

УДК 579.23+579.22+579.083.13+575.224.4

## ВКЛАД ИНФЕКЦИИ *HELICOBACTER PYLORI* В ОСТАНОВКУ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ЭУКАРИОТ

М.О. Анিকেенко, О.Н. Ильинская

### Аннотация

Важная роль инфекции *Helicobacter pylori* в развитии рака желудка уже не вызывает сомнения, в связи с чем становится все более необходимым изучение влияния этой бактерии на изменение таких важнейших процессов, как репарация, апоптоз и регуляция клеточного цикла в клетке, атакованной патогеном. В настоящей работе проведен анализ активации субстратов ATM-киназы Chk2 и p53 в эукариотических клетках после инфицирования *H. pylori* P12. Показана активация белка Chk2 киназой, отличной от ATM, при инфицировании клеток HeLa и AGS; в то же время активация белка p53, субстрата Chk2, не была обнаружена.

**Ключевые слова:** *Helicobacter pylori*, ATM/ATR – сигнальный каскад, фосфорилирование, киназа.

### Введение

В последние годы была выявлена исключительно важная этиологическая роль *Helicobacter pylori* в заболевании раком желудка. Инфицируя желудок, эта специфическая бактерия во многих случаях постепенно вызывает формирование начальных предопухолевых изменений слизистой оболочки желудка (метаплазии тонкокишечного типа) [1–6] и резко повышает риск заболевания раком желудка.

Инфекция *H. pylori* вызывает в качестве ответной реакции организма миграцию полиморфноядерных лейкоцитов и макрофагов из стромы в просвет желудка, что приводит к их тесному контакту с эпителиальными клетками. Их гибель («внеплановый фагоцитоз») сопровождается «оксидативным взрывом» – освобождением и образованием целого спектра свободнорадикальных генотоксических и канцерогенных соединений [7, 8], к числу которых относятся супероксидный анион ( $O_2^-$ ), окись азота (NO), гидроксильные радикалы, пероксинитрит, ионы нитрозония и нитрит – предшественник канцерогенных N-нитрозосоединений.

Таким образом, клетка, атакованная патогеном, подвергается многофакторному воздействию, которое в большинстве случаев исследуется на материале из биоптатов пациентов. Однако влияет ли хеликобактерная инфекция на такие молекулярные процессы, как рекомбинация, репарация, регуляция клеточного цикла в клетке хозяина, неизвестно.

Регуляция клеточного цикла – это сложный многокомпонентный процесс. Одним из путей, который приводит к временной остановке клеточного цикла,

является ATM/ATR – сигнальный каскад. При повреждении ДНК активируются ключевые киназы ATM и ATR, которые фосфорилируют свои субстраты Chk1, Chk2, p53, MDM, NBS1, останавливая клеточный цикл на разных фазах [9–11].

Одним из хорошо изученных компонентов этого каскада является эффекторная киназа Chk2, которая фосфорилируется с помощью ATM и останавливает клеточный цикл на уровне G1, S и, возможно, G2 фаз. В этом процессе участвует белок p53, который является субстратом Chk2, но может фосфорилироваться разными путями: напрямую ATM-киназой или активированной p-Chk2 киназой [9]. Фосфорилированная форма p-53 функционирует как транскрипционный фактор для белка p21, который, в свою очередь, ингибирует распад комплекса CDK2-cyclin E, что приводит к «аресту» G1-фазы [10]. Помимо регуляции клеточного цикла Chk2, вероятно, принимает участие и в активации гомологичной рекомбинации при репарации двуниевых разрывов ДНК путем фосфорилирования ключевого белка этого процесса BRCA1 [12].

Исследования *in vitro* позволяют оценить только влияние бактерии на изменение важнейших внутриклеточных процессов: репарации, апоптоза, регуляции клеточного цикла, за исключением других факторов, участвующих в полноценном иммунном ответе целого макроорганизма на патоген.

Таким образом, целью нашего исследования является анализ активации субстратов ATM-киназы Chk2 и p53 в эукариотических клетках после инфицирования *H. pylori* P12.

## 1. Материалы и методы

**Культуры клеток.** В работе были использованы две стабильные линии опухолевых клеток человека: HeLa (карцинома эндометрия) и AGS (ATCC CRL 1739 аденокарцинома желудка) (коллекция Института Макса Планка, г. Берлин, Германия). Клетки культивировали в 6-луночных плашках со средой RPMI 1640 (Invitrogen, Германия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biocrom, Германия), в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37 °C. За 18 ч до инфицирования среду отбирали и добавляли новую, не содержащую сыворотку.

**Штаммы.** Клетки инфицировали штаммом *H. pylori* P12 *cag+*, *vac+*, выделенным из биоптата пациента с язвой двенадцатиперстной кишки [13]. Бактерии выращивали при 37 °C на L-агаре, содержащим ванкомицин (10 мкг/мл), в анаэробных условиях в атмосфере смеси газов Campylogen 5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> и 85% N<sub>2</sub> (Oxoid, Германия). Перед инфицированием бактерии инкубировали 18 ч в жидкой питательной среде ВНИ, содержащей антибиотики ванкомицин (10 мкг/мл), триметоприм (1.25 мкг/мл) и нистатин (1 мкг/мл). Бактерии ресуспендировали в PBS (Invitrogen) и добавили к клеткам HeLa и AGS с различной концентрацией.

ATM-киназу активировали доксорубицином (1 мкМ, 4 ч) в среде RPMI [14] и гидроксимочевинной (2 млМ, 2 ч) [15]. Для ингибирования ATM-киназы использовали ATM/ATR-ингибитор (Calbiochem), обрабатывая клетки HeLa (2.5 мкг/мл) и AGS (0.7 мкг/мл) за 18 ч до инфицирования [16].

**Электрофорез.** Для приготовления клеточных лизатов клетки лизировали в буфере, содержащем (%): додецилсульфат натрия (SDS)-3, β-меркаптоэтанол-3, глицерин-20, бромфеноловый синий 0.05% и 5 мМ дитиотриэтол. Лизаты нагре-

вали до 95 °С на водяной бане в течение 20 мин, центрифугировали 1 мин при 12 000 об/мин. Белки разделяли в 10% ПААГ в модификации Лаемли [17]. Для определения молекулярной массы белков использовали маркер (New England Biolabs). Электроперенос белков на поливинилиденфторидную (PVDF) мембрану (Poly Screen NEF 1002) проводили в камере для полусухого переноса (Biometra) с использованием буфера, содержащего 20% метанола, 0.02% SDS, 25 мМ Трис-НСl и 192 мМ глицина.

**Иммуноблотинг.** Мембрану с иммобилизованными белками инкубировали в буфере TBS-T (140 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 25 мМ Трис-НСl, 1% Tween<sub>20</sub>), содержащем 3% бычьего сывороточного альбумина (БСА) в течение 1 ч, а затем с первичными антителами, разведенными в TBS-T, содержащем 3% БСА, в течение 1 ч. Мембраны отмывали 45 мин в растворе TBS-T и инкубировали с вторичными антителами, разведенными в TBS-T, содержащем 3% БСА, после чего отмывали тем же способом. Применяли вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. Выявление пероксидазной активности проводили методом усиленной хемилюминесценции Western light Kit, используя пленки Hyperfilm ECL (Amersham Bioscience). Для определения количества нанесенного белка проводили повторный иммуноблотинг с антителами против β-актина. Перед этим мембраны отмывали от предыдущих антител инкубированием в течение 15 мин при 50 °С в буфере, содержащем 31.25 мл 1 М Трис-НСl, 4 мл β-меркаптоэтанола, 50 мл 20% SDS, 500 мл H<sub>2</sub>O.

**Антитела.** В работе использовали кроличьи поликлональные антитела против белков Phospho-(Ser/Thr) ATM/ATR Substrate Antibody, p-Chk-2, p-p53 (Cell Signaling Technology), β-актин (Sigma), также вторичные антитела HRP α-mouse и HRP α-rabbit (Amersham).

## 2. Результаты и обсуждение

Клеточным ответом на повреждение геномного материала является запуск определенных сигнальных путей, ведущих как к репарационным процессам, так и к остановке клеточного цикла поврежденных клеток. Одним из таких каскадов является ATM/ATR-путь, инициация которого происходит в результате двунитевых разрывов ДНК [10, 11]. В этом пути нас интересовала активация ключевой киназы Chk2 и белка p53 в клетках, инфицированных *H. pylori*.

Прежде всего мы показали, что при инфицировании штаммом *H. pylori* P12 в клетках AGS и HeLa происходит активация ряда субстратов ATM, которые скорее всего являются компонентами ATM/ATR-зависимого пути (рис. 1).

Для этого мы использовали антитело против широкого спектра фосфорилированных субстратов ATM, узнающее их по известному мотиву S\*/T\*Q [18]. Наибольшая степень фосфорилирования наблюдалась для разных субстратов в разное время. Интересно, что белок с примерной молекулярной массой 62 кДа, предположительно Chk2, был максимально активирован после шестичасового инфицирования, но не после обработки известным индуктором ATM – гидроксимочевинной. В то же время белок с молекулярной массой 56 кДа, возможно Chk1, обладал более высоким уровнем фосфорилирования после 90 мин инфицирования, сравнимым с уровнем после обработки ГМ. Необходимо также отметить, что мы наблюдали небольшое количество данного белка в фосфорилиро-

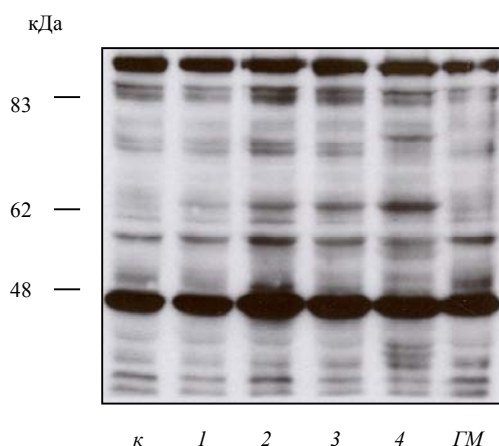


Рис. 1. Содержание фосфорилированных субстратов АТМ в клетках AGS после инфицирования *H. pylori* P12 в концентрации 100 бактерий на клетку. Дорожки: *к* – клетки без обработки бактериями; *ГМ* – клетки, обработанные гидроксимочевинной; *1–4* – клетки через 30 мин, 90 мин, 3 ч и 6 ч инфицирования соответственно

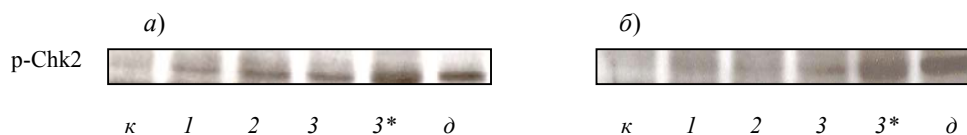


Рис. 2. Содержание фосфорилированной формы Chk 2 в клетках AGS (*а*) и HeLa (*б*) после инфицирования *H. pylori* P12 в концентрации 100 бактерий на клетку. Дорожки: *к* – клетки без обработки бактериями; *д* – обработка доксорубицином (1мкМ); \* – обработка АТМ/АТР ингибитором; *1–3* – клетки через 30 мин, 90 мин, 3 ч и 6 ч инфицирования соответственно

ванной форме и в интактных клетках, однако его количество заметно увеличилось после инфицирования.

Для подтверждения наших предположений об активации конкретных белков мы провели иммуноблотинг с антителами против p-Chk2 и p-p53.

Было обнаружено фосфорилирование белка Chk2 сразу после 90 мин инфицирования клеток AGS (рис. 2, *а*), которое увеличивалось после 3 и 6 ч инфекции.

Для доказательства активации Chk2 именно АТМ-киназой дополнительно клетки обрабатывали ингибитором АТМ в варианте с шестичасовой инфекцией. Однако ингибирование фосфорилирования не произошло, более того, появилась новая полоса в непосредственной близости от маркера с молекулярной массой 62 кДа, что свидетельствует об участии другой киназы в активации Chk2, помимо АТМ. При этом обработка доксорубицином, классическим активатором АТМ [20], приводила к высокому уровню фосфорилирования Chk2. Таким образом, активация Chk2, субстрата АТМ, осуществляется иной киназой, отличной от АТМ и АТР.

Аналогичная динамика активации происходила и в клетках HeLa (рис. 2, *б*) в тех же условиях.

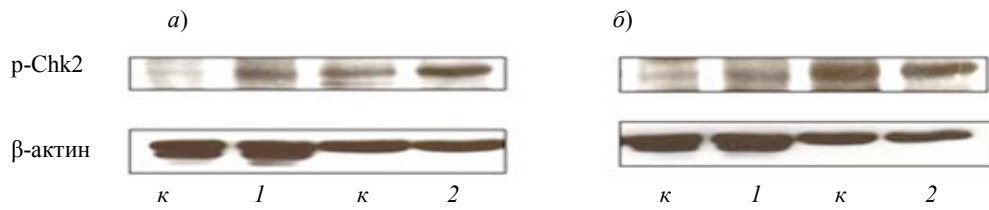


Рис. 3. Содержание фосфорилированной формы Chk 2 в клетках AGS (а) и HeLa (б) после инфицирования *H. pylori* P12 в концентрации 100 бактерий на клетку. Дорожки: κ – клетки без обработки бактериями; 1–2 – клетки через 6 и 24 ч инфицирования соответственно

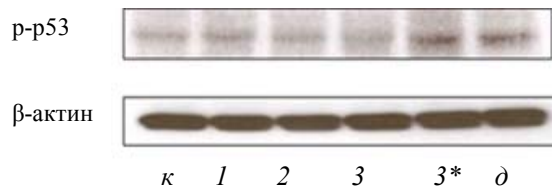


Рис. 4. Содержание фосфорилированной формы p53 в клетках HeLa после инфицирования *H. pylori* P12 в концентрации 100 бактерий на клетку. Дорожки: κ – клетки без обработки бактериями; δ – обработка доксорубицином (1мкМ); \* – обработка ATM/ATR ингибитором; 1–3 – клетки через 30 мин, 90 мин, 3 ч и 6 ч инфицирования соответственно

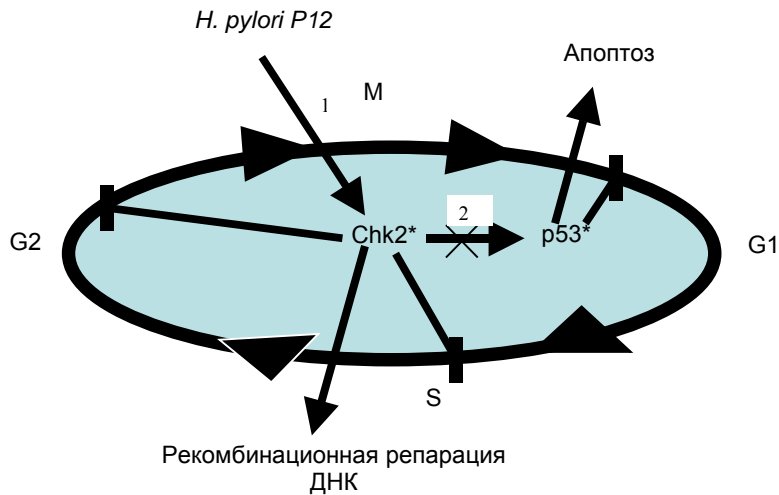


Рис. 5. Роль Chk2 киназы, активируемой инфекцией *H. pylori*, в остановке клеточного цикла. → – активация; ⊥ – блокирование; \* – фосфорилированная форма; <sup>1</sup> – неизвестная киназа, фосфорилирующая Chk2; <sup>2</sup> – Chk2 не фосфорилирует p53 при инфицировании *H. pylori*

При длительном инфицировании обеих клеточных линий наблюдается активация Chk2 и после 24 ч в клетках AGS (рис. 3, а).

При этом в контроле (инкубирование 24 ч в среде RPMI без эмбриональной телячьей сыворотки) также наблюдалось фосфорилирование Chk2 по сравне-

нию с контрольными клетками шестичасовой культуры. Мы связываем появление активированной формы данной киназы в контрольном варианте с отсутствием ростовых факторов и питательных веществ, содержащихся в эмбриональной телячьей сыворотки, что приводит к остановке клеточного цикла, в котором непосредственно принимает участие p-Chk2, у большей части клеток. Та же картина наблюдалась и в клетках HeLa (рис. 3, б).

Проверка активации p53, как одного из субстратов АТМ-киназы, показала, что *H. pylori* не вызывает изменение в уровне фосфорилирования p53 (рис. 4).

Полученные нами данные существенно расширяют представление об иницирующем влиянии инфекции *H. pylori* на сигнальные пути клеток эукариот. Нами впервые установлена активация хеликобактером киназы Chk2, ключевого регулятора клеточного цикла эукариот, но одновременно показано, что активация белка p53 вышеуказанной киназой не происходит (рис. 5).

### Summary

*M.O. Anikeenok, O.N. Ilinskaya. Contribution of Helicobacter pylori Infection to Eukaryotic Cell-Cycle Arrest.*

*Helicobacter pylori* infection plays an important role in the development of gastric adenocarcinoma in humans. Therefore, it is necessary to investigate reparation, apoptosis and cell-cycle regulation in the pathogen-affected cells. The article regards the activation of ATM-kinase substrates Chk2 and p53 in eukaryotic cells after infection with *H. pylori* P12. It is stated that infection leads to phosphorylation of Chk2 by the kinase, different from ATM in HeLa and AGS cells. At the same time, activation of p53, one of the substrates of Chk2, is not detected.

**Key words:** *Helicobacter pylori*, ATM/ATR – signaling pathway, phosphorylation, kinase.

### Литература

1. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process // Cancer Res. – 1992. – V. 52, No 24. – P. 6735–6740.
2. Crespi M., Citarda F. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: an overrated risk? // Scand. J. Gastroenterol. – 1996. – V. 31, No 11. – P. 1041–1046.
3. Hill M.J. Screening for colon cancer // Europ. J. Cancer Prev. – 1994. – V. 3, No 6. – P. 455–456.
4. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans // Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*. – Lyon, France, 1994. – V. 61. – P. 177–240.
5. Koster E.D., Buset M., Fernandes E., Deltenre M. The diagnosis of *Helicobacter pylori* in gastric preneoplastic and neoplastic lesions // Europ. J. Cancer Prev. – 1994. – V. 3, No 2. – P. 61–64.
6. Reed P.I. *Helicobacter pylori* and gastric cancer // Europ. J. Cancer Prev. – 1996. – V. 5, No 2. – P. 49–55.
7. Correa P. The gastric microenvironment determines *Helicobacter pylori* colonization // Am. J. Surg. Pathol. – 1995. – V. 90, No 9. – P. 1379–1381.
8. Mannick E.E., Bravo L.E., Zarama G., Reaple J.L., Zhang X.-J., Ruiz B., Fontham E.T.H., Mera R., Miller M.J.S., Correa P. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and

- apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants // *Cancer Res.* – 1996. – V. 56, No 14. – P. 3238–3243.
9. *Kastan M.B., Lib D.S.* The many substrates and functions of ATM // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2000. – V. 1, No 3. – P. 179–186.
  10. *Elledge S.J.* Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis // *Science.* – 1996. – V. 274, No 5293. – P. 1664–1672.
  11. *Shiloh Y.* ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity // *Nat. Rev. Cancer.* – 2000. – V. 3, No 3. – P. 155–168.
  12. *Cortez D., Wang Y., Qin J., Elledge S.J.* Requirement of ATM-dependent phosphorylation of *brca1* in the DNA damage response to double-strand breaks // *Science.* – 1996. – V. 286, No 5442. – P. 1162–1166.
  13. *Schmitt W., Haas R.* Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the *IgA* protease type of exported protein // *Mol. Microbiol.* – 1994. – V. 12, No 2. – P. 307–319.
  14. *Kurz E.U., Douglas P., Miller L.* Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279, No 51. – P. 53272–53281.
  15. *Stiff T., Walker S., Cerosaletti K., Goodarzi A., Petermann E., Concannon P., Driscoll M., Jeggo P.* ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling // *The EMBO Journal.* – 2006. – V. 25, No 24. – P. 5775–5782.
  16. *Won J., Kim M., Kim N., Ahn J.H., Lee W.G., Kim S.S., Chang K.Y., Yi Y.W., Kim T.K.* Small molecule-based reversible reprogramming of cellular lifespan // *Nat. Chem. Biol.* – 2006. – V. 2, No 7. – P. 369–374.
  17. *Laemmli K.U.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – V. 227. – P. 680–685.
  18. *Kim S.T., Lim D.S., Canman C.E., Kastan M.B.* Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274, No 53. – P. 37538–37543.

Поступила в редакцию  
29.01.09

---

**Аникеенок Марина Олеговна** – аспирант кафедры микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: [marina.anikeenok@gmail.com](mailto:marina.anikeenok@gmail.com)

**Ильинская Ольга Николаевна** – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии Казанского государственного университета.

E-mail: [Olga.Ilinskaya@ksu.ru](mailto:Olga.Ilinskaya@ksu.ru)