

ОСОБЕННОСТИ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ И МИКРОБНОЙ РИБОНУКЛЕАЗ С МАКРОФАГАМИ IN VITRO

© Н. В. Калачева, А. В. Нарулина, Б. М. Куриненко

Лаборатория инженерной энзимологии Казанского государственного университета;
электронный адрес: Natalia.Kalacheva@ksu.ru

Изучено взаимодействие панкреатической РНКазы А и РНКазы *Bacillus intermedius* с перитонеальными макрофагами крысы in vitro. Для оценки эффективности этого взаимодействия измеряли спонтанную и индуцированную фагоцитозом бактерий хемилюминесценцию макрофагов. Показано, что в развитие хемилюминесцентного ответа макрофагов основной вклад вносит электростатическое взаимодействие РНКаз с отрицательно заряженной клеточной мембраной. При этом более основная по значению изоэлектрической точки РНКазы А менее эффективна в отношении макрофагов, чем микробный фермент. Расчет заряда и дипольного момента панкреатической и микробной РНКаз показал, что эффективность взаимодействия белкового поликатиона с клеткой не связана с изоэлектрической точкой, а зависит от суммарного заряда и его распределения на поверхности белковой молекулы при уровне рН, соответствующем условиям взаимодействия.

Ключевые слова: РНКазы А, РНКазы *Bacillus intermedius*, макрофаг, электростатическое взаимодействие, суммарный заряд, дипольный момент.

Принятые сокращения: ХЛ — хемилюминесценция, РНКазы Vi — РНКазы *Bacillus intermedius*.

В последнее время заметно возрос интерес к РНКазам в связи с предложенным механизмом их противоопухолевого действия. Согласно этому механизму, цитотоксические рибонуклеазы способны избирательно связываться с клетками некоторых опухолей и, проникая в них, разрушать внутриклеточную РНК (Libonati, 2004; Ильинская, Макаров, 2005). Однако известно, что некоторые биологические эффекты РНКаз не связаны с каталитической активностью. К таким эффектам относится иммуностимулирующее действие. Это действие РНКаз может быть обусловлено их катионными свойствами и способностью связываться с отрицательно заряженной мембраной иммунокомпетентных клеток (Куриненко, 1991), но экспериментально вклад электростатических сил во взаимодействие РНКаз с клеточной мембраной не показан.

Катионные свойства белка отражает его изоэлектрическая точка (pI). Следует ожидать, что белок с большим значением pI будет проявлять более высокие иммуностимулирующие свойства. Однако при сравнении биологической активности РНКазы А (pI 9.5) и РНКазы Vi (pI 8.5) оказалось, что более высоким иммуностимулирующим действием обладает РНКазы Vi (Куриненко, 1991). Мы объяснили этот факт различиями в поверхностной топографии ферментных белков, которая определяет суммарный заряд белка и его распределение на поверхности белковой глобулы при определенном значении рН. Измерение рН от изоэлектрической точки в сторону его физиологических значений может по-разному отразиться на значении суммарного заряда этих структурно различающихся белков. Вследствие этого можно ожидать,

что pI не всегда будет отражать степень катионизации РНКаз при физиологическом значении рН и их биологическая активность будет связана не со значением pI, а с величиной заряда и его распределением на поверхности молекулы в условиях ее взаимодействия с клеткой.

В связи с вышеизложенным целью настоящей работы заключалась в экспериментальном подтверждении влияния электростатических сил на стимуляцию активности макрофагов структурно различающимися РНКазами и в установлении связи между стимулирующим действием РНКаз и такими интегральными показателями электростатических свойств белковой молекулы, как суммарный заряд и дипольный момент.

Материал и методика

В работе использовали следующие ферменты: кристаллический препарат панкреатической РНКазы А (КФ 3.1.27.5) фирмы Serva (Германия), pI 9.5, мол. масса 12 600 Да; электрофоретически гомогенный препарат РНКазы Vi (КФ 3.1.4.23), полученный по методу, описанному в работе Голубенко и соавторов (1979), pI 8.5, мол. масса 12 300 Да.

Инактивированный структурный аналог РНКазы Vi получали посредством фотоокисления остатка гистидина активного центра (Куриненко и др., 1986). 200 мг РНКазы в 20 мл 0.1 М Трис-ацетатного буфера, рН 7.5, содержащего 0.005 % метиленового синего, облучали в течение 20—22 мин лампой мощностью 200 Вт на расстоянии 22 см при 20 °С в стакане диаметром 4.6 см при

перемешивании со скоростью 300—400 об/мин. Реакционную смесь, сохранившую 50 % остаточной активности, наносили на колонку (1.9 × 26.0 см) с фосфоцеллюлозой Р-II (Whatman, Англия), уравновешенной 0.1 М натрий-ацетатным буфером, рН 6.0, элюировали линейным градиентом концентрации NaCl (0—0.4 М; 1300 мл) в том же буфере. Скорость элюции 100 мл/ч, объем фракции 10 мл. Фракции, соответствующие пику фотоокисленной РНКазы, объединяли, разбавляли в 2 раза водой, подкисляли до рН 5.5 уксусной кислотой и наносили на колонку (0.9 × 5.0 см) с фосфоцеллюлозой, уравновешенной 0.1 М натрий-ацетатным буфером, рН 5.5. Колонку промывали 40—50 мл 0.02 М натрий-фосфатного буфера, рН 7.0, затем элюировали фермент 0.2 М натрий-фосфатным буфером, рН 7.0, концентрировали и хроматографировали на колонке (3.5 × 76.0 см) с сефадексом G-25 (тонким), уравновешенным 0.01 М ацетатно-аммонийным буфером, рН 5.5. Полученный раствор фермента лиофильно высушивали. Выход препарата фотоинактивированной РНКазы составлял 40 %.

РНКазную активность определяли по количеству кислоторастворимых продуктов, образующихся при ферментативном гидролизе дрожжевой суммарной РНК (Лещинская и др., 1980).

Для перевода ферментного белка в анионную форму РНКазу Vi сукцинизировали. Сукцинирование РНКазы Vi проводили так, как описано в работе Торчилина с соавторами (Torchilin et al., 1978). При сукцинировании белка происходит превращение положительно заряженных остатков лизина в отрицательно заряженные карбоксильные группы:



200 мг РНКазы растворяли в 20 мл 0.2 М натрий-фосфатного буфера, рН 7.7. Затем в течение 60 мин в охлажденный (4 °С) раствор фермента вносили небольшими порциями (по 5—15 мг) 200 мг янтарного ангидрида. В течение реакции уровень рН поддерживали постоянным добавлением 0.1 М NaOH и контролировали его в течение 30 мин после добавления янтарного ангидрида. Раствор модифицированной РНКазы обессоливали на сефадексе G-25 (колонка 2.2 × 60.0 см) и лиофильно высушивали.

Определение числа связей фермент—модификатор производили по разности в числе аминокрупп, способных взаимодействовать с тринитробензолсульфокислотой (TNBS), у нативного и модифицированного ферментов (Fields, 1971). Образец фермента, содержащего аминокруппы, смешивали с 0.5 мл 0.1 М боратного буфера, рН 10.1, объем доводили до 1 мл, затем добавляли 20 мкл 1.8 М раствора TNBS и раствор быстро перемешивали. После 5-минутной инкубации реакцию останавливали добавлением 2.0 мл 0.1 М раствора однозамещенного фосфата Na, содержащего 1.5 мМ сульфата Na, и измеряли поглощение при 420 нм. Степень дезаминирования сукцинированного препарата составляла в среднем 80 %.

Суммарный заряд ферментных белков в единицах электрона (e) и дипольный момент белков в дебаях (Д) при рН 7.2 рассчитывали с использованием программ MacroDox. MacroDox представляет собой набор программ на языке Fortran 77, которые среди прочих функций позволяют вычислять частичный и общие заряды и

дипольные моменты протеинов с известной структурой и при заданном значении рН.

Работу с крысами проводили с соблюдением принципов Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным. Белых беспородных крыс забивали декапитацией под эфирным наркозом. Перитонеальные макрофаги выделяли, промывая брюшную полость крысы охлажденным физиологическим раствором. Клетки промывали средой Хенкса, затем суспендировали в среде 199, хранили при 4 °С и использовали для работы в течение 4—5 ч. Жизнеспособность макрофагов в суспензии определяли, используя трипановый синий. Образование фагоцитами активных форм кислорода оценивали по интенсивности люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ). Измерение проводили на люцинометре БХЛ-06М (Нижегород, Россия) при 37 °С и непрерывном перемешивании. В ходе работы измеряли интенсивность спонтанной и индуцированной фагоцитозом бактерий ХЛ макрофагов. Объектом фагоцитоза служила убитая нагреванием культура бактерий *Serratia marcescens*. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева. При измерении спонтанной ХЛ к суспензии макрофагов, содержащей 5 × 10⁶ клеток в 1 мл бесцветного раствора Хенкса и 0.7 М люминола, добавляли препараты ферментов в концентрации 25 мкг/мл. Контролем служили интактные макрофаги. Время измерения спонтанной ХЛ составляло 600 с. При измерении ХЛ, индуцированной фагоцитозом бактерий, макрофаги предобработывали РНКазой в течение 600 с, затем добавляли к ним 5 · 10⁷ убитых бактерий и измеряли ХЛ-ответ клеток в течение 1800 с. Уровень рН поддерживали, добавляя в среду измерения 0.01 М раствор НЕPES-буфера (рН 7.54, 20 °С). Контролем являлся ХЛ-ответ макрофагов на добавление бактерий в отсутствие фермента. Показателем степени активации фагоцитов служила сумма сигналов за определенный промежуток времени (S, мВ/с), которую выражали в отн. ед. по сравнению с контролем.

Влияние ионной силы на спонтанную ХД перитонеальных макрофагов изучали на средах, которые для этих целей использовали Коркина и соавторы (1987). Солевая среда для измерения содержала (в мМ): NaCl — 110.0, глюкоза — 8.0, люминол — 0.7, Трис-НСl-буфер — 4.0 (рН 7.2). Бессолевая среда содержала те же компоненты, за исключением NaCl, который заменяли на сахарозу (220 мМ).

Каждый эксперимент проводили не менее 6 раз. Достоверность различий определяли с помощью критерия Стьюдента.

В работе использовали следующие химические агенты: люминол и TNBS (Sigma, США); 4-(2-оксизтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES; Serva, Германия); остальные реактивы отечественного производства марки х. ч.

Результаты и обсуждение

Макрофаги являются удобной моделью для изучения различных свойств и характеристик клеточных мембран, в том числе и электростатического взаимодействия лигандов с клеткой (Коркина и др., 1987). Для оценки этого взаимодействия мы измеряли спонтанную и индуцированную фагоцитозом ХЛ макрофагов, отражающую состояние окислительного метаболизма клеток и их способность к фагоцитозу соответственно. Оба эффекта свя-

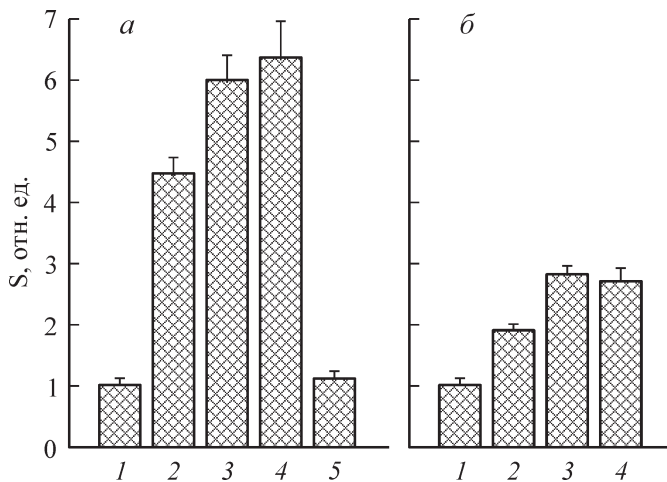


Рис. 1. Влияние рибонуклеаз на спонтанную (а) и индуцированную фагоцитозом бактерий (б) хемилюминесценцию (S) перитонеальных макрофагов крысы.

1 — контроль (а — интактные макрофаги, б — макрофаги с добавлением бактерий), 2 — РНКазы А, 3 — РНКазы В₁, 4 — инактивированная РНКазы В₁, 5 — сукцинированная РНКазы В₁. Концентрация препарата 25 мкг/мл. Активность РНКазы В₁ $1.5 \cdot 10^6$ усл. ед./мг, инактивированной РНКазы В₁ — 730 усл. ед./мг.

заны с функционированием клеточной мембраны (Маянский, Маянский, 1983; Коркина и др., 1987). В предварительных экспериментах было установлено, что экзогенные РНКазы стимулировали люминолзависимую ХЛ макрофагов при концентрации фермента от 5 до 100 мкг/мл. Поэтому во всех экспериментах мы ограничились концентрацией препарата 25 мкг/мл. На рис. 1 представлены данные о влиянии РНКаз на спонтанную (а) и индуцированную фагоцитозом (б) ХЛ макрофагов. Как видно на рис. 1, обе РНКазы стимулируют оба процесса. При этом в обоих случаях стимулирующий эффект микробной РНКазы (РНКазы В₁) выражен больше, чем эффект панкреатической. Наряду с каталитически активной РНКазой В₁ была изучена ее фотоинактивированная форма, остаточная активность которой составляла около 0.1 % от исходной. На рис. 1 приведены данные о влиянии фотоинактивированного препарата микробной рибонуклеазы на спонтанную и индуцированную ХЛ макрофагов. Отсутствие зависимости доза—эффект (остаточная каталитическая активность—эффект) свидетельствует о том, что каталитическая активность рибонуклеазы не влияет на оба эффекта.

Электростатическое взаимодействие лигандов с противоположно заряженными мишенями подавляется одновалентными катионами. В связи с этим мы сравнили ХЛ-ответ макрофагов при действии на них РНКаз в солевой и бессолевой изотонических средах. Сравнительное изучение активации макрофагов РНКазами в средах с различной ионной силой показало, что в бессолевой среде ХЛ-ответ клеток по сумме светосигнала в 1.76—2.30 раза выше, чем в солевой (рис. 2). При этом ответ клеток сильнее выражен при действии на них микробной РНКазы по сравнению с панкреатической. Уменьшение экранирования отрицательного заряда мембраны при замене солевой среды на сахарозу усиливает взаимодействие между отрицательно заряженной клеточной мембраной и исследуемым белком, находящимся в условиях эксперимента в катионной форме, и приводит к увеличению

ХЛ-ответа. Об электростатическом характере взаимодействия РНКаз с мембраной свидетельствует и снижение активирующего действия сукцинированного производного РНКазы В₁ до уровня контроля. Как известно, в процессе сукцинирования белка происходит превращение положительно заряженных остатков лизина в отрицательно заряженные карбоксильные группы, что сопровождается уменьшением положительного заряда модифицированного белка (рис. 1, а).

В настоящее время нет данных о наличии у животных клеток рецепторов для экзогенных РНКаз, вследствие чего они могут взаимодействовать с клеткой не рецепторно-зависимым эндоцитозом, а, вероятнее всего, адсорбционным способом (Ильинская, Макаров, 2005). Важную роль при этом играет основность (катионизация) фермента. В основе взаимодействия положительно заряженных полиэлектролитов, в том числе некоторых основных белков, лежит способность поликатионов образовывать «сшивки» электроотрицательных областей клеточных мембран, что приводит к деструктурированию липидного бислоя и может отразиться на функционировании мембраны. Воздействие поликатионов на клетки, в общем, однотипно, однако количественно эффекты разных препаратов могут различаться. Наибольшее значение имеют плотность заряда и молекулярная масса (Платэ, Васильев, 1986). На первый взгляд электростатические силы лишены специфичности. Вместе с тем разная активность одинаково заряженных веществ показывает, что кроме заряда мембранные структуры клеток способны дифференцировать электростатический профиль полиэлектролитов по типу специфической рецепции.

Основываясь на этих представлениях и принимая во внимание электростатический характер взаимодействия РНКаз с мембраной макрофагов, мы рассчитали суммарный заряд и дипольный момент ферментных белков при рН 7.2. Суммарный заряд РНКазы А оказался равным +3, а РНКазы В₁ — +5, дипольный момент — соответственно 544.5 и 224.8 Д. Таким образом, заряд РНКазы В₁ выше, а дипольный момент значительно ниже, чем соответствующие величины для РНКазы А. Последнее свидетельствует об относительно локальном расположении

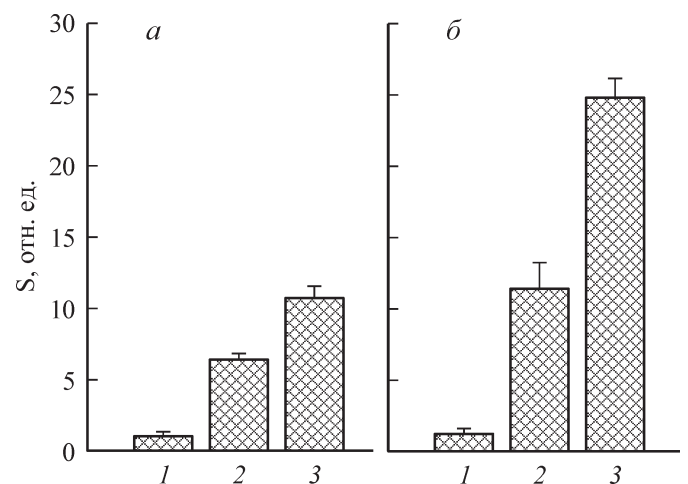


Рис. 2. Изменение хемилюминесценции макрофагов в солевой (а) и бессолевой (б) средах в ответ на введение РНКазы.

1 — контроль (интактные клетки), 2 — РНКазы А, 3 — РНКазы В₁. Концентрация препарата 25 мкг/мл.

зарядов в молекуле панкреатической РНКазы и более равномерном распределении зарядов на поверхности белковой глобулы РНКазы Vi. Большой положительный заряд РНКазы Vi обеспечивает более сильное взаимодействие фермента с отрицательно заряженной мембраной макрофага, а равномерное расположение зарядов приводит к большей площади поверхности взаимодействия. Это в конечном счете способствует увеличению эффективности действия микробной РНКазы на мембрану макрофагов по сравнению с действием панкреатического фермента.

Анализ полученных в работе данных позволяет сделать следующее заключение. Белковые поликатионы, в частности РНКазы, как и описанные в литературе синтетические соединения катионной природы (Коркина и др., 1985, 1987), связываются с мембраной макрофагов за счет неспецифических электростатических сил. Исследованные РНКазы почти не отличаются друг от друга по молекулярной массе, но имеют различные изоэлектрические точки. При этом более основная по значению изоэлектрической точки РНКазы А менее эффективна в отношении макрофагов, чем микробный фермент. Таким образом, основность как характеристика не определяет эффективность действия препарата на клеточную мембрану. Как следует из результатов настоящих исследований, эффективность взаимодействия белкового поликатиона с клеткой зависит от суммарного заряда и его распределения на поверхности белковой молекулы при уровне рН, соответствующем условиям взаимодействия.

Неспецифические силы электростатического взаимодействия имеют значение не только для проявления или усиления различного рода эффектов, реализуемых через клеточную мембрану. Они могут обеспечить предпочтительность связывания биологически активного лиганда с клетками (группами клеток). Выбор предпочтительного лиганда в случае катионных белков может быть достигнут как скринингом препаратов, выделенных из различных источников, так и целенаправленным изменением структуры белка путем химической модификации и сайт-специфического мутагенеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Госконтрактов № 02.434.11.3020 и 02.451.11.709, программы

«Развитие потенциала высшей школы» РНП.2.1.1.1005 и Фонда АН Республики Татарстан (НИОКР АН РТ 03-3.10-230/2005).

Список литературы

- Голубенко И. А., Балабан Н. П., Лецинская И. Б., Волкова Т. И., Клейнер Г. И., Чепурнова Н. К., Афанасенко Г. А., Дудкин С. М. 1979. Рибонуклеаза *Bacillus intermedius* 7P. Очистка хроматографией на фосфоцеллюлозе и некоторые характеристики гомогенного фермента. Биохимия. 44 (4) : 640—648.
- Ильинская О. Н., Макаров А. А. 2005. Почему рибонуклеазы вызывают гибель раковых клеток. Молекуляр. биол. 39 (1) : 3—13.
- Коркина Л. Г., Сулова Т. Б., Гуляева Ж. Г., Зезин А. Б., Величковский Б. Т., Владимиров Ю. А., Кабанов В. А. 1987. Мембранный механизм активации клеток. Биол. мембраны. 4 (10) : 1093—1101.
- Коркина Л. Г., Сулова Т. Б., Гуляева Ж. Г., Зезин А. Б., Величковский Б. Т., Кабанов В. А. 1985. Хемилюминесценция перитонеальных макрофагов, активированная не природными полиэлектролитами. ДАН СССР. 282 (1) : 206—209.
- Куриненко Б. М. 1991. Механизмы биологического действия нуклеаз. В кн.: Нуклеазы бактерий. Казань: Изд-во КГУ. 153—230.
- Куриненко Б. М., Голубенко И. А., Булгакова Р. Ш., Давыдов Р. Э., Нехорошкова З. М., Валиуллина С. Ф., Шляпников С. В. 1986. Фотоокисление рибонуклеазы *Bacillus intermedius* и получение фотоинактивированного фермента. Биоорганич. химия. 12 (5) : 457—468.
- Лецинская И. Б., Балабан Н. П., Капранова М. Н., Голубенко И. А. 1980. Методы определения нуклеаз и родственных ферментов. В кн.: Современные методы изучения нуклеиновых кислот и нуклеаз микроорганизмов. Казань: Изд-во КГУ. 53—60.
- Маянский А. Н., Маянский Д. Н. 1983. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск: Наука. 275 с.
- Платэ Н. Ф., Васильев А. Е. 1986. Физиологически активные полимеры. М.: Химия. 382 с.
- Fields R. 1971. The measurement of amino group in protein and peptides. Biochem. J. 124 : 581—590.
- Libonati M. 2004. Biological actions of the oligomers of ribonuclease A CMLS. Cell. Mol. Life Sci. 61 : 2431—2436.
- Torchilin V. P., Maksimenko A. V., Smirnov V. N., Berezin I. V. 1978. The principles of enzyme stabilization. III. Effect of the length of intra-molecular cross-linkages on thermostability of enzyme. Biochim. biophys. acta. 522 : 187—194.

Поступила 21 III 2006

THE PECULIARITIES OF ELECTROSTATIC INTERACTION OF PANCREATIC AND MICROBIAL RIBONUCLEASES WITH MACROPHAGES *IN VITRO*

N. V. Kalacheva, A. V. Narulina, B. M. Kurinenko

Department of Microbiology, Laboratory of Engineering Enzymology, Kazan State University;
e-mail: Natalia.Kalacheva@ksu.ru

The interaction of RNase A and RNase *Bacillus intermedius* with peritoneal macrophage of rats has been studied. To estimate the efficiency of this interaction the spontaneous chemiluminescence and induced by phagocytosis chemiluminescence of macrophages were investigated. It has been shown that electrostatic interaction of enzyme proteins with negatively charged cell membrane makes substantial contribution to the development of chemiluminescence reply of macrophages. The RNase A, which is more basical than the other (i. e. it has larger value of pI) is less effective with respect to macrophages. The calculation of total charge and dipole moment of pancreatic and microbial RNases showed that the efficiency of interaction between protein polycation and a cell was not connected with pI and depended on the charge and its distribution on the surface of protein molecule at the given pH value.

Key words: RNase A, RNase *Bacillus intermedius*, macrophage, electrostatic interaction, total charge and dipole moment.