Фармакология, генополиморфизм и клонирование генов NAT у человека и животных-моделей

В.Н.Каркищенко, В.В. Мартынов

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Ключевые слова: N-ацетилтрансфераза, метаболизм лекарств, ксенобиотиков, фармакология, онкология, животные-модели.

Одним из самых ранних механизмов адаптации является реакция ацетилирования, необходимая для функционирования цикла Кребса, синтеза стероидов и жирных кислот, в процессах метаболизма или биотрансформации ксенобиотиков, включающих лекарственные препараты, бытовые и промышленные яды. Реакция ацетилирования осуществляется ферментом N-ацетилтрансферазой и коферментом А. В организме человека интенсивность ацетилирования находится под контролем β-адренорецепторов, пантотеновой кислоты, пиридоксина, тиамина и липоевой кислоты и зависит от функционального состояния внутренних органов и печени, в которых содержится N-ацетилтрансфераза. Всего выделено 2 изофермента: N-ацетилтрансфераза 1 (NAT1) и N-ацетилтрансфераза 2 (NAT2). NAT2 – белок, состоящий из 290 аминокислотных остатков, с молекулярной массой 33 кДа и локализующийся в цитоплазме клеток. Ген его находится в 8 хромосоме, локусе 8p23.1 – p21.3.

Оба изофермента генетически полиморфны, то есть имеют несколько аллелей. Присутствие того или иного аллеля в генотипе влияет на скорость метаболизма лекарственных средств и может быть причиной различных нежелательных эффектов. Поэтому, аллельный состав генов NAT необходимо учитывать при проведении доклинических испытаний новых препаратов на животных-моделях.

У человека основным ферментом ацетилирования ряда лекарственных препаратов в частности изониазида и сульфаниламидов, является NAT2, а NAT1 ацетилирует ариламины. К лекарствам, подвергающимся ацетилированию NAT2 относятся сердечно-сосудистые средства (прокаинамид, гидралазин), сульфаниламиды (сульфасалазин, сульфаметоксозол, сульфадиазин, сульфацетамид), ингибиторы стероидогенеза (аминоглутетимид), противотуберкулезные препараты (изониазид, ПАСК), бензодиазепины (нитразепам), а также кофеин, ПАБК и другие [1].

Генетический полиморфизм одно из важных свойств NAT2, описан в 1960 г. Evans и им же выделены «медленные» и «быстрые» ацетиляторы изониазида [2]. «Медленные» ацетиляторы являются гомозиготами по «медленной» аллели NAT2, а «быстрые» метаболизаторы являются гомозиготами или гетерозиготами по «быстрой» аллели NAT2 [4].

Оценены мРНК, уровни экспрессии протеина и стабильность протеина [3]. Не было найдено различий в экспрессии наблюдаемых NAT2*4 и NAT2*5B. Однако, NAT2 5B и NAT2 5D, но не NAT2 6D и NAT2 14G экспрессии протеина были существенно ниже, чем NAT2 4. В противоположность, NAT2 6D были легче (3.4 раз) и NAT2 14G был существенно (29 раз) менее стабилен, чем NAT2 4. Эти результаты предполагают, что 341T C (Ile114 Thr) общий для кластера NAT2*5 достаточен для редукции в экспрессии протеина NAT2, но, что механизм для медленного ацетилятора фенотипа отличается для аллелей NAT2, которые не содержат 341T C, она содержится в кластерах NAT2*6 и NAT2*14. Различия в механизмах для медленной ацетиляции фенотипа у людей связаны с множественной медленной ацетиляцией фенотипов [3].

Генетические вариации в NAT2 показывают предрасположенность людей к раку, индуцированному окружающей средой. Около 50% большинства не-азиатского населения являются фенотипом с медленной ацетиляцией, они чаще испытывают воздействие токсических веществ из многих ароматических аминов и лекарств. Медленные ацетиляторы также показывают предрасположенность к раку мочевого пузыря от канцерогенов ароматических аминов. Показано, что самый медленный ацетиляторный фенотип имеет наивысшую заболеваемость раком мочевого пузыря.

Первоначальные исследования показали, что низкий ацетиляторный фенотип соответствовал снижению или отсутствию N-ацетилтрасферазы печени. Комбинация полиморфизма 341T C/481C T и полиморфизма 590G A в коде NAT2 приводят к уменьшению экспрессии рекомбинантного протеина NAT2 человека в клетках COS-1. Более того, исследования показали полиморфизм 590G A и 857G A в кодировке области NAT2 были связаны с уменьшением экспрессии протеина NAT2 в печени человека и снижению экспрессии рекомбинантного протеина NAT2 в клетках яичников у китайских хомяков. Изучения рекомбинантной экспрессии в прокариотической системе, однако, не показали снижения в протеине NAT2, связанные с медленными ацетиляторными аллелями. Таким образом, молекулярный механизм отклика на медленные ацетиляторные фенотипы остаются не полностью понятными.

Изучение связи генотипов NAT2 с раком выявлены три новые аллели NAT2. Новые аллели NAT2

вместе с наиболее общими быстрыми (NAT2*4) и медленными (NAT2*5B) ацетиляторами аллелей NAT2 были охарактеризованы рекомбинантной экспрессией в дрожжах (Schizosaccharomyces pombe), а у человека относятся к медленному ацетиляторному фенотипу.

Имеются данные о том, что фенотип «быстрого» ацетилирования встречается чаще у светлоглазых и светловолосых людей. Есть также данные о снижении распространенности «медленных» ацетиляторов с Севера на Юг и, что частота рака мочевого пузыря в 2-3 раза больше чем у «быстрых» ацетиляторов. Среди «быстрых» ацетиляторов в 1,8 раз чаще встречается колоноректальный рак и это по-видимому можно объяснить тем, что у них более интенсивный процесс биоактивации потенциальных канцерогенов – ариламинов при их ацетилировании. Среди представителей европеоидной расы распространенность «медленных» ацетиляторов составляет около 50%, а среди монголоидов до 15%. В настоящее время идентифицированы около 15 мутантных аллелей гена NAT2, приводящие к «медленному» ацетилированию.

Тип ацетилирования определяется как фенотипированием, так и генотипированием NAT2, а в качестве маркерных субстратов широко используются дапсон и сульфадимезин. Если отношение концентрации моноацетилдапсона к концентрации дапсона в плазме через 6 часов после введения менее 0,35 – это характерно для «медленных» ацетиляторов, а если более 0,35 – для «быстрых». При использовании сульфадимезина, наличие его менее 25% в плазме через 6 часов после введении и менее 70% в моче, собранной через 5-6 часов после введения характерно для «медленного» ацетилирования.

В Научном центре биомедицинских технологий ведется работа по изучению полиморфизма, в том числе генов NAT и связи этого полиморфизма с функцией ацетилирования у мини-свиней и мышей различных инбредных линий. При помощи праймеров, распознающих консервативные участки в генах NAT, нами были амплифицированы, и впоследствии клонированы фрагменты геномной ДНК мышей линий DBA2 и BALB/c и мини-свиней светлогорской популяции, Сравнение нуклеотидных последовательностей этих фрагментов с уже известными последовательностями генов NAT1 и NAT2 показало, что полученные фрагменты принадлежат генам семейства NAT у исследованных животных. При этом, в случае мини-свиней полученный ген оказался геном NAT1, а в случае мышей геном NAT2. Гомология гена мини-свиньи с генами NAT1 у других представителей класса млекопитающих составила 89%, причем 87% для кошки (Felis catus), 87% для коровы (Bos taurus), 86% для шимпанзе (Pan troglodytes), 86% для макаки (Macaca mulatta), 78% для человека (Homo sapiens) и 78% для мыши (Mus musculus) и крысы (Rattus norvegicus). Амплифицировать ген NAT2 у свиньи нам пока не удалось.

Что касается генов NAT2, полученных нами у двух инбредных линий лабораторных мышей, то эти два клона оказались абсолютно идентичны как между собой, так и по сравнению с сиквенсами этого гена у других линий мышей, найденными нами в генетическом банке. Эти результаты свидетельствуют о высокой генетической однородности мышей различных инбредных линий по гену NAT2. Гомология генов NAT2 мыши и человека составила 80%. Известны и мутантные аллели гена NAT2 у человека, приводящие к медленному ацетилированию. Эти аллели содержат следующие нуклеотидные замены: 191G→A, 282C→T, 341T→C, 481C→T, 590G→A, 803A→G и 857G→A. В полученных нами сиквенсах генов NAT2 у мышей в этих положениях находятся следующие нуклеотиды: 191G, 282T, 341T, 481T, 590G, и 803G, нуклеотид 857 не был апмлифицирован. Нетрудно заметить, что у мышей в указанных позициях находятся либо нуклеотиды соответствующие «нормальному» аллелю человека (191, 341, 590), либо нуклеотиды, аналогичные замещающим нуклеотидам в мутантных человеческих аллелях (282, 481, 803). Из этого можно сделать вывод о консерватизме как «нормальных», так и замещающих нуклеотидов в этих позициях. Однако пока не известно, являются ли эти положения и замены в них функциональными у мыши также как у человека.

Ацетиляционный полиморфизм связан не только с различными устойчивостями к токсичности лекарств, но и раковыми заболеваниями, связанными с ароматическими и гетероцикличными аминами. N-ацетиляция является катализом двух цитозольных N-ацетилтрансфераз (NAT1 и NAT2), которые обезвреживают многие карциногенные ароматические амины. NAT1 и NAT2 также активируют N-гидроксилметаболиты ароматических и гетероцикличных аминных карциногенов до составляющих, которые влияют на ДНК и инициируют рак. Классический N-ацетиляционный полиморфизм регулируется локусом NAT2, который сегрегирует индивидуумов в быстрые, средние и медленные ацетиляторные фенотипы. Некоторые эпидемиологические исследования на людях связаны с медленными и быстрыми ацетиляторными фенотипами с повышением чувствительности в мочевом пузыре и колоректальным раком, соответственно. Ацетилационный полиморфизм был охарактеризован в трех типах грызунов и у мини-свиней для проверки связи между ацетилятором фенотипа NAT2 и восприимчивостью к ракам, вызванным ароматическими и гетероцикличными аминами в различных целевых органах опухоли. Были клонированы и последовательно представлены NAT1 и NAT2 из быстрых и медленных ацетиляторных мышей, сирийского хомяка и крысы. Рекомбинанты NAT1 и NAT2 энзимов раскодированы, коды этих генов характеризовали их каталитическую активность по

активации (О-ацетиляция) и деактивации (N-ацетиляция) ароматических и гетероцикличных аминных карциногенов. Ацетиляторный полиморфизм у мини-свиней, мышей, сирийского хомячка и крысы может быть описан как модель ацетиляционного полиморфизма человека.

Тем не менее необходимы дополнительные исследования полиморфизма генов семейства NAT у лабораторных животных и проведение фенотипирования тех особей, у которых будут выявлены различиия в нуклеотидных последовательностях генов NAT.

Литература

1. *Кукес В.Г.* Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты. – М., 2004.

2. *Evans D.A.P.; Manley K.A.; McKusick, V.A.* Genetic control of isoniazid metabolism in man. // *Brit. Med.J.2: 485-491, 1960.*

3. *Leff M.A., Fetland A.J., Doll M.A., Hein D.W.* Novel Human N-Acetyltransferase 2 Alleles That lifer in Mechanism for Slow acetylator phenotype. // *J. of Biolog. Chemistry Vol. 274, No. 49, pp. 34519-34522, 1999.*

4. *Sunahara S.; Urano V.; Ogawa M.* Genetical and geographic studies on isoniazid inactination. // *Science 134: 1530-1531, 1964.*

Pharmacology, genopolymorphism and of cloning NAT-gene in people and animals-models

V.N. Karkischenko, V.V. Martynov

Research Center of Biomedical Technologies of RAMS, Moscow

Key words: N-acetyltransferase, drug metabolism, xenobiotics, pharmacology, oncology.

Using conservative DNA segments we amplified and cloned the genomic DNA segments of mices (strains DBA2 & BALB/c) and mini-pigs-(Y) (svetlogorskaya strain). By comparison to the known sequences of NAT1- & NAT2- genes the analysed segments were identified as belonging to the NAT-genes group. The examined gene was found to be specifically NAT1-genome for mini-pigs and NAT2-genome for mices.

The homology of mini-pigs´ gene with NAT1-genes of other mammalians was up to: 89% for cat (Felis catus); 87% for cow (Bos taurus) and chimpanzee (Pan troglodytes); 86% for macaque (Macaca mulatta) and human (Homo sapiens); 78% for mouse (Mus musculus) and rat (Rattus norvegicus).