

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ РЕГУЛЯЦИИ ИНДУКЦИИ ИЗОФОРМ ЦИТОХРОМА P450 СЕМЕЙСТВА 1 В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ ОПУХОЛЕВОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

© В. А. Евтеев, Н. П. Щербак, В. А. Кобляков

Институт канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва;
электронный адрес: kobliakov@rambler.ru

Липофильные чужеродные соединения, в том числе и канцерогенные вещества и противоопухолевые препараты, метаболизируются изоформами цитохрома P450 (СУР). Известно, что в опухолях конститутивная и индуцированная экспрессия генов *CYP* снижена по сравнению с гомологичной нормальной тканью, что во многом определяет большую устойчивость опухоли к действию цитостатиков. Для выяснения вопроса о том, на какой стадии опухолевой трансформации происходят изменения в уровне СУР семейства 1, мы сравнивали уровень экспрессии мРНК генов *CYP1*, а также внутриклеточных белков, регулирующих синтез СУР, — Ah-рецептора, ARNT и AHRR. Исследовали эмбриональные фибробластоподобные клетки, эти же клетки, immortalized или вирусом Раушера, или спонтанно после прохождения кризиса, а также клетки трех трансформированных клонов (К1, К2 и К8), полученных воздействием бенз/а/пирена на клетки, immortalized вирусом Раушера. Конститутивный уровень экспрессии изучаемых генов выявляется во всех клеточных культурах. Индукция бенз/а/антраценом увеличивала уровень экспрессии мРНК всех индуцибельных генов (*CYP1A1*, *1B1* и *AHRR*) в исходной культуре, immortalized вирусом Раушера, и трансформированном клоне К2. В культуре спонтанно immortalized клеток и трансформированном клоне К1 наблюдали индукцию только гена *CYP1B1*. В культуре клеток трансформированного клона К8 отсутствовала индукция всех индуцибельных генов. Отсутствие индукции не связано с гиперэкспрессией AHRR — белка, блокирующего индукцию. Полученные результаты свидетельствуют о том, что способность immortalized клеток к индукции изоформ СУР определяется не только их свойством к не ограниченному во времени существованию, но и тем, как это свойство было получено. Показано также, что трансформированные клоны, несмотря на общность происхождения, отличаются друг от друга по индукции в них изоформ СУР. Одинаковый уровень экспрессии мРНК генов *Ah-рецептора* и *ARNT* в клетках, в которых происходит индукция всех индуцибельных генов, и в клетках, в которых происходит индукция не всех индуцибельных генов, свидетельствует о том, что помимо известных участников передачи индукционного сигнала участвуют другие, неизвестные в настоящий момент факторы.

Ключевые слова: цитохром P450, индукция ферментов, трансформация, immortalization, полициклические ароматические углеводороды.

Принятые сокращения: БА — бенз/а/антрацен, БП — бенз/а/пирен, ПАУ — полициклические ароматические углеводороды, СУР — цитохром P450.

Подавляющее большинство органических соединений, являющихся загрязнителями окружающей среды, для реализации своего биологического потенциала (токсического, мутагенного, трансформирующего и пр.) нуждаются в метаболической активации. Активация катализируется монооксигеназным ферментным комплексом, функциональным звеном которого является суперсемейство цитохромов P450 (СУР). Выявлено большое количество изоформ СУР с различной, иногда перекрывающейся субстратной специфичностью и разным механизмом регуляции экспрессии генов. Изоформы СУР разделены на семейства с учетом схожести их аминокислотной последовательности (Nebert et al., 1991). Известна органо- и видоспецифичность различных изоформ фермента, что в свою очередь во многом определяет органо- и видоспецифичность действия как канцерогенов,

так и токсических соединений, нуждающихся в метаболической активации. Экспрессия СУР является чувствительной к различным воздействиям. Так, некоторые ксенобиотики вызывают усиление экспрессии генов тех СУР, которые их окисляют (эффект субстратной индукции) (см. обзоры: Кобляков, 2003; Handschin, Meyer, 2003). Основные загрязнители окружающей среды, в том числе полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), окисляются изоформами *CYP1A1* и *1B1*. Эти ферменты индуцибельны, и их уровень увеличивается при введении субстратов окисления, таких как ПАУ, хлорированные диоксины и др. (см. обзоры: Кобляков, 1990; Denison et al., 2002). Попадая в клетку, индуктор взаимодействует в цитоплазме с Ah-рецептором, который после активации индуктором транспортируется в ядро, где образует тройной комплекс с белком ARNT.

Тройной комплекс является транскрипционным фактором, взаимодействующим с узнающей последовательностью ДНК, называемой XRE (xenobiotic responsible element) (Denison et al., 2002). Гены, в регуляторном участке которых находится XRE, транскрибируются. XRE выявлен в регуляторных участках многих генов (таких, как *CYP1*, *глутатион-S-трансфераза*, *NADPH-хиноноксидоредуктаза* и др.), участвующих в метаболизме ксенобиотиков. Индуцируется также ген, продуцирующий белок AHRR (Ah receptor repressor). Белок AHRR взаимодействует с белком ARNT, образуя неактивный комплекс, препятствующий образованию тройного комплекса: индуктор—Ah-рецептор—ARNT (Mimura et al., 1999). Таким образом белок AHRR реализует регуляцию индукции, вызванной ПАУ.

В опухолях обнаружено изменение соотношения различных изоформ *CYP* и их способности к индукции по сравнению с гомологичной нормальной тканью (см. обзор: Кобляков, 1998). Соответственно клетки опухоли имеют измененную (как правило, ослабленную) по сравнению с нормальной гомологичной тканью чувствительность к действию метаболизируемых этой системой ксенобиотиков (в том числе и противоопухолевых препаратов). Механизм изменения регуляции экспрессии изоформ *CYP* в опухолях неизвестен, как неизвестно и то, на какой стадии опухолевой трансформации эти изменения происходят. Знание механизмов регуляции уровня *CYP* в опухолях может дать возможность влиять на их синтез, увеличивая лечебный эффект цитостатиков. Помимо этого, индукторы *CYP1*, такие как ПАУ или галогенизированные диоксины, являются промоторами канцерогенеза. Не исключено, что создаваемые промоторами условия для преимущественного роста иницированных клеток регулируются через измененный уровень *CYP* или белков, участвующих в передаче индукционного сигнала.

Целью настоящей работы было сравнительное изучение конститутивной и вызванной введением индуктора экспрессии мРНК генов семейства *CYP1* и генов, участвующих в их регуляции (*Ah-рецептора*, *ARNT* и *AHRR*) в клеточных культурах на различных стадиях опухолевой трансформации. В качестве клеточных моделей были использованы эмбриональные фибробластоподобные клетки крыс раннего пассажа (Ф16-5), эти же клетки, immortalizированные неонкогенным вирусом Раушера (Ф27), спонтанно immortalizированные фибробласты (Ф16-20), прошедшие кризис, а также трансформированные клеточные клоны (К1, К2 и К8), полученные после обработки клеток Ф27 канцерогеном бенз/а/пиреном (БП).

Материал и методика

Эмбриональные фибробластоподобные клетки были получены по модифицированной методике Эллиот с сотрудниками (Elliott et al., 1976). 16—18-суточные эмбрионы крыс линии Фишер 344 измельчали ножницами, отмывали от крови в физиологическом растворе, обрабатывали трипсином, отмывали его и получали взвесь клеток, высаживали на чашку в среду RPMI, содержащую 20 % эмбриональной сыворотки.

Получение immortalizированных клеток инфицированием вирусом Раушера проводили по ранее описанной методике (Price et al., 1971), суть которой в том, что на нулевом пассаже кусочки 16—18-суточных эмбрионов

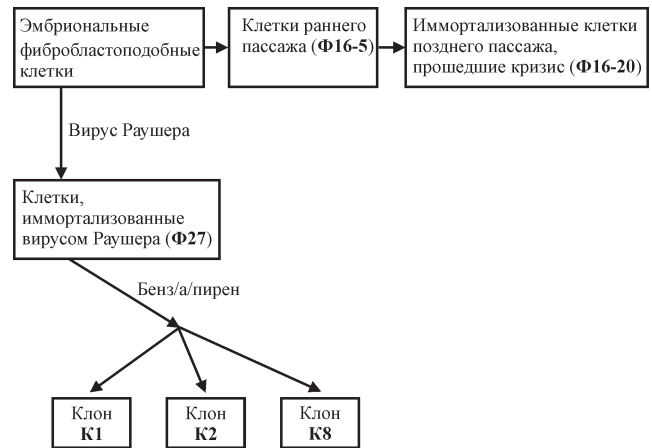


Рис. 1. Схема получения клеток различной степени опухолевой трансформации из фибробластоподобных эмбриональных клеток крысы (подробности см. в тексте).

крыс линии Фишер 344 размером до 1 мм выращивали в среде RPMI, содержащей 20 % эмбриональной сыворотки, в атмосфере 5 % CO_2 при 37 °C до появления из кусочков клеток, прикрепившихся к подложке и образовавших зону роста. Клетки обрабатывали ДЭАЕ-декстраном в концентрации 20 мкг/мл в течение 20 мин при комнатной температуре, отмывали средой RPMI, добавляли концентрат вируса, выдерживали в течение 45 мин при 37 °C, периодически встряхивая, после чего к клеткам добавляли среду RPMI, содержащую 2 % эмбриональной сыворотки; спустя 12 ч среду заменяли на полноценную, содержащую 10 % эмбриональной сыворотки.

Вирус Раушера получали из культуральной жидкости клеток линии JLS-V9, продуцирующей вирус. Вирус концентрировали центрифугированием с последующей ультрафильтрацией. Наличие продукции в культуре ретровируса определяли с помощью ХС-теста. Морфологически клетки Ф16-5, Ф16-20 и Ф27 не отличались друг от друга.

Трансформированные клоны получали обработкой в течение 3 сут клеток Ф27 канцерогеном БП (растворенным в ДМСО) в конечной концентрации 0.15 мкг/мл. Далее БП отмывали, клетки пассировали и из появившихся очагов трансформации получали клоны путем высеивания клеток в полужидкий агар. Схема получения клеток различной степени опухолевой трансформации представлена на рис. 1.

Индукцию изоформ *CYP* семейства 1 вызывали добавлением к клеткам на 24 ч растворенного в ацетоне бенз/а/антрацена (БА) в конечной концентрации 5 мкг/мл, к контрольным клеткам добавляли только ацетон в том же объеме (10 мкл/мл среды). Эксперименты по изучению влияния ингибитора синтеза белка на экспрессию генов проводили с циклогексимином, добавляя его в культуру в концентрации 10 мкг/мл на 24 ч.

Для выделения мРНК использовали TRI-реагент (Sigma, США) согласно протоколу, рекомендуемому фирмой-производителем. Концентрацию тотальной РНК определяли, измеряя оптическую плотность при длине волны 260 нм. Для получения кДНК проводили реакцию обратной транскрипции (ОТ) с синтетическими гексануклеотидами. Для проведения реакции использовали 4 мкг тотальной РНК. Реакцию проводили при 42 °C в течение 1 ч, выдерживали 5 с при 94 °C для инактивации

Нуклеотидные последовательности праймеров, используемых для проведения полимеразной цепной реакции

Ген	Нуклеотидная последовательность праймера	Размер ампликона, пары нуклеотидов
<i>β-Актин</i>	5'-TGCAGAAGGAGATTACTGCC-3' 5'-GCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'	211
<i>CYP1A1</i>	5'-CCATGACCAGGAACATATGGG-3' 5'-TCTGGTGAGCATCCAGGACA-3'	341
<i>CYP1B1</i>	5'-ACCGCAAACCTCAGCAACTTC-3' 5'-GTGTTGGCAGTGGTGGCATG-3'	427
<i>AHRR</i>	5'-CCC-ATC-AGA-TCC-TTT-GGA-TG 5'-AAA-GTC-AGC-ATC-CCT-CCT-TG	160
<i>AHR</i>	5'-TCCATGTAGCAGTGCCAGG-3' 5'-ATATCAGGAAGAGGCTGGGC-3'	212
<i>ARNT</i>	5'-GTCTCCCTCCCAGATGATGA-3' 5'-AAGAGCTCCTGTGGCTGGTA-3'	218

ции фермента. Полученную кДНК использовали для полимеразной цепной реакции (ПЦР). Во всех экспериментах проводили контрольную реакцию с использованием воды вместо РНК. Реакцию ПЦР для всех изучаемых генов проводили по следующей схеме: денатурация при 94 °С в течение 40 с; отжиг праймеров при 60 °С, 10 с; синтез продукта при 72 °С, 10 с; выдержка 2 мин после прохождения циклов при 72 °С. Количество циклов варьировало в пределах 25—30 в зависимости от изучаемого гена. В качестве контроля использовали РНК вместо кДНК. В ОТ-ПЦР использовали следующие ферменты — обратную транскриптазу, MuLV и Taq-SE (Сибээнзим, Россия). Праймеры и гексануклеотиды были синтезированы фирмой Хеликон (Россия).

Уравнивание количества кДНК для амплификации специфических генов проводили по количеству мРНК *β*-актина. Реакцию ОТ и реакции амплификации проводили на приборе «Терцик» (Россия). Последовательности используемых праймеров и размеры образующихся амплифицированных фрагментов указаны в таблице.

Продукты ОТ-ПЦР разделяли стандартным электрофоретическим методом при напряжении 150 В в 2%-ном агарозном геле, приготовленном на ТВЕ-буфере. Электрофореграммы денситрировали. При анализе гелей использовали программу Scion Image, версия 4.0.2.

Результаты

Конститутивный уровень экспрессии мРНК изучаемых генов в клетках различной степени опухолевой трансформации, уравненных по *β*-актину, показан на рис. 2. Видно, что используемые клеточные культуры экспрессируют мРНК всех изучаемых генов. В иммортализованной культуре Ф16-20 экспрессия *CYP1A1* несколько выше, чем в других культурах, а степень экспрессии мРНК неиндуцибельных генов — регуляторов индукции — *AHR* и *ARNT* — примерно одинакова для всех используемых клеточных культур.

Введение индуктора БА (рис. 3) по-разному влияет на индукцию генов в различных изучаемых культурах. Увеличение мРНК всех трех индуцибельных генов

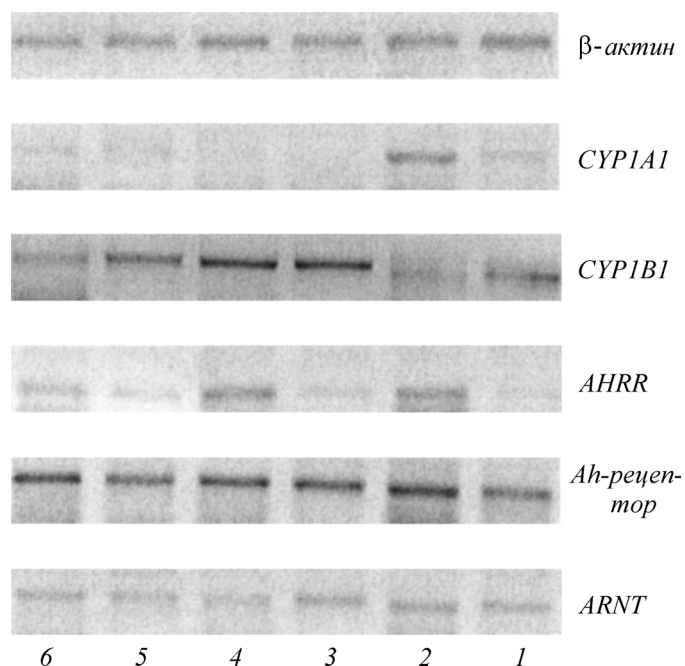


Рис. 2. Определение конститутивной экспрессии мРНК генов *β*-актина, *CYP1A1*, *CYP1B1*, *AHRR*, *Ah*-рецептора и *ARNT* методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в клетках различной степени опухолевой прогрессии, полученных из эмбриональных фибробластоподобных клеток крысы: Ф16-5 (1), Ф16-20 (2), Ф27 (3), К1 (4), К2 (5) и К8 (6).

(*CYP1A1*, *1B1* и *AHRR*) наблюдается в культурах Ф16-5, Ф-27 и К2. При этом степень индукции различна в разных культурах. Так, *CYP1A1* максимально индуцируется в клетках Ф27 (уровень мРНК становится в 8 раз выше, чем в контроле; рис. 3, а), *CYP1B1* — в клоне К2 (уровень мРНК становится в 7 раз выше, чем в контроле; рис. 3, б), а *AHRR* — в клетках Ф27 (уровень мРНК становится в 3 раза выше, чем в контроле; рис. 3, в).

В культуре фибробластов позднего пассажа (Ф16-20), прошедших кризис, наблюдается индукция только гена *CYP1B1* (рис. 3, б), в то время как индукция *CYP1A1* и *AHRR* отсутствует (рис. 3, а, в). В клоне К1 отсутствует индукция *CYP1B1* (рис. 3, б), в то время как индукция *CYP1A1* и *AHRR* сохраняется (рис. 3, а, в). В клоне К8 отсутствует увеличение экспрессии мРНК всех индуцибельных генов — *CYP1A1*, *1B1* и *AHRR* (рис. 3, а, в).

Таким образом, мы получили спектр культур с различным ответом на введение индуктора. Известно, что уровень белка *AHRR* регулирует способность к индукции этих генов. Можно предположить, что одним из факторов, вызывающих блокирование индукции всех индуцибельных генов в клоне К8 или изменение индукции какого-либо индуцируемого гена в клоне К1 и клетках Ф16-20, является гиперэкспрессия гена *AHRR*. Известно, что этот белок короткоживущий и введение в культуру ингибитора синтеза белка циклогексимида приводит к увеличению экспрессии генов, которые чувствительны к ингибиторному действию *AHRR* (Mimura et al., 1999).

Для того чтобы проверить, связано ли отсутствие индукции с блокированием белком *AHRR* чувствительных к нему генов, мы исследовали влияние циклогексимида на экспрессию мРНК изучаемых генов. Как видно на

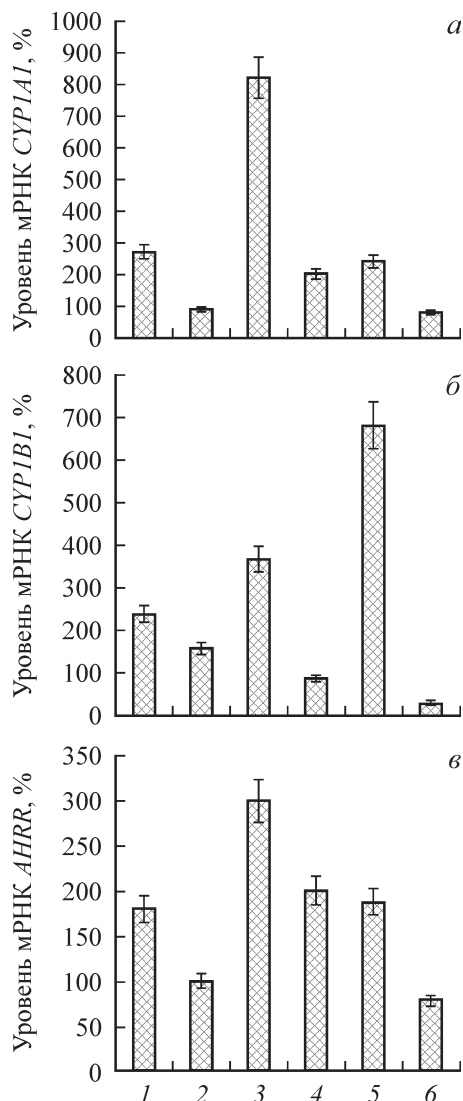


Рис. 3. Влияние бенз/а/антрацена на уровень мРНК генов *CYP1A1* (а), *CYP1B1* (б) и *AHRR* (в) в клетках Ф16-5 (1), Ф16-20 (2), Ф27 (3), К1 (4), К2 (5) и К8 (6).

Здесь и на рис. 4: гистограммы построены по данным денситометрии электрофореграмм (рис. 1). Изменения даны в % по отношению к контролю. Приведены средние из четырех экспериментов.

рис. 4, циклогексимида действительно увеличивает уровень мРНК индуцируемых генов, но только в тех культурах, где происходит индукция при действии БА. Однако гены, которые не отвечают на введение БА, также нечувствительны к введению циклогексимида, из чего можно заключить, что отсутствие индукции не связано с увеличением экспрессии *AHRR*.

Обсуждение

В настоящей работе мы исследовали закономерности регуляции экспрессии мРНК генов изоформ *CYP1A1* и *1B1*, являющихся основными факторами окисления ксенобиотиков типа ПАУ, и экспрессию мРНК генов, участвующих в регуляции *CYP* (*Ah-рецептора*, *ARNT* и *AHRR*), в культурах клеток общего происхождения, но различного уровня трансформации. Исходными для всех

используемых клеток были эмбриональные фибробластоподобные клетки крысы. Клетки первого этапа трансформации — иммортализованные — были получены двумя способами: или введением неонкогенного вируса Раушера в эмбриональные клетки сразу после их получения, или в результате длительного пассирования после прохождения кризиса и спонтанной иммортализации. В клетках, иммортализованных вирусом Раушера, наблюдалась индукция всех индуцибельных генов, не менее эффективная, чем в исходных эмбриональных фибробластоподобных клетках раннего пассажа. В клетках, иммортализованных в результате длительного пассирования и прохождения кризиса, индуцируется только ген *CYP1B1*, а индукция мРНК *CYP1A1* и *AHRR* отсутствует. Эти результаты свидетельствуют о том, что свойства иммортализованных клеток определяются не только их способностью к неограниченному во времени существо-

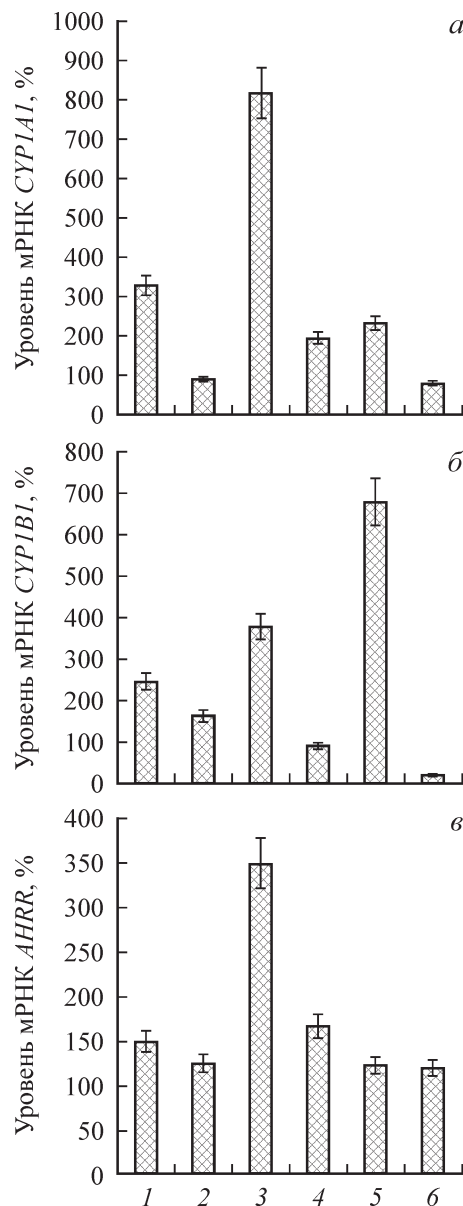


Рис. 4. Влияние циклогексимида на уровень мРНК генов *CYP1A1* (а), *CYP1B1* (б) и *AHRR* (в) в клетках Ф16-5 (1), Ф16-20 (2), Ф27 (3), К1 (4), К2 (5) и К8 (6).

ванию, но и тем, как это свойство было получено. Известно, что в процессе культивирования и старения культуры способность к индукции изоформ CYP уменьшается (Alexander et al., 1997). Введение индуктора БА в среду культивирования клеток, иммортализованных вирусом Раушера сразу после выделения, вызывает высокую степень индукции изоформ CYP, и эта индуцибельность сохраняется в процессе длительного культивирования. При пассировании происходит старение неиммортализованных клеток с падением способности к индукции некоторых генов, связанное, возможно, с укорочением теломеры. Таким образом, иммортализованные в «молодом» состоянии клетки сохраняют способность к индукции ПАУ при длительном пассировании, присущую исходным клеткам. Спонтанно иммортализованные клетки до получения бессмертия прошли многократное деление, приводящее к старению культуры и появлению показателей старения, в том числе потере способности к индукции ряда генов. Поэтому в спонтанно иммортализованных клетках Ф16-20, прошедших длинный путь пассирования, БА вызывает меньшую экспрессию мРНК индуцибельных генов по сравнению с клетками Ф27. Возможно и другое объяснение отсутствия индукции генов CYP1A1 и AHRR в клетках Ф16-20: спонтанно иммортализируются по какой-либо причине только клетки, в которых нарушен механизм индукции, стимулируемый ПАУ.

Трансформированные клоны по способности к индукции отличаются друг от друга, несмотря на то что были получены из общих клеток-предшественников. Если в клоне К2 индуцируются все гены, способные к индукции, в клоне К1 — AHRR и CYP1A1, то в клоне К8 отсутствует индукция всех трех индуцибельных генов. Поскольку в опухолях в подавляющем большинстве случаев конститутивный уровень CYP и способность CYP к индукции снижены (Кобляков, 1998), можно предположить, что опухоль развивается не из всех трансформированных клонов, а только из тех, которые имеют сниженный уровень CYP и(или) пониженную способность генов к индукции. В случае химического канцерогенеза, вызванного действием соединений типа ПАУ, этот феномен может быть объяснен следующим образом. Стадия промоции в развитии опухоли в отличие от стадии образования трансформированных клеток стимулируется не метаболитом, химически инертной молекулой вещества. В неметаболизированной форме канцероген нетоксичен, стимулирует пролиферацию (Гужаева и др., 1999) и нарушает межклеточные щелевые контакты (Шаровская и др., 2004), т. е. вызывает события, необходимые для промоции канцерогенеза (Rakitsky et al., 2000). Таким образом, в клетках, в которых отсутствует индукция CYP, с одной стороны, образуется меньшее количество активных метаболитов, способных вызвать токсическое действие, а с другой — происходит накопление исходной, неметаболизированной формы канцерогена, стимулирующей стадию промоции. Таким образом, можно заключить, что в процессе химического канцерогенеза на стадии трансформации могут образовываться клоны с различным содержанием CYP (в том числе и близким к уровню в исходных клетках) и различной способностью к индукционному ответу на введение ПАУ. Однако преимущество в развитии получают клоны с низкой конститутивной и наведенной (индуцибельной) метаболической активностью в отношении канцерогенов.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в процессе опухолевой трансформации происходят изменения в чувствительности клеток к воздействию индуктора CYP. Следует отметить, что экспрессия мРНК генов, участвующих в передаче индукционного сигнала (Ah-рецептора и ARNT), не меняется в процессе опухолевой трансформации клеток, в то время как в этих же клетках индукция генов CYP1A1, CYP1B1 и AHRR сильно различается. Из этого следует, что регуляция индукции контролируется не только на уровне экспрессии генов Ah-рецептора и белка ARNT, но и других, в настоящий момент неизвестных факторов.

Эксперименты с циклогексимином, который, как было показано ранее (Mimura et al., 1999; Ma et al., 2000), увеличивает экспрессию мРНК генов, зависимых от Ah-рецептора (зависимых благодаря уменьшению уровня лабильного белка AHRR, являющегося отрицательным регулятором экспрессии), показали, что отсутствие индукции не связано с гиперпродукцией этого белка. Введение циклогексимида не увеличивало уровня мРНК генов, которые не индуцировались БА.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48738а).

Список литературы

- Гужаева Е. Л., Остапкина Н. М., Кондаленко В. Ф., Кобляков В. А. 1999. Различные пути передачи митогенного и индуцирующего сигналов при действии индукторов цитохрома P-450. Биохимия. 64 (8) : 1105—1109.
- Кобляков В. А. 1990. Цитохромы семейства P450 и их роль в активации проканцерогенов. М.: ВИНТИ. 190 с.
- Кобляков В. А. 1998. Регуляция цитохрома P450 в опухолях и в процессе канцерогенеза. Биохимия. 63 (11): 1043—1058.
- Кобляков В. А. 2003. Цитохром P450: функционирование и регуляция. Биол. мембраны. 20 (3) : 265—272.
- Шаровская Ю. Ю., Вайман А. В., Соломатина Н. А., Кобляков В. А. 2004. Ингибирование межклеточных щелевых контактов канцерогенными полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ) в культуре клеток в отсутствие метаболического превращения ПАУ. Биохимия. 69 (4) : 511—518.
- Alexander D., Eltom S., Jefcoate C. 1997. Ah receptor regulation of CYP1B1 expression in primary mouse embryo-derived cells. Cancer Res. 57 : 4498—4506.
- Denison M., Pandini A., Nagy S., Baldwin E., Bonati L. 2002. Ligand binding and activation of the Ah receptor. Chem. Biol. Interact. 141 : 3—24.
- Elliott A., Bronson D., Stein N., Fraley E. 1976. In vitro cultivation of epithelial cells derived from tumors of the human urinary tract. Cancer Res. 36 : 365—369.
- Handschin C., Meyer U. 2003. Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. Pharmacol. Rev. 55 : 649—673.
- Ma Q., Renzelli A., Baldwin K., Antonini J. 2000. Superinduction of CYP1A1 gene expression. Regulation of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced degradation of Ah receptor by cycloheximide. J. Biol. Chem. 275 : 12 676—12 683.
- Mimura J., Ema M., Sagawa K., Fujii-Kuriyama Y. 1999. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. Genes Develop. 13 : 20—26.
- Nebert D., Nelson D., Coon M., Estabrook R., Feyerstein R., Fuji-Kuriyama Y., Gonzalez F., Guengerich P., Gunsalus I., Johnson E., Loper J., Sato R., Waterman M., Waxman D. 1991. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. DNA and Cell Biol. 10 : 1—14.
- Nebert D., Roe A., Dieter M., Solis W., Yang Y., Dalton T. 2000. Biochem. Pharmacol. 59 : 65—85.

Price P., Freeman A., Lane W., Huebner R. 1971. Morphological transformation of rat embryo cells by the combined action of 3-methylcholanthrene and Rauscher leukaemia virus. *Nat. New Biol.* 230 : 144—146.

Rakitsky V., Koblyakov V., Turusov V. 2000. Nongenotoxic (epigenetic) carcinogens: pesticides as an example. A critical review. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis.* 20 : 229—240.

Поступила 3 IV 2006

A COMPARATIVE STUDY OF INDUCTION REGULATION IN CYTOCHROMES FAMILY 1 P450
IN CELL CULTURES AT DIFFERENT STAGES OF TUMOR TRANSFORMATION

V. A. Evteev, N. P. Cherback, V. A. Kobliakov

Institute of Carcinogenesis, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Centre RAMS, Moscow;
e-mail: kobliakov@rambler.ru

Lipophilic xenobiotics, including some carcinogenic agents and cytostatics, are metabolized by cytochrome P450 isoforms (CYP). In tumours expression of CYP genes and their inducibility are lower than in a homologous normal tissue. This phenomenon determines the known higher cytostatic stability of tumour cells. To clarify, at which particular stage of tumour transformation the level of family 1 CYP may change, we compared mRNA expression of *CYP1A1*, *CYP1B1* and also of proteins regulated CYP expression: Ah receptor, ARNT and AHRR. For this aim we studied embryonic and fibroblast-like cells, in addition to cells of the same types but immortalized by the Rauscher virus, or spontaneously after crisis. Besides, we investigated transformed clones obtained by means of benzo/a/pyrene action on Rauscher virus-immortalized cells. Constitutive expression of genes studied in all cell cultures was shown. Benzo/a/anthracene induction increases the mRNA expression of all inducible genes (*CYP1A1*, *CYP1B1*, *AHRR*) in the original embryonic cells, in Rauscher virus-immortalized cells, and in transformed clone K2. In both spontaneously immortalized cells and transformed clone K1 only *CYP1B1* was induced. In transformed clone K8 no inducible gene was induced. In summary, we have shown that: 1) the ability of immortalized cells to CYP induction is determined not only by their capacity for a non-limited persistence, but also by the nature of immortalization; 2) despite their common genesis, the transformed clones differ in their ability to induce CYP. In addition to Ah receptor and ARNT, some other, yet unknown factors may also take part in CYP induction.

Key words: cytochrome P450, transformation, immortalization, gene induction, benzo/a/anthracene.