

О.О. КОВАЛЕНКО, І.Є. КОСТЕЦЬКИЙ, Л.Л. ЛУКАШ

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
Київ 143, вул. акад. Заболотного, 150
e-mail: lukash@imbg.org.ua

ВПЛИВ АЛЬБУМІНУ НА ЧАСТОТУ СПОНТАННИХ МУТАЦІЙ В СОМАТИЧНИХ КЛІТИНАХ ССАВЦІВ IN VITRO



Альбумін людини здатний спричиняти статистично вірогідне підвищення частоти спонтанних мутацій за локусом hprt в соматичних клітинах ссавців, що культивуються. Показана пряма залежність мутагенного ефекту від концентрації білка. Продукти деградації альбуміну виявляють антимутагенну активність в досліджуваній тест-системі.

© О.О. КОВАЛЕНКО, І.Є. КОСТЕЦЬКИЙ,
Л.Л. ЛУКАШ, 2005

Вступ. Експериментальних робіт, присвячених дослідженню мутагенної активності біологічних факторів, значно менше, ніж таких, де вивчаються фізичні та хімічні мутагени. Огляд праць в галузі біологічного мутагенезу свідчить про те, що в культурах клітин ссавців найбільш детально досліджено мутагенну дію вірусів та вірусних нуклеїнових кислот [1, 2]. Показано, що мутації в різних локусах індуються головним чином під впливом експресії раних вірусних генів, які кодують регуляторні вірусоспецифічні білки [3–6]. Саме онкогени, які відповідають за злоякісну трансформацію клітин, виявились генами-мутаторами [1, 3–7]. Принципово показана також індукція мутацій в сайтах інтеграції вірусних нуклеотидних послідовностей в клітинну ДНК [8, 9], але мутагенний ефект при інтеграційному процесі не завжди виявлявся [10].

Ще в 60-х роках минулого сторіччя Фахмі та Фахмі відкрили здатність окремих білків та синтетичних полімерів спричиняти мутації у дрозофіли; мутагенні властивості були показані також для дезоксирибонуклеази I та II, для ДНК-полімерази та зворотної транскриптази [11, 12]. Останнім часом показано, що деякі гормони білкової природи, цитокіни та інші біологічні фактори здатні впливати на спонтанний мутаційний процес [13].

Поступово сформувався уявлення про те, що білки, окрім своїх основних або канонічних функцій, мають ще й здатність інформаційно-регуляторним шляхом впливати на перебіг основних матричних процесів і в результаті — на мутаційну мінливість [14]. Та оставалось невідомим, чи притаманна ця здатність таким широко розповсюдженим і багатofункціональним білкам, як альбуміни.

Метою роботи стало дослідження впливу альбуміну людини на генетичну стабільність клітинних популяцій в культурі.

Альбумін широко використовується у медицині, і одна з його характерних ознак — це перетворення проліків у активні ліки в плазмі крові. Альбумін — основний білок плазми крові, відомий як транспортний та «базовий» білок для багатьох ендогенних та екзогенних комплексів. Цей мультифакторний білок до того ж має унікальні лігандзв'язуючі властивості, що необхідні для прояву ензимологічної активності [15]. Для аль-

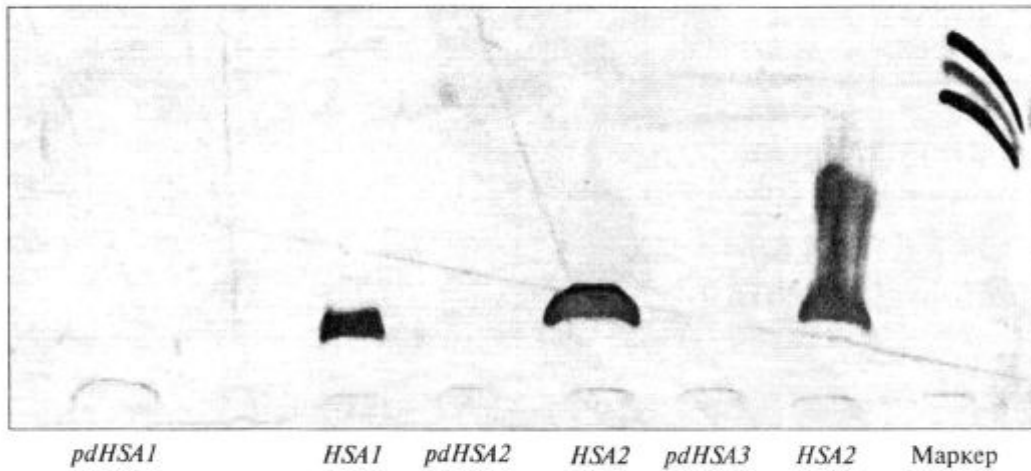


Рис. 1. Електрофореграма нативних та деградованих (pd) препаратів сироваткового альбуміну

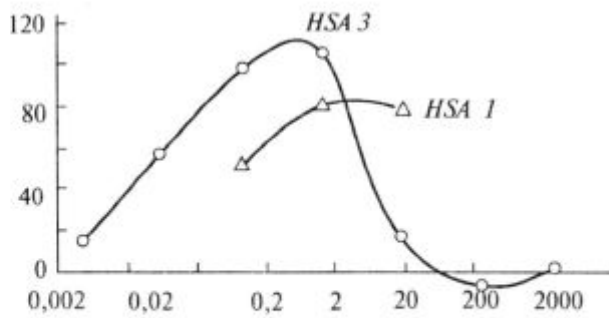


Рис. 2. Залежність частоти індукованих резистентних клонів від концентрації білка: по вертикалі — частота мутантів, $\times 10^{-5}$; по горизонталі — концентрація білка, мкг/мл

буміну характерні різні типи гідролітичної активності, серед яких найбільш відома естеразоподібна. Деякі дані свідчать про те, що альбумін здатний індукувати продукцію реактивних кисневих метаболітів в клітинах крові *in vitro* [16].

Матеріали та методи. У роботі використовували три препарати сироваткового альбуміну людини: очищений альбумін (HSA1) фірми «Reanal» (Угорщина) та два медичних препарати для ін'єкцій (HSA2, HSA3) фірми «Біофарма» (Україна). Розчини, що містили активний або деградований (pd) білок, готували на основі середовища Ігла.

Для гідролізу альбуміну використовували протеїназу К фірми «Roche Diagnostics Corp.»

Підвищення частоти клонів, резистентних до 6МП, під впливом альбуміну

№ досліду	Варіанти	Концентрація білка, мкг/мл	Досліджена вибірка, n	Ефективне клонування	Резистентні клони		Частота за виражуванням контролю	Відношення дослід/контроль	P
					кількість	частота			
1	Контроль		200 000	0,40	93	116,25	—	—	—
	HSA1	0,2	250 000	0,396	168	169,70	53,45	1,46	< 0,001
		2	300 000	0,228	135	197,37	81,1	1,70	< 0,001
		20	150 000	0,371	109	195,87	79,62	1,68	< 0,001
2	Контроль		300 000	0,393	11	9,33	—	—	—
	HSA1	20	250 000	0,395	29	29,37	20,04	3,15	< 0,001
3	Контроль		300 000	0,391	5	4,26	—	—	—
	HSA1	20	300 000	0,301	48	53,16	48,9	12,48	< 0,001
4	Контроль		250 000	0,69	300	173,91	—	—	—
	HSA1	20	250 000	0,307	376	489,90	315,99	2,82	< 0,001

Примітки. 1. Тривалість обробки клітин в експериментах 1 та 4 становила 3 год, в експериментах 2 та 3 — 18 год. 2. Час експресії мутацій в експериментах 1 та 4 становив 4 доби, в експериментах 2 і 3 — 8 діб.

(Німеччина). Деградацію білка проводили при температурі 36,6 °С протягом 14 год, після цього протеїназу К інактивували при 90—95 °С протягом 15 хв. Якість проведення реакції перевіряли за допомогою електрофорезу (рис. 1).

Як об'єкт дослідження слугував клон клітин китайського хомячка *Bld-ii-FAF28C1237-8Glu^{rs}III*, що характеризується чутливістю до дії аналогів пуринових основ. Завдяки цьому дана тест-система дозволяє вивчати індукцію прямих мутацій за локусом *hprt*. Селекцію мутантних клонів проводили в середовищі Ігла за присутності 6-меркаптопурина (6МП) в концентрації 60 мкг/мл. Схема експериментів по дослідженню частоти мутацій резистентності до 6МП описана нами раніше [17].

Обробку клітин білковими препаратами проводили на протязі 4 та 18 год. Перед проведенням обробки і після обробки клітини двічі промивали середовищем Ігла. Як позитивний контроль в цій серії дослідів слугував простий алкілюючий агент МННГ в концентрації 0,5 мкг/мл, досліджений нами детально [18].

Результати досліджень та їх обговорення. За використанням препарату очищеного альбуміну (*HSA1*) було встановлено, що цей білок здатний спричиняти статистично вірогідне підвищення частоти мутацій резистентності до 6МП в даній тест-системі за досліджуваних умов експерименту (таблиця). Ефект індукції мутацій був найбільш виражений при концентраціях білка 2 та 20 мкг/мл. В іншій серії експериментів нами було показано, що саме за цих концентрацій спостерігається зміна біологічної активності від стимуляції до гальмування проліферації досліджуваних клітин китайського хомячка [19]. Кратність зростання частоти мутантів або відношення показників частоти мутантів в дослідних варіантах до контрольних дещо зростала при збільшенні тривалості обробки від 4 до 18 год. Ефект альбуміну можна співставити з мутагенною дією МННГ [18].

При дослідженні очищеного альбуміну (*HSA1*) та медичного препарату (*HSA3*) було показано, що в певному діапазоні концентрацій спостерігається пряма залежність частоти

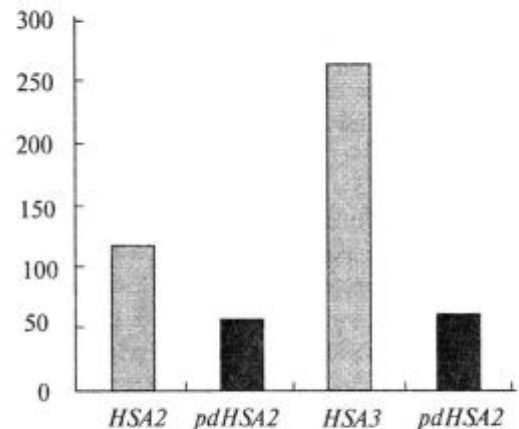


Рис. 3. Порівняння впливу активного альбуміну і продуктів деградації цього білка на частоту клонів, резистентних до 6МП: по вертикалі — частота мутантів, $\times 10^{-5}$

ти індуктованих мутантних клонів від концентрації білка (рис. 2). Але при дії очищеного білка при концентраціях 2—20 мкг/мл спостерігався ефект насичення, а при дії медичного препарату після максимуму при концентрації білка 2 мкг/мл виявлялось різке зниження частоти мутантів.

Виникало питання, чи дійсно причиною індукції мутацій є білок, а не низькомолекулярні домішки, що можуть бути присутні у препаратах. Це особливо стосується медичних препаратів, при приготуванні яких застосовуються стабілізатори та консерванти. Для відповіді на це питання порівнювали дію двох білкових препаратів (*HSA2* та *HSA3*) і цих же препаратів після проведення деградації білка (рис. 3). Було показано, що деградація білка призводить до статистично вірогідного зниження частоти резистентних клонів ($P > 0,001$).

Таким чином, індукція мутацій пов'язана саме з активним білком, а не з присутністю низькомолекулярних домішок. Цікаво відзначити, що при дії деградованого білка частота мутантів була навіть нижчою, ніж в інтактному контролі. Це свідчить про антимутагенний вплив суміші амінокислот на спонтанний мутагенез в досліджуваній клітинній системі.

SUMMARY. Human albumin is able to induce statistically significant increasing of the frequency of spontaneous mutations in the *hprt* locus in cultured somatic mammalian

cells. The strait dependence of the mutagenic effect on the protein concentration has been shown. The products of albumin degradation reveal antimutagenic activity in the investigated test-system.

РЕЗЮМЕ. Альбумин человека способен вызывать статистически достоверное повышение частоты спонтанных мутаций по локусу *hprt* в культивируемых соматических клетках млекопитающих. Показана прямая зависимость мутагенного эффекта от концентрации белка. Продукты деградации альбумина проявляют антимутагенную активность в исследуемой тест-системе.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Лукаш Л.Л. Дестабилизация клеточного генома под влиянием экспрессии ранних регуляторных генов онковирусов // Цитология и генетика. — 2002. — 36, № 2. — С. 68—80.
2. Лукаш Л.Л. Биологические мутагены: их влияние на стабильность эукариотических клеточных систем // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2003. — 1, № 1. — С. 62—81.
3. Pilon L., Langelier L., Royal A. Herpes simplex virus type 2 mutagenesis: characterization of mutants induced at the *hprt* locus of nonpermissive XC cells // Mol. Cell. Biol. — 1986. — 6, № 8. — P. 2977—2983.
4. Lukash L.L., Buzhievskaya T.I. Role of early viral genes in mutagenesis // Biotechnology. Current progress. — Lancaster : Techn. Publ. Comp., Inc., 1991. — P. 119—132.
5. Das C.M., Zhang S., Shillito E.J. Expression of the mutagenic peptide of herpes simplex virus type 1 in virus infected cells // Virus Res. — 1994. — 34, № 2. — P. 97—114.
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. Бобрышева И.В., Варшавер Н.Б. Характеристика мутантов, индуцированных онкогеном *c-Ha-ras1*, и природа мутагенного действия онкогена // Генетика. — 1995. — 31, № 12. — С. 1598—1604.
8. Doerfler W. Uptake, fixation and expression of foreign DNA in mammalian cells: the organization of integrated adenovirus DNA sequences // Curr. Top. Microbiol. Immunol. — 1982. — 101. — P. 128—188.
9. Hausen H. zur. Viruses in Human Cancers // Eur. J. Cancer. — 1999. — 35, № 8. — P. 1174—1181.
10. Попов Л.С., Горбунова Л.В., Варшавер Н.Б. Интеграция ДНК ОВ40 в геном клеток и вирусный мутагенез // Генетика. — 1986. — 22, № 9. — С. 2213—2219.
11. Гершензон С.М., Александров Ю.Н., Малюта С.С. Мутагенное действие ДНК и вирусов у дрозофилы. — Киев : Наук. думка, 1975. — 158 с.
12. Hoffman J.S., Pillaire M.J., Garcia-Estefania D. et al. In vitro bypass replication of the cisplatin-d(GpG) lesion by calf thymus DNA polymerase beta and human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase is highly mutagenic // J. Biochem. Chem. — 1996. — 271, № 26. — P. 15386—15392.
13. Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Мутагены. Скрининг и фармакологическая профилактика воздействия. — М.: Медицина, 1998. — 365 с.
14. Лукаш Л.Л. Регуляция изменчивости генома соматических клеток млекопитающих под влиянием экзогенных биологических факторов // Биополимеры и клетка. — 2004. — 20, № 1/2. — С. 93—105.
15. Krahn-Hansen U., Chuang V.T.G., Otagiri M. Practical aspects of the ligand and Enzymatic Properties of Human Serum Albumin // Biol. Pharm. Bull. — 2002. — 25(6). — P. 695—704.
16. Walters I.D., Spangenberg A., Menzabach A., Engel J., Menges T., Langefeld T.W., Hempelmann G. Der Einfluss verschiedener Volumenersatzmittel auf die Funktion von neutrophilen Granulozyten in vitro // Der Anaesthetist. — 2000. — 49. — P. 196—201.
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. 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-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the HPRT gene of diploid human fibroblasts // Mutat. Res. — 1991. — 250. — P. 397—409.
19. Дослідження ролі репарації ДНК в прояві мутагенної та антимутагенної активності деяких білків // Заключний звіт відділу генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України 2001—2004 рр. — 109 с.

Надійшла 16.03.05