

РЕГУЛЯЦІЯ АКТИВНОСТІ РЕПАРАТИВНОГО ФЕРМЕНТУ АГТ З МЕТОЮ ОПТИМІЗАЦІЇ ЛІКУВАННЯ ДЕЯКИХ ОНКОЗАХВОРЕНЬ

Лукаш Л.Л., Лило В.В., Манько В.Г., Коваленко О.О.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна

Репарація первинних пошкоджень, індукованих зовнішніми та внутрішніми мутагенними чинниками, є ключовим моментом мутаційного процесу. В поновленні первинних пошкоджень, спричинених алкілюючими сполуками, які широко використовуються на виробництві та в медицині, вирішальну роль грає унікальний репаративний фермент O⁶-алкілгуанін-ДНК-алкілтрансфераза (АГТ) [1-4]. Він має практичне значення для прогнозування ефективності лікування онкологічних захворювань із застосуванням алкілюючих сполук

Ми приділили особливу увагу таким питанням: роль репаративних ферментів, алкілтрансфераз, в поновленні первинних пошкоджень ДНК, механізм репарації пошкоджень за допомогою унікального репаративного ферменту АГТ, експресія АГТ у пухлинних та нормальних клітинах різного походження, можливість регуляції пошкоджуючої дії алкілюючих сполук у клітинах за допомогою інгібіторів та активаторів репаративної активності АГТ.

Роль репаративних ферментів, алкілтрансфераз (АТ-аз), в поновленні первинних пошкоджень ДНК. Всебічне дослідження ролі алкілтрансфераз як компонентів клітинних захисних систем призвело дослідників до формулювання таких основних положень [3,4].

1. Алкілтрансферази відіграють значну роль в прояві стійкості клітин до хіміотерапевтичних агентів, що спричиняють певні первинні пошкодження в ДНК, а саме в позиції O⁶-гуаніну.

2. Експерименти по введенню гена АГТ про- та еукаріотичного походження за допомогою методу трансфекції в клітини ссавців підтвердили, що експресія цього гена в клітинах захищає останні від пошкоджуючого впливу похідних алкілнітрозомочевини.

3. Існує зворотня кореляція між рівнем активності АГТ і чутливістю клітин до дії метилуючих та хлоретилуючих агентів, що застосовуються для хіміотерапії онкозахворень, тобто ефективність лікування онкозахворень залежить від активності цього ферменту у пухлинних та нормальних клітинах.

4. Речовини, які пригнічують активність АГТ, сприяють при цьому підвищенню частоти первинних пошкоджень ДНК, мутацій, летальних випадків, індукованих алкілюючими сполуками, у клітинах.

Механізм репарації пошкоджень за допомогою унікального репаративного ферменту АГТ. Алкілтрансферазний ген ссавців має дуже великі розміри, від 145 т.п.н. у мишей до 170 т.п.н. у людини, однак

транскрибується тільки 950 нуклеотидів. Ген ссавців містить 5 екзонів та два дуже великих інтрони [3,4]. Алкілтрансферазний ген людини локалізується на теломерній ділянці довгого плеча хромосоми 10.

Встановлено, що білок алкілтрансфераза, має м.м. біля 22 кДа і складається з 207 амінокислотних залишків. Ділянка білку між 106-м та 169-м залишками, що містить послідовність цистеїнового акцепторного сайту, гомологічна відповідним ділянкам генів *V. subtilis*. Тобто цей ген достатньо консервативний.

Поновлення здійснюється в результаті переносу алкільної групи з ДНК на акцепторний цистеїновий сайт, який локалізується в структурі АГТ. АГТ найбільш ефективно поновлює O^6 -метилгуанін у складі алкілованої ДНК, при цьому молекула ферменту переносить метильований гуанін на власний цистеїновий залишок.

Встановлено також, що цистеїн 145 білку людини є акцептором метильних груп. Кожна молекула ферменту може стехіометрично зв'язуватися тільки з однією метильною групою O^6 -метилгуаніну, при цьому вона інактивується. Ферментативна реакція протікає дуже швидко (протягом 1 с при 37 °C), і утворюється S-алкілцистеїн, який, не спроможний зворотно перетворитися на цистеїн. Ця реакція відома як “механізм самогубства”, за допомогою якого клітина захищається від мутагенного та цитотоксичного впливів.

Алкілтрансферази інгібуються іонами важких металів, таких як Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Ag^{2+} , Pb^{2+} . У більшості випадків цю інактивацію можна припинити додаванням дитіотреїтолу у високій концентрації за рахунок взаємодії тиольних груп з іонами металу.

Таким чином, активація і інгібування АГТ в клітині - дуже специфічний механізм, який виробився й закріпився в процесі еволюції для поновлення одного з найбільш мутагенно шкідливих первинних пошкоджень O^6 -алкілгуаніну, що з великою вірогідністю призводить до мутації, транзиції гуаніну на аденін.

Відомо, що висока протипухлинна активність алкілнітрососечовини та інших алкілюючих сполук в модельних експериментах не завжди успішно реалізується при лікуванні людини. Однією з можливих причиною низької ефективності такого лікування є високий рівень ферменту АГТ. Кореляцію між рівнем репаративного ферменту АГТ і ефективністю генотоксичного впливу алкілнітрососечовини спостерігали в досліджах на безтисумних мишах з пухлинами прямої кишки, біопсійному матеріалі гліом людини, культурах клітин рабдоміосаркоми.

Експресія АГТ у пухлинних та нормальних клітинах різного походження. Існує різниця в активності між тканинами одного індивідуума та між зразками однієї тканини різних індивідуумів. В нормі експресія АГТ значно вище в печінці, прямій кишці, легенях, серці, ніж в мозку та

мієлоїдних тканинах [3-5]. Аналогічні спостереження зроблено на щурах та мишах.

Цікаво, що при дослідженні коливання активності алкілтрансфераз в мононуклеарних клітинах крові у більшості з них виявлено підвищення ферментативної активності опівночі у стані спокою в середньому на 30%. В той же час більшість дослідників не знаходять залежності між активністю алкілтрансфераз та статтю, а також між активністю цих репаративних ферментів та вживанням алкоголю.

Два параметри дуже важливі при лікуванні онкозахворень: вік та циркадний ритм. В педіатрії зроблено спостереження, що алкілтрансферазна активність при пухлинах мозку найвища в 3-12-річному віці, і така кореляція між віковим статусом та експресією відмічена, як в нормальних тканинах мозку, так і в пухлинах мозку у хворих. В той же час при дослідженні пухлин яєчників вікової залежності експресії не виявлено.

Майже всі типи людських пухлин і клітини, трансформовані SV40, експресують АГТ, але рівень експресії різний. В людських пухлинах найвищий рівень експресії виявлено в пухлинах прямої кишки, меланомах, панкреатичній карциномі, гліомі.

На матеріалі хірургічних операцій показано, що, як правило, ферментативна активність АГТ пухлинних клітин вище, ніж оточуючих нормальних клітин, тобто перші більш стійкі до дії алкілюючих сполук. Наприклад, імуногістохімічний аналіз показав статистично більш високий рівень АГТ у пухлині прямої кишки, ніж у нормальній тканині пацієнта. В гліомах мозку теж виявлена більш висока активність АГТ у порівнянні з оточуючими тканинами мозку. В нормі тканини мозку практично не експресують АГТ. Але інші нормальні тканини в більшості випадків мають достатньо високий рівень АГТ активності.

Виявлена така закономірність: АГТ активність в первинних пухлинах людини майже співпадає з активністю в установлених клітинних лініях, що культивуються. Деякі дані свідчать про те, що рівень АТ-азної активності зберігається протягом клітинного циклу в культурі клітин ссавців. Це дозволяє розробляти тест-системи *in vitro* для проведення досліджень чутливості пухлинних клітин до лікарських препаратів, прогнозування їх дії на організм, підсилення ефективності препаратів.

На відміну від загальної закономірності більшість клітин установлених лімфобластоїдних ліній на перших етапах мають більший рівень алкілтрансферазної активності, ніж після довготривалого культивування. Більшість іморталізованих ліній миші, які одержані за допомогою вірусу SV40, не експресують ці ферменти. Однак поява клітин, що експресують АТ-ази, в негативних лімфобластоїдних лініях свідчить про те, що їх експресія може бути поновлена.

Можливість регуляції пошкоджуючої дії алкілюючих сполук у клітинах за допомогою інгібіторів та активаторів репаративної

активності АГТ. Модуляція АТ-азної активності досліджувалась в клітинах і тканинах ссавців [1-5]. Було показано, що агенти, які індукували активність, в тканинах щурів, не завжди були ефективні в тканинах мишей та інших гризунів. Це свідчить про те, що механізми індукції, можливо, різняться у різних видів. Стосовно людини необхідно спеціально розробляти й досліджувати системи регуляції репаративної активності.

Зрозуміло, що для підвищення ефективності хіміотерапії потрібне вибіркове пригнічення репаративної активності в пухлині. Було встановлено, що вільна основа О⁶-бензилгуанін (БГ) інгібує АГТ і тим самим сприяє прояву цитотоксичної та мутагенної дії метилуючих та хлоретилуючих агентів, які застосовуються в онкологічній практиці [1,2].

Показано, що БГ інактивує АГТ за рахунок переносу бензильної групи на цистеїновий залишок, і інгібування найбільш ефективно у порівнянні з іншими відомими інгібіторами АГТ. БГ не інкорпорується в ДНК оброблених клітин, а прямо реагує з цитоплазматичною та ядерною АГТ.

На експериментальній моделі *in vivo* показано, що БГ інгібує пухлинну ксенографтну АГТ у мишей [4,5]. Людська пухлинна ксенографтна АГТ виснажувалась протягом 30 хвилин, і цей стан зберігався від 6 до 8 годин, після чого здійснювалась ендогенна регенерація АГТ шляхом синтезу нового білку. При повторному введенні БГ в організм миші виснаження АГТ активності в пухлинах підтримувалось довше.

Доклінічні дослідження прогнозують, що максимально толерантні дози похідних нітрозосечовини при інгібуванні АГТ могли б складати 25% від тих, що застосовуються без інгібування.

Показано, що цілий ряд сполук активують АГТ у клітинах. Винятковою особливістю цих сполук є здатність спричиняти одониткові розриви ДНК. Нами показано, що така здатність притаманна білкам, таким, наприклад, як лектини, які впливають на клітинний цикл [5].

СПИСОК ПОСИЛАНЬ

1. Dolan M.E., Moshel R.C., Pegg A.E. Depletion of mammalian O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase activity by O⁶-benzylguanine provides a means to evaluate the role of this protein in protection against carcinogenic and therapeutic alkylating agents. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1990. – 87. – P.5368 – 5372.
2. 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.
3. Pegg A.E. Repair of 6-alkylguanine by alkyltransferases. // *Mut. Res.* – 2000. – 462. – P.83 – 100.
4. Лукаш Л.Л., Манько В.Г., Лило В.В. Роль О⁶-алкілгуанін-ДНК-алкілтрансферази в репарації ушкоджень, індукованих алкілюючими сполуками. // *Біополімери і клітина.* – 2001. – 17, №4. – С. 265 – 278.

5. 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.-104 с.