

Експресія O^6 -метилгуанін-ДНК метилтрансферази у клітинах спонтанно іморталізованої лінії G1 миші та її субліній G1-OA і G1-T

А. П. Яцишина, В. В. Лило, О. В. Підпала, Т. П. Рубан, І. М. Вагіна, Л. Л. Лукаш

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

a.p.iatsyshyna@imbg.org.ua

За допомогою Вестерн-блот аналізу проаналізовано експресію гена Mgmt у клітинах спонтанно іморталізованої лінії G1 миші та її субліній G1-OA і G1-T на різних пасажах культивування in vitro. Найвищий рівень експресії виявлено у клітинах субліній G1-T, а найменший – у клітинах субліній G1-OA. У клітинах як вихідної клітинної лінії G1 миші, так і її субліній G1-OA спостерігали збільшення кількості репаративного білка MGMT на пізніших пасажах культивування in vitro. Оскільки сублінія G1-OA характеризується найвищими частотами хромосомних аберацій, мікроядерних і багатоядерних клітин, можна припустити можливу роль дефіциту репаративного ферменту MGMT у підвищенні рівня хромосомних аберацій в субліній G1-OA.

Ключові слова: клітини ссавців in vitro, O^6 -метилгуанін-ДНК метилтрансфераза (MGMT), хромосомні аберації.

Вступ. O^6 -метилгуанін-ДНК метилтрансфераза (також O^6 -алкілгуанін-ДНК алкілтрансфераза, O^6 -methylguanine-DNA methyltransferase – MGMT, у миші – *Mgmt*) є одним із ферментів репарації ДНК, який захищає клітину від мутагенної дії алкілувальних канцерогенів [1, 2]. Фермент MGMT функціонує за стехіометричною реакцією самоінактивації, механізм якої полягає у перенесенні алкільної групи (переважно метильної) з O^6 -позиції гуаніну (O^6 MeG) молекули ДНК на цистеїн активного центра ферменту [1]. Ген *Mgmt* експресується як у нормальних, так і в злоякісних клітинах, однак рівень

його експресії варіює залежно від типу клітин та їхніх ростових характеристик [3]. Наприклад, повідомлялося про підвищену експресію *Mgmt* у клітинах деяких неоплазій, зокрема, стійких до алкілувальних сполук, або про редукцію його експресії при злоякісній трансформації [3–6].

Реакції метилування та етилування гуаніну в позиції O^6 вважають основними мутагенними і канцерогенними чинниками, незважаючи на мінорність таких пошкоджень ДНК [7]. Якщо алкіловані основи не репаруються за допомогою MGMT до наступної реплікації, то ці пошкодження спричиняють генні мутації (транзиції гуанін:цитозин на аденін:тимін), обміни між сестринськими хроматидами, хромосомні аберації, загибель або злоякісну

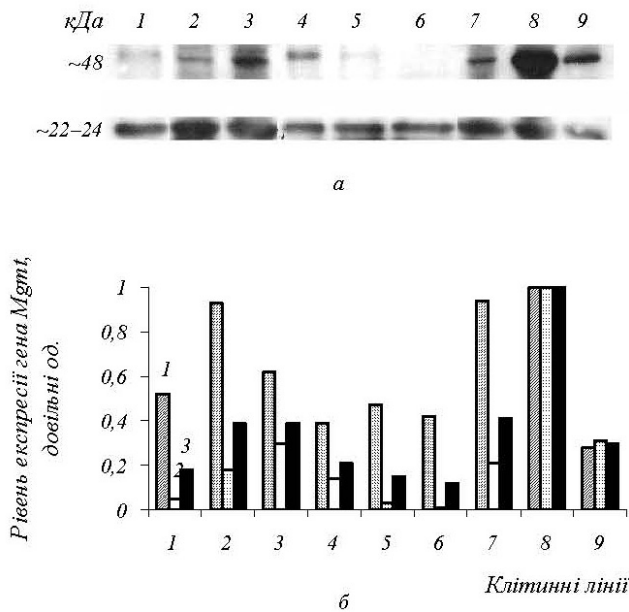


Рис. 1. Аналіз експресії гена *Mgmt* у клітинних лініях: 1 – G1, 59-й пасаж; 2 – G1, 71-й; 3 – G1, 75-й; 4 – G1-OA, 35/26-й; 5 – G1-OA, 35/40-й; 6 – G1-OA, 35/44-й; 7 – 3T3; 8 – G1-T, 66/13-й; 9 – MCF-7 (а – Вестерн-блот аналіз білка MGMT; б – діаграма, яка демонструє відносний рівень білка MGMT: 1 – 22–24 кДа; 2 – 48 кДа; 3 – загальна кількість білка). Клітинні екстракти (по 250 мкг тотального білка на лунку) розділяли у 15 %-му поліакриламідному гелі за допомогою SDS-електрофорезу

трансформацію клітин [7]. Показано, що при дефіциті ферменту MGMT або при його функціональній інактивації O⁶MeG залучається до формування вторинних пошкоджень ДНК, серед яких і аберації хромосом [7–10], однак механізм виникнення таких пошкоджень залишається маловідомим.

За результатами цитогенетичного аналізу спонтанно імморталізованої клітинної лінії G1 миші [11] та її субліній показано відмінності у кількостях різних хромосомних аберацій.

Мета даної роботи – проаналізувати експресію гена *Mgmt* на рівні білка у клітинах нової лінії G1 і її субліній G1-OA і G1-T на різних пасажах культивування *in vitro* та виявити кореляцію між хромосомними абераціями та рівнями досліджуваного репаративного білка.

Матеріали і методи. Клітинну лінію G1 миші отримано з ембріонального матеріалу лабораторної миші лінії BALB/c у відділі генетики людини Інституту молекулярної біології та генетики НАН України, її сублінії G1-OA та G1-T відібрано за ознаками

трансформованого фенотипу *in vitro* [12, 13]. У роботі використано також 12,5-денні ембріони миші лінії BALB/c для одержання клітинної лінії G1 миші [12], а також клітинні лінії із Санкт-Петербурзької колекції клітинних ліній [14] – миші 3T3 (ембріон) і людини MCF-7 (аденокарцинома молочної залози), яка слугувала позитивним контролем [15].

Рівень білка MGMT визначали за допомогою Вестерн-блот аналізу, використовуючи моноклональні антитіла анти-MGMT фірми «Novus Biologicals» (США). Як вторинні антитіла використано видоспецифічні кон'юговані з пероксидазою хрому антитіла фірми «Jackson ImmunoResearch» (США). Білкові екстракти отримували, дотримуючись рекомендацій [16]. Концентрацію тотального білка у клітинних лізатах визначали за кількісним методом Бредфорда [17]. Гель-електрофорез білкових екстрактів та Вестерн-блот аналіз здійснювали згідно з методичними рекомендаціями [16, 18]. Рентгеновські плівки відскановано на денситометрі «Ultrascan XL» («ЛКВ», Швеція).

Результати і обговорення. За допомогою Вестерн-блот аналізу досліджуваних клітин з антитілами до MGMT виявлено смужки білків з молекулярною масою на рівні ~22–24 і ~48 кДа (рис. 1, 2), які є специфічною реакцією моноклональних антитіл, оскільки подібних сигналів не спостерігали після обробки мембрани 1 %-м розчином альбуміну сироватки бика замість первинних антитіл з подальшими маніпуляціями згідно з протоколом. Відмічено залежність детекції білка MGMT у ділянках ~22–24 або ~48 кДа від режиму зберігання приготовлених білкових зразків, а також від різновиду клітинної культури (даних не наведено). Тому при аналізі кількості детектованого білка MGMT враховували дані обох ділянок: ~22–24 і ~48 кДа. Детектований білок з молекулярною масою ~48 кДа може бути продуктом або альтернативного сплайсингу мРНК, або перебудованого гена, або ж білковим комплексом та потребує подальших детальних досліджень.

Як видно з даних рис. 1, у клітинах лінії G1 миші на 59-му пасажі культивування *in vitro* рівень експресії *Mgmt* був меншим, ніж на 71-му і 75-му пасажах. Загальна кількість білка MGMT на 71-му і

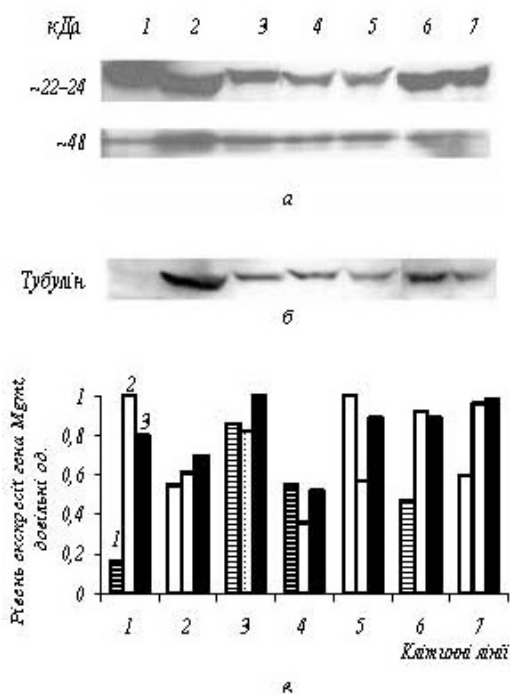


Рис. 2. Аналіз експресії гена *Mgmt*: 1 – ембріон BALB/c; 2 – G1, 27-й пасаж; 3 – G1, 104-й; 4 – G1-OA, 35/24-й; 5 – G1-OA, 35/65-й; 6 – G1-T, 66/17-й; 7 – G1-T, 66/35-й (а – імунодетекція білка MGMT у ділянках ~22–24 та ~48 кДа з використанням анти-MGMT антитіл; б – Вестерн-блот аналіз за допомогою антитіл анти-тубулін (~55 кДа), який був контролем нанесення; в – діаграма, яка демонструє відносний рівень білка MGMT: 1 – 22–24 кДа; 2 – 48 кДа; 3 – загальна кількість білка). Клітинні екстракти (по 100 мкг тотального білка на лунку) розділяли у 15 %-му поліакриламідному гелі за допомогою SDS-електрофорезу

75-му пасажах суттєво не відрізнялася. Кількість білка MGMT у лізатах клітин сублінії G1-OA на 35/26-му, 35/40-му і 35/44-му пасажах культивування була меншою, ніж вихідної лінії G1 на 70-х пасажах. Спостерігали зменшення загальної кількості досліджуваного білка із збільшенням пасажів клітин сублінії G1-OA. Найвищий рівень білка MGMT виявили у клітинах G1-T на 66/13-му пасажі. Детектували білок MGMT і в клітинах лінії 3T3 миші, яка є умовно нормальною клітинною лінією із збалансованим каріотипом.

Порівнювали також рівень білка MGMT у лізатах клітин ембріонів миші лінії BALB/c, у вихідної клітинної лінії G1 на 27-му та 104-му пасажах, у клітинах її субліній G1-OA на 35/24-му і 35/65-му пасажах та G1-T на 66/17-му і 66/35-му пасажах культивування *in vitro* (рис. 2).

У ділянці ~22–24 кДа відмічено найменший рівень білка MGMT у клітинах ембріонів BALB/c (рис. 2). У клітинах вихідної лінії G1 та її субліній G1-OA і G1-T спостерігали спільну тенденцію до збільшення кількості білка MGMT у клітинах на пізніших пасажах культивування *in vitro*. У ділянці ~48 кДа також виявлено специфічні сигнали білка MGMT та таку ж картину зростання кількості репаративного білка на більш пізніх пасажах клітинних культур (рис. 2). У клітинах ембріонів BALB/c, окрім смужок ~22–24 і ~48 кДа, помічено додаткові сигнали специфічної імунореакції (даних не наведено). Підсумовуючи результати аналізу загальної кількості білка MGMT у досліджуваних культурах, потрібно зазначити суттєве збільшення кількості білка *Mgmt* у клітинах лінії G1 на 104-му пасажі порівняно із 27-м пасажем, а також у клітинах сублінії G1-OA на пізньому 35/65-му пасажі культивування порівняно з більш раннім 35/24-м пасажем (рис. 2). Як впливає з даних рис. 2, у клітинах сублінії G1-T кількість білка MGMT на 66/17-му та 66/35-му пасажах суттєво не відрізнялась. Вона перевищувала таку у клітинах 12,5-денних ембріонів миші лінії BALB/c та була значно більшою від кількості досліджуваного білка у клітинах вихідної клітинної лінії G1 і її сублінії G1-OA на 27-му та 35/24-му пасажах відповідно.

Показано, що хромосомні аберації є вторинними пошкодженнями ДНК, які виникають через два цикли реплікації ДНК із O^6 MeG при дефіциті ферменту MGMT [7, 8]. Наприклад, інгібування активності MGMT за допомогою O^6 -бензилгуаніну у фібробластах людини L136 призводить до підвищення кількості хромосомних аберацій як одразу після обробки даною сполукою, так і в наступних клітинних циклах [9]. У той же час клітини CHO з надекспресією *Mgmt* набули резистентності до алкілування, що показано на прикладі формування обмінів між сестринськими хроматидами та хромосомних аберацій порівняно з MGMT-дефіцитними клітинами [10]. Цитогенетичними дослідженнями фібробластів миші також виявлено вищі частоти обмінів між сестринськими хроматидами у другому мітозі після обробки метилувальною речовиною MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) порівняно з першим мітозом при виснаженні фермен-

ту MGMT [8]. Як встановлено, підвищена кількість хромосомних аберацій індукувалася первинним пошкодженням ДНК – O⁶MeG [8]. Переважно в роботах, присвячених вивченню репаративного ферменту MGMT у формуванні вторинних пошкоджень ДНК, серед яких і аберації хромосом, основну роль відводять дослідженню частот хромосомних аберацій, які виникають після обробки метилувальними речовинами, у клітинах з різним рівнем експресії *Mgmt*. Ми проаналізували відносний рівень експресії *Mgmt* у клітинах спонтанно іморталізованої клітинної лінії G1 миші на різних пасажах культивування *in vitro*, а також у клітинах її субліній G1-OA і G1-T за допомогою Вестерн-блот аналізу.

У результаті проведених досліджень виявили найвищий рівень експресії *Mgmt* у клітинах сублінії G1-T, для якої характерний багатоядерний ріст [13]. Найменшу кількість білка MGMT знайдено в екстрактах клітин сублінії G1-OA, клітини якої здатні рости у середовищі, бідному на ростові фактори сироватки [13]. За попередніми результатами цитогенетичного аналізу різних субліній лінії G1 миші, у сублінії G1-T на 66/30-му пасажі спостерігали найменшу кількість аберацій хромосом, у той час як у популяціях клітин сублінії G1-OA на різних пасажах встановлено найвищі частоти хромосомних аберацій та мікроядерних і багатоядерних клітин [11, 13]. У клітинах як вихідної клітинної лінії G1 миші, так і її сублінії G1-OA відмічено збільшення кількості репаративного білка на пізніших пасажах культивування *in vitro*. Досліджувані клітинні культури на ранніх пасажах мали підвищену генетичну нестабільність та дестабілізований каріотип. Зменшена кількість білка MGMT корелює з підвищеною кількістю хромосомних аберацій у клітинах досліджуваних ліній. Таким чином, отримані результати дають підставу для припущення стосовно можливої ролі дефіциту MGMT у підвищенні рівня хромосомних аберацій у сублінії G1-OA.

Автори висловлюють щире подяку Г. Г. Панасюк та І. О. Немазаному за методичні поради, О. П. Коваленко – за допомогу при проведенні денситометричного аналізу, а також С. М. Кваші та

О. В. Анопрієнко – за корисні поради при підготовці рукопису.

A. P. Iatsyshyna, V. V. Lylo, O. V. Pidpala, T. P. Ruban, I. M. Vagina, L. L. Lukash

The expression of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in the spontaneously immortalized mouse cell line G1 and its sublines G1-OA and G1-T

Summary

The expression of Mgmt gene was investigated by Western blot analysis in the spontaneously immortalized mouse cell line G1 and in its sublines G1-OA and G1-T at different passages of in vitro cultivation. The highest level of Mgmt expression has been revealed in G1-T subline cells and the lowest – in G1-OA subline cells. The increase in the level of DNA repair enzyme MGMT was observed in the cells of mouse cell line G1 as well as in its subline G1-OA at later passages of in vitro cultivation. Since the G1-OA subline is characterized by the highest frequencies of chromosomal aberrations, micronucleate and multinucleate cells, it is possible to suppose a role of deficiency of DNA repair enzyme MGMT in the increase of the chromosomal aberration level in G1-OA subline.

Keywords: mammalian cells in vitro, O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), chromosomal aberrations

A. П. Яцишина, В. В. Лыло, О. В. Пидпала, Т. П. Рубан, И. Н. Вагина, Л. Л. Лукаш

Экспрессия O⁶-метилгуанин-ДНК метилтрансферазы в клетках спонтанно иммортализованной линии G1 мыши и ее сублиний G1-OA и G1-T

Резюме

С помощью Вестерн-блот анализа проанализирована экспрессия гена Mgmt в клетках спонтанно иммортализованной линии G1 мыши и ее сублиний G1-OA и G1-T на разных пассажах культивирования in vitro. Самый высокий уровень экспрессии выявлен в клетках сублинии G1-T и наименьший – в клетках сублинии G1-OA. В клетках как исходной клеточной линии мыши G1, так и ее сублинии G1-OA наблюдали увеличение количества репаративного белка MGMT на более поздних пассажах культивирования in vitro. Поскольку для сублинии G1-OA характерны самые высокие частоты хромосомных абераций, микроядерных и многоядерных клеток, можно предположить возможную роль дефицита репаративного фермента MGMT в повышении уровня хромосомных абераций в сублинии G1-OA.

Ключевые слова: клетки млекопитающих in vitro, O⁶-метилгуанин-ДНК метилтрансфераза (MGMT), хромосомные аберации.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Pegg A. E., Dolan M. E., Moschel R. C. Structure, function, and inhibition of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase // *Progr. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.*–1995.–**51**.–P. 167–223.
2. Pegg A. E. Repair of O⁶-alkylguanine by alkyltransferases // *Mutat. Res.*–2000.–**462**.–P. 83–100.
3. Yuan Q., Matsumoto K., Nakabeppu Y., Iwaki T. A comparative immunohistochemistry of O⁶-methylguanine-DNA

- methyltransferase and p53 in diffusely infiltrating astrocytomas // *Neuropathology*.—2003.—**23**.—P. 203–209.
4. *Harris L. C., Remack J. S., Houghton P. J., Brent T. P.* Wild-type p53 suppresses transcription of the human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene // *Cancer Res.*—1996.—**56**.—P. 2029–2032.
 5. *Wolf P., Hu Y. C., Doffek K., Sidransky D., Ahrendt S. A.* O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase promoter hypermethylation shifts the p53 mutational spectrum in non-small cell lung cancer // *Cancer Res.*—2001.—**61**.—P. 8113–8117.
 6. *Osanaï T., Takagi Y., Toriya Y., Nakagawa T., Agura T., Iida S., Uetake H., Sugihara K.* Inverse correlation between the expression of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) and p53 in breast cancer // *Jap. J. Clin. Oncol.*—2005.—**35**.—P. 121–125.
 7. *Kaina B., Ziouta A., Ochs K., Coquerelle T.* Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O⁶-methylguanine in Mex⁻, Mex⁺ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models // *Mutat. Res.*—1997.—**381**.—P. 227–241.
 8. *Debiak M., Nikolova T., Kaina B.* Loss of ATM sensitizes against O⁶-methylguanine triggered apoptosis, SCEs and chromosomal aberrations // *DNA Repair (Amst)*.—2004.—**3**.—P. 359–368.
 9. *Bean C. L., Bradt C. I., Hill R., Johnson T. E., Stallworth M., Galloway S. M.* Chromosome aberrations: persistence of alkylation damage and modulation by O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase // *Mutat. Res.*—1994.—**307**.—P. 67–81.
 10. *Kaina B., Fritz G., Coquerelle T.* Contribution of O⁶-alkylguanine and N-alkylpurines to the formation of sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations, and gene mutations: new insights gained from studies of genetically engineered mammalian cell lines // *Environ. Mol. Mutagen.*—1993.—**22**.—P. 283–292.
 11. *Яцишина А. П., Підпала О. В., Кочубей Т. П., Лукаш Л. Л.* Цитогенетичний аналіз спонтанно іморталізованої клітинної лінії G1 миші // *Біополімери і клітина*.—2006.—**22**.—С. 299–306.
 12. *Лукаш Л. Л., Яцишина А. П., Підпала О. В., Вагіна І. М., Кочубей Т. П.* Одержання нових ліній стовбурових клітин миші і вивчення впливу мікрооточення на їхню каріотипічну мінливість *in vitro* // *Физиология и биохимия культурных растений*.—2006.—**38**.—С. 144–152.
 13. *Яцишина А. П., Підпала О. В., Рубан Т. П., Тимощук О. В., Лукаш Л. Л.* Цитоморфологічна характеристика нової клітинної лінії миші G1 // *Цитология и генетика*.—2006.—**40**.—С. 49–58.
 14. *Russian cell culture collection (RCCC): Catalogue / Eds G. P. Pinaev, G. G. Poljanskaja, G. A. Sakuta, M. S. Bogdanova.*—St. Petersburg, Omsk, 1999.—204 p.
 15. *Teo A. K. C., Oh H. K., Ali R. B., Li B. F. L.* The modified human DNA repair enzyme O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase is a negative regulator of estrogen receptor-mediated transcription upon alkylation DNA damage // *Mol. Cell. Biol.*—2001.—**21**.—P. 7105–7114.
 16. *Sambrook J., Fritsh E. F., Maniatis T.* Molecular cloning: a laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.
 17. *Bradford M. M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding // *Anal. Biochem.*—1976.—**72**.—P. 248–254.
 18. *Остерман Л. А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие).—М.: Наука, 1981.—288 с.

УДК 576.5+577.21
Надійшла до редакції 16.02.07