

Вплив лектинів різного походження на мутаційний процес у популяціях соматичних клітин ссавців *in vitro*

О. О. Коваленко, К. В. Костецька, Л. Л. Лукаш

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

E. mail: xsana@mail.ru

Досліджені лектини різного походження здатні впливати на проліферацію соматичних клітин людини і китайського хом'ячка в культурі. Їхні ефекти є порівнянними з дією цитостатика мітоміцину С. Виявлено пряму залежність впливу лектину кори бузини чорної *Sambucus nigra* на генетичну стабільність соматичних клітин ссавців за локусом *hprt* від концентрації білка. При концентраціях 20–200 мкг/мл проявлявся ефект насичення. Статистично достовірне підвищення частоти генних мутації за локусом *hprt*, а також пригнічення проліферації та/або цитотоксичну дію спостерігали в діапазоні концентрацій білків від 2 до 2000 мкг/мл. Імовірно, вплив рослинних лектинів родини RIP білків на проліферацію культур клітин не пов'язаний з їхньою вуглеводною специфічністю, а залежить від структурно-функціональних особливостей системи лектин—клітина. Одержано нові дані про здатність лектину ікри окуня *Persa fluviatilis* змінювати проліферацію клітин ссавців порівняно з дією рослинних RIP білків.

Ключові слова: лектини, RIP білок, генетична стабільність, пригнічення проліферації, цитотоксична дія, клітини ссавців у культурі.

Вступ. Лектини належать до широко розповсюджених у природі вуглеводз'язувальних білків. Біологічні функції цих білків різноманітні і залежать від структурно-функціональних особливостей біосистем, але вважається, що ці функції здебільшого обумовлені їхньою здатністю взаємодіяти з вуглеводами, тобто субстратною специфічністю. Білково-вуглеводні взаємодії відбуваються у різноманітних біологічних процесах і слугують однією з форм передачі біологічної інформації [1, 2]. Екзогенні лектини здатні впливати через глікозилізовану поверхню клітинної мембрани, яка містить чисельні сигнальні точки клітини, на адгезію, міграцію, апоптоз, проліферацію і, як показано нами

[4–7], на спонтанний та індукований мутаційний процес у про- та еукаріотних системах.

Таким чином, лектини завдяки своїй розповсюженості у природі і здатності впливати на процеси біосинтезу білка в клітині становлять принциповий інтерес в плані наукових досліджень для їхнього подальшого використання як модуляторів спонтанного мутаційного процесу [8].

Мета нашої роботи полягала у вивченні впливу лектинів, різних за походженням і вуглеводною специфічністю, на проліферацію і генетичну стабільність у клітинах ссавців в умовах *in vitro*.

Матеріали і методи. При проведенні досліджень використовували лектини рослинного (кори бузини чорної *Sambucus nigra*, насіння сочевиці *Lens culinaris*) та тваринного (ікри окуня *Persa fluviatilis*) походження, одержані з НВК «Лектино-

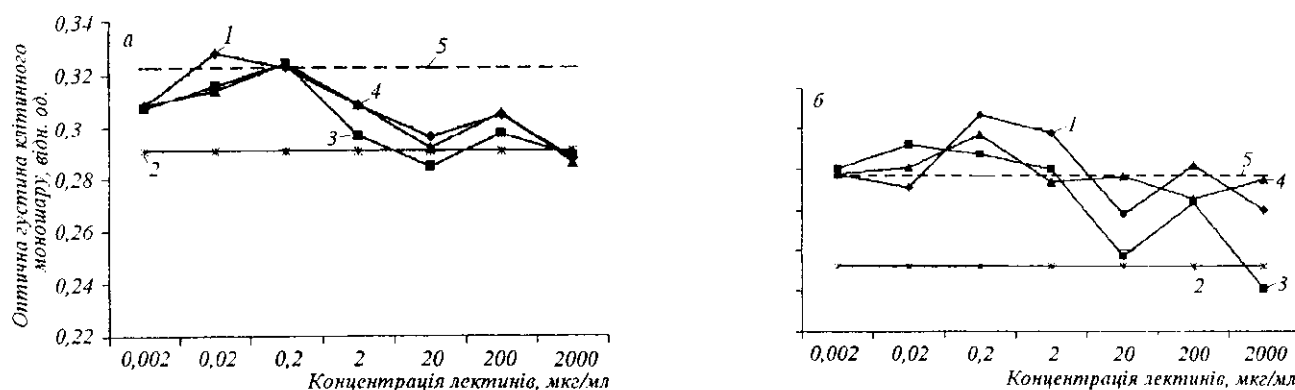


Рис. 1. Вплив лектинів на проліферацію культур клітин китайського хом'ячка (а) та клітин людини А-102 (б) (середні дані трьох дослідів): 1 — лектин ікри *P. fluvialis*; 2 — мітоміцин С; 3 — лектин насіння *L. culinaris*; 4 — лектин кори *S. nigra*; 5 — контроль

тест» (Україна). Ці лектини відрізняються не лише за своїм походженням, а й за молекулярною масою, яка становить 140, 49 і 100 кДа відповідно, а також за вуглеводною специфічністю. Так, лектин бузини чорної, специфічний до D-галактози, М-ацетил-D-галактозаміну та до залишків сіалової кислоти, лектин сочевиці — до α -D-глюкози та α -D-манози. За існуючими класифікаціями лектинів вищих рослин, обидва білки належать до так званих рибосомінактивуючих білків (RIP білки) [10]. На сьогодні відомо, що лектин окуня (власна розробка НВК «Лектинотест») є специфічним до α -фукози, але стосовно його класифікації та можливої дії на культури клітин ссавців літературних даних ще немає.

Всі експерименти проводили в умовах *in vitro* з використанням культур клітин китайського хом'ячка лінії B1ld-ii-FAF28C1237 та клітин людини лінії А-102. Остання люб'язно надана нам проф. МакКормиком (Мічиганський університет).

Вплив досліджуваних білків на темп проліферації методом мікрокультур виявляли за допомогою клітин обох ліній; вплив білків на спонтанний мутаційний процес — лише однієї лінії B1ld-ii-FAF28C1237, яка чутлива до дії аналогів пуринових основ. Завдяки цьому описана тест-система дозволяє вивчати індукцію генних мутацій за локусом *hprt*. Селекцію мутантних клонів проводили протягом 12—14 діб у культуральному середовищі Ігла з додаванням 6-меркаптопурину (6-МП) у концентрації 60 мкг/мл. Методику виконання експериментів детально описано в [11].

Вивчення впливу на темп проліферації клітин усіх досліджуваних лектинів здійснювали за такою

схемою: клітини обробляли лектинами протягом 4 год, концентрація білка становила 0,002; 0,02; 0,2; 2; 20; 200 і 2000 мкг/мл в культуральному середовищі Ігла за відсутності сироватки. У негативному контролі клітини інкубували в середовищі Ігла без сироватки. У позитивному контролі для пригнічення клітинного поділу використовували відомий цитостатик мітоміцин С у концентрації 10 мкг/мл. Фіксацію, фарбування клітин та аналіз результатів проводили через 43—44 год.

У дослідях з індукції генних мутацій за локусом *hprt* використовували лише лектин кори *S. nigra*; обробка лектином тривала 3 і 4 год у різних дослідях. Як позитивний контроль у цих експериментах використано алкілюючий агент N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідин (МННГ) у концентрації 0,5 мкг/мл; клітини обробляли упродовж 1 год. Мутагенну дію цього чинника досліджено нами раніше [12].

Результати і обговорення. Вплив лектинів на проліферацію. Результати аналізу впливу лектинів *S. nigra*, *L. culinaris* і *P. fluvialis* на проліферацію клітин китайського хом'ячка показали, що всі білки здатні пригнічувати поділ клітин китайського хом'ячка в діапазоні концентрацій 2—2000 мкг/мл нарівні з мітоміцином С (рис. 1, а). Не виключено також, що зниження кількості клітин при використанні досліджуваного мікротесту зумовлене не лише інгібуючим впливом на проліферацію, а й цитотоксичною дією лектинів на досліджувані клітини. На рис. 1 представлено усереднені дані за трьома експериментами. Для всіх лектинів спостерігали тенденцію до послаблення пригнічення клітинного поділу та/або цитотоксичної дії при

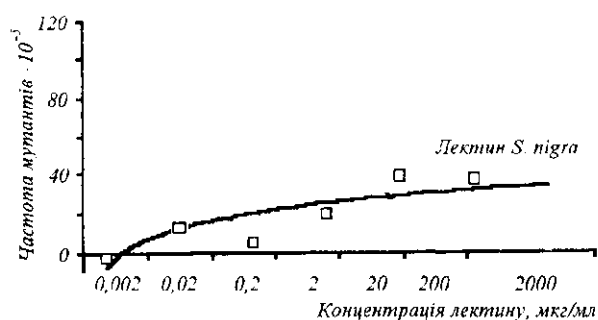


Рис. 2. Залежність індукції резистентних до 6-МП клонів від концентрації лектину кори бузини чорної (*S. nigra*)

зменшенні концентрації білка, однак при концентрації 0,2 мкг/мл цей ефект взагалі був відсутнім. При подальшому зменшенні концентрації лектину до 0,002 мкг/мл знов виявлялася тенденція до підсилення інгібування проліферації та/або зростання цитотоксичної дії. Детальніші дослідження впливу білків за малих концентрацій, можливо, підтвердять наявність другого, менш вираженого піку інгібуючої активності.

Таким чином, з використанням клітин китайського хом'ячка як тест-системи виявлено значну подібність у біологічній дії лектинів різного походження та вуглеводної специфічності.

Аналогічну залежність інгібуючої та/або цитотоксичної дії лектинів насіння сочевиці та ікри окуня від концентрації ми спостерігали і при використанні як модельного об'єкта клітин людини А-102 (рис. 1, б). Потрібно відзначити, що найвиразнішу інгібуючу дію у даній тест-системі демонструє лектин насіння сочевиці в концентраціях 20 і 200 мкг/мл. Але, на відміну від клітин китайського хом'ячка, в цій системі знайдено і деякі відмінності у біологічній дії лектинів різної природи. Так, лектин ікри окуня виявив досить високу мітогенну активність при концентраціях 0,2 і 2 мкг/мл. За малої концентрації (0,002 мкг/мл) усі досліджувані лектини не проявляли біологічної активності. А при дослідженні дії різних концентрацій лектину кори бузини чорної не помічено їхнього значного впливу на проліферацію клітин людини, за винятком концентрацій білка 0,2 і 200 мкг/мл (рис. 1, б).

Цитотоксичність лектинів — це наслідок прояву відомих на сьогоднішній день типових для них ензиматичних активностей, але для багатьох RIP білків описано також неканонічні ензиматичні вла-

стивості, а саме — ДНКазна та/або РНКазна, які спостерігаються при їхніх високих концентраціях. Показано, що цитотоксичність лектинів сочевиці і бузини чорної є наслідком основної функції усіх RIP білків — деаденілювання рибосом. Той факт, що білки з різною вуглеводною специфічністю однаково впливають на проліферацію клітин китайського хом'ячка, свідчить, скоріше за все, про залежність такого ефекту від внутрішньоклітинних процесів. Це не суперечить існуючому уявленню стосовно того, що вуглеводна специфічність лектинів принципово важлива лише на перших стадіях взаємодії білка і клітини: розпізнавання та зв'язування. А токсичність білків RIP обумовлена доменною організацією самого лектину та рибосомних білків клітини-реципієнта [10, 13]. Так, наприклад, відомо, що рицин є високоактивним відносно рибосом дріжджів і ссавців та майже або повністю неактивний щодо рибосом рослин і деяких бактерій. Більшість RIP білків першого типу мають ширший спектр взаємодії на відміну від RIP білків другого типу, які проявляють РНК-N-глікозидазну активність переважно до рибосом тварин. Ця різниця залежить від типу рибосомних білків, які перешкоджають або сприяють зв'язуванню А-ланцюга лектину і сарцин/рицинової петлі рРНК з консервативною послідовністю. Зокрема, ідентифіковано специфічні до А-ланцюга рицину білки L9 і L10 з печінки щурів; описано рибосомні білки, специфічні і до інших лектинів [13]. Саме цим, на нашу думку, пояснюється і практично відсутня токсична дія лектину бузини чорної на клітини людини на відміну від клітин китайського хом'ячка.

Вплив лектинів на мутаційний процес. Цікавим, з нашої точки зору, було зіставити пригнічувальний та/або цитотоксичний ефект лектину з можливим впливом і на генетичну стабільність у клітинах ссавців. Ці дослідження ми проводили, індукуючи прямі рецесивні мутації. Як діючий чинник використовували лектин кори бузини чорної, оскільки його досить добре вивчено [4—7] і його виразний інгібуючий вплив на клітини китайського хом'ячка в діапазоні концентрацій від 2 до 2000 мкг/мл також відомий.

При виконанні дослідів з індукції генних мутацій за локусом *hprt* лектин кори *S. nigra* використовували у широких межах концентрацій (таблиця, рис. 2). В обох дослідах спостерігали підвищення частоти резистентних клонів до аналога азотистих основ 6-МП при всіх досліджуваних концентраціях

Залежність частоти резистентних клонів від концентрації лектину *S. nigra*

№ дослідю Варіант	Концентрація, мкг/мл	Вибірка N, тис.	Ефективність кло- нування, %	Резистентні клони		Частота із вираху- ванням контролю	Достовірність, р
				Кількість	Частота, $\cdot 10^{-5}$		
<i>Тривалість обробки клітин у повторності 1—3 год; час експресії мутації — 1—3 доби</i>							
1. Контроль	—	300	0,456	26	19,00	—	—
Лектин	0,002	250	0,814	33	16,21	-2,79	< 0,05
	0,02	250	1,0	79	31,50	12,50	< 0,01
	0,2	250	0,993	59	23,77	4,77	< 0,05
	2	200	0,244	19	38,93	19,93	< 0,001
	20	200	0,247	43	58,03	39,03	< 0,001
	200	300	0,178	30	56,18	37,18	< 0,001
<i>Тривалість обробки клітин у повторності 2—4 год; час експресії мутації — 2—4 доби</i>							
2. Контроль	—	200	0,916	3	1,67	—	< 0,01
Лектин	0,002	200	0,628	23	18,31	16,64	< 0,01
	0,2	200	0,453	7	7,73	6,06	< 0,01
	20	200	0,820	56	34,15	32,48	< 0,01
	2000	200	0,772	42	27,20	25,53	< 0,01
МННГ	0,5	200	0,399	43	53,88	52,21	< 0,01

П р и м і т к а. Частоту резистентних клонів визначали з урахуванням ефективності клонування.

білка, за винятком однієї — 0,002 мкг/мл. Частота резистентних клонів, індукованих лектином, статистично достовірно перевищує таку в контролі. Саме в діапазоні концентрацій 2—2000 мкг/мл відмічено найвищу кратність зростання частоти мутантних клонів в обох дослідях. При концентрації білка 20 мкг/мл спостерігається максимальний мутагенний ефект, при подальшому підвищенні концентрації частота індукованих мутантних клонів тримається на такому ж рівні або дещо знижується, тобто має місце ефект насичення. Це проілюстровано даними, наведеними на рис. 2. Аналогічні результати одержано нами з лектином, виділеним із суцвіть лектину бузини чорної [7]. Мутагенний ефект лектинів бузини чорної, скоріш за все, не залежить від їхньої вуглеводної специфічності.

Порівняння частоти індукованих мутацій при дослідженні біологічного і хімічного чинників у досліді № 2 показало (таблиця), що ефект лектину в концентрації 200 мкг/мл не перевищує значення частоти мутантів, індукованих супермутагеном МННГ у концентрації 0,5 мкг/мл.

Імовірно, одержані нами результати вивчення мутагенної дії, пригнічення проліферації та/або

цитотоксичності лектинів не пов'язані з їхньою вуглеводною специфічністю, а залежать від структурно-функціональних особливостей системи лектин—клітина. Стосовно RIP білків, до яких належать досліджувані нами рослинні лектини, то різний прояв їхньої біологічної дії при використанні двох тест-систем можна пояснити особливостями взаємодії з клітинними рибосомними білками, але це питання потребує подальшого вивчення.

Висновки. Досліджені лектини різного походження та з різною субстратною специфічністю здатні впливати на проліферацію популяцій соматичних клітин ссавців у культурі. Цей ефект можна зіставити з дією хімічних чинників. Пригнічення проліферації та/або цитотоксичний ефект показані в діапазоні концентрацій лектину від 2 до 2000 мкг/мл.

Лектин тваринного походження може впливати на проліферацію клітин ссавців *in vitro* так само, як і інші RIP білки рослинного походження.

Виявлено пряму залежність регуляторної дії лектину *S. nigra* на генетичну стабільність від концентрації білка — це статистично вірогідне підвищення частоти генних мутацій за локусом *hprt*.

При концентраціях 20—200 мкг/мл спостерігався ефект насичення.

O. O. Kovalenko, K. V. Kostetskaia, L. L. Lukash

The influence of lectins of different origin on mutagenic process of mammalian somatic cells *in vitro*

Summary

Lectins of different origin can influence proliferation of human and Chinese hamster cells *in vitro*, this effect may be compared with the action of cytostatic agent mitomycin C. We have demonstrated that *Sambucus nigra* bark lectin controls genetic stability of mammalian somatic cells (*hprt* locus), in dose dependent manner reaching the maximum at the concentration of 20—200 g/ml. Significant increase in gene mutation frequency in the *hprt* locus, inhibition of cell proliferation and cytotoxic action were observed in the range of protein concentration from 2 to 2000 g/ml. Probably, the influence of plant lectins (which belong to the RIP-protein family) on cell proliferation is not linked to their carbohydrate specificity but depends on the specific interactions of the lectin chain A with ribosomal proteins of the recipient cell which provide or hinder lectin associated N-glycosidase activity. Also, we have found that *Perca fluviatilis* roe lectin affects cell proliferation in the same way as plant RIP lectins.

Key words: lectins, RIP proteins, genetic stability, inhibition of proliferation, cytotoxic action, mammalian cells *in vitro*.

O. A. Kovalenko, E. V. Kosteckaya, L. L. Lukash

Влияние лектинов разного происхождения на мутационный процесс в популяциях соматических клеток млекопитающих *in vitro*

Резюме

Исследованные лектины разного происхождения способны влиять на пролиферацию соматических клеток человека и китайского хомячка. Их эффекты сопоставимы с действием цитостатика митомицина С. Обнаружена прямая зависимость влияния лектина коры бузины черной *Sambucus nigra* на генетическую стабильность соматических клеток млекопитающих от концентрации белка. Статистически достоверное повышение частоты генных мутаций по локусу *hprt*, а также ингибирование и/или цитотоксическое действие наблюдались в диапазоне концентраций белков 2—2000 мкг/мл. При концентрациях белка 20—200 мкг/мл проявлялся эффект насыщения. Вероятно, влияние растительных лектинов, относящихся к RIP белкам, на пролиферацию культур клеток не связано с их углеводной специфичностью, а зависит от структурно-функциональных особенностей системы лектин—клетка. Получены новые данные о способности лектина икры окуня *Perca fluviatilis* изменять пролиферацию клеток млекопитающих в сравнении с действием растительных RIP белков.

Ключевые слова: лектины, RIP белок, генетическая стабильность, ингибирование пролиферации, цитотоксическое действие, клетки млекопитающих в культуре.

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. Boettner 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., Льво 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. О., Сухорада О. М., Лукаш Л. Л. Дослідження впливу білків на генетичну мінливість клітинних популяцій *in vitro* // *Фактори експериментальної еволюції організмів (Збірник наукових 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 (Збірник наукових 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* // *Биополимеры и клетка.*—2003.—19, № 3.—С. 224—230.
8. Лукаш Л. Л. Мутагенез та антимутагенез — протилежно спрямовані процеси, що визначають рівень генетичної мінливості та стабільності // *Биополимеры и клетка.*—1998.—14, № 6.—С. 500—511.
9. Лахтин В. М. Молекулярная организация лектинов // *Молекуляр. биология.*—1994.—28.—С. 245—273.
10. Barbieri L., Cidni M., Girbes T., Wang-yi Liu, 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.
11. Бужиевская Т. И., Лукаш Л. Л., Подольская С. В. Экспериментальные модели для изучения мутагенеза и трансформации, индуцированных вирусами и нуклеиновыми кислотами // *Методы молекуляр. биологии.*—Київ: Наук. думка, 1986.—С. 147—158.
12. 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.
13. Дурнев А. Д., Середенин С. Б. Мутагены. Скрининг и фармакологическая профилактика воздействия.—М.: Медицина, 1998.—365 с.
14. Peumans W. J., Hao Q., Van Damme E. J. Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? // *The FASEB J.*—2001.—15.—P. 1493—1506.

УДК 577.21

Надійшла до редакції 17.12.04