

В.В. ЛИЛО, В.Г. МАНЬКО, І.О. НЕМАЗАНІЙ,
О.О. КОВАЛЕНКО, Л.Л. МАЦЕВИЧ, Л.Л. ЛУКАШ

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

ВИЗНАЧЕННЯ НАЯВНОСТІ РЕПАРАТИВНОГО ФЕРМЕНТУ О6-АЛКІЛГУАНІН-ДНК- АЛКІЛТРАНСФЕРАЗИ В КЛІТИНАХ ССАВЦІВ IN VITRO



Виявлено присутність ферменту О6-алкілгуанін-ДНК-алкілтрансфери (АГТ) в культурах клітин людини (фібробласти та кардіоміоцити) та китайського хом'ячка. В той же час в клітинах оболонки мозку людини фермент АГТ не продукується.

© В.В. ЛИЛО, В.Г. МАНЬКО, І.О. НЕМАЗАНІЙ,
О.О. КОВАЛЕНКО, Л.Л. МАЦЕВИЧ, Л.Л. ЛУКАШ, 2004

Вступ. В поновленні первинних пошкоджень, спричинених алкілюючими сполуками, які широко використовуються на виробництві та в медицині, вирішальну роль відіграє унікальний репаративний фермент О6-алкілгуанін-ДНК-алкілтрансфераза (АГТ). Цей фермент видаляє алкільну групу в ДНК з позиції О6-гуаніну і переносить її на власний цистеїновий залишок, втрачаючи власну ферментативну активність [1, 2]. Ця реакція відома як «механізм самогубства», за допомогою якого клітина захищається від мутагенного та цитотоксичного пошкодження [3]. Мітра і співавт. [4] встановили, що алкілтрансфераза людини має молекулярну масу біля 22 кДа і складається з 207 амінокислотних залишків.

Алкілтрансфери (АТ-ази) відіграють значну роль в прояві стійкості клітин до алкілюючих агентів, що спричиняють певні первинні пошкодження в ДНК, а саме в позиції О6-гуаніну. Існує зворотна кореляція між рівнем активності АГТ і чутливістю клітин до дії метилуючих та хлоретилуючих агентів, що застосовуються для хіміотерапії онкозахворювань. Таким чином, ефективність лікування онкозахворювань залежить від активності цього ферменту у пухлинних та нормальних клітинах. Речовини, які пригнічують активність АГТ, сприяють підвищенню частоти первинних пошкоджень ДНК, мутацій, летальних випадків, індукованих алкілюючими сполуками, у клітинах.

Відомо, що висока протипухлинна активність алкілнітрозосечовини та інших алкілюючих сполук в модельних експериментах не завжди успішно реалізується при лікуванні людини. Однією із причин низької ефективності такого лікування може бути високий рівень ферменту АГТ [5].

Майже всі типи людських пухлин експресують АГТ, але рівень експресії різний [6]. В людських пухлинах найвищий рівень експресії виявлено в пухлинах прямої кишки [7], меланомах [8], панкреатичній карциномі [9], гліомі [10, 11]. На матеріалі хірургічних операцій показано, що, як правило, ферментативна активність АГТ пухлинних клітин вища, ніж оточуючих нормальних клітин [11], тобто перші більш стійкі до дії алкілюючих сполук. Існує різниця в АГТ активності між тканинами одного індивідуума та між зразками однієї тканини різних індивідуумів. В нормі експресія АГТ значно вище в тканинах печінки, прямої киш-

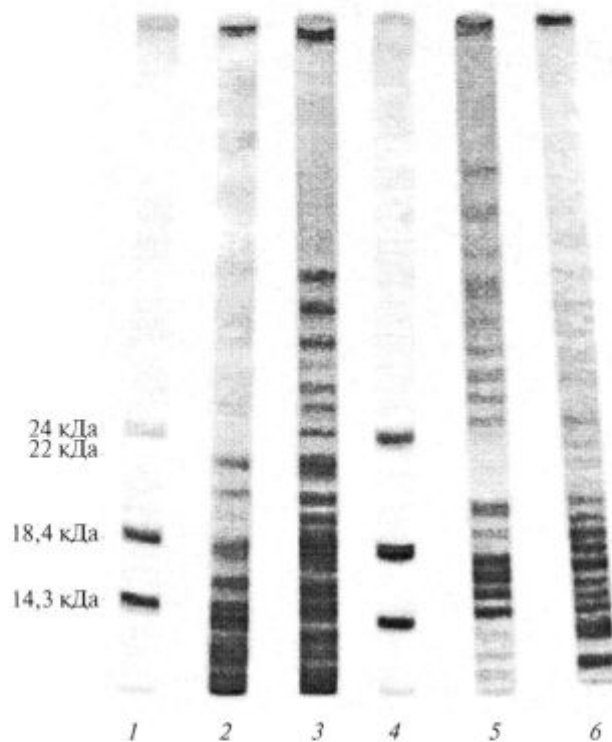


Рис. 1. Електрофореграма білкових екстрактів клітин різного походження: 1, 4 — маркер; 2 — ембріональні кардіоміоцити людини E19; 3 — фібробласти людини E16; 5 — клітини оболонки мозку людини E18B; 6 — клітини китайського хом'ячка

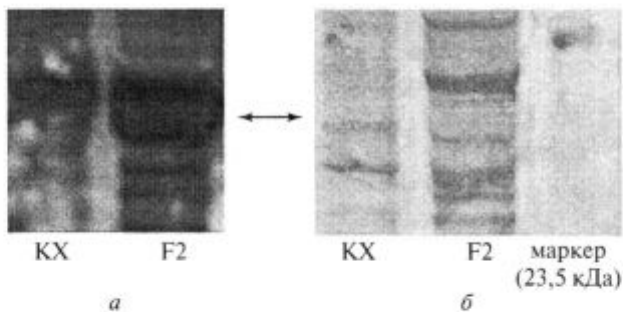


Рис. 2. Порівняльний вміст АГТ в двох клітинних лініях різного походження: а — результати імуноблотингу; б — результати гелі-електрофорезу; КХ — клон клітин китайського хом'ячка; F2 — клон клітин людини

ки, легенів, ніж в тканинах мозку, в якому клітини практично не експресують АГТ [12].

Дослідники встановили, що АГТ активність в первинних пухлинах людини майже співпадає з активністю в установлених клітинних лініях, що культивуються [7–11]. Це дозволяє

розробляти тест-системи *in vitro* для проведення досліджень чутливості пухлинних клітин до лікарських препаратів, прогнозування їхньої дії в організмі, підсилення ефективності препаратів за допомогою впливу на різні метаболічні шляхи, репаративні ферменти, в тому числі на активність АГТ.

В культурах клітин ссавців спостерігали, що більшість клітин установлених лімфобластоїдних ліній на перших етапах мають високий рівень АТ-азної активності [13], тоді, як після довготривалого культивування у значній кількості ліній ферментативна активність не виявляється [14]. Більшість іморталізованих ліній миші, одержаних за допомогою вірусу SV40, не експресують АТ-ази. Однак поява клітин, експресуючих АТ-ази, в негативних лімфобластоїдних лініях свідчить, що експресія АТ-аз може бути поновлена [15].

Деякі дані свідчать про те, що рівень АТ-азної активності зберігається протягом клітинного циклу в культурі клітин ссавців [16]. Модуляцію АТ-азної активності досліджували в клітинах і тканинах гризунів. Було показано, що агенти, які індукували АГТ активність в тканинах щурів, не завжди були ефективні в тканинах мишей та інших гризунів. Це свідчить про те, що механізми індукції, можливо, різняться у різних видів. Стосовно людини необхідно спеціально розробляти і досліджувати системи регуляції репаративної активності АГТ, бо це необхідно для оптимізації хіміотерапії онкозахворювань.

Мета роботи — визначення наявності Об-алкілгуанін-ДНК-алкілтрансферази в культурах клітин ссавців різного походження.

Матеріали і методи. При проведенні роботи використовували два клони, виділені нами при культивуванні клітин установлених ліній китайського хом'ячка лінії Bld-ii-FAF28C1237-8Glu-ts III та людини A102F2 (остання лінія люб'язно надана проф. МакКорміком). Крім того, об'єктом дослідження були культури первинних клітин людини, виділені нами з ембріональних тканин за стандартними методами [17]: кардіоміоцити E19, фібробласти E16, клітини оболонки мозку E18B. Оптимальна кількість клітин для одержання білкового екстракту приблизно 10 млн/мл.

Білковий екстракт одержували згідно з [18].

SDS-електрофорез белків проводили в 15%-ному поліакриламідному гелі за методом [19]. Маркерами слугували білки: лізоцим — 14,3 кДа, бета-лактоглобулін — 18,4 кДа, трипсиноген — 24 кДа. Гелі фарбували сріблом [20].

Western Blot аналіз використали для ідентифікації АГТ в клітинному екстракті. Моноклональні антитіла до людської АГТ одержали з фірми «Novus biologicals, Littleton Co» (США) 80160. Процедури по ідентифікації АГТ в наших пробах проводили згідно з методичними вказівками фірми-виробника. Маркером слугував білок трипсин (23,5 кДа).

Результати досліджень та їх обговорення. Було проведено електрофоретичний аналіз білкових екстрактів, одержаних з клітин людини і китайського хом'ячка, для виявлення репаративного ферменту АГТ. Досліджували клітинні культури, наведені вище. При проведенні електрофорезу в 15%-ному SDS-поліакриламідному гелі у всіх зразках, крім клітин головного мозку, в області 20–24 кДа спостерігали три смуги (рис. 1). Ми припустили, що одна з цих смуг належить даному ферменту, оскільки з літературних даних відомо, що фермент АГТ ссавців має молекулярну масу 22 кДа.

Дійсно, на електрофореграмі виявляється смуга з молекулярною масою 22 кДа, характерна для цього білка. Смуга в зоні 22 кДа виявляється у випадку ембріональних кардіоміоцитів і фібробластів людини, а також клітин китайського хом'ячка, але вона відсутня при дослідженні клітин ембріонального мозку людини. Одержані нами дані узгоджуються з літературними відомостями про те, що клітини головного мозку мають зменшений рівень АГТ, що робить їх уразливими щодо дії алкілюючих сполук, які бувають причиною онкологічних захворювань [21].

Для підтвердження того, що виявлена нами смуга в області 22 кДа відповідає ферменту АГТ, було проведено ідентифікацію цього білка за використанням стандартного Western blot аналізу. Клітинні екстракти розгоняли в 12%-ному SDS-поліакриламідному гелі. Потім проводили гібридизацію з людськими анти-АГТ-моноклональними антитілами МТ 23,2. В результаті цих досліджень була підтверджена присутність АГТ (смуга в області 22 кДа) в досліджуваних клітинах китайського хом'ячка та

людини (рис. 2). За нашими даними кількість ферменту в клітинах китайського хом'ячка істотно менше, ніж в клітинах людини, що співпадає з літературними відомостями [16].

Автори висловлюють щире подяку співробітниці відділу структури та функції нуклеїнових кислот Г.В. Овчаренко за методичну допомогу.

SUMMARY. The enzyme O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase (AGT) has been revealed to be present in human cell cultures (fibroblasts and cardiomyocytes) and chinese hamster culture cells. At the same time the enzyme AGT is not reproduced in the human brain shell culture cells.

РЕЗЮМЕ. Выявлено наличие фермента O6-алкилгуанин-ДНК-алкилтрансферазы (АГТ) в культурах клеток человека (фибробласты и кардиомиоциты) и китайского хомячка. В то же время в культурах клеток оболочки мозга человека фермент АГТ не продуцируется.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Pegg A.E. Mammalian O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylation carcinogenesis and therapeutic agents // *Cancer Res.* — 1990. — **50**, № 25. — P. 6119–6122.
2. Лукаш Л.Л., Манько В.Г., Лило В.В. Роль O6-алкілгуанін-ДНК-алкілтрансферази в репарації ушкоджень, індукованих алкілюючими сполуками // *Біополімери і клітина.* — 2001. — **17**, № 4. — С. 265–278.
3. Kyrtopoulus S.A. O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase: influence on susceptibility to the genetic effects of alkylating agents // *Toxic. Lett.* — 1998. — **102/103**. — P. 53–57.
4. McCarthy T.V., Lindahl T. Methyl phosphotriesters in alkylated DNA are repaired by the Ada regulatory protein of E.coli // *Nucl. Acids Res.* — 1985. — **113**, № 8. — P. 2683–2698.
5. Belanich M., Pastor M., Pandall T. et al. Perspective study of the correlation between the DNA repair protein alkyltransferase and survival of brain tumor patients treated with carmustine // *Cancer Res.* — 1996. — **56**, № 3. — P. 783–788.
6. Day R.S., Ziolkowski C.H.J., Scuriedo D.A. et al. Defective repair of alkylated DNA by human tumor and SV-40 transformed human cell strains // *Nature.* — 1980. — **288**. — P. 724–727.
7. Zaidi N., Liu L., Gerson S.L. Quantitative immunohistochemical estimates of O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase expression in normal and malignant human colon // *Cancer Res.* — 1996. — **2**. — P. 577–584.
8. Moriwaki S., Nishigori C., Takebe H. et al. O6-alkylguanine DNA transferase activity in human malignant melanoma // *J. Dermatol. Sci.* — 1992. — **4**. — P. 6–10.

9. Kokkinakis D.M., Ahmed M.M., Delgado R. et al. Role of O6-methylguanine-DNA-methyltransferase in the resistance of pancreatic tumors to DNA alkylating agents // *Cancer Res.* — 1997. — **57**. — P. 5360–5368.
10. Bobola M.S., Berger M.S., Ellenbogen R.T. et al. O6-methylguanine-DNA-methyltransferase in pediatric primary brain tumors: relation to patient and tumor characteristics // *Clin. Cancer Res.* — 2001. — **7**. — P. 613–619.
11. Silber J.R., Blank A., Bobola M.S. et al. O6-methylguanine-DNA-methyltransferase-deficient phenotype in human gliomas. Frequency and time to tumor progression after alkylating agent based chemotherapy // *Clin. Cancer Res.* — 1999. — **5**. — P. 807–814.
12. Harris L.C., Potter P.M., Tano K. et al. Characterization of the promoter region of O6-methylguanine-DNA-methyltransferase gene // *Nucl. Acids Res.* — 1991. — **19**. — P. 6163–6167.
13. Strauss B.S. The control of O6-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) activity in mammalian cells: a pre-molecular view // *Mutat. Res.* — 1990. — **233**. — P. 139–150.
14. Ariba J., Tachibana A., Takabe H., Tatsumi K. Pre-dominance of Mer⁺ cells in newly established human lymphoblastoid cell lines // *Carcinogenesis*. — 1989. — **10**. — P. 2067–2073.
15. Arita J., Fujimori A., Takebe H., Tatsumi K. Evidence for spontaneous conversion of Mer⁻ to Mer⁺ in human lymphoblastoid cells // *Carcinogenesis*. — 1990. — **11**. — P. 1733–1738.
16. Bauziane M., Miao F., Bates S.E., Somsouk L., Sang B.C., Denisseuko M., O'Connor T.R. Promoter structure and cell cycle dependent expression of the human methylpurine-DNA-glycosylase gene // *Mutat. Res.* — 2000. — **461**. — P. 15–29.
17. 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.
18. Morton E.N., Margison G.P. Increased O6-alkylguanine DNA alkyltransferase activity in Chinese hamster V-79 cells following selection with chloroethylating agents // *Carcinogenesis*. — 1988. — **9**. — P. 45–49.
19. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4 // *Nature*. — 1970. — **227**. — P. 680–685.
20. Heukoshoven Y., Dernick R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels // *Electrophoresis*. — 1985. — **6**. — P. 103–112.
21. Silber J.R., Blank A., Bobola M.S., Mueller B.A., Kostoe D.D., Ojemann G.A., Berger M.S. Lack of the DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase in histologically normal brain adjacent to primary human brain tumors // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1996. — **93**. — P. 6941–6948.

Надійшла 25.11.04