

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.29; 615.015; 616.006

© Коллектив авторов

ПРОНИКНОВЕНИЕ БИНАЗЫ В КЛЕТКИ АЛЬВЕОЛЯРНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЛЕГКИХ НЕ ИНДУЦИРУЕТ ИХ ГИБЕЛЬ

Э.А. Кабрера Фуентес^{1,2}, Н.В. Калачева², Р.Т. Мухаметшина¹, П.В. Зеленихин^{2*},
А.И. Колпаков², Г. Баррето¹, К.Т. Прайсснер³, О.Н. Ильинская²

¹Max-Planck-Institute for Heart and Lung Research, Bad Nauheim, Germany

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Казанский (Приволжский) федеральный университет”, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18; тел: (843) 233-78-84;
эл. почта: pasha_mic@mail.ru

³Department of Biochemistry, Medical School, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany

Микробные рибонуклеазы обладают широким спектром биологической активности, проявляя в малых концентрациях стимулирующие, а в высоких концентрациях - цитотоксические и генотоксические свойства. Механизмы проникновения этих ферментов в клетки до сих пор неясны. В настоящей работе исследовано проникновение рибонуклеазы *Bacillus intermedius* (биназы) в клетки альвеолярного эпителия легких – пневмоциты типа II. Впервые методом иммунофлуоресценции показана интернализация биназы первичными недифференцированными пневмоцитами АТII. В пневмоцитах опухолевой линии MLE-12, также происходящие из клеток типа II, фермент не проникал. Тем не менее биназа обладала цитотоксичностью только по отношению к клеткам MLE-12, но не к клеткам АТII. Полученные данные однозначно свидетельствуют о том, что чувствительность опухолевых клеток к биназе выше, чем у нормальных клеток, а проникновение фермента внутрь альвеолярных эпителиальных клеток напрямую не связано с гибелью последних.

Ключевые слова: биназа, цитотоксичность, интернализация, иммунофлуоресценция, альвеолярные эпителиальные клетки типа II, MLE-12, АТII.

ВВЕДЕНИЕ. Сегодня известно значительное количество РНКаз, обладающих селективным цитотоксическим действием по отношению к клеткам опухолей [1-4]. Противоопухолевый препарат, достигший стадии клинических испытаний, – онконаза – выделена из ооцитов леопардовой лягушки [5]. Считается, что каталитическая активность необходима для проявления цитотоксичности экзогенных РНКаз [1, 2]. Как и онконаза, бактериальные РНКазы нечувствительны к действию присутствующего в клетках млекопитающих ингибитора РНКаз [6] и вследствие этого сохраняют свою каталитическую активность в обработанных ими клетках [7]. Однако до сих пор однозначно не установлено, проникают ли микробные РНКазы в клетки эукариот и является ли это проникновение обязательным для индукции гибели клеток. В связи с вышеизложенным целью настоящей работы стала оценка возможности интернализации рибонуклеазы *Bacillus intermedius* (биназы) в клетки альвеолярного эпителия лёгких – пневмоциты типа II.

* - адресат для переписки

Лёгочный эпителий состоит из двух типов пневмоцитов. Преобладающий тип I представлен крупными клетками (диаметр до 100 мкм), которые играют важную роль в газообмене, транспорте ионов и воды [8]. Альвеолярные эпителиальные клетки типа II, занимающие всего 5% поверхности легочного эпителия, представляют собой клетки кубоидной формы диаметром около 10 мкм, которые секретируют сурфактанты, - смесь фосфолипидов и белков - и могут быть конвертированы в клетки типа I при развитии плода, а также при репарации повреждений лёгких [9]. Именно эти клетки в процессе канцерогенеза трансформируются в раковые. В частности, линия A549, выделенная от пациента с аденокарциномой лёгких, происходит из пневмоцитов типа II, однако клетки A549 уже не могут превращаться в тип I [10]. Недавно с помощью Рамановской микроспектроскопии было показано, что клетки A549 более сходны по характеристикам с дифференцированными клетками АТІ, чем с недифференцированными АТІІ [10]. Линия MLE-12 из опухоли лёгких мышей также не полностью сохраняет морфологические характеристики и экспрессионный профиль пневмоцитов типа II [11]. Чтобы в дальнейшем понять перспективы воздействия биназы на неопластические клетки в сравнении с нормальными, мы выбрали для экспериментов две линии мышиных эпителиальных клеток типа II: первичные недифференцированные клетки АТІІ, способные к конверсии как в нормальные клетки типа I, так и в раковые, и линию MLE-12 опухоли лёгких трансгенной мыши, несущей антиген TAG вируса SV40 под транскрипционным контролем регуляторной последовательности промоторной области гена белка человека SP-C [11]. Сравнительный анализ интернализации биназы этими клетками позволит оценить вклад внутриклеточной локализации фермента в индуцируемую им цитотоксичность.

МЕТОДИКА. Биназа – гуанилспецифичная РНКазы *Bacillus intermedius* 7P (молекулярная масса 12,3 кДа, 109 аминокислотных остатков, pI=9,5) – была изолирована в виде гомогенного белка из культуральной жидкости *Escherichia coli* BL21, несущей плазмиду pGEMGX1/ent/Bi, согласно процедуре, описанной Schulga с соавт. [12]. Каталитическая активность биназы охарактеризована ранее по отношению к синтетическим субстратам [13] и высокополимерной дрожжевой РНК [14].

В работе использована первичная культура клеток альвеолярного эпителия легких типа II (АТІІ), выделенная из изолированного лёгкого мыши, и культура альвеолярного эпителия мышей (MLE-12) из коллекции клеточных культур США (ACCC). Клетки АТІІ получали после 40 мин инкубации легкого в шейкере с раствором нейтральной протеазы (“Dispase”, Worthington, США), и последующего измельчения в среде DMEM (“Sigma”, США), содержащей 10 пг/мкл ДНКазы I (“Serva”, Германия). После 10 мин инкубации взвесь фильтровали, осадок промывали DMEM и отделяли от супернатанта центрифугированием (10 мин, 300 g). К осадку вновь добавляли среду, содержащую телячью сыворотку и связанные с магнитными частицами антитела против цитокинов CD16/CD32 и CD45, и выдерживали 30 мин при 37°C. Затем проводили двукратное промывание осадка солевым фосфатным буфером PBS pH 7,4 (“Sigma”) и отделяли магнитные частицы, связавшиеся с лимфоцитами, на магнитном сепараторе MagnaRack (“Invitrogen”, США). Оставшиеся клетки центрифугировали в PBS 10 мин при 400 g и переносили осадок в среду DMEM для культивирования клеток АТІІ.

Клетки АТІІ и MLE-12 засевали с плотностью 5-10 тыс/мл и выращивали на стандартной среде DMEM с добавлением пенициллина/стрептомицина (по 10000 ед.) и 10% телячьей сыворотки в атмосфере 5% CO₂. После образования монослоя заменяли среду на аналогичную, содержащую 100 нмоль биназы, и выращивали 24 ч. Анализ цитотоксичности биназы проводили с использованием теста, основанного на увеличении выхода в среду внутриклеточной лактат дегидрогеназы при воздействии на клетки токсичных факторов (Cytotoxicity Detection Kit LDH, “Roche”, Германия).

Антитела, специфичные к биназе, выделяли из крови кролика после введения трёх внутримышечных инъекций с 10-суточным интервалом (1, 2 и 3 мг биназы, смешанной с равным объемом адьюванта Фрейнда (“Sigma”). Через 10 суток после последней иммунизации отбирали 15 мл крови, центрифугировали (10 мин, 1200 g) и сыворотку использовали для выделения антител.

Иммуносорбент с “пришитой” биназой получали следующим образом: 150 мг CNBr-сефарозы 4B (“Sigma”) тщательно промывали на стеклянном фильтре сначала 0,1 М HCl, затем 0,1 М NaHCO₃ буфером, содержащим 0,5 М NaCl (pH 8,3). Очищенную сефарозу помещали в стаканчик и добавляли 12 мг биназы, растворённую в 6 мл буфера. Смесь оставляли на 2 часа при комнатной температуре при слабом перемешивании. Свободный фермент отмывали буфером, контролируя оптическую плотность при 280 нм.

Иммунную сыворотку кролика, содержащую антитела против биназы, в объёме 4 мл осветляли центрифугированием при 10000 g, затем добавляли 4 мл 0,2 М трис-HCl буфера pH 7,5, помещали в стаканчик с иммуносорбентом и оставляли на магнитной мешалке на 3 часа при комнатной температуре. Затем суспензию переносили в колонку, сыворотку отмывали 0,2 М раствором трис-HCl буфера с 0,5 М NaCl (pH 7,5) до нулевой оптической плотности при 280 нм. Для извлечения антител через отмытый иммуносорбент пропускали 3 мл 0,05 М глицин-HCl буфера pH 2,8. Элюцию повторяли несколько раз. Фракции, содержащие антитела, объединяли, быстро нейтрализовали раствором 0,1 М NaOH до pH 7,5 и концентрировали с помощью концентратора Microcon^R (“Millipore”, США). Очищенные антитела хранили при –20°C. Специфичность антител к РНКазе *B. intermedius* проверяли с помощью реакции преципитации.

Иммуноокрашивание проводили после трёхкратной отмывки (по 3 мин) клеток PBS, фиксации в течение 20 мин в 4% формальдегиде, пермеабиллизации клеток в течение 10 мин с помощью 0,2% Тритон X-100 и блокирования реакций при действии 1% бычьего сывороточного альбумина (15 мин). С первичными антителами к биназе (γ-a-binase, разведение 1:100), либо антителами к ламинину – гликопротеину внеклеточного матрикса (γ-a-LamB, разведение 1:200, “Santa Cruz Biotechnology”, США), как и с флуоресцентным красителем на ДНК DRAQ5[™] (“Biostatus Limited”) клетки выдерживали 1 ч при 37°C. После стандартной процедуры отмывки клетки обрабатывали 15 мин 1% альбумином и инкубировали 30 мин при 37°C. Конъюгированные с красителем ALEXA вторичные антитела (разведение 1:1000) (Donkey anti rabbit A1488 для первичных антител к биназе, дающие зелёную окраску, либо Donkey anti goat A1594 для антител к LamB1, дающие красную окраску (“Santa Cruz Biotechnology”)), инкубировали с клетками 30 мин при 37°C. Каждый этап завершали трехкратной отмывкой клеток в PBS. Слайды высушивали и хранили в темноте при температуре не выше 20°C. Визуализацию изображений осуществляли на флуоресцентном конфокальном микроскопе Zeiss LSM 710.

Статистическую обработку результатов, полученных из трёхкратных повторений каждого эксперимента, проводили стандартными методами в программе Microsoft Excel 2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Анализ цитотоксических свойств биназы показал, что фермент индуцирует гибель клеток опухолевой линии MLE-12 и совершенно не токсичен по отношению к нормальным клеткам альвеолярного эпителия лёгких АТII. Этот факт подтверждает ранее полученные нами данные о преимущественном поражении биназой клеток миелоидных предшественников крови FDC-P1, трансформированных онкогеном *kit*, по сравнению с нетрансформированными миелоидными предшественниками [15, 16], а также селективной гибели *ras*-трансформированных фибробластов по сравнению с нормальными [17]. Отметим, что чувствительность клеток MLE-12 к биназе довольно высока и проявляется в концентрации 1,2 мкг/мл (100 нмоль) спустя 48 ч культивирования с ферментом (рис. 1), что сопоставимо

ПРОНИКНОВЕНИЕ БИНАЗЫ В КЛЕТКИ АЛЬВЕОЛЯРНОГО ЭПИТЕЛИЯ

с чувствительностью эпителиальных клеток аденокарциномы лёгких человека A549 [18]. Поскольку клетки MLE-12 отличаются от АТII экспрессией на своей поверхности вирусного белка Tag, можно утверждать, что именно это свойство обуславливает чувствительность клеток к биназе. Т-антиген выполняет многочисленные функции, необходимые для репликации вирусной ДНК и вызывает онкогенную трансформацию клеток млекопитающих [11, 19-21]. Если предположить, что мишенью биназы является мРНК Tag, то фермент способен разрушить её только внутри клетки. Поэтому нами была исследована интернализация биназы в клетки MLE-12 и АТII.

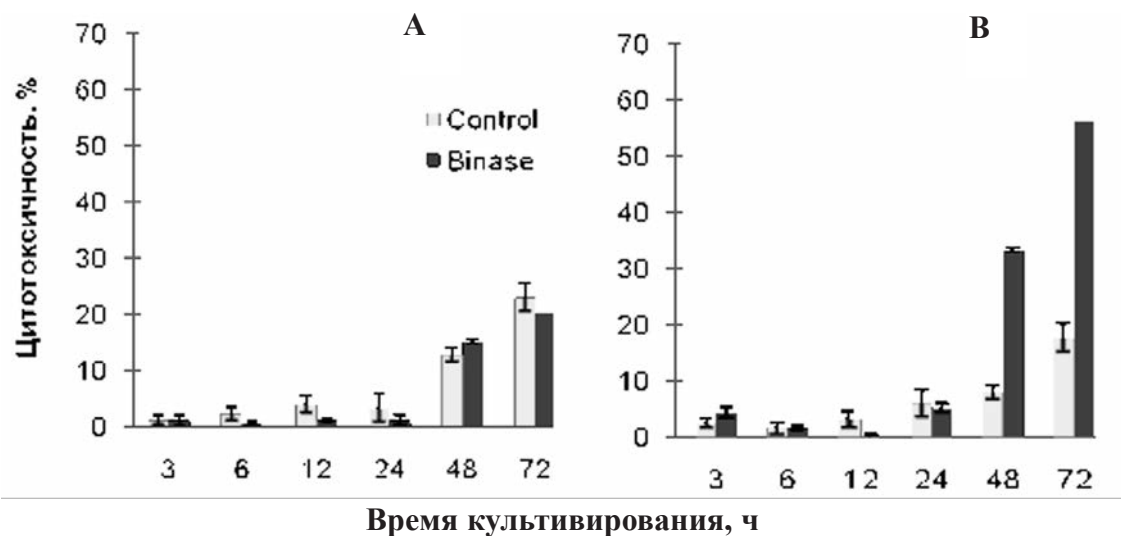


Рисунок 1.

Цитотоксичность биназы (100 нмоль) по отношению к линиям клеток АТII (А) и MLE-12 (В) в тесте по активации выхода лактатдегидрогеназы. За 100% цитотоксичности принят вариант, где выход лактатдегидрогеназы из клеток индуцирован Тритоном X-100.

Неожиданно оказалось, что биназа за 24 ч проникает в клетки АТII (рис. 2) и не обнаруживается в клетках MLE-12 (рис. 3), хотя именно последние погибают при обработке ферментом (рис. 1В). Из рисунка 2 видно, что ядра клеток MLE-12 окрашены голубым цветом (краситель на ДНК DRAQ5™), а примембранная область, содержащая ламинин, – красным (вторичные антитела, связанные с красителем A1594) в то время как антитела к биназе не связываются ни с какими клеточными компонентами, вследствие чего зелёная окраска, характерная для вторичных антител с A1488, отсутствует. Напротив, рисунок 3 чётко указывает на наличие биназы внутри клеток АТII. Поскольку в ядрах этих клеток также отмечены зоны, окрашенные зелёным при наложении изображений А, В и С, можно предполагать, что биназа проникает и в клеточное ядро (рис. 3D). Ранее было установлено, что активность внутриклеточных пуриин-специфичных РНКаз, не характерных для эукариотических клеток [22], возрастает при обработке клеток миелоидных предшественников крови FDC-P1 гуанил-специфичной биназой независимо от того, были ли эти клетки нормальными или трансформированными онкогеном *kit* [7]. Это косвенно свидетельствует о проникновении биназы в клетки FDC-P1. Поскольку возрастание активности пуриин-специфичных РНКаз спустя 24 ч культивирования клеток с биназой наблюдали и в цитозольной, и в ядерной фракциях клеток [7], можно считать, что в недифференцированные клетки биназа проникает вплоть до ядра.

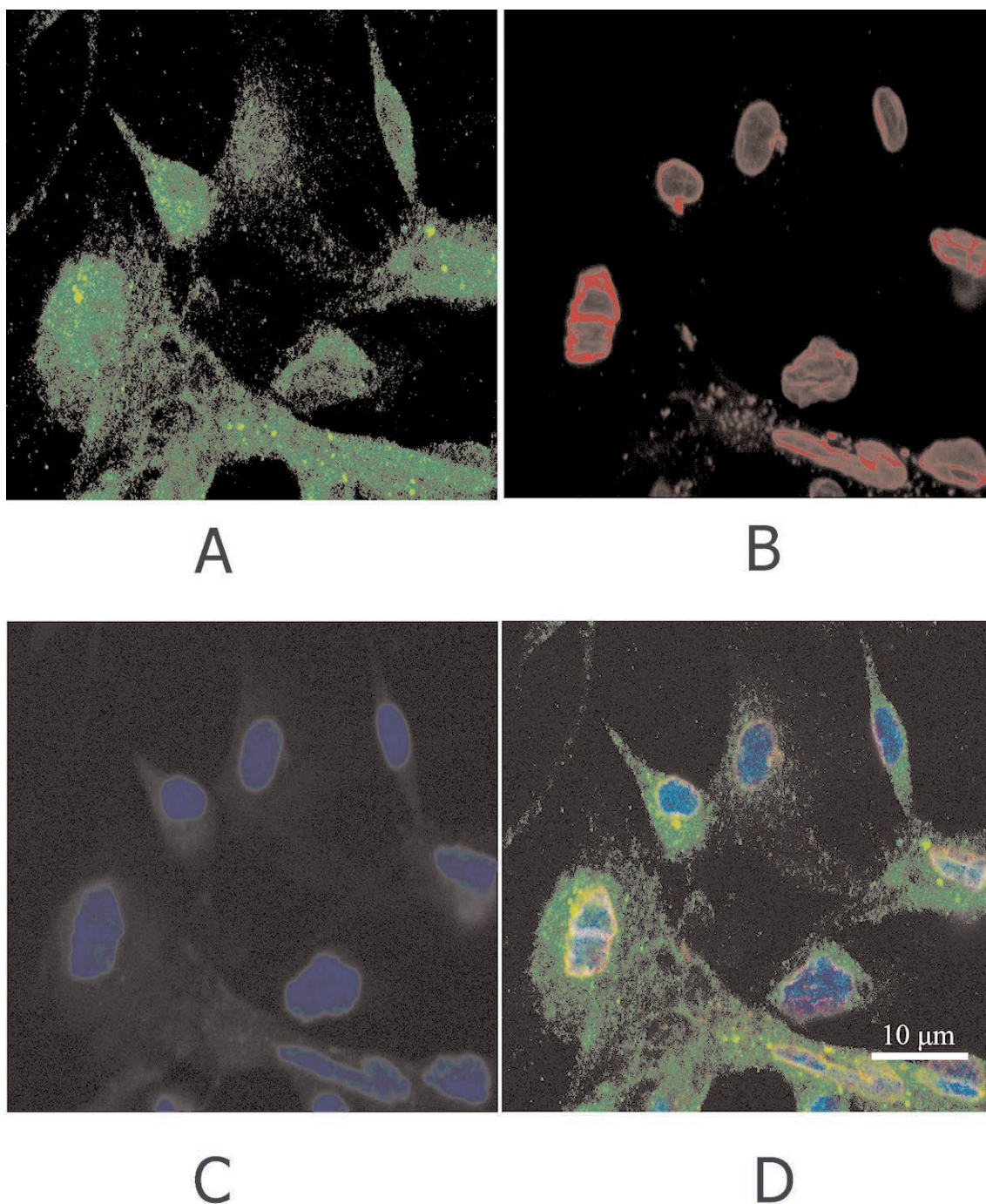


Рисунок 2.

Флуоресцентная идентификация биназы в клетках эпителия лёгких АТII
после 24 ч действия 100 нмоль биназы.

- А - Обработка первичными антителами к биназе и окраска вторичными антителами
Donkey anti-rabbit A1488;
В - обработка антителами к ламинину и окраска вторичными антителами Donkey anti-goat A1594;
С - окраска DRAQ5™;
D - наложение изображений А, В, С.

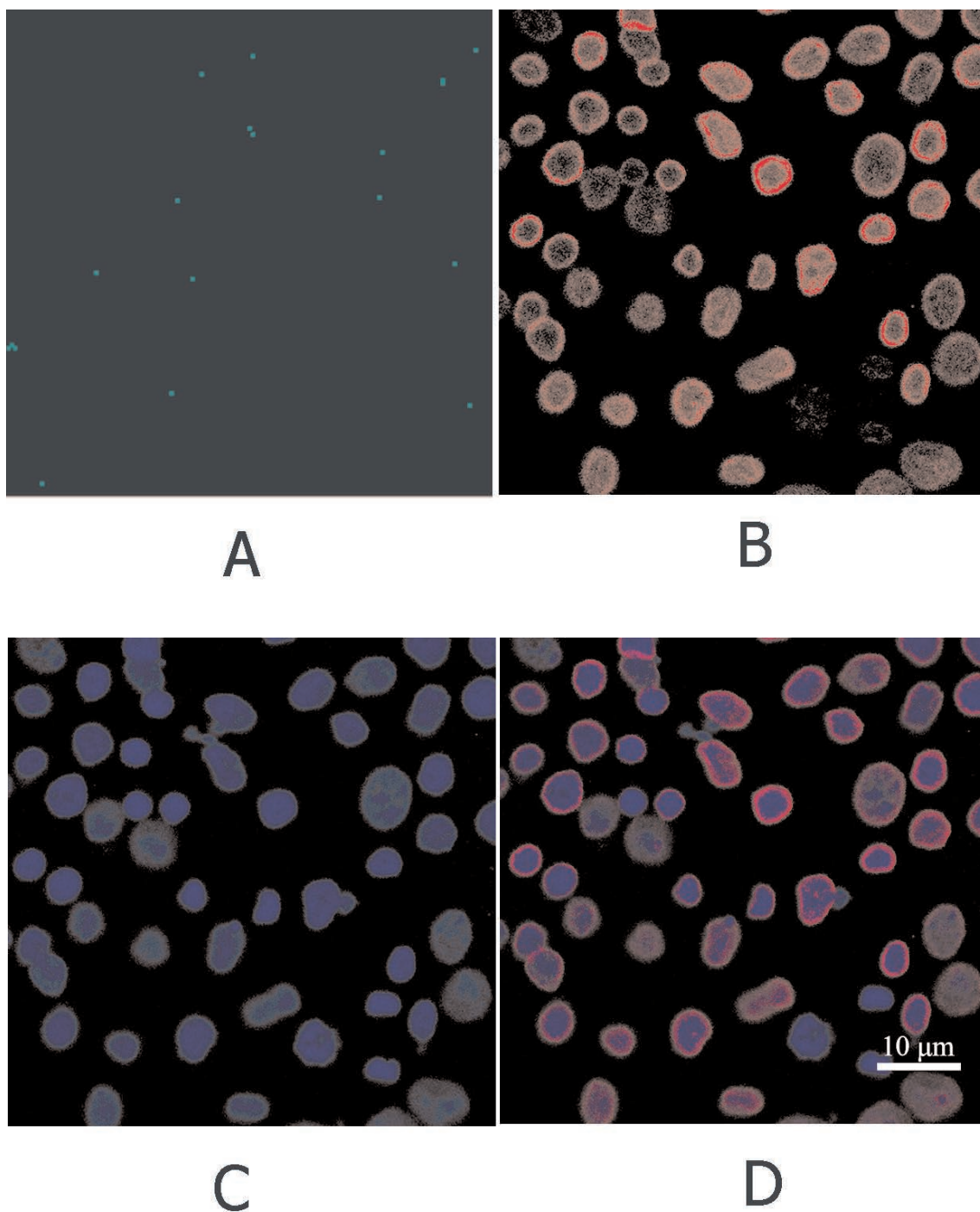


Рисунок 3.

Флуоресцентная идентификация биназы в клетках эпителия лёгких MLE12 после 24 ч действия 100 нмоль биназы.

А - Обработка первичными антителами к биназе и окраска вторичными антителами Donkey anti-rabbit A1488;

В - обработка антителами к ламинину и окраска вторичными антителами Donkey anti-goat A1594;

С - окраска DRAQ5™;

Д - наложение изображений А, В, С.

Таким образом, иммунофлуоресцентным методом мы подтвердили возможность интернализации биназы клетками эукариот. Однако, пневмоциты типа II проницаемы для биназы только в том случае, если они не подверглись онкогенной трансформации Tag. Факт, что поглощение биназы нетрансформированными клетками АТII не индуцирует их гибель, по всей видимости, не случаен, поскольку ранее мы показали, что снижение уровня внутриклеточной РНК при действии биназы не коррелирует с апоптотической гибелью клеток [7].

Каким же образом экспрессия вирусного TAg онкогена делает пневмоциты MLE-12 чувствительными к токсическому действию биназы даже без её интернализации? Показано, что белок TAg, изолированный из трансформированных клеток мыши в присутствии ингибитора РНКаз, является фосфопротеином, ковалентно связанным с РНК: его гидролиз РНКазой приводит к образованию стандартных рибонуклеотидфосфатов [23]. TAg протеин связан с РНК фосфодиэфирной связью между гидроксильной группой серина и 5'-фосфатом цитидинового остатка [23]. Вероятно, биназа способна гидролизовать РНК, относящуюся к Tag и образовывать из неё продукты, аналогичные малым интерферирующим РНК. Проникновение последних внутрь трансформированных клеток и вмешательство в процесс РНК-интерференции может индуцировать апоптоз клеток MLE-12. Возможно также, что расщепление РНК в составе TAg предотвращает возможность блокирования апоптоза TAg-экспрессирующих опухолевых клеток благодаря способности этого белка образовывать стабильные комплексы с проапоптотическим протеином p53 [21].

Известный химиотерапевтический агент блеомицин обладает РНКазной активностью [24] и вызывает гибель клеток альвеолярного лёгочного эпителия, подавляя экспрессию антиапоптотических генов семейства bcl-2 [25]. Аналогично и действие биназы снижает уровень экспрессии bcl-2, одновременно повышая экспрессию p53 [7]. Вызванное биназой изменение активности важнейших генов, регулирующих процесс апоптоза, индуцирует гибель альвеолярных клеток типа II независимо от накопления фермента внутри клеток, но, согласно полученным данным, только в том случае, если клетка подверглась онкогенной трансформации Tag SV40.

Работа выполнена при поддержке International Graduate School PROMISE (DFG), Conacyt Mexico (CVU260952), Российских федеральных программ (№ 2.1.1./920, № 02.740.11.0391).

ЛИТЕРАТУРА

1. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. (2008) *BioEssays*, **30**, 781-790.
2. Leland P., Raines R. (2001) *Chemistry Biology*, **8**, 405-413.
3. Spalletti-Cernia D., Sorrentino S., Di Gaetano S., Piccoli R., Santoro V., D'Alessio G., Laccetti P., Vacchio G. (2004) *Brit. J. Cancer. Res.*, **90**, 270-277.
4. Ильинская О.Н., Макаров А.А. (2005) *Молекулярная биология*, **39**(1), 1-11.
5. Ardelit W., Shogen K., Darzynkiewicz Z. (2008) *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **9**, 215-225.
6. Sevcik J., Urbanikova L., Leland P.A., Raines R.T. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 47325-47330.
7. Mitkevich V.A., Tchurikov N.A., Zelenikhin P.V., Petrushanko I.Yu., Makarov A.A., Ilinskaya O.N. (2010) *FEBS Journal*, **277**(1), 186-196.
8. Dobbs L.G., Gonzalez R., Matthey M.A., Carter E.P., Allen L., Verkman A.S. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2991-2996.
9. Chen J., Chen Z., Chintagari N.R., Bhaskaran M., Jin N., Narasaraju T., Liu L. (2006) *J. Physiol.*, **572**, 625-638.
10. Swain R.J., Kemp S.J., Goldstraw P., Tetley T.D., Stevens M.M. (2010) *Biophys. J.*, **98**, 1703-1711.

ПРОНИКНОВЕНИЕ БИНАЗЫ В КЛЕТКИ АЛЬВЕОЛЯРНОГО ЭПИТЕЛИЯ

11. *Wikenheiser K.A., Vorbroker D.K., Rice W.R., Clark J.C., Bachurski C.J., Oie H.K., Whitsett J.A.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11029-11033.
12. *Schulga A., Kurbanov F., Kirpichnikov M., Protasevich I., Lobachev V., Ranjbar B., Chekhov V., Polyakov K., Engelborghs Y., Makarov A.* (1998) *Protein Engineering*, **11**, 773-780.
13. *Yakovlev G.I., Moiseyev G.P., Struminskaya N.K., Borzykh O.A., Kipenskaya L.V., Znamenskaya L.V., Leschinskaya I.B.* (1994) *FEBS Lett.*, **354**, 305-306.
14. *Ilinskaya O.N., Ivanchenko O.B., Karamova N.S., Kipenskaya L.V.* (1996) *Mut. Res.*, **354**, 203-209.
15. *Ilinskaya O.N., Zelenikhin P.V., Petrushanko I.Yu., Mitkevich V.A., Prasolov V.S., Makarov A.A.* (2007) *BBRC*, **361**, 1000-1005.
16. *Mitkevich V.A., Petrushanko I.Yu., Kretova O.V., Spirin P.V., Zelenikhin P.V., Prassolov V.S., Tchurikov N.A., Ilinskaya O.N., Makarov A.A.* (2010) *Cell Cycle*, **9**, 2674-2678.
17. *Ilinskaya O.N., Decker K., Koschinski A., Dreyer F., Repp H.* (2001) *Toxicology*, **156**, 101-107.
18. *Кабрера Фуентес Э.А., Зеленихин П.В., Колпаков А.И., Прайсснер К.Т., Ильинская О.Н.* (2010) *Уч. зап. Казанского ун-та*, **152**, 143-148.
19. *Bocchetta M., Di Resta I., Powers A., Fresco R., Tosolini A., Testa J.R., Pass H.I., Rizzo P., Carbone M.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10214-10219.
20. *Bocchetta M., Elias S., De Marco M.A., Rudzinski J., Zhang L., Carbone M.* (2008) *Cancer Res.*, **68**, 1022-1029.
21. *Ali S.H., De Caprio J.A.* (2001) *Semin. Cancer Biol.*, **11**(1), 15-23.
22. *Cheniclet C., Bendayan M.* (1990) *J. Histochem. Cytochem.*, **38**, 551-562.
23. *Carroll R.B., Samad A., Mann A., Harper J., Anderson C.W.* (1988) *Oncogene.*, **2**, 437-444.
24. *Abraham A.T., Lin J., Newton D.L., Rybak S., Hecht S.* (2003) *Chem. Biol.*, **10**, 45-52.
25. *Lee V.Y., Schroedl C., Brunelle J.K., Buccellato L.J., Akinci O.I., Kaneto H., Snyder C., Eisenbart, J., Budinger S., Chandel N.S.* (2005) *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.*, **289**, 521-528.

Поступила: 26. 08. 2011.

**BINASE PENETRATION INTO ALVEOLAR EPITHELIAL CELLS
DOES NOT INDUCE CELL DEATH**

***H.A. Cabrera Fuentes^{1,2}, N.V. Kalacheva², R.T. Mukhametshina¹, P.V. Zelenikhin², A.I. Kolpakov²,
G. Barreto¹, K.T. Preissner³, O.N. Ilinskaya²***

¹Max-Planck-Institute for Heart and Lung Research, Bad Nauheim, Germany

²Kazan Federal University, Kremlyovskaya ul., 18, Kazan, Republic of Tatarstan, 420008 Russia;
tel.: (843) 233-78-84, e-mail: pasha_mic@mail.ru

³Department of Biochemistry, Medical School, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany

Microbial ribonucleases possess a broad spectra of biological activities, demonstrating stimulating properties at low concentrations and cytotoxicity and genotoxicity at high concentrations. The mechanisms of their penetration into the cells are not clear so far. This research is aimed to the study of *Bacillus intermedius* RNase (binase) penetration in alveolar lung epithelial cells - pneumocytes of type II. Using immunofluorescence we have shown for the first time have internalization of binase by primary non-differentiated pneumocytes ATII. The enzyme did not penetrate in pneumocytes MLE-12, which also derived from type II cells. However, binase was cytotoxic towards tumor MLE-12 cells, but not ATII cells. The obtained results testified the higher sensitivity of tumor cells towards binase compared with normal cells, and also showed that penetration of the enzyme into alveolar cells did not directly correlated with the cell death.

Key words: binase, cytotoxicity, internalization, immunofluorescence, alveolar epithelial cells type II, MLE-12, ATII.