

О.А. ПИВЕНЬ, Л.Л. ЛУКАШ

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев  
E-mail: xsana@mail.ru

## ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ БЕЛКОВ НА МУТАЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС



*Рассмотрены факторы мутагенеза биологического происхождения на примере углеводсвязывающих белков, предпринята попытка обобщить существующие данные относительно участия экзогенных макромолекул в мутационном процессе, предложены механизмы влияния экзогенных макромолекул на мутагенез, пролиферацию и выживание клеток млекопитающих.*

© О.А. ПИВЕНЬ, Л.Л. ЛУКАШ, 2011

Проблема индуцированного мутагенеза была и остается одной из наиболее актуальных проблем биологии. Актуальность исследований мутационного процесса и его механизмов объясняется не только критическим ухудшением состояния окружающей среды за счет антропогенного загрязнения во всем мире и в разных регионах Украины [1, 2], но и практической необходимостью поиска новых активных веществ, способных влиять на процессы мутагенеза как в сторону его повышения, так и снижения. А это в свою очередь стимулирует развитие исследований в области антимутагенеза – биологического процесса, обратного мутагенезу, суть которого состоит в снижении частоты спонтанных и индуцированных мутаций: за счет блокирования мутагенно активных веществ, уменьшения проницаемости клеточной мембраны, активации собственных репаративных систем клетки и элиминации мутантных клеток из популяции. Среди исследований последних лет, которые проводятся в этом направлении, в первую очередь следует выделить поиск природных веществ, способных предотвращать или уменьшать цитотоксическое и мутагенное действие факторов окружающей среды.

В настоящем обзоре мы остановимся на проблеме «биологического мутагенеза», т.е. мутационного процесса, индуцированного различными факторами биологической природы. Следует отметить, что мы используем термин «биологический мутагенез» в широком смысле, имея в виду разнообразные генетические повреждения, вызванные воздействием внешних биогенных факторов, таких как вирусы, нуклеиновые кислоты, мобильные генетические элементы, ферменты и другие метаболиты [3–15].

В настоящее время уже доказано, что биологические факторы не только влияют на спонтанный мутационный процесс, но и способны изменить последствия мутагенного действия химических и физических мутагенов.

Макромолекулы, которые контролируют мутационный процесс в клетках млекопитающих, разнообразны и многочисленны, но фундаментальных исследований, посвященных их изучению, явно недостаточно, не разработана единая система классификации этой группы мутагенов.

Можно лишь указать, что наряду с вирусами, нуклеиновыми кислотами и контролирующими элементами к ним относятся разнооб-

разные клеточные метаболиты, ферменты, витамины и др. [11, 13, 16, 17]. Кроме того, к биогенным факторам, которые непосредственно влияют на спонтанный мутагенез, следует отнести и процессы старения, иммунные и нейроэндокринные конфликты в организме. Главной особенностью их воздействия есть то, что они в отличие от физических или химических факторов не вызывают аддуктов или физико-химических повреждений ДНК, а действуют, как правило, опосредованно, влияя на сигнально-регуляторные механизмы в клетке.

Исследования мутационного процесса, индуцированного факторами биологической природы, начались в 30-е годы прошлого века. Именно генетические исследования с вирусами, нуклеиновыми кислотами и вирусными вакцинами дали основной материал для развития представлений о процессе индуцированного биологическими факторами мутагенеза и его особенностях [3–6, 13, 14].

Особый вклад в понимание механизмов влияния экзогенных макромолекул на мутагенез в популяциях клеток млекопитающих внесли исследования с использованием фрагментов генома вирусного и клеточного происхождения в качестве воздействующих агентов [4, 6, 7]. Стало ясно, что дестабилизирующее действие ДНК-геномных онковирусов на клеточный геном в первую очередь определялось экспрессией вирусоспецифических ранних регуляторных белков в инфицированных клетках. Это было особенно четко показано на примере онкогенного аденовируса.

Таким образом, было установлено, что первичным фактором мутагенеза в системе экзогенный онковир — клетка является экспрессия ранних регуляторных генов, которые отвечают за стимуляцию репликации ДНК и злокачественную трансформацию, а вторичным фактором — перепрограммирование клеточного генома под влиянием экспрессии вирусных генов и их интеграции с хромосомной ДНК. Эти данные прямо указывали на возможную роль экзогенных белков с регуляторными функциями в спонтанном мутационном процессе.

Предположение о возможном влиянии экзогенных белков на мутагенез нашло подтверждение еще в 60-х годах прошлого века в иссле-

довании Fahmy et al. [18]. Авторам удалось показать способность отдельных белков и синтетических полимеров вызывать мутации у дрожофилы. Мутагенные свойства были выявлены у дезоксирибонуклеазы I и II, у ДНК-полимеразы и обратной транскриптазы, т.е. у белков, которые имели энзиматичные активности, обеспечивающие их участие в протекании основных матричных процессов. Однако в дальнейшем выяснилось, что не только белки-ферменты, участвующие в матричных синтезах, но и некоторые гормоны пептидной природы [9, 10], цитокины [19], а также другие биологические факторы [11] способны оказывать влияние на мутационный процесс.

В настоящем обзоре собраны разрозненные фактические данные относительно способности белков разного происхождения и структуры оказывать влияние на процессы мутагенеза в различных тест-системах. Нам удалось получить экспериментальный материал, который позволил расширить и дополнить представления о мутагенном и/или антимутагенном действии белков. Поэтому мы попытались обобщить существующие литературные и собственные данные относительно влияния белков на процессы спонтанного и индуцированного мутагенеза в про- и эукариотических тест-системах (таблица).

В результате исследований влияния лектинов на процессы мутагенеза, пролиферации и выживания клеток млекопитающих в условиях *in vitro* нам удалось показать статистически достоверную индукцию мутаций резистентности к 6-меркаптопурину (6-МП). При этом была установлена прямая зависимость мутагенного и цитотоксического эффектов от концентрации белка во всех проведенных нами экспериментах (рис. 1). Цитотоксическое действие проявлялось в способности исследованных белков вызывать характерные для апоптоза изменения ядерного аппарата и, как следствие этого, гибель клеток. Кроме того, примеры модуляции уровня мутагенеза в популяциях клеток млекопитающих под влиянием экзогенных белков получены с использованием лектина соцветий бузины черной [20], фитогемагглютина [21], альбумина [22] и цитокина ЕМАРП [23]. Зарубежными авторами показана способность некоторых цитокинов и ростовых фак-

Сведения о мутагенном и цитотоксическом действии некоторых белков

Белок	Тесты			Ссылки
	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	прокариотические	
Гистоны	Индукция хромосомных мутаций	—	—	[18]
Дезоксирибонуклеаза ДНК-полимераза	То же »	— —	— —	[24] [25]
Тироксин	Индукция геномных мутаций, протекторное действие относительно радиации	—	—	[9, 26, 27]
Фитогемагглютинин	—	Антимутагенное действие на хромосомном уровне	—	[21]
Лектин икры жабы	Индукция апоптоза	Индукция апоптоза	—	[28, 29]
Интерферон α человека	Индукция сестринских хроматидных обменов	—	—	[19]
Интерферон α 2b человека	—	Индукция хромосомных аберраций	—	[15]
Интерферон γ человека	Индукция сестринских хроматидных обменов	—	—	[15]
Интерлейкин	То же	—	—	[15]
Эпидермальный фактор роста	»	—	—	[15]
Инсулин	—	Модуляция мутагенеза	—	[10]
Лектин омелы белой	—	Индукция апоптоза	—	[30]
соцветий бузины черной	Индукция разрывов ДНК и генных мутаций, антимутагенное действие	—	—	[20, 37–39]
коры бузины черной	Индукция разрывов ДНК генных мутаций и апоптоза, антимутагенное действие	—	Индукция мутаций, протекторное действие относительно солей тяжелых металлов	[31–34, 37–42]
икры окуня	Индукция генных мутаций и апоптоза, антимутагенное действие	—	—	[31–34]
семян чечевицы	Индукция генных мутаций и апоптоза	—	—	[31–34]
фасоли обыкновенной	—	—	Индукция мутаций, протекторное действие относительно солей тяжелых металлов	[35–42]
гороха	—	—	—	[35–42]
ландыша мечевидного	—	—	—	[35–42]
золотого дождя	—	—	—	[35–42]
картофеля	—	—	—	[35–42]
Альбумин	—	Индукция генных мутаций	—	[22]

Белок	Тесты			Ссылки
	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	Прокариотические	
Рицин, шига токсин	–	Индукция разрывов ДНК, апоптоза, ингибирование репарации	–	[43]
Галектины	–	Индукция апоптоза	–	[44]
Лектин арахиса	–	Индукция апоптоза	–	[45]
Цитокин ЕМАРП	–	Индукция генных мутаций	–	[23]

торов индуцировать сестринские хроматидные обмены [19]. В то же время известно, что некоторые из указанных в таблице лектинов индуцируют секрецию интерлейкинов [35, 36], поэтому генетический эффект мог быть обусловлен их совместным действием.

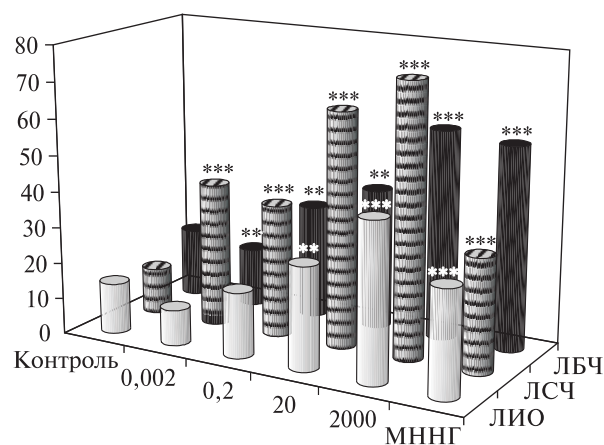
Следует подчеркнуть, что мы наблюдали такую закономерность: практически все исследуемые экзогенные белки имели общее свойство — распознавать углеводы и связываться с ними в составе мембранных рецепторов клетки, а это в свою очередь могло индуцировать цепь событий, влияющих на процессы мутагенеза и апоптоза, в зависимости от структурно-функциональной организации и концентрации воздействующих агентов. Вместе с тем генетические эффекты зависели также от особенностей клеточной системы. Так, нами показано, что в популяциях клеток человека в отличие от клеток китайского хомячка лектины проявляли себя как белки-митогены, т.е. стимулировали клеточную пролиферацию при малых концентрациях.

Фактические данные, полученные с использованием популяций клеток млекопитающих, в целом согласуются с результатами, полученными с использованием прокариотических систем. Так, в исследованиях Карповой и др. [42] на примере бактериальных тест-систем показано, что экзогенные лектины бактериального, растительного и животного происхождения способны влиять на процессы мутагенеза как в сторону его повышения, так и снижения. Генетические эффекты исследуемых белков зависели от работы репаративных систем бактерий.

Таким образом, результаты исследований мутационного процесса с использованием экзогенных белков-митогенов совпадают с результатами, полученными в нашей лаборатории ранее с использованием ДНК- и РНК-геномных вирусов [4, 6, 9, 16].

Как уже отмечалось, нами была установлена определенная корреляция мутагенной активности исследованных лектинов с их цитотоксичностью. Эти результаты согласуются с литературными данными, которые получены с использованием других лектинов.

Так, на примере рицина и шига токсина, которые относятся к токсичным RIP-белкам 2-го типа, было показано, что они способны инду-



**Рис. 1.** Влияние лектинов на частоту резистентных к 6-МП клонов клеток [31]: по вертикали — частота мутантных клонов,  $\times 10^{-5}$ ; по горизонтали — концентрация исследованных веществ, мкг/мл; ЛБЧ — лектин бузины черной; ЛСЧ — лектин семян чечевицы; ЛИО — лектин икры окуня. \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$

цировать однонитевые разрывы ДНК и апоптоз через 2 сут после обработки, но их цитотоксическая активность регистрировалась авторами в культуре клеток человека при значительно меньших концентрациях, чем в наших опытах.

Для сравнения в работах Мацевич и др. [37–39] была показана способность лектинов коры и соцветий бузины черной индуцировать разрывы ДНК; при этом лектин коры индуцировал разрывы уже при концентрации 0,5 мкг/мл, а лектин соцветий — при 2 мкг/мл. Мы также регистрировали статистически достоверный летальный эффект вследствие индукции апоптоза лектинами на вторые сутки после обработки клеток млекопитающих различного происхождения, но с той разницей, что апоптотные изменения при обработке клеток лектинами обнаруживались при более высокой концентрации белков (20 мкг/мл) по сравнению с экспериментами по индукции разрывов ДНК.

В результате проведения этих исследований была показана принципиальная возможность влиять на пролиферацию клеток и апоптоз с помощью так называемых нетоксичных белков 2-го типа, инактивирующих рибосомы (RIP), на примере лектина коры бузины черной, при условии их транспорта в цитозоль. Именно этим — эффективностью транспорта — объясняются, по нашему мнению, и различия в проявлении биологической активности одного и того же лектина коры бузины черной в культурах клеток человека и китайского хомячка.

Учитывая литературные и собственные данные относительно цитотоксического действия разных лектинов из группы RIP, можно высказать предположение, что способность к индукции апоптоза присуща всем белкам этой группы. Различия в цитотоксической активности между так называемыми токсичными и нетоксичными белками этой группы очевидно состоят в том, при концентрациях какого порядка проявляется биологический эффект. Так, например, нами показано, что лектин коры бузины черной способен вызывать летальный эффект в культуре клеток млекопитающих в диапазоне концентраций от 20 до 2000 мкг/мл, тогда как для рицина такая активность зарегистрирована уже при пикомолярных концентрациях.

Согласно литературным источникам, лектины благодаря углеводной специфичности способны связываться с рецепторами гормонов (например инсулина), факторов роста и некроза и, таким образом, активировать и/или ингибировать разнообразные биологические процессы в клетке (пролиферация, активация/угнетение синтеза ДНК, иммунный ответ и т.п.).

Цитотоксичность исследованных нами лектинов и способность их влиять на мутационный процесс может быть следствием непрямого вмешательства лектинов в ход основных матричных процессов на сигнально-регуляторном уровне. Кроме того, нельзя исключить, что генетическая активность некоторых лектинов может быть и следствием проявления энзиматических активностей, ассоциированных лектином: N-гликозидазной, которая ассоциирована с A-цепью лектинов группы RIP, а также ДНКазной и РНКазной.

«Арест» синтеза белка — это один из наиболее изученных механизмов индукции программированной гибели клетки. На примере токсичных лектинов группы RIP хорошо исследован механизм реализации N-гликозидазной активности (рис. 2). Именно A-цепь проникает в цитозоль и депурирует большую рибосомную РНК, блокируя таким образом синтез белка в клетке.

Несмотря на отсутствие сведений о цитотоксичности лектина икры окуня, есть некоторые литературные данные относительно других лектинов животного происхождения. Так, японскими учеными была показана способность лектина из икры жабы вида *Rana cotesbeiana*, проявляющего специфичность к остаткам сиаловой кислоты, индуцировать апоптоз в условиях *in vitro* и *in vivo*. После обработки культуры клеток P388 этим лектином авторы наблюдали не только характерные для апоптоза морфологические изменения ядра (фрагментация), но и биохимические (активация каспаз), что коррелирует с включением сигнального пути апоптоза, который индуцируется фактором смерти (FAS-лиганд или TNF) [28, 29].

Авторы с помощью добавления в культуру соответствующих специфических ингибиторов доказали, что апоптоз, вызванный этим лектином, сопровождается или индуцируется акти-

вацией каспазы-3 и каспазы-8, но не каспазы-1 (рис. 3).

До сих пор не выяснена связь между активацией сиалосодержащего рецептора и активацией каспаз, медиаторов апоптоза, под действием этого лектина. Не установлено также, каким именно путем лектин влияет на активацию каспаз; возможно, в этом процессе задействованы не только уже известные для лектинов РНКазная и/или ДНКазная активности, но и еще другие неустановленные энзиматические активности этих белков. Возможно, это является следствием взаимодействия лектина с определенными рецепторами на клеточной поверхности. Все эти вопросы открыты для дальнейших исследований.

Тот факт, что лектины способны вовлекать в реализацию своего влияния на апоптоз больше, чем один сигнально-регуляторный путь, доказано на примере другой группы животных лектинов – галектинов [44, 46]. Так, установлено, что в процессе индукции галектинами апоптоза задействованы несколько факторов или внутриклеточных медиаторов апоптоза. Среди них следует выделить такие, как специфические транскрипционные факторы, модуляция синтеза Bcl-2 белков, активация каспаз и высвобождение цитохрома. Каждый лектин имеет свои особенности. Например, как недавно показано в исследованиях с галектином-1, индукция апоптоза в этом случае не зависит от активации каспазы-3 (добавление специфического ингибитора не предотвращает развития событий апоптоза) и высвобождения цитохрома. Поэтому для выяснения молекулярных механизмов влияния лектинов на генетические процессы нужно проводить специальные исследования в каждом конкретном случае.

Анализ литературных и собственных данных относительно особенностей мутаций, индуцированных лектинами и другими экзогенными белками в клеточных популяциях про- и эукариотического происхождения, свидетельствует о том, что эти факторы индуцируют генные мутации в разных локусах, избранных для исследований и, вероятно, разного типа.

Так, выявление резистентных к 6-МП клонов, способных размножаться в среде с аминоптеринном, свидетельствует о возможности одновременной индукции лектинами мутаций

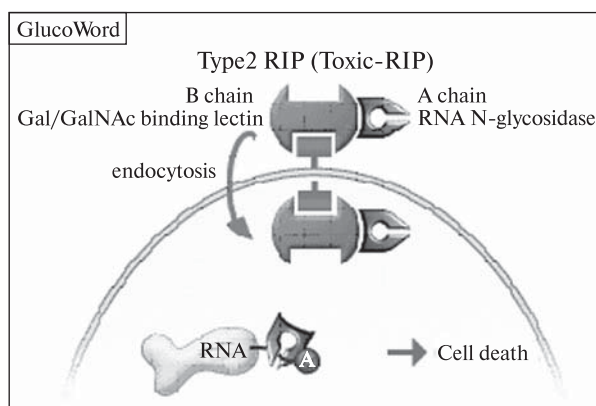


Рис. 2. Схематическое изображение механизма деаденирования рибосомной РНК лектинами, которые относятся к токсичным белкам группы RIP (сайт <http://www.gak.co.jp/TIGG/index.html>)

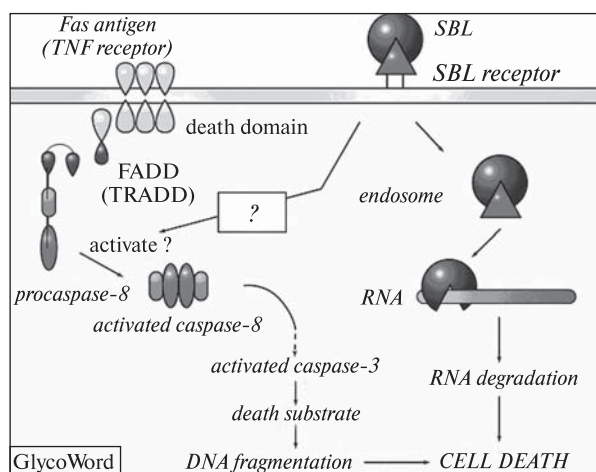


Рис. 3. Механизм индукции апоптоза в культуре клеток млекопитающих лектином икры *Rana cotesbeiana* (cSBL) (сайт <http://www.gak.co.jp/TIGG/index.html>)

как в локусе *hprt*, так и в гене, который кодирует устойчивость к аминоптерину. Резистентность клеток к аналогам пуриновых оснований, которая связана практически с полным отсутствием ферментативной активности ГФРТ, может быть следствием мутационных повреждений разного типа – вставок, делеций и замен пар оснований. В то же время возникновение под действием лектинов бузины, чечевицы, икры окуня и цитокина ЕМАРІІ мутантных клонов, резистентных к 6-МП и способных размножаться на среде ГАТ благодаря сохранению остаточной активности фермента ГФРТ,

очевидно, не обусловлено делеционными мутациями. В исследованиях с бактериями было показано, что другой лектин, известный митоген фитогемагглютинин, способен индуцировать реверсии от ауксотрофности к прототрофности по триптофану, которые по своей природе являются заменами пар оснований [41].

Совокупность всех полученных с белками данных вносит определенный вклад в развитие теории мутагенеза и свидетельствует в пользу универсальности явления индукции генных мутаций под влиянием экзогенных углеводсвязующих белков, которые могут вызывать дифференцировку клеток, т.е. выступают индукторами изменения программ генной экспрессии.

Известно, что исследуемые нами лектины влияют на внутриклеточные процессы через взаимодействие с рецепторами на поверхностной мембране клетки [47–50]. Тем не менее не исключается также возможность прямого взаимодействия этих белков с нуклеиновыми кислотами клетки, поскольку в структуре целого ряда лектинов найдены ДНК-связывающие домены и для многих из них выявлены ДНКазная и РНКазная активности [47].

В отличие от мутагенного действия вирусов, где мутационный эффект зависит от экспрессии ранних вирусоспецифических белков, которые синтезируются внутриклеточно, влияние экзогенных лектинов на мутационный процесс в первую очередь зависит от эффективности их взаимодействия с гликоконъюгатами на поверхности клеточной мембраны, т.е. от соответствия углеводной специфичности лектина и «гликокода» клеточной мембраны. На первый взгляд кажется, что взаимодействие лектина и клетки реализуется довольно просто: распознавание — связывание и, как результат, активация или угнетение соответствующего сигнально-регуляторного пути, который, в свою очередь, приводит к нарушениям нормального метаболизма клетки и индукции генетических повреждений. Но существование ДНК- и РНК-связывающих доменов в структуре многих растительных и животных лектинов, выявление ДНК- и РНКазных свойств, N-гликозидазной активности заставляет нас рассматривать лектины как белки, которые способны влиять на внутриклеточные процессы не только через рецепторную активацию

сигнально-регуляторных путей, но и прямым образом — через взаимодействие с макромолекулами клетки, контролирующими процессы генетической стабильности. Как уже отмечалось, при ретроградном транспорте этих белков в цитозоль, что было экспериментально доказано на примере токсичных лектинов — ригина и шига токсина [51–53], они способны непосредственно ингибировать эксцизионную репарацию ДНК [43].

Таким образом, как один из возможных путей повышения частоты генных мутаций под влиянием лектинов следует рассмотреть их взаимодействие с определенными репаративными ферментами клетки, что приводит к накоплению генетических повреждений, которые в норме должны быть исправлены соответствующими системами репарации.

Неслучайно влияние исследованных белков на мутационный процесс в клеточных популяциях мы сравнивали с действием химического соединения N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина (МННГ). Нитрозогуанидин относится к классу многочисленных монофункциональных алкилирующих соединений, которые являются канцерогенами и способны индуцировать опухоли у грызунов [54]. Монофункциональные метилирующие агенты реагируют с нуклеофильными сайтами в ДНК с образованием аддуктов, но только два из них, O<sup>6</sup>-метилгуанин и O<sup>4</sup>-метилтимин, являются главными предмутационными повреждениями. В эукариотических клетках их соотношение составляет соответственно 120 : 1, т.е. доминирующим является O<sup>6</sup>-метилгуанин [55].

Генетические повреждения, индуцированные нитрозогуанидином, возникают главным образом в точке репликации как результат неправильного спаривания оснований, вследствие чего возникают точковые мутации (транзиции) [56]. Неисправленные алкильные группы приводят также к образованию разрывов ДНК и апуриновых сайтов, которые, в свою очередь, ведут к возникновению вторичных генетических повреждений, таких как хромосомные аберрации [57].

Несмотря на принципиальную разницу в действии белков и нитрозогуанидина, есть и некоторые общие черты — образование разрывов ДНК и апуриновых сайтов. Это указывает

на возможность существования общих путей влияния на мутагенез через индукцию репаративных ферментов.

Итак, нами высказано предположение, что некоторые лектины и мутагены химической природы могут использовать общие пути для реализации своего мутагенного влияния на примере избранной нами модели клеток млекопитающих в условиях *in vitro*. Действительно, несмотря на то что лектины начинают действовать на сигнальные пути через связывание с рецепторами поверхностной мембраны клетки, ключевым фактором, который влияет на возникновение и проявление мутаций, индуцированных мутагенами разной природы, есть активация или угнетение репаративных ферментов [58]. Способность белков влиять на репаративные системы клетки показано как прямыми [43], так и косвенными методами [40, 41]. При исследовании лектинов соцветий и коры бузины черной, с одной стороны, удалось выявить их способность к индукции однонитевых разрывов клеточной ДНК, а с другой – антимуtagenный эффект относительно алкилирующего агента МННГ [20, 37–39].

Исследования комбинированного влияния лектинов и нитрозогуанидина на мутагенез показали, что общий мутагенный эффект биологического и химического факторов, независимо от последовательности обработки клеток, всегда ниже, чем можно было бы ожидать на основании теоретических расчетов при условии аддитивного действия двух факторов. Так, например, в случае двух лектинов, выделенных из разных органов бузины черной (кора, соцветие), при совместной обработке клеточных популяций лектином и алкилирующим агентом экспериментально полученный эффект был значительно ниже, чем теоретически ожидаемый. Это свидетельствовало о существовании общих клеточных мишеней для действия исследованных нами факторов биологической и химической природы и подтверждало мысль относительно их влияния на мутационный процесс с помощью одних и тех же механизмов.

Поскольку известно, что в исправлении первичных повреждений, вызванных алкилирующими соединениями, решающую роль играет

репаративный фермент O<sup>6</sup>-алкилгуанин-ДНК-алкилтрансфераза (АГТ), который индуцируется в ответ на появление однонитевых разрывов ДНК [57], мы высказали предположение, что он может быть одной из возможных мишеней для регуляторного влияния углеводсвязывающих белков. Как выяснилось в проведенных нами экспериментах, исследованные лектины при концентрации порядка 20 мкг/мл действительно повышали уровень экспрессии репаративного фермента АГТ.

Благодаря влиянию на репаративные системы, по нашему мнению, реализуются и протекторные свойства некоторых лектинов. Так, на примере фитогемагглютинаина показано [21], что белок снижал частоту хромосомных аномалий, индуцированных циклофосфамидом, в клетках сирийского хомяка *in vivo*. С использованием бактериальных тест-систем было показано протекторное действие лектинов ландыша мечевидного, фасоли обыкновенной и золотого дождя [40, 41], причем лектины не только снимали токсический эффект солей тяжелых металлов (Ni(II)), но и по-разному взаимодействовали с бактериями мутантного по репарации и дикого штаммов. Это еще раз подтвердило способность лектинов взаимодействовать с репаративными системами как про-, так и эукариотических клеток.

В наших исследованиях с использованием клеток млекопитающих наиболее активным протектором и потенциальным антимуtagenном оказался лектин икры окуня, который при концентрациях порядка 0,002 мкг/мл достоверно снижал уровень спонтанного мутагенеза по сравнению с контролем. При проведении предобработки клеток этим белком до введения нитрозогуанидина общий мутагенный эффект был почти вдвое, а в некоторых вариантах – в пять раз ниже, чем при действии одного алкилирующего агента. По литературным данным некоторые лектины животного происхождения имеют свойства РНК/ДНК-связывающих белков, а их С-концевой домен аналогичен домену ядерных РНК-связывающих белков. Некоторым сиалоспецифическим лектинам, например белкам, выделенным из икры жаб, присущи свойства РНКаз и ангиогенинов. Кроме того, они характеризуются высокой



степенью гомологии первичной структуры с РНКазами [47].

Математическое моделирование мутационного процесса, индуцированного лектинами в сопоставлении с цитокином ЕМАРІІ, показало, что механизмы их влияния на мутагенез различаются. Это, возможно, объясняется более сложной структурно-функциональной организацией указанного цитокина по сравнению с лектинами.

Создается общее впечатление, что способность оказывать влияние на мутационный процесс в клеточных популяциях присуща разным белкам, связывающим углевод, и характер этого влияния зависит от концентрации, молекулярного строения самого белка и, вероятно, особенностей гликозилированной мембраны клетки.

Так, анализ собственных и литературных данных [59] свидетельствует о том, что одни и те же лектины способны выступать как в роли мутагенов, так и протекторов в зависимости от их концентрации и других условий проведения эксперимента. Кроме того, одни и те же белки по-разному ведут себя в различных тест-системах, что, вероятно, зависит не только от углеводной специфичности белка, но и от «гликокода» поверхностной мембраны клетки-реципиента.

Таким образом, учитывая представленные данные, следует сделать вывод, что способность влиять на генетическую изменчивость присуща не только химическим, физическим, но и биологическим факторам разной степени сложности, в том числе определенным белкам, обладающим свойствами связывать углевод.

Лектин — это достаточно сложный биологический мутаген, который является постоянным компонентом окружающей среды. Процесс взаимодействия лектина и клетки-реципиента можно условно разделить на такие этапы: 1) распознавание и связывание — проявление собственно лектиновой активности; 2) транспорт в цитозоль; 3) проявление энзиматических и регуляторных активностей, ассоциированных лектином. Итак, путь влияния лектинов на мутагенез, вероятно, многостадийный и опосредованный участием эндогенных факторов, которые контролируют генети-

ческую стабильность клеточных популяций и организма в целом через клеточный аппарат репликации, рекомбинации и репарации.

Обобщая собственные и литературные данные, мы попытались сформулировать некоторые основные положения, которые характеризуют в целом мутационный процесс, вызванный различными макромолекулами [4, 11, 12]. Мутагенез (антимутагенез) является интегральным ответом системы на появление, исчезновение или изменение количества функционально активных макромолекул экзогенного и/или эндогенного происхождения, нарушение их баланса, образование новых биополимерных комплексов [4]. Влияние экзогенных факторов биологического происхождения на процессы мутагенеза реализуется при участии тех же механизмов образования мутаций, что и при спонтанном мутагенезе, но это влияние реализуется при участии чужеродных макромолекул, которые претерпевают определенную эволюцию в клетке и могут быть причиной продолжительной дестабилизации клеточного генома [5]. Скорость снижения индуцированного мутагенеза к норме зависит как от особенностей мутагена, так и от эффективности работы всех клеточных защитных систем распознавания, модификации, детоксикации, выведения чужеродных макромолекул, репарации повреждений ДНК и энергетической обеспеченности клетки [12, 58].

Основной вывод заключается в том, что первичным фактором мутационного процесса, индуцированного факторами биологической природы является эффективное функционирование активных чужеродных макромолекул, а их инактивация приводит к снижению и даже исчезновению мутагенного эффекта [4, 5, 59]. Вторичным фактором является изменение активности, мутации клеточных генов и мобильных генетических элементов под влиянием макромолекул экзогенного происхождения.

Структурно-функциональные исследования лектинов, проведенные разными авторами, выявление особенностей их биологической активности, в том числе и в наших экспериментах, расширяют представление относительно механизмов взаимодействия экзогенного белка с клеткой.

O.O. Piven, L.L. Lukash

INFLUENCE OF EXOGENEOUS PROTEINS  
ON MUTAGENIC PROCESS

Mutagenic factors of biological origin by the example of carbohydrate-binding proteins are observed. An attempt of summarizing the existing data concerning participation of exogenous macromolecules in mutagenic process is made. The mechanisms of the influence of exogenous macromolecules on mutagenesis, proliferation, and surviving of mammalian cells are discussed.

O.O. Півень, Л.Л. Лукаш

ВПЛИВ ЕКЗОГЕННИХ БІЛКІВ  
НА МУТАЦІЙНИЙ ПРОЦЕС

Розглянуто чинники мутагенезу біологічного походження на прикладі вуглеводз'язувальних білків, зроблено спробу узагальнення існуючих даних відносно участі екзогенних макромолекул в мутаційному процесі, запропоновано механізми впливу екзогенних макромолекул на мутагенез, проліферацію та виживання клітин ссавців.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сердюк А.М. Демографія та екологія в Україні: взаємозв'язок, ризик, прогноз // Демографічна ситуація в Україні : Матеріали конф. (Київ, 6–9 жовт. 1993 р.) – Київ, 1993. – Т. 2. – С. 136–139.
2. Баріляк І.Р. Проблеми збереження генофонду населення України як перебудова її демографічного розвитку // Демографічна ситуація в Україні : Матеріали конф. (Київ, 6–9 жовт. 1993 р.) – Київ, 1993. – Т. 2. – С. 152–157.
3. Гершензон С.М., Александров Ю.Н., Малота С.С. Мутагенное действие ДНК и вирусов у дрозофилы. – К.: Наук. думка, 1975. – 160 с.
4. Лукаш Л.Л. Мутагенез і антимутагенез – протилежно спрямовані процеси, що визначають рівень генетичної мінливості та стабільності // Біополімери і клетка. – 1998. – 14, № 6. – С. 500–511.
5. Лукаш Л.Л. Регуляція мутаційного процесу під впливом екзогенних нуклеотидних послідовностей в соматичних клітинах ссавців // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть : Зб. наук. пр. – К.: Логос, 2001. – Т. 1. – С. 120–130.
6. Shapiro N.I., Marshak M.I., Varshaver N.B. Mutagenic effects of DNA-containing oncogenic viruses and malignant transformation of mammalian cells // Cancer Genet. Cytogenet. – 1984. – 13, № 1. – Р. 167–179.
7. Бужиевская Т.И. Вирусиндуцированный мутагенез в клетках млекопитающих – К.: Наук. думка, 1984. – 134 с.
8. Лукаш Л.Л., Бужиевская Т.И., Варшавер Н.Б. и др. Индукция хромосомных aberrаций в клетках китайского хомячка онкогенным бычьим аденовирусом типа 3 // Биол. науки. – 1980. – № 4. – С. 91–95.
9. Тимченко О.И. Выявление и оценка мутагенных эффектов низкоэнергетических физических факторов: роль нарушения гормонального гомеостаза : Автореф. дис.... д-ра мед. наук. – Киев, 1991. – 42 с.
10. Лукаш Л.Л., Подольская С.В., Евсеенко А.А. и др. Рекомбинантная ДНК, содержащая экспрессирующий ген препроинсулина человека, не проявляет мутагенной активности // Биополімери і клетка. – 1999. – 15, № 1. – С. 28–37.
11. Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Мутагены. Скрининг и фармакологическая профилактика воздействия. – М.: Медицина, 1998. – 365 с.
12. Акифьев А.П., Худолый Г.А. Мутагенез и генетический гомеостаз у высших организмов // Вестн. РАМН. – 1993. – № 1. – С. 3–9.
13. Novick A., Scillard L. Experiments on spontaneous and chemically induced mutations of bacteria growing in the chemostat // Cold Spring Harb. Quant. Biol. – 1951. – 16. – Р. 121–137.
14. Гончарова Р.И. Антимутагенез. – Минск : Наука и техника, 1974. – 57 с.
15. Томшин Н.В. Генетическая стабильность клетки. – Л.: Наука, 1983. – 156 с.
16. Лукаш Л.Л. Дестабилизация клеточного генома под влиянием экспрессии ранних регуляторных генов онковирусов // Цитология и генетика. – 2002. – 36, № 2. – С. 68–80.
17. Керкус Ю.Я. Некоторые аспекты изучения мутагенных эффектов загрязнения среды обитания людей // Генетические последствия загрязнения окружающей среды. – М.: Наука, 1977. – С. 37–41.
18. Fahmy O.G., Fahmy M.J. Differential induction of chromosome deletions by natural and synthetic macromolecules in *Drosophila melanogaster* // Genetics. – 1965. – 52, № 5. – Р. 861–873.
19. Lazytka J.R. Genetic toxicity of cytokines // Mutat. Res. – 1996. – 371, № 12. – Р. 95–105.
20. Лукаш Л.Л., Карпова И.С., Мирошниченко О.С. и др. 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.
21. Лалчев С. Цитогенетическая оценка антимутагенной активности препарата Phs *in vitro* // Современ. методы. – 1987. – 33, № 12. – С. 221–224.
22. Коваленко О.О., Костецкий І.Є., Лукаш Л.Л. Вплив альбуміну на частоту спонтанних мутацій в соматичних клітинах ссавців *in vitro* // Цитология и генетика. – 2005. – 39, № 4. – С. 53–56.

23. Коваленко О.О., Лукаш Л.Л., Лукаш С.І. Індукція генних мутацій цитокіном ЕМАРІІ та лектинами різного походження в соматичних клітинах ссавців *in vitro* // Біополімери і клітина. — 2007. — **23**, № 5. — С. 410–415.
24. Kaufmann B.P., Gay H., Buchanan J. et al. Mutagenicity of agents interacting with DNA / Carnegie Inst.-Washington : Year Book., 1962. — № 61. — P. 467–468.
25. Spriggate C.F., Loeb L.A. Mutagenic DNA polymerase in human leukemic cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1973. — **70**, № 2. — P. 245–249.
26. Тимченко О.И., Антупенко Е.Н. Об условиях применения тироксина как антимутогена после общего рентгеновского облучения // Радиобиология. — 1981. — **21**, № 3. — С. 2044–2007.
27. Ярмоненко С.П. Радиобиология человека и животных. — М.: Высш. шк., 1988. — 424 с.
28. Nitta K., Ozaki K., Ishikawa M. et al. Inhibition of cell proliferation by *Rana catesbeiana* and *Rana japonica* lectins belonging to the ribonuclease superfamily // Cancer Res. — 1994. — **54**, № 4. — P. 920–927.
29. Nitta K., Ozaki K., Ishikawa M. et al. Catalytic lectin (leczyme) from bullfrog (*Rana catesbeiana*) eggs : Mechanism of tumoricidal activity // Int. J. Oncol. — 1996. — № 9. — P. 19–23.
30. Bussing A., Schetzel M. Apoptosis inducing properties of *Viscum album* L. extracts from different host trees, correlation with their content of toxic mistletoe lectins // Anticancer Res. — 1999. — **19**, № 1. — P. 23–28.
31. 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.
32. Коваленко О.О., Лукаш Л.Л. Індукція апоптозу у популяціях клітин ссавців *in vitro* під впливом лектинів // Цитология и генетика. — 2007. — **41**, № 5. — С. 48–53.
33. Коваленко О.О. Дослідження сумісного впливу лектинів та MNNG на генетичну стабільність клітин ссавців *in vitro* // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології : Зб. наук. пр. — К.: Логос, 2007. — Т. 2. — С. 245–249.
34. Коваленко О.О., Лукаш Л.Л. Антимутагенний ефект при спільній дії лектину та N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідину на мутагенез в клітинах ссавців *in vitro* // Цитология и генетика. — 2007. — **41**, № 6. — С. 62–66.
35. Горудко А.В., Тимошенко А.В. Действие сигнальных ингибиторов на выход лизоцима из нейтрофилов человека, активизированных лектином коры бузины черной (*Sambucus nigra*) // Биохимия. — 2006. — **65**, № 8. — С. 1107–1113.
36. Rodriguez-Juan C., Perez-Blas M., Suarez-Garsia E. et al. Lens culinaris, phaseolus vulgaris and *Vicia faba* lectins specifically trigger IL-8 Production by the human colon carcinoma cell line CACO-2 // Cytokine. — 2000. — **12**, № 8. — P. 1284–1287.
37. Мацевич Л.Л., Коваленко О.А., Сухорада О.М. та ін. Дослідження впливу білків на генетичну мінливість клітинних популяцій *in vitro* // Фактори експериментальної еволюції організмів : Зб. наук. пр. — К.: Аграр. наука, 2003. — С. 91–98.
38. 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. пр. — К.: Аграр. наука, 2004. — С. 111–116.
39. Macewicz L.L., Suchorada O.M., Lukash L.L. Influence of *Sambucus nigra* bark lectin on cell DNA under different in vitro conditions // Cell Biol. Inter. — 2005. — **29**, № 1. — P. 29–32.
40. Карнова И.С., Корецькая Н.В. Модулирующее влияние лектинов на мутагенез у *Bacillus subtilis* опосредовано системой репарации // Фактори експериментальної еволюції організмів : Зб. наук. пр. — К.: Аграр. наука, 2004. — С. 294–299.
41. Карнова И.С., Коваленко Е.О., Корецькая Н.В. и др. Вплив лектинів на репаративні процеси // Матеріали установчого з'їзду Українського товариства клітинної біології (Львів, 25–28 квіт. 2004 р.). — Львів, 2004. — С. 258.
42. Карнова И.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.
43. Sestili P., Alfieri R., Carnicelli D. et al. Shiga toxin and ricin inhibit the repair of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA single strand breaks in cultured mammalian cells // DNA Rep. — 2005. — **4**, № 2. — P. 271–277.
44. Rubinstein N., Toscano M.A., Ibarraqui J.M. et al. The sweet kiss of death: a link between galectin-1, glycosylation and generation of immune privilege // Trends Glycosci. and Glycotech. — 2005. — **17**, № 96. — P. 133–143.
45. Singh R., Subramanian S., Rhodes J.M. et al. Peanut lectin stimulated proliferation of colon cancer cell by interaction with glycosylated CD44v6 isoforms and consequential activation of c-Met and MAPK: functional implications for disease-associated glycosylation changes // Glycobiology. — 2006. — **16**, № 7. — P. 594–601.
46. Iglesias M.M., Rabinovich G.A., Ambrosio A.L. et al. Lectin-induced immunoregulation in ovine placenta // Electronic Lectin J. — 1998. — режим доступу до журн.: <http://plab.ku.dk/tcbh/Lectins12/contents.htm>.
47. Лахтин В.М. Молекулярная организация лекти-

- нов // Молекуляр. биология. — 1994. — **28**, № 2. — С. 245–273.
48. *Nielsen K., Boston R.S.* Ribosome-inactivating proteins: A plant perspective // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* — 2001. — № 52. — P. 785–816.
49. *Boettner D.R., Huston C., Petri W.A.* Galactose/N-acetylgalactosamine lectin: the coordinator of host cell killing // *J. Biosci.* — 2002. — **27**, № 6. — P. 553–557.
50. *Sacchettini J.C., Baum L.G., Brewer C.F.* Multivalent protein-carbohydrate interactions. A new paradigm for supermolecular assem and signal transduction // *Biochemistry.* — 2001. — № 40. — P. 3009–3015.
51. *Sandvig K., Van Deurs B.* Endocytosis and intracellular sorting of ricin and Shiga toxin // *FEBS Lett.* — 1994. — **346**. — P. 99–102.
52. *Lord J.M., Roberts L.M.* Toxin entry: Retrograde transport through the secretory pathway // *J. Cell Biol.* — 1998. — **140**, № 4. — P. 733–736.
53. *Slominska-Wojewodzka M., Gregers T.F., Walchi S. et al.* EDEM is involved in retrotranslocation of ricin from the endoplasmic reticulum to the cytosol // *Mol. Biol. Cell.* — 2006. — **17**. — P. 1664–1675.
54. *Singer B., Kusmierek J.T.* Chemical mutagenesis // *Annu. Rev. Biochem.* — 1982. — **50**, № 19. — P. 655.
55. *Pegg A.* Mammalian O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA-alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents // *Cancer Res.* — 1990. — № 50. — P. 6119–6129.
56. *Lukash L.L., Boldt J., Pegg A.E. et al.* Effect of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA-alkyltransferase on the frequency and spectrum of mutations induced by N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine in the HPRT gene of diploid human fibroblasts // *Mutat. Res.* — 1991. — **250**. — P. 397–409.
57. *Kaina B., Ziouta A., Ochs K. et al.* Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O<sup>6</sup>-methylguanine in Mex<sup>-</sup>, Mex<sup>+</sup> and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models // *Mutat. Res.* — 1997. — **28**, № 381. — P. 227–241.
58. *Жестяников В.Д.* Репарация ДНК и ее биологическое значение. — Л.: Наука, 1979. — 286 с.
59. *Лукаш Л.Л.* Регуляция изменчивости генома соматических клеток млекопитающих под влиянием экзогенных биологических факторов // *Біополімери і клітина.* — 2004. — **20**, № 1/2. — С. 93–105.

Поступила 18.08.09