

## Індукція генних мутацій лектинами різного походження та цитокином ЕМАР II в соматичних клітинах ссавців *in vitro*

О. О. Коваленко, Л. Л. Лукаш, С. І. Лукаш

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

lukash@imbg.org.ua

---

*Екзогенні вуглеводз'язувальні білки – три лектини різного походження та цитокин ЕМАР II виявили здатність індукувати мутації за локусом *hprt* у клітинах китайського хом'ячка *in vitro*. При дослідженні їхньої біологічної дії в широкому діапазоні доз (від 0,002 до 2000 мкг/мл) визначено пряму залежність мутагенного ефекту від концентрації чужорідного білка в клітинній системі. Як показало математичне моделювання, результуюча крива залежності частоти мутантів від концентрації для ЕМАР II є складовою трьох процесів: перший протікає з насиченням, другий – з лінійною залежністю від дози, а третій описується нелінійним рівнянням другого ступеня. Мутагенна активність лектинів реалізується за останнім рівнянням і характеризується поступовим підвищенням частоти мутантів із зростанням концентрації білка.*

*Ключові слова: клітина ссавців, цитокин, лектин, резистентність до б-меркаптопурину, мутації, локус *hprt*, апоптоз, математичне моделювання.*

---

**Вступ.** Досліджувані нами екзогенні вуглеводз'язувальні білки мають різноманітні біологічні функції і здатні впливати на такі внутрішньоклітинні процеси, як адгезія, міграція, апоптоз, проліферація та диференціація. Свій вплив вони здійснюють через чисельні сигнальні шляхи клітини [1–3]. Одним з найменш досліджених питань є можлива участь екзогенних чужорідних білків у генетичних процесах, а саме – у процесах мутагенезу та репарації пошкоджень ДНК клітини-реципієнта. Раніше нами показано здатність одного з лектинів бузини чорної індукувати як первинні пошкодження ДНК, так і генні мутації [4–7]. Цитокин ЕМАР II (ендотеліальний та

моноцитаривуючий поліпептид II) – це мультифункціональний білок-медіатор, який має як цитокинову, так і РНК-зв'язувальну функції. ЕМАР II спричинює ефект апоптозу, а також є фактором антиангіогенезу при розвитку судинної системи пухлин; крім того, він виконує низку важливих функцій при ембріогенезі [8, 9].

Метою даної роботи було дослідити закономірності дії вуглеводз'язувальних білків – різних за походженням та вуглеводною специфічністю лектинів і цитокину ЕМАР II на спонтанний мутаційний процес у соматичних клітинах ссавців *in vitro*.

**Матеріали і методи.** Всі експерименти виконували з використанням клітин китайського хом'ячка лінії B11d-ii-FAF28C1237-8Glu-tsIII, яким притаманна чутливість до дії аналогів пуринових

основ, у тому числі 6-меркаптопурину (6-МП). Завдяки цьому застосована тест-система дозволяє вивчати індукцію прямих рецесивних мутацій за локусом гіпоксантин-гуанін-фосфорибозилтрансферази (*hprt*).

Як біологічні чинники використано комерційні препарати лектинів рослинного (кори бузини чорної *Sambucus nigra* – ЛБЧ та насіння сочевиці *Lens culinaris* – ЛНС) і тваринного (ікри окуня *Persa fluviatilis* – ЛЮ) походження виробництва фірми «Лектинотест» (Україна). Білок цитокін ЕМАР II був експресований у клітинах *Escherichia coli* і очищений до гомогенного стану (не менше 95 %) методом металхелатуючої хроматографії на Ni-NTA агарозі, як описано раніше [10]. Біологічну дію білків досліджували у широкому діапазоні концентрацій (від 0,002 до 2000 мкг/мл). Клітини обробляли кожним із досліджуваних білків протягом 3–4 год у середовищі MEM за відсутності ембріональної сироватки (ЕС) великої рогатої худоби. Позитивним контролем слугував алкілувальний агент N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин (МННГ) у концентрації 500 нг/мл; обробка клітин тривала 1 год у безсироватковому середовищі [15]. Методику проведення експериментів з індукції генних мутацій за локусом *hprt* детально описано раніше [14]. Час експресії мутацій становив 3–4 доби в різних експериментах. Селекцію мутантів проводили з додаванням у культуральне середовище 6-МП у концентрації 60 мкг/мл. Частоту резистентних до 6-МП клонів визначали з урахуванням ефективності клонування.

Для дослідження успадкування та природи резистентності до 6-МП клони клітин незалежного походження, які виростили в селективному середовищі різних варіантів, знімали за допомогою стерильних Cloning Disks («Scienceware», США), переносили у стандартне ростове середовище з 10 %-м вмістом ЕС і культивували протягом 20–25 пасажів. Після цього аналізували ефективність клонування клітин досліджуваних клонів на різних селективних середовищах: з додаванням 6-МП, 6-тіогуаніну (6-ТГ), 8-азагуаніну (8-АГ) та аміноптерину у концентраціях 60, 10, 30 і 0,003 мкг/мл відповідно [16]. Одержані результати порівнювали з даними ефективності клонування в ростовому середовищі та се-

редовищі АТГ («ПанЭко», РФ), на якому здатні рости лише клітини з активним або частково активним ферментом гіпоксантин-гуанін-фосфорибозилтрансферазою (ГГФРТ). Клітини з прямими мутаціями за локусом *hprt*, які призводять до втрати активності ферменту ГГФРТ, не здатні розмножуватися на середовищі АТГ, але утворюють колонії на інших селективних середовищах.

Статистичну обробку одержаних даних здійснювали за критерієм Фішера і проводили математичне моделювання мутаційного процесу, індукваного біологічними чинниками.

**Результати і обговорення.** Результати двох експериментів з вивчення біологічної дії цитокіну ЕМАР II у діапазоні концентрацій від 2 до 200000 нг/мл виявилися дуже близькими і тому були усереднені. У всіх використаних концентраціях білок спричиняв статистично вірогідне підвищення частоти мутацій резистентності до 6-МП.

Дію білка в концентрації  $C$  на мутаційний процес у популяціях клітин китайського хом'ячка на прикладі прямих мутацій за локусом *hprt* можна репрезентувати як спільний ефект перебігу трьох біологічних процесів зі своїми механізмами:

$$F = \frac{F_1 + F_2 + F_3}{n} \quad (1)$$

де  $F$  – частота мутантів в експерименті;  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_3$  – частоти мутантів, одержаних при дії кожного окремого процесу. Взагалі ці три процеси можуть бути як залежними, так і незалежними один від одного. Такої вибраної кількості процесів, розглянутої нами, цілком достатньо для певного уявлення про взаємодію клітин з молекулами білка за умови існуючої похибки вимірів у 10 %.

Перший процес  $F_1$  може викликати мутагенний ефект із насиченням до частоти мутантів  $F_{01} = 205$  при значеннях концентрації  $C = 2$  мкг/мл:

$$F_1 = F_{01} (1 - e^{-C}), \quad (2)$$

де параметр  $F_{01}$  – максимально можливе значення частоти мутантів при заданих умовах;  $\ln(C)$  – функція від концентрації білка. Тобто відповідно до цього механізму мутагенний ефект проявляється лише в інтервалі концентрацій  $\{C_1, C_2\}$ , де  $C_1 =$

= 0,002 і  $C_2 = 2$  мкг/мл. Для  $C > C_2$  збільшення концентрації не впливає на величину ефекту.

Другий процес призводить до мутагенного ефекту з лінійною залежністю від параметра в усьому діапазоні досліджуваних концентрацій. Знак мінус свідчить про зменшення ефекту при зростанні діючої концентрації. Параметр  $F_{02} = 30$  відображає початкові умови;  $f_{02} = 12$  – величина спонтанного мутагенезу:

$$F_2 = (F_{02} - f_{02}) \cdot C \quad (3)$$

Третій процес описується нелінійним рівнянням другого ступеня і в нашому випадку може бути представлений квадратичною залежністю ефекту з параметром  $F_{03} = 2,5$  і спонтанним мутагенезом  $f_{03} = 12$ :

$$F_3 = F_{03} \cdot C^2 + f_{03} \cdot C \quad (4)$$

Значення параметра  $F_{0x}$ , де  $x = 1, 2, 3$ , можуть свідчити про початкові характеристики досліджуваних клітин і білків. Порівняння цих параметрів з аналогічними для інших об'єктів може дати нові дані про взаємодію клітина–білок.

Похибка підрахунку мутантів  $F$  у вимірах умовно прийнята рівною  $\pm 10\%$  і постійна за усім діапазоном вимірів.

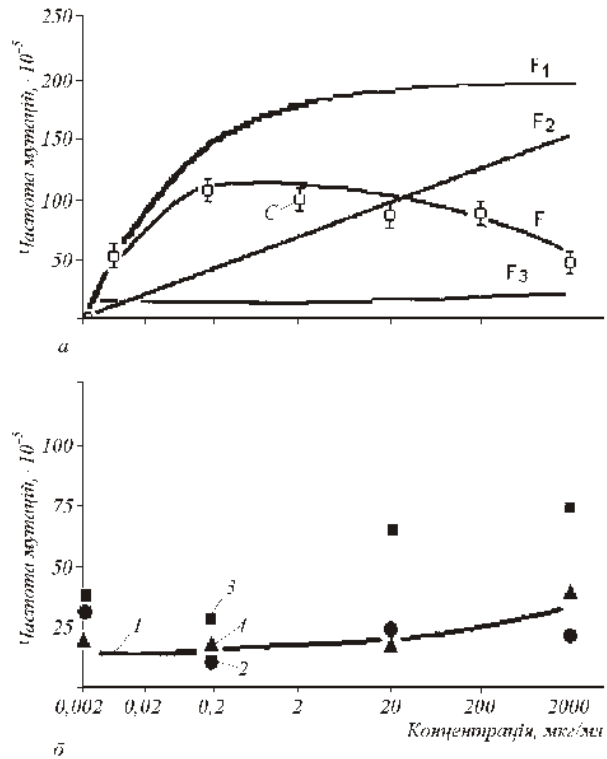
Зведена формула (1) для дії всіх трьох процесів має такий вигляд:

$$F = F_{\text{exp}} - F_{01} (1 - e^{-\ln C}) - F_{02} \ln C - F_{03} (\ln C)^2. \quad (5)$$

На рисунку, а, символами  $F_1, F_2, F_3$  позначено теоретично розраховані окремі криві залежності  $F_n = f(C)$ , результуючій кривій відповідає символ  $F$ .

Експериментальні дані для цитокіну позначено окремими маркерами, як це відображено на згаданому рисунку. Варто відзначити, що, згідно із застосованою моделлю, внесок кожного з процесів у спільний мутагенний ефект починається від самих низьких концентрацій, тобто від початкових значень в експерименті. Це свідчить про незалежність дії кожного з процесів при малих концентраціях.

Однак від'ємний знак ефекту у разі процесу  $F_2$  засвідчує, що існують одні й ті самі клітинні мішені



Залежність частоти мутацій, індукованих цитокіном ЕМАР II (а: за теоретичними розрахунками  $F_1$ – $F_3$  – механізми 1–3,  $F$  – результуюча; за експериментальними даними  $C$  – цитокін) і лектинами (б: 1 – теоретично розрахована крива для механізму 3; 2 – лектин кори бузини чорної (*S. nigra*); 3 – насіння сочевиці (*L. culinaris*); 4 – ікри окуня (*P. fluviatilis*) у клітинах китайського хом'ячка, від концентрації білка

при дії усіх трьох процесів, які є складовими результуючого прояву мутагенного ефекту і за які відбувається конкуренція між макромолекулами.

Подальший розвиток цих уявлень може дозволити виявити молекулярні механізми перебігу основних біологічних процесів.

Для порівняння з дією цитокіну на рисунку, б, наведено дані для лектинів кори бузини чорної (*S. nigra*), насіння сочевиці (*L. culinaris*) та ікри окуня (*P. fluviatilis*). Помітно, що дія лектинів значно слабша, ніж дія цитокіну. Для інтервалу досліджуваних концентрацій можливим процесом прояву мутагенезу можна вважати  $F_3$  і для одержання більш-менш значного ефекту потрібна вища концентрація, ніж для цитокіну (табл. 1).

Усі три лектини виявили здатність підвищувати частоту резистентних до 6-МП клонів у популяціях

Таблиця 1

Значення експериментальних і теоретичних даних по частотах мутантів, індукованих цитокіном ЕМАР II

C, нг/мл	lnC	F <sub>exp</sub>	Моделювальний процес			
			F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>n</sub> <sup>3</sup> <sub>n1</sub>
0	0,00	0,00	00,0	00,0	0,0	00,0
2	0,30	52,8	52,0	9,0	0,0	43,0
20	1,30	107,6	145,5	39,0	0,8	107,4
200	2,30	100,8	180,0	69,0	2,6	113,6
2000	3,30	87,9	192,6	99,0	5,4	99,0
20000	3,30	92,5	197,3	129,0	9,2	77,5
200000	5,30	50,9	199,0	159,0	14,1	54,0

клітин китайського хом'ячка. На рисунку показано, що існує поступове підвищення мутагенного ефекту залежно від їхньої концентрації, причому характер цієї залежності наближався до процесу, який описується нелінійним рівнянням другого ступеня (процес 3 згідно з моделлю). При найменшій з досліджуваних концентрацій білка (0,002 мкг/мл) частота індукованих мутацій суттєво не відрізнялася від контрольного рівня. При вищих концентраціях усіх трьох лектинів відмічено статистично вірогідне зростання частоти мутантів стосовно контролю. Індукований лектинами мутагенез можна порівняти з мутагенним ефектом хімічного супермутагену МННГ. При концентраціях лектинів, які спричинюють статистично вірогідний мутагенний ефект, зареєстровано індукцію запрограмованої загибелі клітин внаслідок апоптозу [17]. Імовірно, що існує більш ніж один шлях реалізації впливу білків на генетичну стабільність клітин ссавців у наведеній тест-системі та за даних умов [18]. Подальший розвиток цих уявлень, можливо, дозволить виявити молекулярні механізми індукованих білками генетичних процесів.

Одержані нами результати узгоджуються з поодинокими літературними даними стосовно здатності деяких ростових факторів і цитокінів індукувати генетичні пошкодження в клітинах ссавців [19]. Нами вперше детально досліджено залежність мутагенного ефекту білків від їхньої концентрації і

здійснено математичне моделювання мутаційного процесу.

При проведенні дослідів з мутагенезу відібрано та проаналізовано 11 клонів клітин, резистентних до 6-МП (табл. 2). Контрольний клон клітин китайського хом'ячка, як і очікувалося, був чутливим до всіх аналогів пуринових основ і водночас розмножувався на селективному середовищі АТГ. Це цілком типова картина поведінки клітин з активним ферментом ГГФРТ. Клітини всіх досліджуваних клонів, резистентних до 6-МП, зберігали цю ознаку після довготривалого культивування в ростовому середовищі, тобто всі вони виявилися мутантами. Усі проаналізовані мутантні клони були здатні розмножуватися не лише в середовищі з 6-МП, а й демонстрували перехресну резистентність до інших аналогів пуринових основ. Більшість з них, окрім МП31 та МП34, водночас не розмножувалися на середовищі АТГ та середовищі з аміноптерином, що вказувало на повну відсутність ферментативної активності ГГФРТ (прямі мутації за локусом *hprt*).

Клітини клонів МП31 і МП34 поводити себе дещо аномально, а саме – вони не лише демонстрували перехресну резистентність до аналогів пуринових основ, а й утворювали колонії в середовищі з аміноптерином і селективному середовищі АТГ. На нашу думку, причина цього полягає у наявності мутації резистентності до аміноптерину в клітинах цих двох клонів.

Таблиця 2

Аналіз ефективності клонування контрольного та резистентних до 6-МП клонів клітин китайського хом'ячка в ростовому і селективних середовищах

№ клону	Агент, мкг/мл	Ефективність клонування на контрольному та селективному середовищах, %					
		Ростове середовище	6-МП, 60 мкг/мл	6-ТГ, 10 мкг/мл	8-АГ, 30 мкг/мл	Аміноптерин, 0,003 мкг/мл	АТГ
МП30	–	66,00	63,45	65,40	75,00	0,00	00,0
МП37	–	39,50	34,15	42,35	28,65	0,00	00,0
МП31	ЛНС, 20	30,80	33,45	23,65	30,80	1,60	1,40
00МП32	ЛНС, 20	44,50	38,52	31,25	43,45	0,00	0,00
МП34	ЛБЧ, 0,2	63,50	60,02	68,50	65,80	0,15	0,80
МП39	ЛЮ, 200	62,01	58,32	60,53	59,20	0,00	0,00
МП40	ЛЮ, 20	65,60	63,00	53,70	70,40	0,00	0,00
МП41	ЕМАР II	47,40	54,30	49,65	52,80	0,00	0,00
Мп42	ЕМАР II	66,10	51,20	53,21	57,00	0,01	0,06
МП44	ЕМАР II	51,60	41,60	52,30	56,20	н	н
МП36	МННГ, 0,5	47,35	42,15	47,80	44,55	0,00	0,00
Вихідна лінія клітин	–	68,32	0,00	0,00	0,00	0,00	57,14

Отже, усі виділені та проаналізовані нами резистентні до 6-МП клони клітин успадкували цю ознаку при довготривалому культивуванні в ростовому середовищі і виявили перехресну резистентність до різних аналогів пуринових основ. Це вказує на той факт, що ознака резистентності клонів клітин до 6-МП зумовлена мутацією. У більшості мутантних клонів така мутація призводила до повної втрати ферментативної активності ГГФРТ. З'ясування природи зазначених мутацій потребує проведення секвенування повної нуклеотидної послідовності кодуючої частини гена *hprt*.

Таким чином, залежність мутагенного ефекту від концентрації при дії цитокіну ЕМАР II носить складніший характер порівняно з лектинами. Біологічна дія останніх характеризується поступовим підвищенням частоти мутантів із зростанням дози. Ця залежність описується нелінійним рівнянням другого ступеня. Мутагенна активність лектинів корелює з їхньою здатністю індукувати апоптоз у клітинах китайського хом'ячка.

Автори висловлюють щире подяку професору О. І. Корнелюку за надання препарату цитокіну ЕМАР II для проведення наших досліджень, а також за допомогу при обговоренні отриманих результатів та підготовці статті до друку.

*O. O. Kovalenko, L. L. Lukash, S. I. Lukash*

Induction of gene mutations by lectins of different origin and cytokine EMAP II in somatic mammalian cells *in vitro*

Summary

*Exogenous carbohydrate binding proteins, namely, three lectins of different origin and cytokine EMAP II, have revealed the ability to induce mutations in hprt locus in Chinese hamster cells in vitro. In the investigations of their biological action at the wide range of doses (from 0.002 to 2000 µg/ml) direct dependence of mutagenic effect on the concentration of foreign protein in cellular system has been manifested. Mathematical modelling has shown that resulting curve consists of three processes: the first one proceeds with saturation, the second one – with linear dependence on the dose, and the third one is described by non-linear equation of the second degree. Mutagenic activity of lectins is realized according to the latter equation and characterized by gradual increasing of mutation frequency with the increase in the protein dose.*

*Keywords: mammalian cells, cytokine, lectin, resistance, mutations, hprt locus, apoptosis, mathematical modelling.*

О. А. Коваленко, Л. Л. Лукаш, С. І. Лукаш

Индукция генных мутаций лектинами разного происхождения и цитокином ЕМАР II в соматических клетках млекопитающих *in vitro*

#### Резюме

Экзогенные углеводсвязывающие белки – три лектина разного происхождения и цитокин ЕМАР II проявляют способность индуцировать мутации по локусу *hprt* в клетках китайского хомячка *in vitro*. При исследовании их биологического действия в широком диапазоне доз (от 0,002 до 2000 мкг/мл) выявлена прямая зависимость мутагенного эффекта от концентрации чужеродного белка в клеточной системе. Как показало математическое моделирование, результирующая кривая зависимости частоты мутантов от концентрации для ЕМАР II является составляющей трех процессов: первый протекает с насыщением, второй – с линейной зависимостью от дозы, а третий описывается нелинейным уравнением второй степени. Мутагенная активность лектинов реализуется по последнему уравнению и характеризуется постепенным повышением частоты мутантов с увеличением дозы белка.

Ключевые слова: клетки млекопитающих, цитокин, лектин, резистентность к 6-меркаптопурину, мутации, локус *hprt*, апоптоз, математическое моделирование.

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Loris R. Principles of structures of animal and plant lectins // *Biochim. et Biophys. Acta.*—2002.—**1772**.—P. 198–208.
2. Lis H., Sharon N. Lectins: carbohydrate specific proteins that mediate cellular recognition // *Chem. Rev.*—1998.—**98**.—P. 637–674.
3. Voettner D. R., Huston C., Petri W. A., Jr. Galactose/N-acetylgalactosamine lectin: the coordinator of host cell killing // *J. Biosci.*—2002.—**27**.—P. 553–557.
4. Лукаш Л. Л., Карпова И. С., Мирошниченко О. С., Тихонова Т. Н., Лыло В. В., Манько В. Г., Сухорада Е. М., Голынская 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.
5. Мацевич Л. Л., Коваленко О. А., Сухорада О. М., Лукаш Л. Л. Дослідження впливу білків на генетичну мінливість клітинних популяцій *in vitro* // Фактори експериментальної еволюції організмів (Зб. наук. праць за ред. акад. М. В. Роїка).—Київ: Аграрна наука, 2003.—С. 91–97.
6. Мацевич Л. Л., Лукаш Л. Л. Вплив деяких низькомолекулярних сполук та модифікуюча дія лектину кори *Sambucus nigra* на мінливість популяцій клітин *in vitro* // Фактори експериментальної еволюції організмів (Зб. наук. праць за ред. акад. М. В. Роїка).—Київ: Аграрна наука, 2004.—С. 111–116.
7. Карпова І. С., Корецька Н. В. Дослідження модифікуючого впливу лектинів на токсичність і мутагенність іонів Ni(II) в культурі *Bacillus subtilis* // *Біополімери і клітина.*—2003.—**19**, № 3.—С. 224–230.

8. Kao J., Houck K., Haehnel I., Libutti S. K., Kayton M. L., Grikscheit T., Chsbot J., Nowygrod R., Greenberg S. Characterization of a novel tumor-derived cytokin endothelial-monocyte activating polypeptide II // *J. Biol. Chem.*—1994.—**269**.—P. 25106–25119.
9. Berger A. C., Tang G., Alexander H. R., Libutti S. K. Endoteli-monocyte activating polypeptide II induces endothelial cells apoptosis and may inhibit tumor angiogenesis // *Microvasc. Res.*—2000.—**60**.—P. 70–80.
10. Дубровский А. Л., Браун Дж., Корнелюк А. И., Мюррей Дж. К., Мацука Г. Х. Бактериальная экспрессия полно-размерных и усеченных форм цитокина ЕМАР-2 и цитокинподобного домена тирозил-гРНК синтазы млекопитающих // *Биополимеры и клетка.*—2000.—**16**, № 3.—С. 229–235.
11. Лукаш Л. Л. Регуляция изменчивости генома соматических клеток млекопитающих под влиянием экзогенных биологических факторов // *Біополімери і клітина.*—2004.—**20**, № 1–2.—С. 93–105.
12. Лахтин В. М. Молекулярная организация лектинов // *Молекуляр. биология.*—1994.—**28**.—С. 245–273.
13. Barbieri L., Cidni M., Girbes T., Liu W., Van Damme E. J. M., Peumans W. J., Stirpe F. Enzymatic activity of toxic and non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins // *FEBS Lett.*—2004.—**563**.—P. 219–222.
14. Бужиевская Т. И., Лукаш Л. Л., Подольская С. В. Экспериментальные модели для изучения мутагенеза и трансформации, индуцированных вирусами и нуклеиновыми кислотами // *Методы молекуляр. биологии.* – Киев: Наук. думка, 1986.—С. 147–158.
15. 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 // *Биополимеры и клетка.*—1995.—**11**, № 1.—С. 87–91.
16. Моисеенко Е. В., Лусс Е. В., Петрова О. Н., Шапиро Н. И. Анализ мутантов по локусу гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазы (ГГФРТ) с аномальным поведением на селективных средах // *Генетика.*—1978.—**14**, № 5.—С. 829–835.
17. Коваленко О. О., 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.
18. Peumans W. J., Hao Q., Van Damme E. J. Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? // *FASEB J.*—2001.—**15**.—P. 1493–1506.
19. Дурнев А. Д., Середенин С. Б. Мутагены. Скрининг и фармакологическая профилактика воздействия.—М.: Медицина, 1998.—365 с.

УДК 575.113:575.224  
Надійшла до редакції 22.12.06