ca^{2+} , запускающее открытие каналов hSK4 для тока калия. Даже в клетках, которые способны активировать каналы в ответ на Ca^{2+} , калиевый ток снижен на 30% [11], хотя лишь

Таблица 1

Изменение в процессе инкубации в присутствии биназы числа клеток линии A549 с поврежденной мембраной

Время инкубации, ч	Количество клеток			
	Обработка биназой (500 мкг/мл)		Без обработки биназой	
	С целой мембраной, ед./поле зрения	С поврежденной мембраной, ед./поле зрения (% от общего числа клеток)	С целой мембраной, ед./поле зрения	С поврежденной мембраной, ед./поле зрения (% от общего числа клеток)
0	143,7±3,1	1,3±1,1 (0,9)	138,3±2,4	1±0,7 (0,7)
4	141±2,0	2,3±2,1 (1,3)	142±3,2	1,7±1,0 (1,1)
8	144,7±3,3	1,7±1,3 (1,1)	131±3,1	1±0,6 (0,8)
24	141±1,1	3,3±0,2 (2,3)*	149,7±4,3	2±0,3 (1,3)
48	129±1,8	4,7±0,8 (3,4)*	136±1,7	2,3±0,4 (1,7)
72	108,7±1,2	14,3±2,2 (8,4)*	139±1,2	3±1,2 (2,2)

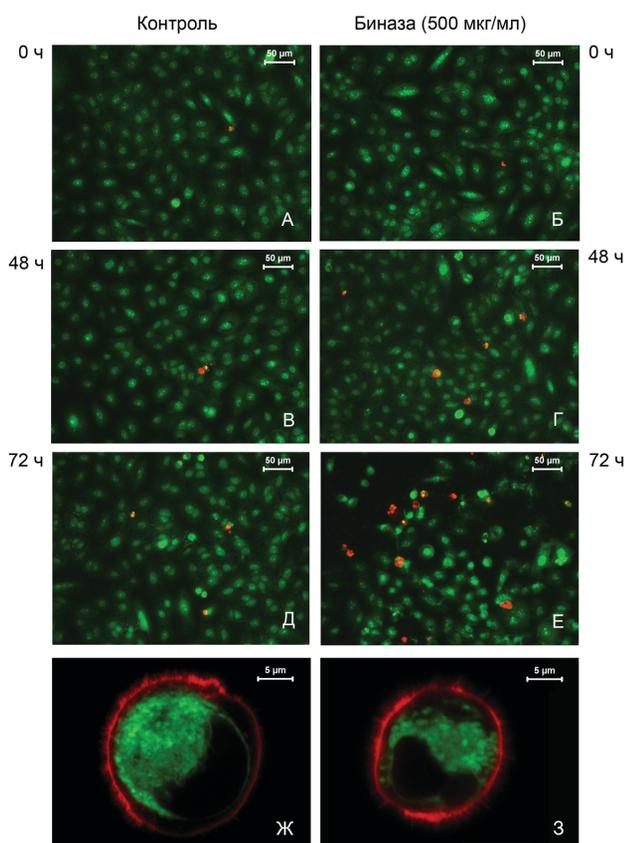
* $p \leq 0,05$ при сравнении с соответствующим вариантом без обработки РНКазой.

Рис. 1. Визуализация клеток карциномы легкого человека A549, обработанных и не обработанных биназой в течение 0–72 ч (А–Е). Окраска LIVE/DEAD. Клетки с поврежденной мембраной окрашены красным цветом. Масштабная линейка – 50 мкм. Лазерная конфокальная микроскопия клеток A549 после 24 ч инкубации с РНКазой (З) и без нее (Ж). Масштабная линейка – 5 мкм. Окраска CellVue Claret и DiOC₆

малая часть клеток окрашивается PI как клетки с поврежденной мембраной (табл. 1).

Лазерная конфокальная микроскопия позволила зафиксировать снижение интенсивности флуоресценции потенциал-зависимого красителя DiOC₆

в митохондриях клеток A549 после 24 ч их инкубации в присутствии биназы (рис. 1, Ж, З), что свидетельствует о влиянии экзогенной РНКазы на энергетический статус клетки.

Использование двойного окрашивания DiOC₆/PI и проточной цитометрии позволило точнее охарактеризовать влияние биназы на мембранные структуры клеток A549. РНКазы обладали способностью индуцировать нарушения как цитоплазматических, так и митохондриальных мембран (рис. 2). Через 24 ч культивирования в присутствии биназы доля клеток с низким потенциалом мембран митохондрий (DiOC₆⁻) составила 15% и 27% для концентраций РНКазы 100 мкг/мл и 300 мкг/мл, соответственно, в то время как значение данного показателя в варианте без обработки ферментами не превышало 9%. Увеличение времени инкубации с РНКазой до 48 ч привело к дальнейшему усилению эффекта; в случае большей исследованной концентрации (300 мкг/мл) доля клеток с низким мембранным потенциалом митохондрий достигла 36%. В концентрации 100 мкг/мл биназа за это время уже не приводила к появлению статистически достоверных различий с контролем значений митохондриального потенциала. Вероятно, это связано с частичной протеолитической деградацией интернализованного фермента клетками-мишенями в ходе длительной инкубации.

Оказалось, что обработка биназой опосредует нарушение целостности ЦПМ клеток A549; это подтверждают данные флуоресцентной микроскопии. Однако доля клеток с пермеабиллизованной ЦПМ (PI⁺), установленная при помощи проточной цитометрии, более чем вдвое превышала значение данного показателя, определенного микроскопически, и достигала 17% в варианте с обработкой ферментом в концентрации 300 мкг/мл в течение 48 ч (рис. 2). Это может объясняться тем, что протокол подготовки образцов для флуоресцентной микроскопии допускает потерю клеток, лишившихся адгезивных свойств. Таким образом, цитометрический

анализ в данном контексте представляется более предпочтительным, поскольку позволяет сохранить всю популяцию клеток и проанализировать их состояние с большей точностью.

Проведенное исследование позволило выявить и визуализировать разные этапы влияния биназы на мембранные структуры клеток-мишеней. Интернализация фермента (рис. 3, Б, 2) сопровождается кратковременным увеличением проницаемости ЦПМ для белков, затем он опосредует процессы, приводящие к нарушению целостности митохондриальных мембран (рис. 3, Б, 3). Действительно, ранее мы показали, что биназа активирует компоненты “внутреннего” (митохондриального) пути апоптоза [6], необходимым элементом которого является перфорация митохондриальных мембран. На более поздних стадиях апоптоза, запущенного по данному механизму, барьерную функцию теряет ЦПМ (рис. 3, Б, 4). Как следует из различий в полученных нами результатах флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии, этот процесс сопровождается потерей клетками адгезивных свойств. Крайне незначительная доля клеток в популяции с перфорированной ЦПМ и сохранившими потен-

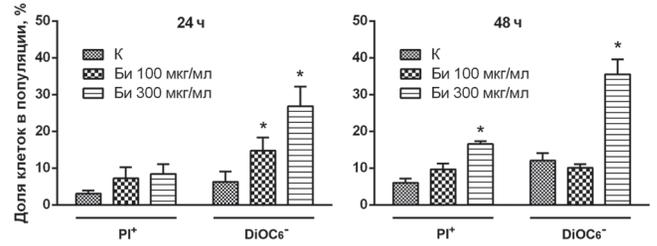


Рис. 2. Доля клеток с поврежденными мембранами в культуре клеток линии A549, включая клетки, потерявшие способность к адгезии (24 и 48 ч культивирования), по данным цитометрии. Общее количество клеток принято за 100%. PI⁺ – клетки с пермебилизированной ЦПМ, DiOC₆⁻ – клетки с нарушенной митохондриальной мембраной. * – $p \leq 0,05$ в сравнении с вариантом без обработки РНКазой (К)

циал митохондриями, которая при всех вариантах обработки не превышала 1,5%, свидетельствует о том, что у биназы в исследованных концентрациях отсутствует способность индуцировать некроз клеток-мишеней.

Таким образом, в работе продемонстрировано нарушение нормального функционирования цитоплазматической мембраны и мембран митохондрий клеток аденокарциномы легких человека линии A549

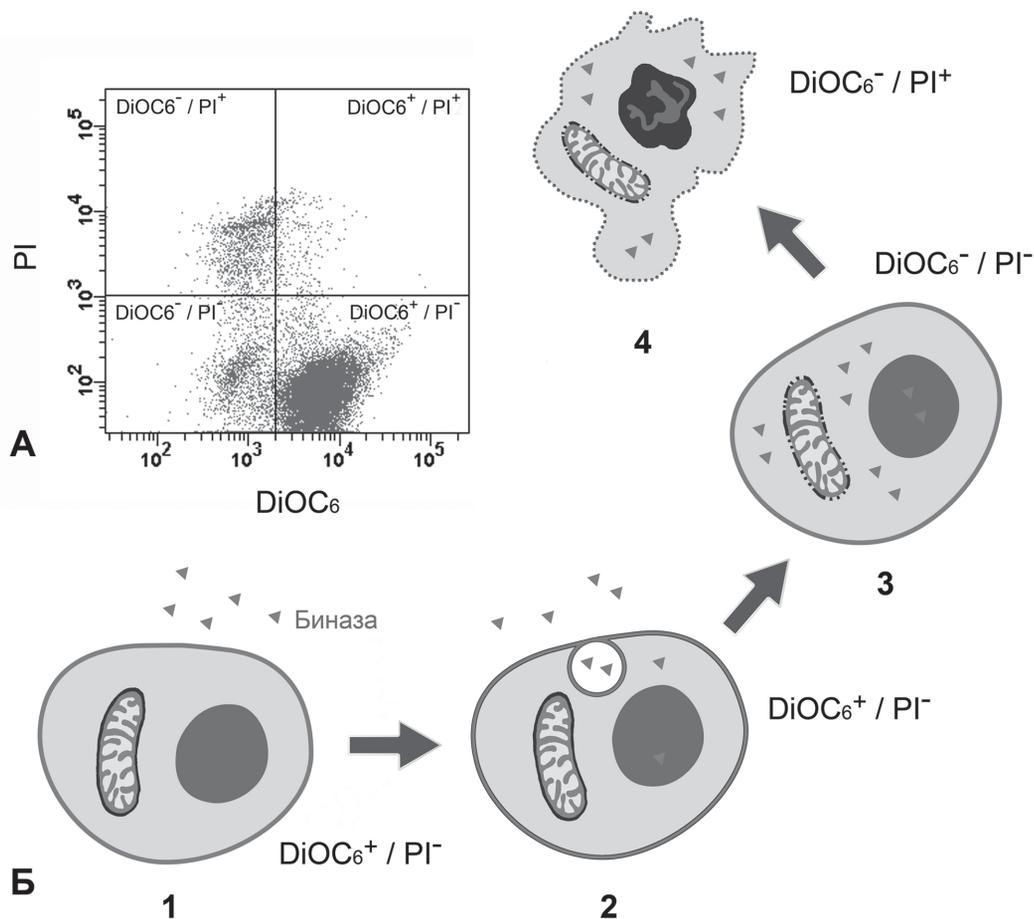


Рис. 3. Действие экзогенной биназы на клетки линии A549. А – цитометрическое распределение клеток, обработанных биназой (300 мкг/мл) в течение 48 ч. Б – этапы действия биназы: 1 – первичное взаимодействие фермента с клеткой; 2 – эндоцитоз, индуцированный биназой; 3 – ранний апоптоз; 4 – поздний апоптоз. Обозначения: клетки без повреждений мембран – DiOC₆⁺/PI⁻; с неповрежденной ЦПМ и нарушенной митохондриальной мембраной – DiOC₆⁻/PI⁻; с нарушением ЦПМ и митохондриальных мембран – DiOC₆⁻/PI⁺

под действием рибонуклеазы *Bacillus pumilus* (биназы) в различных концентрациях. Определена этапность влияния бактериальной РНКазы на мембранные структуры клеток-мишеней и выявлено, что вначале нарушения затрагивают мембраны митохондрий. Полученные результаты могут служить подтверждением того, что биназа индуцирует

преимущественно “внутренний” (митохондриальный) путь апоптоза клеток А549.

Работа выполнена в рамках Программы повышения конкурентоспособности К(П)ФУ и партнерского договора с университетом имени Ю. Либиха (Гиссен, Германия); поддержана грантом Российского научного фонда (проект №14-14-00522).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ardelt W., Shogen K., Darzynkiewicz Z. Onconase and amphinase, the antitumor ribonucleases from *Rana pipiens* oocytes // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2008. Vol. 9. N 3. P. 215–225.
2. Kao R., Davies J. Fungal ribotoxins: a family of naturally engineered targeted toxins? // *Biochem. Cell Biol.* 1995. Vol. 73. N 11–12. P. 1151–1159.
3. Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O. Barnase and binase: twins with distinct fates // *FEBS J.* 2011. Vol. 278. N 19. P. 3633–3643.
4. Cabrera-Fuentes H.A., Aslam M., Saffarzadeh M., Kolpakov A., Zelenikhin P., Preissner K.T., Ilinskaya O. Internalization of *Bacillus intermedius* ribonuclease (BINASE). induces human alveolar adenocarcinoma cell death // *Toxicol.* 2013. Vol. 69. P. 219–226.
5. 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. N 2–3. P. 101–107.
6. Mitkevich V.A., Kretova O.V., Petrushanko I.Y., Burnysheva K.M., Sosin D.V., Simonenko O.V., Ilinskaya O.N., Tchurikov N.A., Makarov A.A. Ribonuclease binase apoptotic signature in leukemic Kasumi-1 cells // *Biochimie.* 2013. Vol. 95. N 6. P. 1344–1349.
7. Zelenikhin P., Pukhovskaya V., Garipov A., Makeeva A., Sokolova, E., Ilinskaya O. Obvious and hidden reasons of breast cancer cell sensitivity to antitumor RNase // *BioNanoScience.* 2016. Vol. 6. N 4. P. 528–533.
8. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents // *Bioessays.* 2008. Vol. 30. N 8. P. 781–790.
9. Makarov A.A., Ilinskaya O.N. Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets // *FEBS Lett.* 2003. Vol. 540. N 1–3. P. 15–20.
10. Ilinskaya O.N., Karamova N.S., Ivanchenko O.B., Kipenskaya L.V. SOS-inducing ability of native and mutant microbial ribonucleases // *Mut. Res.* 1996. Vol. 354. N 2. P. 203–209.
11. Ilinskaya O.N., Koschinski A., Repp H., Mitkevich V., Dreyer F., Scholtz J.M., Pace C.N., Makarov A. RNase-induced apoptosis: fate of calcium-activated potassium channels // *Biochimie.* 2008. Vol. 90. N 5. P. 717–725.
12. Dudkina E., Ulyanova V., Shah Mahmud R., Khodzhaeva V., Dao L., Vershinina V., Kolpakov A., Ilinskaya O. Three-step procedure for preparation of pure *Bacillus altitudinis* ribonuclease // *FEBS Open Bio.* 2016. Vol. 6. N 1. P. 24–32.
13. Yakovlev G.I., Moiseyev G.P., Struminskaya N.K., Borzykh O.A., Kipenskaya L.V., Znamenskaya L.V., Leschinskaya I.B., Chernokalskaya E.B., Hartley R.W. Mutational analysis of the active site of RNase of *Bacillus intermedius* (BINASE) // *FEBS Lett.* 1994. Vol. 354. N 3. P. 305–306.
14. Freshney R.I. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2016. 728 pp.

Поступила в редакцию
09.10.2017

Принята в печать
12.12.2017

CELL BIOLOGY

BINASE INDUCED CHANGES OF TUMOR CELL MEMBRANES

P.V. Zelenikhin¹, A.S. Gorbunova¹, K. Beuerlein², A.V. Makeeva^{1,*}, O.N. Ilinskaya¹

¹Kazan Federal University, Kremlyovskaya st. 18, Kazan, 420008, Russia;

²Rudolf Buchheim Institute of Pharmacology, Justus-Liebig-University, Schubertstrasse 81, Giessen, 35392, Germany

*e-mail: avmakeeva.kpfu@gmail.com

Exogenous ribonuclease of bacilli can selectively induce apoptosis of malignant cells. The analysis of the ability of *Bacillus pumilus* ribonuclease – binase – to induce processes, which lead to a dynamic disruption of the integrity of A549 human adenocarcinoma cell membranes, was performed. The influence of different enzyme concentrations on the state of the cytoplasmic membrane of cells and mitochondrial membranes was characterized. Using the methods of flow cytometry and fluorescence microscopy, it has been established that binase leads to normal functioning disruption of both types of membranes, with mitochondrial membranes affected first. The study allowed to identify and visualize the effects of binase on the membrane structures of

target cells and to confirm that bacterial RNase induces apoptosis of target cells mainly through the “internal” (mitochondrial) pathway.

Keywords: *RNase, Bacillus pumilus, binase, antitumor activity, membranes disruption, lung adenocarcinoma A549*

Сведения об авторах

Зеленихин Павел Валерьевич – канд. биол. наук, доц. кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии К(П)ФУ. Тел.: 8-843-233-78-84; e-mail: rasha_mic@mail.ru

Горбунова Анна Сергеевна – магистрант кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии К(П)ФУ. Тел.: 8-843-233-78-55; e-mail: gorbunovaanna94@gmail.com

Бойерляйн Кнут – науч. сотр. Института фармакологии им. Рудольфа Буххайма Университета Гиссена, Гиссен, Германия. Тел.: +49-0641-99-47601; e-mail: knut.beuerlein@pharma.med.uni-giessen.de

Макеева Анна Владимировна – вед. инженер НИЛ биосинтеза и биоинженерии ферментов кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии К(П)ФУ. Тел.: 8-843-233-78-55; e-mail: avmakeeva.kpfu@gmail.com

Ильинская Ольга Николаевна – докт. биол. наук, проф., зав. кафедрой микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии К(П)ФУ. Тел.: 8-843-233-78-55; e-mail: olga.ilinskaya@kpfu.ru