

Л. Л. Лукаш, С. В. Подольская, Е. М. Сухорада,
Е. В. Костецкая, И. Е. Костецкий, И. С. Варзанова,
Ю. В. Пацковский, И. В. Вавилина, С. В. Дейс

ВЛИЯНИЕ АЛКИЛИРУЮЩЕГО АГЕНТА МННГ НА МУТАГЕННЫЙ ЭФФЕКТ ЭКЗОГЕННОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ ДНК

В работе исследована возможная мутагенная активность трех рекомбинантных плазмид pBR322ins, pAins, pGins. Через три дня после трансфекции клеток китайского хомячка в случае двух (pBR322ins, pAins) из них обнаружен мутагенный эффект. Частота мутантов уменьшалась к девятому дню после трансфекции. Мутагенная активность рекомбинантных плазмид, по-видимому, зависит от присутствия нуклеотидных последовательностей, происходящих от исходных плазмид, а не от гена инсулина из генома человека. В случае pAins, скорее всего, она определяется присутствием A11-последовательности, которая переклонирована из плазмиды pAL1. Алкилирующий агент МННГ усиливал мутагенный эффект экзогенных ДНК на 10-е сутки после трансфекции.

Введение. Цель настоящей работы состояла в оценке влияния экзогенных рекомбинантных молекул на спонтанный и химический мутагенез в культивируемых клетках млекопитающих. Эти рекомбинантные ДНК были сконструированы специально для разработки подходов к генной терапии инсулинзависимого сахарного диабета. Их функциональная активность тестировалась в соответствующих модельных системах. Первоочередным было изучение возможной мутагенной активности трех рекомбинантных плазмид pBR322ins, pAins, pGins, содержащих ген препроинсулина из генома человека, и исходных плазмид, которые использовались для их конструирования. Вторая задача заключалась в оценке совместного мутагенного эффекта экзогенной ДНК и простого алкилирующего агента N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина (МННГ).

Материалы и методы. В качестве модельной системы использовали клетки китайского хомячка Bhd-li-FAF28, клон 237. Эффективность клонирования этих клеток колебалась от опыта к опыту в пределах от 20 до 70 %. Клетки культивировали в стандартной среде Игла с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота и антибиотиков. Для селекции мутантных клеток применяли селективную среду, в которую добавляли 6-меркаптопурин (6-МП) в концентрации 30 или 60 мкг/мл. Эксперименты по мутагенезу детально описаны [1, 2].

Конструирование рекомбинантных молекул и тестирование их функциональной активности осуществляли по [3]. В качестве источника гена препроинсулина человека использовали рестрикционный фрагмент *BglII-Taql* [4].

Экзогенную ДНК (10 мкг/мл) вводили в клетки с помощью кальций-фосфатного метода [5, 6]. В ряде экспериментов использовали ДНК, метилированную с помощью диметилсульфата [7].

Алкилирующим агентом МННГ в концентрации 2—4 мкМ клетки обрабатывали через 3 ч после трансфекции.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 представлены частоты мутантов, резистентных к 6-меркаптопурину (МП), обнаруженные в кон-

© Л. Л. Лукаш, С. В. Подольская, Е. М. Сухорада, Е. В. Костецкая, И. Е. Костецкий,
И. С. Варзанова, Ю. В. Пацковский, И. В. Вавилина, С. В. Дейс, 1995

трольных и опытных вариантах. Через три дня после трансфекции клеток китайского хомячка в случае двух (*pBR322ins*, *pAins*) из трех рекомбинантных плазмид наблюдался мутагенный эффект. Для третьей рекомбинантной плазмиды *pGins* он выявлен не был. После трансфекции клеток первыми двумя плазмидами частота мутантов соответственно в два и четыре раза превышала контрольный уровень (14 и 36 индуцированных мутантов на 10^5 жизнеспособных клеток, образующих клоны). Согласно критерию Фишера, различие между контролем и опытом высокодостоверно ($P < 0,001$). Мутагенный эффект *pAins* обнаружен нами ранее при использовании другого метода трансфекции [9]. Частота мутантов уменьшалась к девятому дню после трансфекции.

Мутагенная активность рекомбинантных плазмид, по-видимому, зависит от присутствия нуклеотидных последовательностей, происходящих от исходных плазмид, а не от гена препроинсулина человека. Для *pAins*, вероятно, она определяется присутствием *Alu*-последовательности из генома человека, которая переклонирована из плазмиды *pALI*.

Показан синергидный мутагенный эффект при совместном действии на клетки экзогенной ДНК и МННГ через 8—10 дней после обработки клеток (табл. 2). К этому времени мутагенный эффект рекомбинантных и исходных плазмид уже не обнаруживался. МННГ без ДНК вызывал статистически достоверный мутагенный эффект, который существенно увеличивался при совместном действии на клетки алкилирующего агента и ДНК (30—50 индуцированных мутантов на 10^5 жизнеспособных клеток). При использовании метилированной ДНК синергидный эффект еще ярче выражен (70—100 индуцированных мутантов на 10^5 жизнеспособных клеток).

Таблица 1

Частота мутантов, устойчивых к 6-меркаптопурину, индуцированных рекомбинантными ДНК в клетках китайского хомячка

Вариант	Число обнаруженных колоний	Эффективность клонирования во время селекции	Число мутантов на 10^5 клонируемых клеток	Число индуцированных мутантов на 10^5 клонируемых клеток	P
Время экспрессии — 3 дня					
Контроль	11	0,26	8,46	—	> 0,05
<i>ins</i>	12	0,19	12,63	4,17	< 0,001
<i>pBR322</i>	17	0,18	18,89	10,43	< 0,001
<i>pBR322ins</i>	21	0,19	22,10	13,64	> 0,05
<i>pGins</i>	11	0,25	8,80	0,34	> 0,05
<i>pUC18</i>	8	0,20	8,89	0,43	< 0,001
<i>pAins</i>	44	0,20	44,00	35,54	> 0,05
9 дней					
Контроль	9	0,28	6,43	—	> 0,05
<i>ins</i>	22	0,60	7,33	0,90	> 0,05
<i>pBR322</i>	9	0,43	4,19	-2,24	> 0,05
<i>pBR322ins</i>	22	0,77	5,71	-0,74	> 0,05
<i>pGins</i>	9	0,39	4,61	-1,82	> 0,05
<i>pUC18</i>	8	0,35	4,57	-1,86	> 0,05
<i>pAins*</i>	8	0,18	9,88	3,45	> 0,05
3 дня					
Контроль	17	0,19	17,89	—	> 0,05
<i>pBR322</i>	21	0,14	30,00	12,11	< 0,001
<i>pBR322ins</i>	27	0,17	31,76	13,87	< 0,001
<i>pGins</i>	17	0,16	21,25	3,36	> 0,05
<i>pUC18</i>	22	0,23	19,13	1,24	> 0,05
<i>pALI</i>	43	0,17	50,59	32,70	< 0,001
<i>pAins</i>	38	0,14	54,28	36,39	< 0,001

Примечание. Концентрация ДНК 10 мкг/мл. В каждом варианте изучено $5 \cdot 10^5$ клеток. * Исследовано $4,5 \cdot 10^5$ клеток.

Таким образом, рекомбинантные ДНК могут реально влиять на мутационный процесс в культивируемых клетках млекопитающих. Ранее нами было показано, что в присутствии рекомбинантной плазмиды *pBR325*, содержащей трансформирующую область онкогенного бычьего аденовируса типа 3 (БАВ-3) или раннюю область вируса герпеса простого типа 1 (ВПГ-1), также увеличивалась частота мутантов, резистентных к 6-МП [10, 11]. Мутагенная активность в этих случаях, по-видимому, обусловлена наличием вирусных трансформирующих генов, так как исходная плаزمида *pBR325* не влияла на уровень генных мутаций по локусу ГФРТ в сторону увеличения. В то же время рестрикционный фрагмент ДНК, включающий трансформирующую область БАВ-3, также вызывал возрастание уровня индуцированных мутантов [12].

Результаты этой работы свидетельствуют о том, что бактериальной плазмиде *pBR322* присуща мутагенная активность. Это, скорее всего, зависит от определенной нуклеотидной последовательности. Другая бактериальная плазмида *pUC18* не проявляла подобной активности. В то же время очень похожая плазмида *pUC19*, имеющая последовательность из 51 пары нуклеотидов в другой ориентации, была мутагенной для клеток китайского хомячка [9].

Мутагенные свойства *pAL1* и *pAins*, вероятно, зависят от присутствия *Ain*-последовательности из генома человека.

Наличие экзогенной ДНК в клетках, особенно метилированной, делало их более чувствительными к мутагенному действию МННГ. В присутствии любой ДНК и МННГ наблюдался синергидный мутагенный эффект. Эти данные согласуются с ранее полученными для других рекомбинантных ДНК и МННГ [14]. Таким образом, этот фе-

Таблица 2

Частота мутантов, резистентных к 6-меркаптопурину, индуцированных совместным действием ДНК и МННГ на клетки китайского хомячка

Вариант	Число мутагных колоний	Эффективность клонирования во время селекции	Число мутантов на 10^6 жизнеспособных клеток	Число индуцированных мутантов на 10^6 жизнеспособных клеток	Число индуцированных мутантов без эффекта МННГ*
Контроль*	30	0,71	4,22	—	—
<i>ins</i>	10	0,46	4,35	0,13	—
<i>pUC18</i> **	7	0,69	2,54	-1,68	—
<i>pAL1</i>	3	0,64	0,94	-3,28	—
<i>pAins</i>	3	0,62	0,97	-3,25	—
<i>pGins</i> **	7	0,82	2,13	-2,09	—
МННГ	113	0,58	19,43	15,26	—
<i>ins</i> +МННГ	101	0,27	74,81	70,59	55,33
<i>pUC18</i> +МННГ***	55	0,26	47,01	42,79	27,53
<i>pAL1</i> +МННГ	100	0,29	68,96	64,74	49,48
<i>pAins</i> +МННГ	86	0,28	61,43	57,21	41,95
<i>pGins</i> +МННГ	110	0,40	55,00	50,78	35,52
Контроль	2	0,28	1,43	—	—
<i>pAins</i>	3	0,15	4,00	2,57	—
<i>mpAins</i>	3	0,36	1,67	0,24	—
МННГ	65	0,26	50,00	48,57	—
<i>pAins</i> +МННГ	97	0,20	97,00	95,57	47,00
<i>mpAins</i> +МННГ	40	0,18	155,56	154,13	105,43
Контроль	20	0,41	9,76	—	—
<i>pAins</i>	31	0,38	16,31	6,55	—
<i>mpAins</i>	11	0,27	8,15	-1,61	—
МННГ	104	0,37	56,22	46,46	—
<i>pAins</i> +МННГ	184	0,43	85,58	75,82	29,36
<i>mpAins</i> +МННГ***	124	0,22	125,25	115,49	69,03

Примечание. Концентрация ДНК 10 мкг/мл, МННГ — 4 мкМ. В большинстве вариантов изучено по $5 \cdot 10^6$ клеток. Разница между совместным эффектом двух факторов и эффектом МННГ статистически достоверна, $P < 0,001$. *mpAins* — метилированная ДНК плазмиды *pAins*. * Исследовано $1 \cdot 10^6$; ** $4,0 \cdot 10^6$ и *** $4,5 \cdot 10^6$ клеток.

номен не зависит от мутагенной способности самой ДНК. Мы предполагаем, что наличие большого числа молекул двунитчатой ДНК (особенно метилированной) в клетке ингибирует специфическую O⁶-алкилгуанин-ДНК-алкилтрансферазную активность (АГТ). Известно, что двунитчатая ДНК является хорошим субстратом для этого белка, причем он специфически взаимодействует с O⁶-метилгуанином [15], перенося метильную группу на собственный цистеиновый остаток. При этом происходит необратимое связывание, способствующее инактивации фермента. Свободный O⁶-метилгуанин, присутствующий в культуральной среде, по-видимому, ингибирует ферментативную активность не столь активно. Несколько лет тому назад было показано, что свободный O⁶-метилгуанин, хотя и увеличивал мутагенную активность МННГ, но не столь радикально, как в наших исследованиях [16]. Еще более эффективным ингибитором репарации является O⁶-бензилгуанин, с помощью которого удалось показать доминирующую роль АГТ-активности в репарации повреждений, индуцированных МННГ в нормальных фибробластах человека [17]. O⁶-бензилгуанин практически полностью подавляет АГТ-активность и позволяет выявлять полный мутагенный эффект алкилирующего агента МННГ.

Л. Л. Лукаш, С. В. Подольска, О. М. Сухорада, К. В. Костецька, І. Є. Костецький, І. С. Варзанова, Ю. В. Пацковський, І. В. Вавіліна, С. В. Дейс

ВЛИВ АЛКІЛЮЮЧОГО АГЕНТА МННГ НА МУТАГЕННИЙ ЕФЕКТ ЕКЗОГЕННОЇ РЕКОМБІНАНТНОЇ ДНК

Резюме

В роботі досліджено можливу мутагенну активність трьох рекомбінантних плазмід *pBR322ins*, *pAins*, *pGins*. Через три доби після трансфекції клітин китайського хом'яка у випадку двох (*pBR322ins*, *pAins*) із них помічено мутагенну дію. Частота мутантів зменшувалася протягом дев'яти днів після трансфекції. Мутагенна активність рекомбінантних плазмід, очевидно, залежить від присутності нуклеотидних послідовностей, які походять від вихідних плазмід, а не від гена інсуліну із геному людини. У випадку *pAins*, скоріш за все, вона визначається присутністю Alu-послідовності, яка переклонована з плазмід *pALI*. Алкілюючий агент МННГ підсилював мутагенну дію екзогенних ДНК на 10-й день після трансфекції.

L. L. Lukash, S. V. Podolskaya, H. M. Suhorada, K. V. Kostetskaya, I. E. Kostetsky, I. S. Varzanova, Yu. V. Patkovsky, I. V. Vavilina, S. V. Deis

THE INFLUENCE OF ALKYLATING AGENT MNNG ON MUTAGENIC EFFECT OF EXOGENEOUS RECOMBINANT DNA

Summary

The possible mutagenic activity of three recombinant plasmids *pBR322ins*, *pAins*, *pGins* has been investigated in this work. In three days after transfection two (*pBR322ins*, *pAins*) out of three recombinant plasmids revealed mutagenic effect in chinese hamster cells. The mutation frequency decreased to ninth day after transfection. The mutagenic activity of recombinant plasmids presumably depends on the presence of nucleotide sequences which were coming from parental plasmids but not on insulin gene from human genome. Mutagenic activity of *pAins* probably was determined by the presence of Alu sequence that was recloned from plasmid *pALI*. The alkylating agent MNNG increased the mutagenic effect of exogeneous DNA on 10th day after transfection.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Lukash L. L., Buzhievskaya T. I., Varshaver N. B., Shapiro N. I. Oncogenic adenovirus as mutagen for Chinese hamster cells *in vitro* // *Somat. Cell. Genet.*—1981.—7, N 2.—P. 133—146.
2. Буживевская Т. И., Лукаш Л. Л., Подольская С. В. Экспериментальные модели для изучения мутагенеза и трансформации, индуцированных вирусами и нуклеи-

- новыми кислотами // *Методы молекуляр. биологии.*— Киев: Наук. думка, 1986.— С. 147—158.
3. Korayum V. A., Frotkis V. I., Lukash L. L. et al. Gene therapy of mass pathologies // *Biopolymers and Cell.*— 1993.— 9, N 4.— P. 63—104.
 4. Неборачко Л. Н., Лукаш Л. Л., Трояковский Б. М. и др. Изучение возможности экспрессии экзогенного гена инсулина человека в культивируемых клетках млекопитающих // *Биополимеры и клетка.*— 1989.— 5, № 2.— С. 58—61.
 5. Graham F. L., Van der Eb A. J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA // *Virology.*— 1973.— 52, N 3.— P. 456—467.
 6. Van der Eb A. J., Graham F. L. Assay of transforming activity of tumor virus DNA // *Meth. Enzymol.*— 1980.— 65, N 3.— P. 826—839.
 7. Leng M., Rosilio C., Boudet J. Etude des effets de la methylation sur le comportement de l'acide deoxyribonucleique // *Biochim. et biophys. acta.*— 1968.— 174, N 2.— P. 674—684.
 8. Domoradski J., Pegg A. E., Dolan M. E. et al. Correlation between O⁶-methyltransferase activity and resistance of human cells to the cytotoxic and mutagenic effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine // *Carcinogenesis.*— 1984.— 5.— P. 1641—1647.
 9. Рубашевский Е. Л., Пацковский Ю. В., Подольская С. В. и др. Индукция мутаций резистентности к 6-меркаптопурину в клетках китайского хомячка под действием рекомбинантной плазмиды pAnis, содержащей ген инсулина человека // *Цитология и генетика.*— 1993.— 27, № 3.— С. 63—68.
 10. Lukash L. L., Varshaver N. B., Buzhievskaya T. I., Shapiro N. I. The oncogene of BAV-3 as a mutagen // *J. Cell. Sci.*— 1985.— 78.— P. 97—103.
 11. Buzhievskaya T. I., Lukash L. L., Rubashevsky E. L. Mutagenic and transforming action of some viruses, genes and recombinant molecules // *Biotechnology (PA 17604, USA).*— Lancaster: Curr. progr. techn. publ. Co., 1991.— P. 133—156.
 12. Lukash L. L., Buzhievskaya T. I. Role of early genes in mutagenesis // *Ibid.*— P. 119—131.
 13. Рубашевский Е. Л., Пацковский Ю. В., Лысенко Е. Ф. и др. Мутагенный эффект рекомбинантной плазмиды pBR322ins, содержащей нативный и измененный ген инсулина человека // *Цитология и генетика.*— 1993.— 27, № 4.— С. 44—51.
 14. Лукаш Л. Л. Корреляция мутагенеза и злокачественной трансформации. Эволюционные аспекты // *Генетические последствия загрязнения окружающей среды.*— Киев: Наук. думка, 1989.— С. 121—143.
 15. Dolan M. E., Pegg A. E. Extent of formation of O⁶-methylthymine in calf thymus DNA methylated by N-methyl l-N-nitrosourea and lack of repair of this product by rat liver O⁶-alkylguanine DNA-alkyltransferase // *Carcinogenesis.*— 1985.— 6.— P. 1611—1614.
 16. Domoradski J., Pegg A. E., Maher A. E. et al. Depletion of O⁶-alkylguanine-DNA methyltransferase in human cells increases the mutagenic response to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine // *Ibid.*— P. 1823—1826.
 17. Lukash L. L., Boldt J., Pegg A. E. et al. 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.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
НАН Украины, Киев

Получено 30.08.94