

УДК 577.21+577.151.6:57.085.23

ИЗМЕНЕНИЯ РЕДОКС-СТАТУСА И ГЛУТАТИОНИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ БИНАЗЫ НА ВПЧ-16-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ КЛЕТКИ КАРЦИНОМЫ SiHa

© 2024 г. А. И. Надырова^{а, *}, И. Ю. Петрушанко^б, В. А. Митькевич^б, О. Н. Ильинская^а

^аИнститут фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет,
Казань, 420008 Россия

^бИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: alsu.nadyrova@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.04.2024 г.

После доработки 11.04.2024 г.

Принята к публикации 19.04.2024 г.

Вирус папилломы человека 16 типа (ВПЧ-16) относится к группе вирусов высокого риска и характеризуется гиперэкспрессией онкобелков E6 и E7, определяющих онкогенные свойства вируса: иммортализацию и злокачественную трансформацию пролиферирующих эпителиальных клеток. Биогенез редоксчувствительных белков E6 и E7 на ранних этапах вирусной инфекции приводит к блокированию антиоксидантных систем клетки и убиквитинзависимой деградации опухолевых супрессоров p53 и Rb. Поддержание высоких темпов пролиферации опухолевых клеток способствует повышению уровня продукции активных форм кислорода (АФК) и смещению окислительно-восстановительного баланса в сторону окислительных процессов. Восстановленный глутатион (GSH) через S-глутатионилирование тиоловых групп редоксчувствительных белков обеспечивает антиоксидантную защиту опухолевых клеток, что приводит к появлению лекарственно устойчивых злокачественных новообразований. В связи с этим особое значение приобретают лекарственные препараты, действие которых направлено на восстановление редокс-баланса в раковых клетках и тем самым на повышение их чувствительности к химиотерапии. Нами установлено, что в ВПЧ-16-положительной линии клеток SiHa плоскоклеточной карциномы шейки матки РНКазы *Bacillus pumilus* (биназа) модулирует редоксзависимые регуляторные механизмы, обеспечивающие нечувствительность этих клеток к апоптозу. Действие биназы в нетоксичных концентрациях (0.8 мкМ) инициирует ряд начальных апоптогенных изменений, а именно: снижает уровень АФК и GSH, ингибирует экспрессию онкобелка E6, активирует экспрессию супрессора опухоли p53, снижает уровень глутатионилирования p53 и повышает глутатионилирование Na,K-АТФазы. Индуцированное биназой нарушение целостности мембран митохондрий является сигналом к активации митохондриального пути апоптоза.

Ключевые слова: биназа, редокс-статус, злокачественные клетки, глутатионилирование, p53, Na/K-АТФаза

DOI: 10.31857/S0026898424050109, **EDN:** HUFEUW

ВВЕДЕНИЕ

Восстановленный глутатион (GSH) – трипептид, состоящий из трех аминокислотных остатков: L-глутамата, L-цистеина и глицина. GSH синтезируется в цитозоле, где его концентрация составляет 5–10 мМ; из цитозоля GSH транспортируется в митохондрии, эндоплазматический ретикулум, пероксисомы и ядро [1]. Ключевые функции GSH – вывод ксенобиотиков из клетки, антиоксидантная защита и редоксзависимая модификация тиоловых групп белков, в результате которой происходит

образование дисульфидного мостика между белком и глутатионом (S-глутатионилирование) [2].

В норме на долю GSH приходится около 99% от его общего внутриклеточного содержания [1, 3]. Окислительно-восстановительный потенциал пары GSH/GSSG часто используют для определения редокс-статуса клетки [3, 4]. Нарушение внутриклеточного баланса GSH/GSSG наблюдается при ряде патологий, включая нейродегенеративные заболевания, муковисцидоз, ВИЧ и злокачественные но-

вообразования [2, 5]. Редокс-статус опухолевых клеток кардинально отличается от здоровых вследствие повышенного содержания активных форм кислорода (АФК), вызванного гиперэкспрессией онкогенов *MYC* и *KRAS*, мутации в которых обнаруживают в 20–30% всех опухолей [6, 7]. Помимо антиоксидантной активности, GSH действует как детоксикант, образуя конъюгаты с химиотерапевтиками, которые затем выводятся из клетки эффлюкс-системой [8]. В связи с этим глутатион считают важным звеном разработок стратегии противоопухолевой терапии.

Сдвиг внутриклеточного редокс-статуса в более окисленную область, характерный для злокачественных клеток, индуцирует S-глутатионирование редоксчувствительных белков (киназ, факторов транскрипции, ионных транспортеров). Это защищает тиоловые группы от необратимого окисления либо приводит к изменению функциональной активности белков [9, 10]. Так, вирус папилломы человека (ВПЧ) ингибирует антиоксидантные системы клетки для активации редоксчувствительных онкобелков E6 и E7, подавляющих активность опухолевых супрессоров p53 и Rb. Злокачественная трансформация клеток SiHa поддерживается за счет экспрессии белков E6 и E7, кодируемых ВПЧ типа 16 (ВПЧ-16), относящегося к вирусам высокого канцерогенного риска [11].

Терапевтическая эффективность препаратов, направленных на восстановление редокс-статуса клетки, уже доказана при лечении некоторых онкологических заболеваний, включая промиелоцитарный лейкоз, рак пищевода, толстой кишки, молочной железы и немелкоклеточный рак легкого [12, 13]. Установлено, что РНКазы также обладают антиоксидантными свойствами. Так, РНКазы *Bacillus pumilus* (биназа) снижает уровень АФК в клетках Kasu-mi-1, меланомы В16 и Jurkat [14–16]. Таким образом, восстановление редокс-статуса опухолевых клеток РНКазами до уровня, характерного для нормы, препятствует их неконтролируемой пролиферации и приводит к повышению чувствительности клеток к апоптозу.

Здесь проанализированы опосредованные модуляцией редокс-статуса клеток и глутатионирования белков механизмы цитотоксического действия биназы на ВПЧ-16-положительные клетки SiHa плоскоклеточной карциномы шейки матки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток. Линию клеток SiHa – ВПЧ-16-позитивной плоскоклеточной карциномы шейки матки человека (АТСС, США) – культивировали на питательной сре-

де RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS; “ПанЭко”, Россия), 2 мМ глутамина (“ПанЭко”), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (“ПанЭко”), при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Клетки засеивали в 12-луночные плоскодонные планшеты (“Nest”, Китай) и растили до образования 50%-ного монослоя.

Ферментативная обработка клеток. В работе использовали биназу – РНКазу *B. pumilus* дикого типа (ЕС 3.1.27.3, 109 а.о., M_r 12.3 кДа, рI 9.5), полученную как описано ранее [17]. Учитывая данные V. Mitkevich и др. [18] по коэффициенту цитотоксичности биназы (CC₅₀ – 50% cytotoxicity concentration) для клеток SiHa, который составляет 1.2 ± 0.2 мкМ за 72 ч инкубации, мы использовали фермент в концентрации 0.8 мкМ. Клетки инкубировали с биназой в течение 24, 48 и 72 ч.

Цитофлуориметрический анализ. Внутриклеточные параметры оценивали с помощью проточного цитофлуориметра BD LSRFortessa™ (“Becton Dickinson”, США).

Процент клеток с поврежденной мембраной в популяции определяли с помощью йодида пропидия (PI; “Sigma-Aldrich”, США). Краситель в конечной концентрации 10 мкг/мл вносили в суспензию клеток за 1 мин до проведения измерений. Окрашенные PI (PI⁺) клетки определяли как мертвые (некротические) и исключали из рассмотрения при оценке уровня АФК, глутатиона и митохондриального потенциала.

Для определения уровня АФК клетки обрабатывали дигидрородамином 123 (DHR123; “Invitrogen”, США) в концентрации 10 мкМ.

Содержание восстановленного глутатиона, GSH, в клетках определяли с использованием красителя ThiolTracker™ Violet (“Invitrogen”), конечная концентрация которого составляла 7.5 мкМ.

Величину митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$) в клетках с неповрежденной мембраной оценивали с использованием красителя MitoProbe™ DiIC₁(5) (“Invitrogen”) в конечной концентрации 0.5 мкМ.

Обработанные красителями клетки инкубировали при 37°C в темноте в течение 30 мин. В клетках с неповрежденной мембраной содержание АФК и GSH оценивали по интенсивности флуоресценции зеленого цвета для соответствующих красителей, а изменение митохондриального потенциала – по изменению интенсивности флуоресценции красного цвета для красителя DiIC₁(5).

Иммуноблоттинг. Осадок клеток ресуспендировали в 200 мкл лизирующего буфера RIPA (25 mM Трис-НСl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.1% SDS, 1% дезоксихолата натрия). Суспензию инкубировали при 4°C в течение 1 ч при перемешивании, после чего центрифугировали (10 000 g, при 4°C) и собирали супернатант. Концентрацию белка в клеточных лизатах определяли методом Лоури. Электрофоретическое разделение белков проводили в денатурирующем 10%-ном ПААГ. После разделения белки переносили на PVDF-мембрану с использованием системы Trans-Blot Turbo ("Bio-Rad", США). По окончании процесса мембраны инкубировали сначала в течение 30 мин в блокирующем буфере, содержащем 5% обезжиренного молока в PBST (50 mM Трис-НСl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20), а затем при 4°C в течение ночи с мышиными моноклональными антителами против следующих белков: p53 ("Santa Cruz Biotechnology", США; в разведении 1 : 1 000), E6, Na,K-АТФазы- $\alpha 1$ ("Sigma-Aldrich"; 1 : 10 000), β -актина ("Invitrogen"; 1 : 10 000), глутатиона ("Sigma-Aldrich"; 1 : 1 000) – или с кроличьими антителами против p53, глутатионированного по Cys141 ("Sigma-Aldrich"; 1 : 1 000). После тщательной промывки в PBST мембраны инкубировали с мечеными пероксидазой хрена козыми антителами против IgG соответственно мыши или кролика. Для визуализации результатов использовали набор SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate ("Thermo Fisher Scientific", США) на геле-документаторе ChemiDoc MP ("Bio-Rad"). Денситометрический анализ содержания белков проводили с использованием программного пакета Image Lab ("Bio-Rad").

Статистическая обработка результатов. Все эксперименты проведены в трех биологических повторах. Для статистической обработки данных

использовали *t*-тест Стьюдента. Значение $p \leq 0.05$ отражало статистически значимые различия. Для статистического анализа использовали программные пакеты STATISTICA 10.0 и MS Excel 2020 ($p \leq 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние биназы на редокс-статус клеток линии SiHa

Повышенный уровень продукции АФК – следствие высоких темпов пролиферации опухолевых клеток. Адаптация клеток к избыточному уровню АФК посредством глутатионирования редоксчувствительных белков способствует увеличению их выживаемости и появлению агрессивных опухолей, обладающих лекарственной устойчивостью [19]. Влияние биназы на редокс-статус клеток SiHa оценивали по изменению уровня АФК и восстановленного глутатиона. Инкубация клеток с биназой в течение 24 ч приводила к снижению уровня АФК в клетках SiHa на 25%; при увеличении времени инкубации до 48 и 72 ч антиоксидантный эффект биназы сохранялся (рис. 1а). Уровень восстановленного глутатиона достоверно снижался только через 72 ч инкубации с биназой (рис. 1б).

Проапоптотический эффект биназы

Снижение митохондриального потенциала – один из ярких маркеров внутреннего (митохондриального) пути апоптоза. Изменения митохондриального потенциала в клетках после обработки биназой в концентрации ниже CC_{50} (0.8 vs 1.2 мкМ) оценивали с помощью флуоресцентного трекера DiIC₁(5), накапливающегося в митохондриях. Анализ изменения доли живых клеток со сниженным митохондриальным потенциалом в течение 72 ч инкубации с биназой

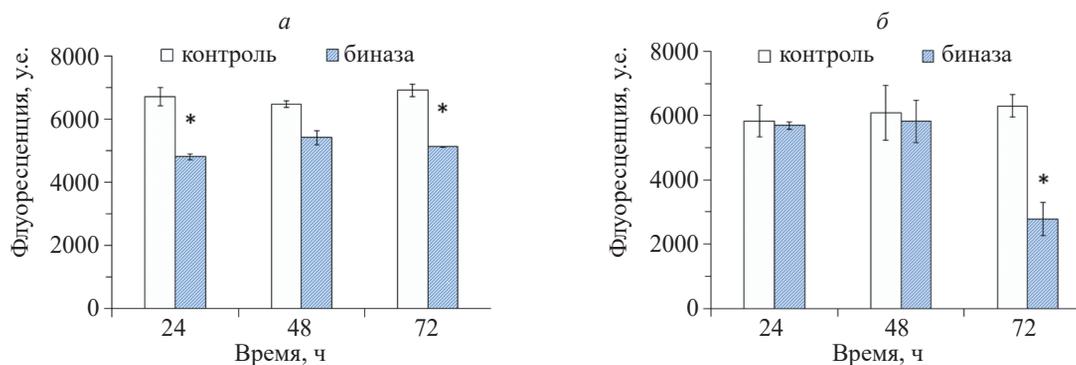


Рис. 1. Цитофлуориметрический анализ содержания АФК (а) и восстановленного глутатиона (б) в клетках SiHa, инкубированных с биназой (0.8 мкМ) в течение 24, 48 и 72 ч. Результаты представлены как сигнал флуоресценции красителей DHR123 (АФК) и ThiolTrackerTM Violet (GSH), полученный от клеток, инкубированных с биназой, относительно необработанных. * $p \leq 0.05$.

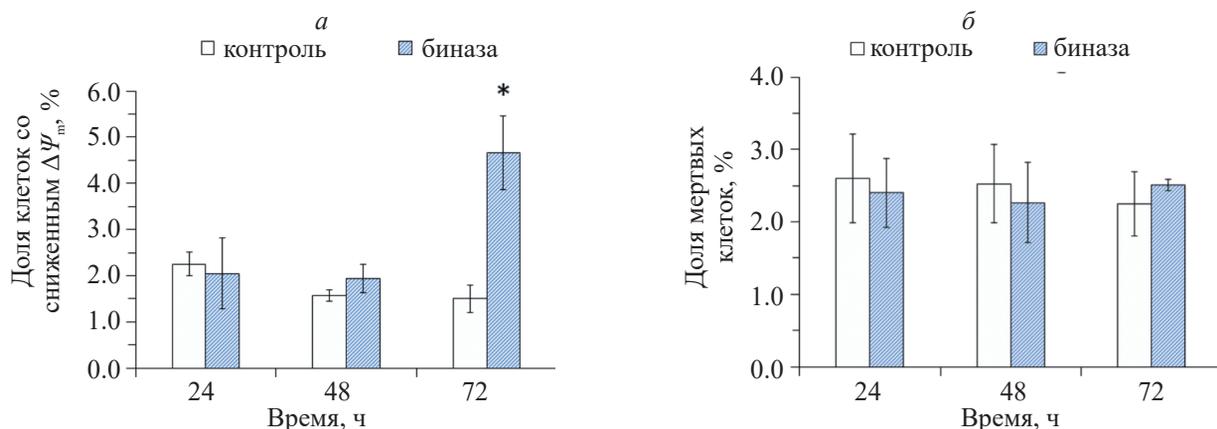


Рис. 2. Цитофлуориметрический анализ содержания клеток со сниженным митохондриальным потенциалом (а) и мертвых клеток (б) после обработки биназой (0.8 мкМ) в течение 24, 48 и 72 ч. * $p \leq 0.05$.

приведен на рис. 2а. Как видно, резкий рост доли клеток со сниженным митохондриальным потенциалом зарегистрирован через 72 ч; при этом увеличения доли мертвых клеток не наблюдали (рис. 2б).

Влияние биназы на глутатионирование p53 и Na,K-АТФазы

Чувствительность опухолевых клеток к цитотоксическому действию биназы зависит от экспрессии специфических онкогенов: KIT, RUNX1 (AML1-ETO), FLT3 и KRAS [20–22]. Линия клеток SiHa, ВПЧ-16-положительной плоскоклеточной карциномы шейки матки, характеризуется экспрессией редоксчувствительных вирусных онкобелков E6 и E7. Их основная функция заключается в блокировании антиоксидантных систем и подавлении опухолевых супрессоров p53 и Rb. Так, вирусный белок E6 индуцирует убиквитинзависимую деградацию онкосупрессора p53 [23]. Кроме того, известно, что в условиях оксидативного стресса белок p53

подвергается редоксзависимому глутатионированию, что препятствует его связыванию с ДНК и, как следствие, реализации противоопухолевой активности [24].

Как видно из данных, представленных на рис. 3, инкубация клеток SiHa с биназой в концентрации 0.8 мкМ приводит к снижению экспрессии вирусного белка E6 и усилению биогенеза p53. Это согласуется с результатами, полученными нами ранее для более высоких концентраций фермента (8 мкМ) [18]. Кроме того, в присутствии биназы снижен уровень глутатионирования белка p53 (рис. 3), что повышает его онкосупрессорный потенциал.

Na,K-АТФаза относится к ключевым редоксчувствительным белкам клетки. Функциональная активность этого фермента напрямую зависит от окислительно-восстановительного статуса клетки и снижается при окислительном стрессе, гипоксии и глутатионировании каталитической $\alpha 1$ -субъединицы [25]. Раковые клетки характеризуются повышенной актив-

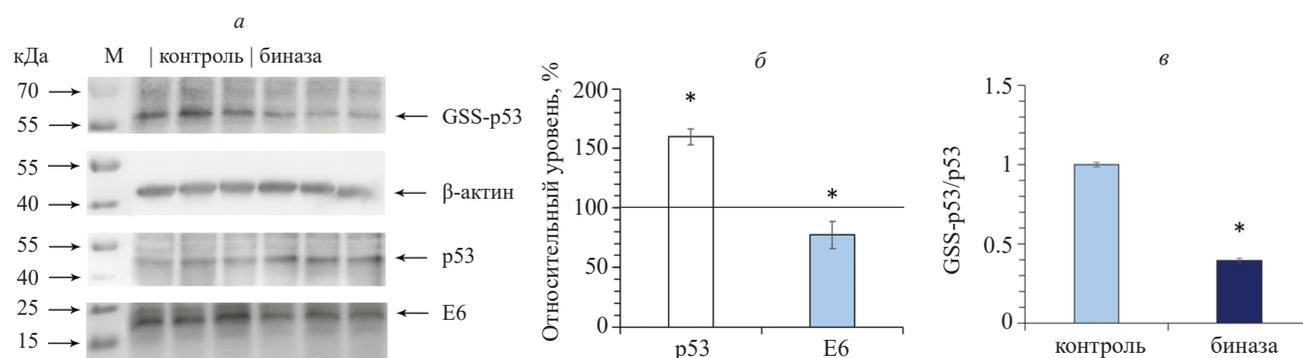


Рис. 3. Влияние биназы на уровни белков E6 ВПЧ-16 и p53 в клетках SiHa. а – Электрофоретический анализ белков в лизатах клеток SiHa. Здесь и далее: М – маркеры молекулярной массы белков PageRuler Prestained Protein Ladder (“Thermo Fisher Scientific”, США), контроль – необработанные клетки; биназа – клетки инкубировали с 0.8 мкМ биназой в течение 48 ч. б – Относительное содержание белков p53 и E6 в лизатах, обработанных биназой клеток SiHa. За 100% принят уровень соответствующих белков в контроле. в – Изменение степени глутатионирования белка p53 (GSS-p53) при обработке клеток SiHa биназой. Кратность изменения рассчитывали как GSS-p53/p53; за единицу принято значение GSS-p53/p53 в контроле. * $p \leq 0.05$.

ностью Na,K-АТФазы, поэтому ингибиторы ее ферментативной активности относятся к перспективным препаратам для лечения онкологических заболеваний [26, 27].

Нами показано, что в клетках SiHa, инкубированных с биназой в концентрации 0.8 мкМ в течение 48 ч, уровень Na,K-АТФазы снижался на 45% относительно необработанных клеток; при этом на 20% повышалось содержание глутатионилированной формы каталитической $\alpha 1$ -субъединицы фермента (рис. 4). Все эти процессы приводит к ингибированию АТФазной активности фермента и, как следствие, к нарушению ионного гомеостаза и последующему апоптозу клеток. Таким образом, конечным результатом действия биназы даже в нетоксичной концентрации можно считать ее проапоптотический эффект.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Антиоксидантный потенциал биназы

Антиоксидантная функция восстановленного глутатиона, GSH, заключается в предотвращении развития окислительного стресса, защите белков от необратимого окисления и поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза в клетках. GSH взаимодействует с окисленными формами молекул и АФК как напрямую, так и в качестве косубстрата фермента глутатионпероксидазы. В ходе ферментативной реакции глутатионпероксидазы восстанавливает H_2O_2 и перекиси липидов до воды и соответствующих спиртов [28]. Детоксикация ксенобиотиков также одна из важнейших функций GSH. В реакции, катализируемой глутатион-S-трансферазой, GSH образует конъюгаты с электрофильными ксенобиотиками. Такие конъюгаты (GS-X) выбрасываются из клетки ABC-транспортером MRP1 (multidrug resistance protein 1), что приводит к развитию лекарственной устойчивости опухолевых клеток [29, 30].

Изучению антиоксидантной активности РНКаз животного и бактериального происхождения посвящен ряд исследований. Так, В. Ardelt с соавт. [31] установили снижение АФК в клетках канальцевой карциномы молочной железы и фибросаркомы после обработки РНКазой из ооцитов лягушки *Rana pipiens* (онконазой). На модели опухолевых клеток Kasumi-1 В. Митькевич (Mitkevich) с соавт. [15] выявили дозозависимое снижение продукции АФК под действием биназы. Интересно отметить, что оно коррелировало с ростом внутриклеточного кальция и процента апоптотических клеток. Подавление окислительного стресса в клетках Jurkat после обработки биназой коррелировало со снижением уровня экспрессии транскрипционного фактора NF- κ B1, при этом возрастала доля клеток в состоянии апоптоза [16]. Онконаза также снижала уровень экспрессии NF- κ B1 в клетках мезотелиомы [32]. Известно, что повышенное содержание АФК в клетках индуцирует экспрессию NF- κ B, что приводит к активации генов пролиферации и снижению чувствительности клеток апоптозу. По-видимому, подавление продукции АФК и снижение уровня NF- κ B характерны для цитотоксичных РНКаз различного происхождения. Установленное нами снижение уровня АФК в клетках SiHa после инкубации с биназой в нетоксичной концентрации, по-видимому, тоже связано с этим механизмом. Наблюдаемое под действием биназы снижение уровня АФК в клетках SiHa, предшествующее снижению уровня глутатиона и индукции падения митохондриального потенциала, является еще одним подтверждением важности антиоксидантной активности РНКаз в реализации их цитотоксического действия.

Проапоптотический потенциал биназы

Более 200 белков млекопитающих участвует в тиол-дисульфидном обмене [33, 34]. Установлено, что S-глутатионирование ингибирует активность ядерного фактора NF1,

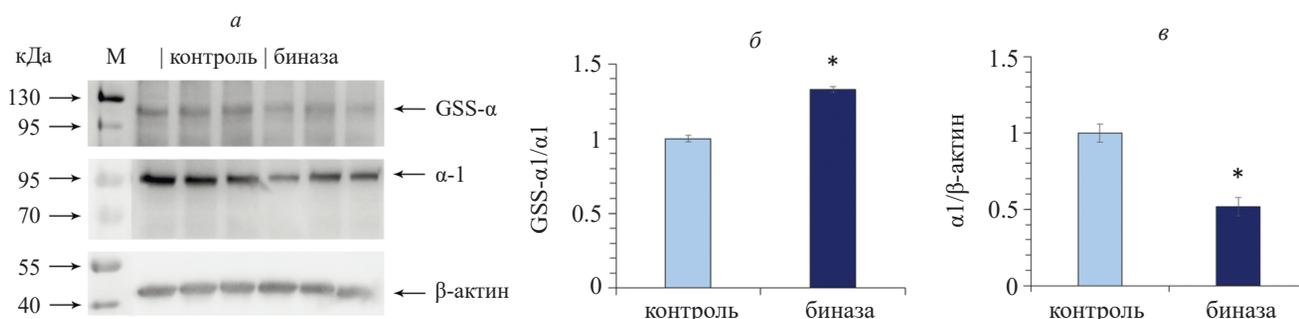


Рис. 4. Влияние биназы на уровень $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы в клетках SiHa. *a* – Электрофоретический анализ содержания $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы в клетках SiHa. Обозначения см. в подписи к рис. 3. Изменение степени глутатионирования (*b*) и содержания (*c*) $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы в лизатах клеток SiHa, обработанных биназой. За единицу приняты значения в контроле. * $p \leq 0.05$.

актина, транскрипционного фактора NF- κ B, опухолевого супрессора p53 и киназы I κ B (IKK). Функционирование клеточного актина происходит при посредничестве обратимого S-глутатионилирования, нарушение которого меняет структурную организацию стресс-фибрилл актинового цитоскелета [35]. Сохранение оптимального соотношения восстановленного глутатиона к окисленному (GSH/GSSG) в клетке – ключевой фактор ее нормального функционирования. Дисбаланс GSH/GSSG, вызванный ингибированием синтеза GSH, приводит к редоксзависимой активации сигнальных путей ERK/JNK/p38 и запуску апоптоза [36–38]. Баланс GSH/GSSG сдвигается в сторону GSSG при развитии окислительного стресса, что индуцирует глутатионилирование белков [25]. Таким образом, повышенный уровень АФК, характерный для опухолевых клеток, индуцирует глутатионилирование белков, что в ряде случаев изменяет их функционирование. Так, глутатионилирование транскрипционного фактора p53 препятствует его связыванию с молекулой ДНК. Это приводит к тому, что опухолевые клетки реализуют механизм адаптации, который подавляет развитие апоптотического ответа на ранней стадии окислительного стресса, и тем самым избегают немедленной гибели [39]. Здесь нами показано, что снижение уровня АФК в клетках SiHa под действием биназы приводит к уменьшению степени глутатионилирования p53 (рис. 3*в*). Ранее V. Mitkevich и др. [18] показали, что под действием биназы в этих клетках снижалась экспрессия белка E6 ВПЧ-16, что сопровождалось повышением уровня p53. Таким образом, биназа даже в низкой, нетоксичной концентрации оказывает проапоптотический эффект на клетки SiHa. Увеличение транскриптов белка p53 под действием биназы ранее было показано и на моделях опухолевых клеток HEK293T [40].

Интересно отметить, что при инкубации с биназой уровень глутатионилирования мембранного белка Na,K-АТФазы возрастает (рис. 4*а, б*), а это, как показано нами ранее [25], приводит к ингибированию ее активности и, как следствие, снижению выживаемости опухолевых клеток. Возрастание глутатионилирования Na,K-АТФазы под действием биназы (0.8 мкМ) было нами показано ранее и на клетках Kasumi-1 миелогенного лейкоза [41]. Ключевая функция Na,K-АТФазы в клетке заключается в поддержании ионного гомеостаза и трансмембранного потенциала. В раковых клетках активность Na,K-АТФазы часто повышена в связи с особенностями их метаболизма. Во многих типах раковых клеток замечена активация каталитической

α 1-субъединицы этого фермента [42]. Кроме того, в опухолевых клетках некаталитическая β -субъединица Na,K-АТФазы играет ключевую роль в механизмах клеточной адгезии и миграции, а ее блокирование приводит к опухолевой инвазии и метастазированию [43]. В связи с этим Na,K-АТФаза может служить перспективной мишенью для противоопухолевой терапии. Кардиотонические стероиды (КТС), содержащиеся в том числе в организме человека, относятся к специфическим ингибиторам и регуляторам Na,K-АТФазы. Длительное время КТС применяли для лечения сердечной недостаточности, так как ингибирование Na,K-АТФазы и, как следствие, увеличение концентрации кальция приводит к усилению сердечных сокращений [44]. В ряде исследований показана эффективность таких КТС, как убаин, дигиталин и буфалин, в лечении рака простаты [45, 46], хотя для некоторых препаратов этой группы повышен риск возникновения онкологических заболеваний [47]. Терапевтический индекс большинства КТС, обладающих противоопухолевой активностью, достаточно низок, что ограничивает перспективы их применения в лечении онкологических заболеваний. В то же время биназа в концентрации 0.8 мкМ блокирует активность Na,K-АТФазы, снижая адаптивный потенциал опухолевых клеток, что обосновывает возможность применения в противоопухолевой терапии даже малых доз этой РНКазы.

Митохондрии играют ключевую роль в инициации Bcl-2-зависимого механизма апоптоза опухолевых клеток. Падение митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$) приводит к изменению проницаемости мембран, ускорению высвобождения апоптотических факторов (цитохром *c*, Smac/Diablo и AIF), активации каспаз и, как следствие, к гибели клеток [48]. Так, в диабетических кардиомиоцитах стресс-индуцированное окисление митохондриального GSH приводило к снижению $\Delta\Psi_m$, активации каспазы-9 и каспазы-3 [49]. В клетках В-клеточной лимфомы человека АФК-зависимое снижение митохондриального глутатиона (mGSH) инициировало апоптоз и сопровождалось резким падением $\Delta\Psi$, высвобождением цитохрома *c* и активацией каспазы-3 [50]. Нами показано, что в клетках SiHa через 72 ч инкубации с биназой снижается как уровень глутатиона, так и величина митохондриального потенциала, то есть нарушается работа митохондрий. Ранее показано, что индуцированный биназой апоптоз клеток Kasumi-1 и HEK293T опосредован деполаризацией мембран митохондрий и повышением содержания Ca^{2+} внутри клеток [15, 51]. Вероятно, снижение митохондриального потенциала

в клетках SiHa также служит ранним маркером последующих апоптотических изменений.

Таким образом, нами установлено, что биназа в низких концентрациях приводит к снижению уровня АФК, индуцируя снижение глутатионирования p53, повышению уровня немодифицированного p53 и тем самым способствует восстановлению нормальной функции белка p53 в клетках SiHa – ВПЧ-16-положительной плоскоклеточной карциномы. Падение уровня восстановленного глутатиона под действием биназы, вероятно, вносит вклад в падение митохондриального потенциала, что индуцирует развитие митохондриального пути апоптоза. Под действием биназы уровень Na,K-АТФазы снижается и увеличивается доля глутатионированной формы. Логично предположить, что это приводит к падению ферментативной активности Na,K-АТФазы в клетке, а значит и нарушению ионного гомеостаза. Следовательно, в низких концентрациях биназа снижает защитные свойства раковых клеток за счет нормализации работы редоксчувствительных систем и изменения глутатионирования ряда белков. Полученные результаты позволяют рассматривать биназу в качестве агента, регулирующего редокс-баланс опухолевых клеток в составе комплексной терапии онкопатологий.

Работа выполнена в рамках программы «Приоритет-2030» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-10036) и гранта ICGEB (CRP/RUS20-01).

Настоящее исследование проводилось без использования биологических материалов, полученных от людей и животных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Green R.M., Graham M., O'Donovan M.R., Chipman J.K., Hodges N.J. (2006) Subcellular compartmentalization of glutathione: correlations with parameters of oxidative stress related to genotoxicity. *Mutagenesis*. **21**, 383–390. doi: 10.1093/mutage/gel043
- Kennedy L., Sandhu J.K., Harper M.E., Cuperlovic-Culf M. (2020) Role of glutathione in cancer: from mechanisms to therapies. *Biomolecules*. **10**, 1429. doi: 10.3390/biom10101429.
- Schafer F.Q., Buettner G.R. (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 1191–1212. doi: 10.1016/s0891-5849(01)00480-4
- Buettner G.R., Wagner B.A., Rodgers V.G. (2013) Quantitative redox biology: an approach to understand the role of reactive species in defining the cellular redox environment. *Cell Biochem. Biophys.* **67**, 477–483. doi: 10.1007/s12013-011-9320-3
- Townsend D.M., Tew K.D., Tapiero H. (2003) The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacother.* **57**, 145–155. doi: 10.1016/S0753-3322(03)00043-X
- Vafa O., Wade M., Kern S., Beeche M., Pandita T.K., Hampton G.M., Wahl G.M. (2002) c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol. Cell*. **9**, 1031–1044. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00520-8
- Weinberg F., Hamanaka R., Wheaton W.W., Weinberg S., Joseph J., Lopez M., Kalyanaraman B., Mutlu G., Budinger S., Chandel N.S. (2010) Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 8788–8793. doi: 10.1073/pnas.1003428107
- Ballatori N., Krance S.M., Marchan R., Hammond C.L. (2009) Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. *Mol. Aspects Med.* **30**, 13–28. doi: 10.1016/j.mam.2008.08.004
- Mieyal J.J., Gallogly M.M., Qanungo S., Sabens E.A., Shelton M.D. (2008) Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1941–1988. doi: 10.1089/ars.2008.2089
- Miller O.G., Mieyal J.J. (2015) Sulfhydryl-mediated redox signaling in inflammation: role in neurodegenerative diseases. *Arch. Toxicol.* **89**, 1439–1467. doi: 10.1007/s00204-015-1496-7
- Xue X., Wang B., Du W., Zhang C., Song Y., Cai Y., Cen D., Wang L., Xiong Y., Jiang P., Zhu S., Zhao K.N., Zhang L. (2016) Generation of antibody molecules specific for HPV16 E7 recognition. *Oncotarget*. **7**, 73995–74005. doi: 10.18632/oncotarget.12174
- Wondrak G.T. (2009) Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 3013–3069. doi: 10.1089/ars.2009.2541
- Tew K.D., Townsend D.M. (2011) Redox platforms in cancer drug discovery and development. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 156–161. doi: 10.1016/j.cbpa.2010.10.016
- Mironova N.L., Petrushanko I.Y., Patutina O.A., Sen'kova A.V., Simonenko O.V., Mitkevich V.A., Markov O.V., Zenkova M.A., Makarov A.A. (2013) Ribonuclease binase inhibits primary tumor growth and metastases via apoptosis induction in tumor cells. *Cell Cycle*. **12**, 2120–2131. doi: 10.4161/cc.25164

15. 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. (2013) Ribonuclease binase apoptotic signature in leukemic Kasumi-1 cells. *Biochimie*. **95**, 1344–1349. doi: 10.1016/j.biochi.2013.02.016
16. Бурнышева К.М., Петрушанко И.Ю., Спирин П.В., Прасолов В.С., Макаров А.А., Митькевич В.А. (2016) Рибонуклеаза биназа вызывает гибель клеток острого Т-лимфобластного лейкоза, индуцируя в них апоптоз. *Молекуляр. биология*. **50**, 347–352. doi: 10.7868/S0026898416020038
17. Шульга А.А., Окороков А.Л., Панов К.И., Курбанов Ф.Т., Чернов Б.К., Скрябин К.Г., Кирпичников М.П. (1994) Суперпродукция рибонуклеазы *Bacillus intermedius* 7P (биназы) в *E. coli*. *Молекулярная биология*. **28**(2), 453–463.
18. Mitkevich V.A., Burnysheva K.M., Petrushanko I.Y., Adzhubei A.A., Schulga A.A., Chumakov P.M., Makarov A.A. (2017) Binase treatment increases interferon sensitivity and apoptosis in SiHa cervical carcinoma cells by downregulating E6 and E7 human papilloma virus oncoproteins. *Oncotarget*. **8**, 72666–72675. doi: 10.18632/oncotarget.20199
19. Pal D., Rai A., Checker R., Patwardhan R.S., Singh B., Sharma D., Sandur S.K. (2021) Role of protein S-glutathionylation in cancer progression and development of resistance to anti-cancer drugs. *Arch. Biochem. Biophys.* **704**, 108890. doi: 10.1016/j.abb.2021.108890
20. Ilinskaya O.N., Singh I., Dudkina E., Ulyanova V., Kayumov A., Barreto G. (2016) Direct inhibition of oncogenic KRAS by *Bacillus pumilus* ribonuclease (binase). *Biochim. Biophys. Acta*. **1863**, 1559–1567. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.04.005
21. Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Spirin P.V., Fedorova T.V., Kretova O.V., Tchurikov N.A., Prasolov V.S., Ilinskaya O.N., Makarov A.A. (2011) Sensitivity of acute myeloid leukemia Kasumi-1 cells to binase toxic action depends on the expression of *KIT* and *AML1-ETO* oncogenes. *Cell Cycle*. **10**, 4090–4097. doi: 10.4161/cc.10.23.18210
22. Митькевич В.А., Орлова Н.Н., Петрушанко И.Ю., Симоненко О.В., Спирин П.В., Прокофьева М.М., Горностаева А.С., Stocking C., Макаров А.А., Прасолов В.С. (2013) Экспрессия онкогена *FLT3-ITD* сообщает предшественникам В-клеток мыши линии ВАF3 чувствительность к цитотоксическому действию биназы. *Молекуляр. биология*. **47**, 282–282. <https://doi.org/10.7868/s0026898413020092>
23. Zur Hausen H. (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer*. **2**, 342–350. doi: 10.1038/Nrc798
24. Velu C.S., Niture S.K., Doneanu C.E., Pattabiraman N., Srivenugopal K.S. (2007) Human p53 is inhibited by glutathionylation of cysteines present in the proximal DNA-binding domain during oxidative stress. *Biochemistry*. **46**, 7765–7780. doi: 10.1021/bi700425y
25. Petrushanko I.Y., Yakushev S., Mitkevich V.A., Kamanina Y.V., Ziganshin R.H., Meng X., Anashkina A.A., Makhro A., Lopina O.D., Gassmann M., Makarov A.A., Bogdanova A. (2012) S-glutathionylation of the Na, K-ATPase catalytic α subunit is a determinant of the enzyme redox sensitivity. *J. Biol. Chem.* **287**, 32195–32205. doi: 10.1074/jbc.M112.391094
26. Alevizopoulos K., Calogeropoulou T., Lang F., Stournaras C. (2014) Na^+/K^+ ATPase inhibitors in cancer. *Curr. Drug Targets*. **15**, 988–1000. doi: 10.2174/1389450115666140908125025
27. Bejček J., Spiwok V., Kmoníčková E., Rimpelová S. (2021) Na^+/K^+ -ATPase revisited: on its mechanism of action, role in cancer, and activity modulation. *Molecules*. **26**, 1905. doi: 10.3390/molecules26071905
28. Lushchak V.I. (2012) Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J. Amino Acids*. **2012**, 736837. doi: 10.1155/2012/736837
29. Zou J., Shang X., Li C., Ouyang J., Li B., Liu X. (2019) Effects of cadmium on mineral metabolism and antioxidant enzyme activities in *Salix matsudana* Koidz. *Pol. J. Environ. Stud.* **28**, 989–999. doi: 10.15244/pjoes/81697
30. Allocati N., Masulli M., Di Ilio C., Federici L. (2018) Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis*. **7**, 8. doi: 10.103/s41389-017-0025-3
31. Ardelt B., Juan G., Burfeind P., Salomon T., Wu J.M., Hsieh T.C., Li X., Sperry R., Pozarowski P., Shogen K., Ardelt W., Darzynkiewicz Z. (2007) Onconase, an anti-tumor ribonuclease suppresses intracellular oxidative stress. *Int. J. Oncol.* **31**, 663–669. doi: 10.3892/ijo.31.3.663
32. Tsai S.Y., Ardelt B., Hsieh T.C., Darzynkiewicz Z., Shogen K., Wu J.M. (2004) Treatment of Jurkat acute T-lymphocytic leukemia cells by onconase (Ranpirinase) is accompanied by an altered nucleocytoplasmic distribution and reduced expression of transcription factor NF- κ B. *Int. J. Oncol.* **25**, 1745–1752. doi: 10.3892/ijo.25.6.1745
33. Fratelli M., Gianazza E., Ghezzi P. (2004) Redox proteomics: identification and functional role of glutathionylated proteins. *Expert Rev. Proteomics*. **1**, 365–376. doi: 10.1586/14789450.1.3.365
34. Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Colombo R., Milzani A. (2007) S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 883–898. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.014
35. Fiaschi T., Cozzi G., Raugei G., Formigli L., Ramponi G., Chiarugi P. (2006) Redox regulation of β -actin during integrin-mediated cell adhesion. *J. Biol. Chem.* **281**, 22983–22991. doi: 10.1074/jbc.M603040200

36. Lu G.D., Shen H.M., Chung M.C., Ong C.N. (2007) Critical role of oxidative stress and sustained JNK activation in aloë-emodin-mediated apoptotic cell death in human hepatoma cells. *Carcinogenesis*. **28**, 1937–1945. doi: 10.1093/carcin/bgm143
37. Cuadrado A., Garcia-Fernandez L.F., Gonzalez L., Suarez Y., Losada A., Alcaide V., Martinez T., Fernandez-Sousa J.M., Sanchez Puelles J.M., Munoz A. (2003) Aplidin induces apoptosis in human cancer cells via glutathione depletion and sustained activation of the epidermal growth factor receptor, Src, JNK, and p38 MAPK. *J. Biol. Chem.* **278**, 241–250. doi: 10.1074/jbc.M201010200
38. Ji L., Shen K., Jiang P., Morahan G., Wang Z. (2011) Critical roles of cellular glutathione homeostasis and jnk activation in andrographolide-mediated apoptotic cell death in human hepatoma cells. *Mol. Carcinog.* **50**, 580–591. doi: 10.1002/mc.20741
39. Velu C.S., Niture S.K., Doneanu C.E., Pattabiraman N., Srivenugopal K.S. (2007) Human p53 is inhibited by glutathionylation of cysteines present in the proximal DNA-binding domain during oxidative stress. *Biochemistry*. **46**, 7765–7780. doi: 10.1021/bi700425y
40. Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Kretova O.V., Zelenikhin P.V., Prassolov V.S., Tchurikov N.A., Ilinskaya O.N., Makarov A.A. (2010) Oncogenic *c-kit* transcript is a target for binase. *Cell Cycle*. **9**, 2674–2678. doi: 10.4161/cc.9.13.12150
41. Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Makarov A.A. (2019) RNases disrupt the adaptive potential of malignant cells: perspectives for therapy. *Front. Pharmacol.* **10**, 922. doi: 10.3389/fphar.2019.00922
42. Mijatovic T., Dufrasne F., Kiss R. (2012) Na⁺/K⁺-ATPase and cancer. *Pharm. Pat. Anal.* **1**, 91–106. doi: 10.4155/ppa.12.3
43. Eskiocak U., Ramesh V., Gill J.G., Zhao Z., Yuan S.W., Wang M., Vandergriff T., Shackleton M., Quintana E., Frankel A., Johnson T., DeBerardinis R., Morrison S.J. (2016) Synergistic effects of ion transporter and MAP kinase pathway inhibitors in melanoma. *Nat. Commun.* **7**, 12336. doi: 10.1038/ncomms12336
44. Ren J., Gao X., Guo X., Wang N., Wang X. (2022) Research progress in pharmacological activities and applications of cardiotoxic steroids. *Front. Pharmacol.* **13**, 902459. doi: 10.3389/fphar.2022.902459
45. Ayogu J.I., Odoh A.S. (2020) Prospects and therapeutic applications of cardiac glycosides in cancer remediation. *ACS Comb. Sci.* **22**, 543–553. doi:10.1021/acscombsci.0c00082
46. Chang Y.M., Shih Y.L., Chen C.P., Liu K.L., Lee M.H., Lee M.Z., Hou H.T., Huang H.C., Lu H.F., Peng S.F., Chen K.W., Yeh M.Y., Chung J.G. (2019) Ouabain induces apoptotic cell death in human prostate DU 145 cancer cells through DNA damage and TRAIL pathways. *Environ. Toxicol.* **34**, 1329–1339. doi:10.1002/tox.22834
47. Osman M.H., Farrag E., Selim M., Osman M.S., Hasanine A., Selim A. (2017) Cardiac glycosides use and the risk and mortality of cancer; systematic review and meta-analysis of observational studies. *PloS One*. **12**, e0178611. doi: 10.1371/journal.pone.0178611
48. Ortega A.L., Mena S., Estrela J.M. (2011) Glutathione in cancer cell death. *Cancers*. **3**, 1285–1310. doi: 10.3390/cancers3011285
49. Ghosh S., Pulinilkunnil T., Yuen G., Kewalramani G., An D., Qi D., Abrahani A., Rodrigues B. (2005) Cardiomyocyte apoptosis induced by short-term diabetes requires mitochondrial GSH depletion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **289**, H768–H776. doi: 10.1152/ajpheart.00038.2005
50. Armstrong J.S., Steinauer K.K., Hornung B., Irish J.M., Lecane P., Birrell G.W., Peehl D.M., Knox S.J. (2002) Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. *Cell Death Differ.* **9**, 252–263. doi: 10.1038/sj.cdd.4400959
51. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. (2008) Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents. *BioEssays*. **30**, 781–790. doi: 10.1002/bies.20789

Redox Status and Protein Glutathionylation in Binase-Treated HPV16-Positive SiHa Carcinoma Cells

A. I. Nadyrova^{1, *}, I. Y. Petrushanko², V. A. Mitkevich², O. N. Ilinskaya¹

¹*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*

²*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

*e-mail: alsu.nadyrova@yandex.ru

Human papillomavirus type 16 (HPV16) belongs to the high-risk type viruses and is associated by overexpression of E6 and E7 oncoproteins, which determine the oncogenic properties of the virus such as immortalization and malignant transformation of proliferating epithelial cells. The biogenesis of redox-sensitive proteins E6 and E7 at the early stages of viral infection leads to blocking of cell antioxidant defense system and ubiquitin-dependent degradation of p53 and Rb tumor suppressors. Maintaining high rates of tumor cell proliferation contributes to an increase in the reactive oxygen species (ROS) production level and a shift in the redox balance towards oxidative processes. Reduced glutathione (GSH) provides antioxidant protection to tumor cells through S-glutathionylation of thiol groups of redox-sensitive proteins, which leads to the appearance of multidrug-resistant forms of cancer. In this regard, drugs restoring redox balance and increasing susceptibility to antitumor therapy are of particular importance. We have established that in HPV-16-positive SiHa cells of cervical squamous cell carcinoma, *Bacillus pumilus* RNase (binase) modulates the redox-dependent regulatory mechanisms that ensure tumor cell resistance to apoptosis. Binase in nontoxic concentrations initiates a number of pre-apoptogenic changes, i.g., decreases ROS and GSH levels, suppresses the expression of E6 oncoprotein, activates the expression of p53 tumor suppressor, and reduces the mitochondrial potential of tumor cells. Binase-induced disruption of the mitochondrial membrane integrity is a signal for the mitochondrial apoptosis pathway activation.

Keywords: binase, redox status, malignant cells, glutathionylation, p53, Na/K-ATPase