

О.О. КОВАЛЕНКО, Л.Л. ЛУКАШ
Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
Київ-143, вул. Акад. Заболотного, 150
E-mail: xsana@mail.ru, lukash@imbg.org.ua

АНТИМУТАГЕННИЙ ЕФЕКТ ЛЕКТИНУ ТА N-МЕТИЛ-N'-НІТРО-N- НІТРОЗОГУАНІДИНУ НА ІНДУКОВАНИЙ МУТАГЕНЕЗ В КЛІТИНАХ ССАВЦІВ *IN VITRO*



Розглянуто фактори і шляхи впливу макромолекул на мутаційний процес. Показано антимуtagenний ефект при дослідженні комбінованого впливу лектинів і алкілюючого агента МННГ на мутагенез в клітинах китайського хом'ячка. Так, при різних схемах обробки клітин білком та МННГ експериментальна частота мутацій, індукованих двома агентами, була статистично вірогідно нижчою, ніж теоретично очікувана величина при умові їхньої незалежної сумарної дії. Обговорюється можливість існування спільних мішеней і механізмів, через які діють на клітинну ДНК різні за своєю природою мутагенні чинники.

© О.О. КОВАЛЕНКО, Л.Л. ЛУКАШ, 2007

Вступ. Узагальнюючи експериментальні дані, одержані нами протягом останніх років, ми спробували сформулювати деякі основні положення, що характеризують біологічний мутагенез, спричинений макромолекулами [1].

Біологічний мутагенез (антимутагенез) є інтегральною відповіддю системи на появу, зникнення або зміну кількості функціонально активних макромолекул екзогенного та/або ендогенного походження, порушення їх балансу, утворення нових біополімерних комплексів [2]. В біологічний мутагенез залучаються принципово ті ж механізми утворення мутацій, що і при спонтанному мутагенезі, але вони реалізуються за участі чужорідних макромолекул, які зазнають певної еволюції в клітині і можуть призводити до тривалої дестабілізації клітинного геному [3]. Швидкість зниження індукованого мутагенезу до норми залежить як від особливостей біомутагена, так і від ефективності роботи всіх клітинних захисних систем розпізнавання, модифікації, детоксикації, виведення чужорідних макромолекул, репарації пошкоджень ДНК та енергетичної забезпеченості клітини [4].

Таким чином, первинним фактором в системі біологічного мутагенезу є експресія функціонально активних чужорідних макромолекул, а їхня інактивація призводить до зниження або зникнення мутагенного ефекту [3, 5]. Вторинним фактором дестабілізації є зміна активності і мутації клітинних генів та мобільних генетичних елементів під впливом тривалої експресії макромолекул екзогенного походження. Досить виразно це було продемонстровано нами та іншими авторами при дослідженні мутагенезу і злоякісної трансформації клітин в системі онковірус—клітина [3, 6]. На основі цих даних ми висловили припущення, що зміна програм генної експресії, ймовірно, супроводжується запуском процесів мутаційної та рекомбінаційної мінливості, як це має місце, наприклад, при продукуванні антитілотвірних клітин в організмі [7]. Дійсно, мутагенний ефект чужорідних лектинів в популяціях клітин китайського хом'ячка було зареєстровано саме за тих умов (концентрація білка, час експресії), коли вони індукували запрограмовану загибель клітин внаслідок апоптозу [8, 9].

Принципово існують два можливих шляхи впливу екзогенних білків на генетичну стабільність клітинних систем *in vitro*: 1) опосередко-

ваний клітинним апаратом для здійснення основних матричних процесів на ДНК; 2) через їхню пряму взаємодію з клітинною ДНК. Відомо, що досліджувані нами лектини впливають на внутрішньоклітинні процеси через взаємодію з рецепторами на поверхневій мембрані клітини [10], проте не виключається також можливість прямої взаємодії цих білків з нуклеїновими кислотами клітини, оскільки у структурі цілої низки лектинів знайдено ДНК-зв'язувальні домени та для багатьох з них описано ДНКазну та РНКазну активності [11].

Ключовим фактором мутагенезу, який впливає на виникнення і прояв мутацій, індукованих чинниками різної природи, є активація або пригнічення активності репаративних ферментів. Досліджувані нами раніше лектини з суцвіть та кори бузини чорної з одного боку виявляли здатність до індукції одностранных розривів клітинної ДНК, а з другого — антимутагенну активність у відношенні до алкілюючого агента *N*-метил-*N'*-нітро-*N*-нітрозогуанідину (МННГ) [12, 13]. Оскільки відомо, що у відновленні первинних пошкоджень, спричинених алкілюючими сполуками, вирішальну роль відіграє репаративний фермент O^6 -алкілгуанін-ДНК-алкілтрансфераза (АГТ), який індукується у відповідь на появу одностранных розривів ДНК [14, 15], ми висловили припущення, що він може бути однією з можливих мішеней для регуляторного впливу білків-мітогенів на індукований мутагенез.

Метою даної роботи було дослідити закономірності комбінованого впливу, різних за походженням та вуглеводною специфічністю лектинів і алкілюючого агента МННГ на мутаційний процес в клітинах ссавців *in vitro*. Як вже зазначено, одним з питань, на яке ми хотіли знайти відповідь, було існування спільних клітинних мішеней для чинників біологічної і хімічної природи.

Матеріали та методи. Для з'ясування питання про можливість антимутагенного впливу на індукований мутагенез біологічного та хімічного чинників при проведенні цієї серії дослідів використовували різні схеми обробки клітин досліджуваними сполуками. Клітини обробляли лектином перед та після внесення в клітинну систему МННГ, а також застосовували одночасну спільну обробку обома чинниками.

Як біологічні чинники використовували комерційні препарати лектинів рослинного (кори бузини чорної, *Sambucus nigra*) і тваринного (ікри окуня, *Persa fluviatilis*) походження виробництва фірми «Лектинотест». Обробку клітин кожним з досліджуваних білків у концентрації 0,2 мкг/мл проводили протягом 4 год в середовищі МЕМ за відсутності ембріональної сироватки (ЕС) великої рогатої худоби. Препарат МННГ використовували у концентрації 0,5 мкг/мл, тривалість експозиції клітин з хімічним мутагеном становила 1 год, а в експериментах при одночасній обробці клітин двома чинниками — 4 год.

Всі експерименти проводились з використанням клітин китайського хом'ячка лінії Bld-ii-FAF28C1237-8GlutsIII, що характеризується чутливістю до дії аналогів пуринових основ, в тому числі 6-меркаптопурину (6-МП). Методика проведення експериментів з індукції генних мутацій за локусом *hprt* детально описана раніше [16]. Час експресії мутацій становив 4 доби. Селекцію мутантів проводили з додаванням в культуральне середовище 6-МП в концентрації 60 мкг/мл. Частота резистентних до 6-МП клонів визначалась з урахуванням ефективності клонування. Вірогідність різниці між дослідом та контролем обраховували за допомогою методу Фішера.

Результати досліджень та їх обговорення. Принципова можливість модуляції мутагенного ефекту при спільній дії МННГ і біологічних чинників (екзогенних ДНК і білків) показана нами раніше [12, 17]. В даній роботі представлено результати чотирьох експериментів з дослідження комбінованого впливу на мутаційний процес лектинів та алкілюючого агента МННГ при різних схемах введення їх в клітинну систему. На рис. 1 та 2 представлені значення індукованих вказаними чинниками мутагенних ефектів за вирахуванням спонтанного фону. В цих дослідженнях білок використовували у відносно малій концентрації 0,2 мкг/мл, при якій ще не виявлявся цитотоксичний ефект, але вже, як правило, спостерігалось істотне підвищення частоти мутацій, резистентних до 6-МП.

На рис. 1 представлено усереднені за двома експериментами порівняльні дані із спільної дії на генетичну стабільність МННГ та лектинів, виділених з різних органів рослини бузи-

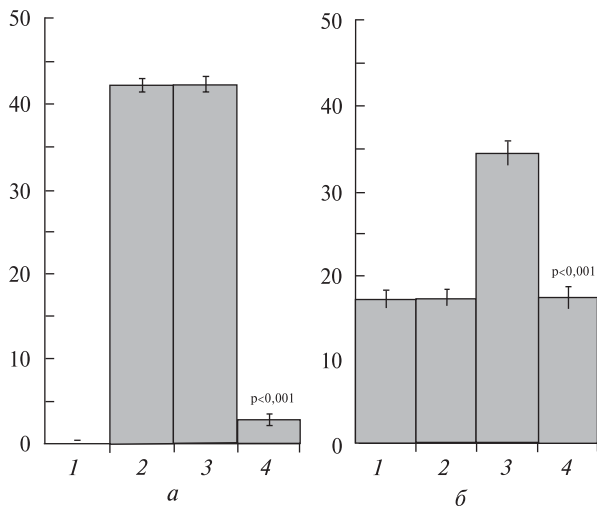


Рис. 1. Мутагенний ефект при комбінованій послідовній обробці клітин лектином та МННГ: *a* – лектин, виділений із суцвіть бузини чорної; *б* – лектин, виділений з кори бузини чорної; по вертикалі – частота індукованих мутантів, $\times 10^{-5}$; по горизонталі – 1 – ефект при обробці клітин білком в концентрації 0,2 мкг/мл; 2 – ефект при обробці клітин МННГ в концентрації 0,5 мкг/мл; 3 – теоретично очікуваний спільний ефект при умові незалежної сумарної дії двох чинників; 4 – експериментальний ефект при обробці клітин двома чинниками: спочатку білок, потім МННГ. Вказано вірогідність різниці між теоретичним та експериментальним значеннями

ни чорної. Експериментальні дані з лектином, виділеним із суцвіть, були одержані нами раніше [12], а з лектином кори бузини чорної – в серії експериментів, описаних в даній роботі. Слід зазначити, що лектин, виділений із суцвіть, в концентрації 0,2 мкг/мл не спричиняв статистично вірогідного підвищення частоти мутантів на відміну від лектину кори бузини чорної. Це можна пояснити як різницею в біологічній активності самих лектинів, так і їхніх препаратів, одержаних за різних умов. Незалежно від прояву їхньої власної активності попередня обробка клітин лектином призводила до статистично вірогідного зниження спільного мутагенного ефекту біологічного та хімічного чинників (варіант 4) порівняно з теоретично очікуваною величиною за умов їхньої незалежної сумарної дії (варіант 3). Ці дані вказували на те, що, можливо, макромолекули білка, зв'язуючись з якимись клітинними мішенями, робили їх недоступними для молекул алкілюючої сполуки.

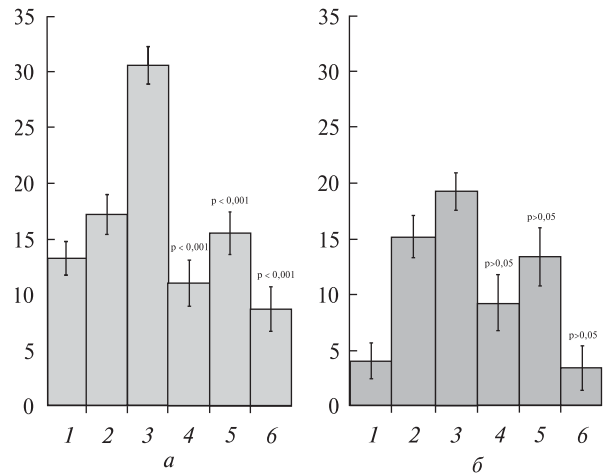


Рис. 2. Мутагенний ефект при різних схемах обробки клітин лектином та МННГ: *a* – лектин, виділений з кори бузини чорної; *б* – лектин, виділений з ікри окуня; по вертикалі – частота індукованих мутантів, $\times 10^{-5}$; по горизонталі – 1 – ефект при обробці клітин білком в концентрації 0,2 мкг/мл; 2 – ефект при обробці клітин МННГ в концентрації 0,5 мкг/мл; 3 – теоретично очікуваний спільний ефект при умові незалежної сумарної дії двох чинників; 4 – експериментальний ефект при послідовній обробці клітин двома чинниками: спочатку білок, потім МННГ; 5 – експериментальний ефект при послідовній обробці клітин двома чинниками: спочатку МННГ, потім білок; 6 – експериментальний ефект при одночасній обробці клітин білком та МННГ. Вказано вірогідність різниці між теоретичним та експериментальним значеннями

Для того щоб перевірити можливість конкуренції двох чинників за спільні клітинні мішені, в наступних експериментах застосували різну послідовність обробки, а також одночасну обробку клітин двома чинниками (рис. 2). Дані, одержані при різних схемах обробки клітин лектином кори бузини чорної та МННГ, підтвердили попередні спостереження, що експериментальна величина спільного мутагенного ефекту статистично вірогідно нижча теоретично розрахованої величини, яку можна було б очікувати за умов незалежної адитивної дії двох чинників (рис. 2, *a*). При застосуванні лектину, виділеного з ікри окуня, спостерігалась принципово така ж тенденція: експериментальна величина при комбінованій обробці клітин двома чинниками була нижчою, ніж теоретично очікуваний мутагенний ефект, однак ця різниця не була статистично вірогідною за даних умов експерименту.

Взагалі за даними двох експериментів (рис. 2) зниження експериментальної величини відносно теоретично очікуваної було максимальним і статистично достовірним (рис. 2, *a*) у варіанті 6, коли проводилась одночасна обробка клітин лектином і МННГ протягом 4 год, тобто при максимальній концентрації молекул і тривалості їх сумісної присутності в клітинній системі. При обробці клітин спочатку алкілюючим агентом, потім лектином зниження експериментальної величини відносно теоретично очікуваної виражене найменшим ступенем. Варіант обробки клітин спочатку лектином, а потім МННГ займав проміжне місце в цих експериментах.

Таким чином, одержані нами дані не суперечать уявленню про існування спільних клітинних мішеней, за які конкурують молекули біологічних і хімічних мутагенних чинників. Нами було зроблено припущення, що однією з багатьох можливих мішеней регуляторного впливу лектинів на мутаційний процес в досліджуваних клітинах може бути і репаративний фермент *O*⁶-алкілгуанін-ДНК-алкілтрансфераза (АГТ). Сукупність даних, одержаних нами в різних серіях експериментів, не суперечить цьому уявленню.

По-перше, при спільній обробці клітин чужорідним лектином та специфічним індуктором репаративного ферменту АГТ, алкілюючим агентом МННГ, спостерігався антимутагенний ефект. Тією чи іншою мірою тенденція до зниження частоти індукованих мутантів спостерігалась незалежно від порядку введення двох діючих агентів у систему, що вказувало на наявність репарогенних властивостей у обох чинників.

По-друге, в досліджуваних нами клітинах китайського хом'ячка детектовано присутність фермента АГТ за допомогою стандартного Western blott аналізу з використанням відповідних моноклональних антитіл [18]. У відповідь на дію специфічного індуктора, алкілюючого агента, спостерігали збільшення рівня експресії АГТ в клітинах ссавців.

По-третє, оскільки досліджувані нами лектини спричиняли односторонні розриви ДНК, що показано нами раніше, вони потенційно відносяться до неспецифічних індукторів репаративного ферменту АГТ, які на відміну від алкілюючих сполук не несуть алкільної групи і

тому не здатні специфічно інактивувати цей фермент [13, 15].

В наступній роботі будуть опубліковані результати досліджень з перевірки гіпотези щодо можливостей індукції репаративного ферменту АГТ під впливом досліджуваних вуглеводз'язуючих білків, лектинів. Слід зазначити, що не виключається існування інших численних спільних клітинних мішеней для досліджуваних чинників біологічної та хімічної природи.

SUMMARY. The factors and the ways of the influence of macromolecules on mutation process are considered. The antimutagenic effect of the combined application of lectins and *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine on mutagenesis in chinese hamster cells has been shown. The experimental frequency of mutations induced by the both compounds was statistically reliably lower than the theoretically expected one in the case of their independent summary action. The possibility of existence of mutual targets and mechanisms of the action of different mutagenic agents on cellular DNA are discussed.

РЕЗЮМЕ. Рассмотрены факторы и пути влияния макромолекул на мутационный процесс. Показан антимутагенный эффект при исследовании комбинированного действия лектинов и алкилирующего агента МННГ на мутагенез в клетках китайского хомячка. Так, при разных схемах обработки клеток белком и МННГ экспериментальная частота мутаций, индуцированных двумя агентами, была статистически достоверно ниже, чем теоретически ожидаемая величина при условии их независимого суммарного действия. Обсуждается возможность существования общих мишеней и механизмов, через которые действуют на клеточную ДНК разные по своей природе мутагенные факторы.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Акифьев А.П., Худолый Г.А. Мутагенез и генетический гомеостаз у высших организмов // Вестн. РАМН. – 1993. – № 1. – С. 3–9.
2. Лукаш Л.Л. Мутагенез та антимутагенез – протилежно спрямовані процеси, що визначають рівень генетичної мінливості та стабільності // Биополимеры и клетка. – 1998. – 14, № 6. – С. 500–511.
3. Лукаш Л.Л. Дестабилизация клеточного генома под влиянием экспрессии ранних регуляторных генов онковирусом // Цитология и генетика. – 2002. – 36, № 2. – С. 68–80.
4. Середенин С.Б., Дурнев А.Д. Фармакологическая защита генома. – М.: ВИНТИ, 1992. – 162 с.
5. Коваленко О.О., Костецкий І.Є., Лукаш Л.Л. Вплив альбуміну на частоту спонтанних мутацій в соматичній клітині

- тичних клітинах ссавців *in vitro* // Цитология и генетика. — 2005. — **39**, № 4. — С. 53–56.
6. Лукаш Л.Л., Коваленко О.А. Картирование трансформирующей и мутагенной активности аденовирусов // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2004. — **2**, № 1. — С. 104–121.
 7. Лукаш Л.Л. Регуляция изменчивости генома соматических клеток млекопитающих под влиянием экзогенных биологических факторов // Біополімери і клітина. — 2004. — **20**, № 1/2. — С. 93–105.
 8. Коваленко Л.Л., Костецька К.В., Лукаш Л.Л. Вплив лектинів різного походження на мутаційний процес у популяціях соматичних клітин ссавців // Біополімери і клітина. — 2006. — **22**, № 1. — С. 33–38.
 9. Коваленко О.О., Лукаш Л.Л. Індукція апоптозу у популяціях клітин ссавців *in vitro* під впливом лектинів // Цитология и генетика. — 2007. — **41**, № 5. — С. 48–53.
 10. Лахтин В.М. Молекулярная организация лектинов // Молекуляр. биология. — 1994. — **28**. — С. 245–273.
 11. Peumans W.J., Qiang Hao, Van Damme E.J. Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? // FASEB J. — 2001. — **15**. — P. 1493–1506.
 12. Лукаш Л.Л., Карпова И.С., Мирошниченко О.С., Тихонова Т.Н., Лыло В.В., Манько В.Г., Сухорада Е.М., Гольнская Е.Л. Влияние лектина соцветий *Sambucus nigra* на спонтанный и индуцированный алкилирующим агентом мутагенез в соматических клетках млекопитающих // Цитология и генетика. — 1997. — **31**, № 5. — С. 52–60.
 13. Macewicz L.L., Suchorada O.M., Lukash L.L. Influence of *Sambucus nigra* bark lectin on cell DNA under different *in vitro* conditions // Cell Biol. Intern. — 2005. — **29**. — P. 29–32.
 14. Lukash L.L., Boldt J., Pegg A.E., Dolan M.E., Maher V.M., McCormick J.J. Effect of O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase on the frequency and spectrum of mutations induced by N-methyl-N⁷-nitro-nitrosoguanidine in the HPRT gene of diploid human fibroblasts // Mutat. Res. — 1991. — **250**. — P. 397–409.
 15. Gerhard F., Bern K. Stress factors affecting expression of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase mRNA in rat hepatoma cells // Biochim. Biophys. acta. — 1992. — **1171**. — P. 35–40.
 16. Бужиевская Т.И., Лукаш Л.Л., Подольская С.В. Экспериментальные модели для изучения мутагенеза и трансформации, индуцированных вирусами и нуклеиновыми кислотами // Методы молекулярной биологии. — Киев: Наук. думка, 1986. — С. 147–158.
 17. Лукаш Л.Л., Подольская С.В., Сухорада Е.М., Костецкая Е.В., Костецкий И.Е., Варзанова И.С., Пацковский Ю.В., Вавилина И.В., Дейс С.В. Влияние алкилирующего агента МННГ на мутагенный эффект экзогенной рекомбинантной ДНК // Біополімери і клітка. — 1995. — **11**, № 1. — С. 87–91.
 18. Лило В.В., Манько В.Г., Немазаній І.О., Коваленко О.О., Мацевич Л.Л., Лукаш Л.Л. Визначення наявності репаративного ферменту O⁶-алкілгуанін-ДНК-алкілтрансферази в клітинах ссавців *in vitro* // Цитология и генетика. — 2004. — **38**, № 6. — С. 67–70.

Надійшла 06.12.06