

УДК ВМ 08-332
©Коллектив авторов

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ СУБСТРАТОВ АТМ/АТР КИНАЗ В ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ ПОСЛЕ *HELICOBACTER PYLORI* ИНФЕКЦИИ

М.О. Аникеенок^{1}, Ю.Н. Чурин², Т. Майер², О.Н. Ильинская¹*

¹Биолого-почвенный факультет Казанского государственного университета,
420008 Казань, ул. Кремлевская 18; факс: (843) 238-71-21;
эл. почта: marina.anikeenok@gmail.com

²Отдел молекулярной биологии, Институт инфекционной биологии М. Планка,
Берлин, Германия

Проведена характеристика фосфорилирования субстратов АТМ/АТР киназ в клетках HeLa и AGS в ответ на инфекцию *H. pylori*. При инфекции клеток двумя штаммами *H. pylori* диким типом и мутантом, дефектным по *cagPAI* (*cag* (cytotoxin-associated gene) pathogenicity island), киназы Chk1 и Chk2 активируются при инфекции, при этом только Chk1 фосфорилируется непосредственно АТМ киназой. Используя методы двумерного гель-электрофореза и масс-спектрометрии, определена группа белков, которые фосфорилируются в AGS клетках АТМ/АТР киназами во время инфекции *H. pylori*.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, АТМ/АТР киназы, фосфорилирование, RPA32A, сплайсинг-факторы.

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время установлено, что *Helicobacter pylori* является причиной развития хронического гастрита, важнейшим фактором патогенеза язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и желудка [1–3]. Гиперплазия и метаплазия желудочного эпителия, как последствия *H. pylori* инфекции, значительно увеличивают риск развития рака желудка и МALT-лимфомы [4]. Накоплено большое количество эпидемиологических данных о связи бактериальной инфекции с развитием злокачественных новообразований, однако, процессы, происходящие на молекулярном уровне в клетке, атакованной патогеном, практически не изучены.

* - адресат для переписки

Воспаление слизистой оболочки желудка – результат взаимодействия *H. pylori* с желудочным эпителием. Такие вирулентные факторы бактерии, как вакуолизирующий цитотоксин (VacA), белок цитотоксинассоциированного гена (CagA), уреазы и ряд других ферментов усиливают прямой повреждающий эффект патогена [5]. В процессе адгезии *H. pylori* к слизистой оболочке желудка клетки происходит активация каскада протеинкиназ ERK, p38, JNK, приводящая к повышению активности транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию ядерных генов [6–8]. Накоплено большое количество эпидемиологических данных о связи бактериальной инфекции с развитием злокачественных новообразований, однако, механизмы клеточного ответа на повреждения ДНК вследствие бактериальной инфекции изучены недостаточно.

Хорошо изучена сигнальная система, отвечающая на появление двунитевых разрывов ДНК и связанная с первичной активацией протеинкиназы АТМ (ataxia-telangiectasia mutant) [9]. Активируя разнообразные субстраты, такие как p53, H2AX, Chk1, Chk2 и другие, АТМ вносит свой вклад в регуляцию клеточного цикла, репарационные и рекомбинационные процессы [10–12].

Исследования, связывающие инфекцию *H. pylori* с повреждениями ДНК эпителиальных клеток, были проведены с использованием биоптатов эпителия желудка мышей [13], и людей [14]. Поскольку бактерия *H. pylori* является не единственным фактором, влияющим на состояние слизистой оболочки желудка, представляется более корректным изучить возможность индукции повреждений ДНК эукариотических клеток при *H. pylori* инфекции в модельных системах *in vitro*. Поскольку АТМ/АТР активируются в ответ на двойные разрывы ДНК [15], об их наличии косвенно можно судить по образованию фосфорилированных субстратов АТМ. В настоящей работе показано, что фосфорилированные субстраты АТМ/АТР киназ накапливаются в клетках хозяина инфицированных *H. pylori*. Наличие фосфорилированных субстратов АТМ/АТР продемонстрировано методами иммуноблотинга и MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) масс-спектрометрии. Наши результаты подтверждают генотоксический потенциал патогена.

МЕТОДИКА.

Культуры клеток. В работе были использованы две линии опухолевых клеток человека: HeLa (карцинома эндометрия) и AGS (ATCC CRL 1739 аденокарцинома желудка) (коллекция Института инфекционной биологии Макса Планка, Берлин, Германия). Клетки культивировали в 6-луночных планках со средой RPMI 1640 (“Invitrogen”, Германия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (“Biochrom”, Германия), в атмосфере 5% CO₂ 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 [16] и мутантом *H. pylori* ΔPAI, дефектным по наличию островка патогенности [17]. Бактерии выращивали при 37°C на GC-агаре, содержащем ванкомицин (10 мкг/мл), в микроаэрофильных условиях. Перед инфицированием бактерии инкубировали 18 ч в жидкой питательной среде ВНІ, содержащей антибиотики ванкомицин (10 мкг/мл), триметоприм (1,25 мкг/мл) и нистатин (1 мкг/мл) для дикого типа *H. pylori* P12 и ванкомицин (10 мкг/мл), триметоприм (1,25 мкг/мл), неостатин (1 мкг/мл) и канамицин (8 мкг/мл) для *H. pylori* ΔPAI. Бактерии ресуспендировали в PBS (“Invitrogen”) и добавляли к клеткам HeLa и AGS в соотношении 100 бактерий на одну клетку хозяина.

АТМ/АТР киназы активировали доксорубицином (1 мкМ, 4 ч) в среде RPMI [18]. Для ингибирования киназ использовали АТМ/АТР ингибитор (“Calbiochem”), обрабатывая клетки HeLa (2,5 мкг/мл) и AGS (0,7 мкг/мл) за 18 ч до инфицирования [19]. Для ингибирования ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК) применяли ДНК-ПК III ингибитор (“Calbiochem”) (25 мкМ) обрабатывая клетки за 2 ч до инфицирования [20].

Электрофорез. Для приготовления клеточных лизатов клетки лизировали в буфере, содержащем 2% SDS, 3% β -меркаптоэтанол, 20% глицерин, 0,05% бромфеноловый синий, и 5 мМ дитиотрейтол. Лизаты прогревали при 95°C в течение 20 мин, центрифугировали 1 мин при 12 000 об/мин. Белки разделяли в 10% ПААГ в модификации Laemmli [21]. Для определения молекулярной массы белков использовали маркер ("New England Biolabs"). **Двумерный электрофорез** белков клеточного лизата проводили в соответствии с ранее описанной методикой [22]. Белки в геле детектировали (визуализировали) окрашиванием Кумасси-G250 ("Serva"). Электроперенос белков на поливинилиденфторидную (PVDF) мембрану ("Poly Screen NEF 1002") проводили в камере для полусухого переноса ("Biometra") с использованием буфера, содержащем 20% (v/v) метанола, 0,02% (m/v) SDS, 25 мМ трис-HCl и 192 мМ глицин. Окрашивание мембран после двумерного электрофореза производили пятиминутным инкубированием в водном растворе, содержащем Кумасси R 250 ("Serva") 0,1%, 40% (v/v) метанол, 10% (v/v) уксусную кислоту, затем отмывали 3 раза по 5 мин в водном растворе 40% (v/v) метанола, 10% (v/v) уксусной кислоты и высушивали на воздухе. Отмывку (stripping) проводили согласно Pryor [23].

Иммуноблотинг. Мембрану с иммобилизованными белками инкубировали в буфере TBS-T (140 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 25 мМ трис-HCl, 1% (v/v) твин-20), содержащем 3% 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 ("Perkin Elmer"), используя плёнки 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°C в буфере, содержащем 31,25 мл 1 М трис-HCl, 4 мл β -меркаптоэтанол, 50 мл 20% (m/v) Ds-Na, 500 мл H₂O.

Антитела. В работе использовали кроличьи поликлональные антитела против белков Phospho-(Ser/Thr) ATM/ATR Substrate Antibody ("Cell Signaling Technology"), моноклональные мышинные антитела против RPA 32A subunit (MA34) ("Santa Cruz"), β -актин ("Sigma"). Вторичные антитела HRP α -mouse и HRP α -rabbit ("Amersham").

Масс-спектрометрия. Анализ проводили с помощью MALDI-TOF/TOF масс спектрометра. Полученные результаты обрабатывали с помощью программы Mascot в базе данных NCBI.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Прежде всего мы показали, что при инфекции AGS клеток бактериями дикого типа *H. pylori* P12 и мутантными бактериями *H. pylori* Δ cagPAI происходит фосфорилирование белков, совпадающих по своим молекулярным массам (м.м.), 62 и 56 кДа, с известными ATM/ATR субстратами Chk1 и Chk2, соответственно (рис. 1). Кроме этих двух белков, особенно сильно *H. pylori* инфекция индуцирует фосфорилирование белка (или группы белков) с м.м. 32 кДа (рис. 1). Аналогичное фосфорилирование трех упомянутых белков происходит и в HeLa клетках, инфицированных *H. pylori* (рис. 2, дорожки 2, 3, и 4). Необходимо отметить, что фосфорилирование всех трёх субстратов происходит как при инфекции клеток хозяина диким типом *H. pylori* P12, так и мутантом *H. pylori* Δ cagPAI (рис. 1). В связи с этим, в дальнейших экспериментах для инфекции использовали только штамм дикого типа *H. pylori* P12. Таким образом, фосфорилирование субстратов ATM/ATR киназ не зависит от типа инфицированной клеточной линии (AGS или HeLa) и от наличия cagPAI.

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ СУБСТРАТОВ АТМ/ATR-КИНАЗ В КЛЕТКАХ

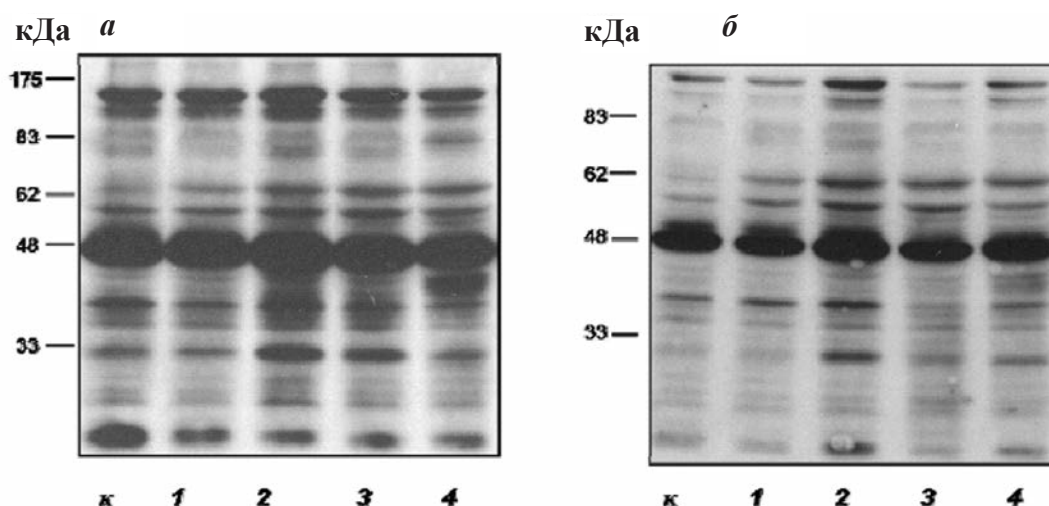


Рисунок 1.

Содержание фосфорилированных субстратов АТМ в клетках AGS после инфицирования *H. pylori* P12 (а) и *H. pylori* ΔPAI (б) в концентрации 100 бактерий на клетку. Дорожки: κ - клетки без обработки бактериями; 1-4 - клетки через 30 мин, 90 мин, 3 ч и 6ч инфицирования соответственно.

Чтобы доказать, что за фосфорилирование белков в клетках хозяина ответственны АТМ/ATR киназы, мы провели иммуноблот-анализ лизатов клеток хозяина, инфицированных *H. pylori* в присутствии специфичного ингибитора этих киназ с тем же антителом. Результаты этих экспериментов показали, что ингибитор подавляет фосфорилирование только белка, соответствующего по м.м. киназе Chk1. В то же время, снижения уровня фосфорилирования Chk2 не происходит (рис. 2, дорожки 2*, 3*, 4*). При обработке клеток хозяина доксорубицином, активатором АТМ/ATR [18], в присутствии ингибитора оба белка (обе группы белков) не фосфорилируются (рис. 2, дорожка д*). Таким образом, фосфорилирование Chk2 при *H. pylori* инфекции может происходить при участии другой, отличной от АТМ/ATR, киназы.

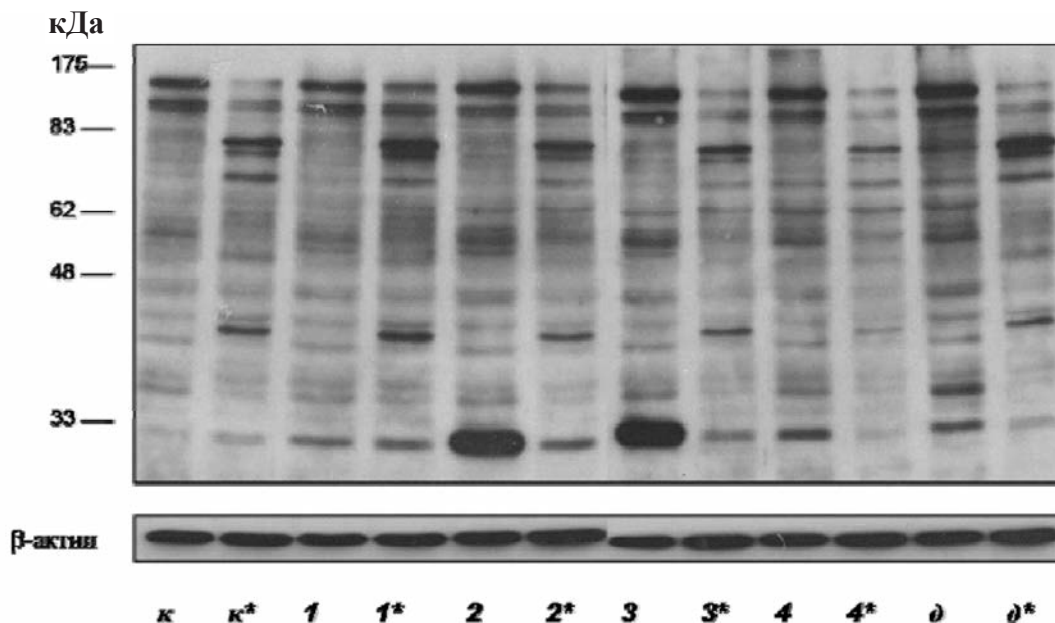


Рисунок 2.

Содержание фосфорилированных субстратов АТМ в клетках HeLa после инфицирования *H. pylori* в концентрации 200 бактерий на клетку. Дорожки: κ - клетки без обработки бактериями; д - обработка доксорубицином; * - обработка АТМ/ATR ингибитором; 1-4 - клетки через 30 мин, 90 мин, 3 ч и 6 ч инфицирования соответственно.

Особенностью HeLa клеток в этом случае является то, что уровень фосфорилирования белка с мм 32 кДа, достигший максимума после 90 мин инфекции не снижается после трех часов инфекции, как в случае AGS клеток (рис. 1 и 2, дорожки 2 и 3).

Чтобы идентифицировать белки, фосфорилируемые ATM/ATR киназами, мы инфицировали AGS клетки *H. pylori* P12 в течение 90 мин. Белки неинфицированных и инфицированных AGS клеток были разделены, используя двумерный гель-электрофорез, перенесены на мембрану и проанализированы, используя anti - Phospho-(Ser/Thr) ATM/ATR Substrate антитело (рис. 3). Антитело реагирует с целым рядом белков в неинфицированных клетках, что свидетельствует о важной роли, которую играют ATM/ATR киназы в нормальном функционировании клеток хозяина. После инфекции мы наблюдали увеличение уровня фосфорилирования уже модифицированных белков (рис. 3а). Кроме того, в результате инфекции появились 9 новых сигналов (рис. 3а*), что свидетельствует о повышении активности ATM/ATR киназ в результате инфекции. Необходимо отметить, что происходило не только фосфорилирование, но и дефосфорилирование ряда белков в результате инфекции (рис. 3а*, стрелки). Таким образом, использование двумерного гель-электрофореза, имеющего более высокую, чем одномерный гель-электрофорез, разрешающую способность, позволяет выявить большее количество различных в уровне фосфорилирования субстратов ATM/ATR киназ.

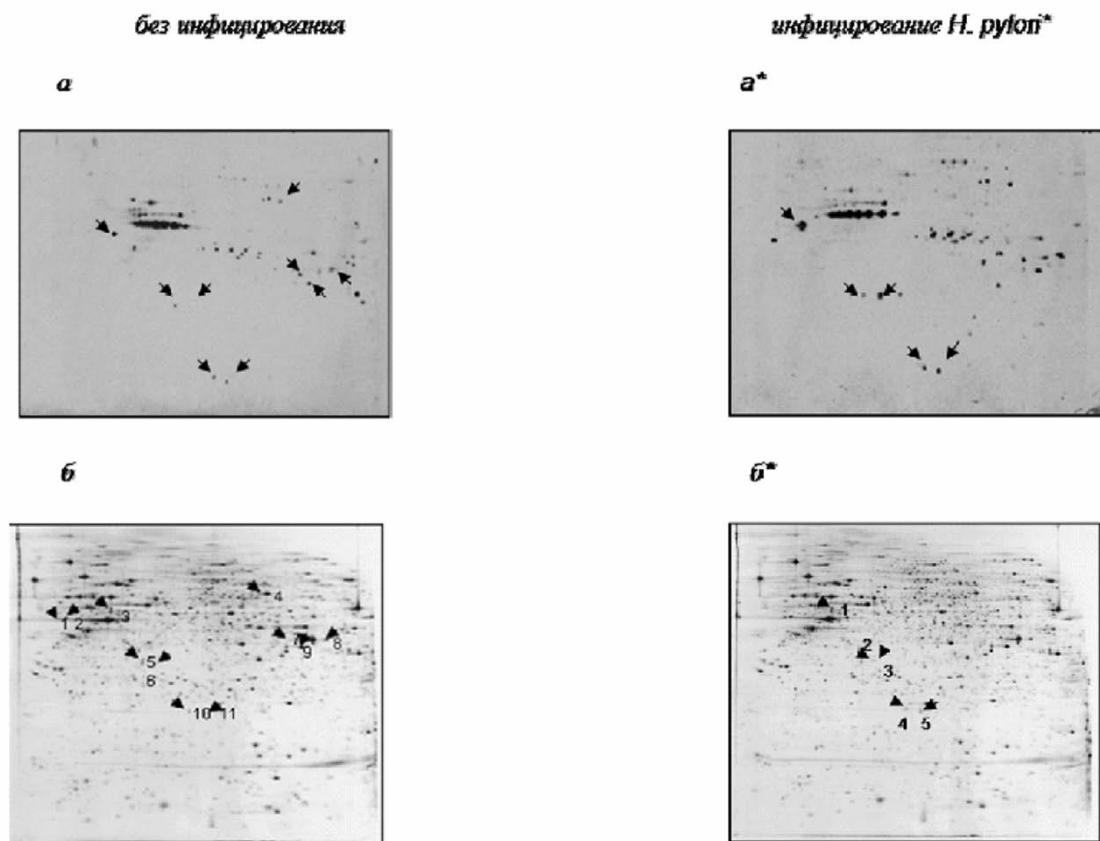


Рисунок 3.

Двухмерное электрофоретическое разделение белков клеток AGS без инфицирования (слева), и после 90 мин инфицирования *H. pylori* P12 в концентрации 100 бактерий на клетку - *H. pylori** (справа). а - иммуноблотинг с антителами против фосфо-(Ser/Thr) ATM/ATR субстратов, стрелками отмечены белки, содержание которых изменяется; б - окраска геля CBB-R250, стрелками и номером отмечены белки для идентификации MALDI.

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ СУБСТРАТОВ АТМ/АТР-КИНАЗ В КЛЕТКАХ

Мы выделили (рис. 3б, стрелки) наиболее измененные инфекцией по уровню фосфорилирования белки и идентифицировали их с помощью MALDI масс-спектрометрии. Результаты масс-спектрометрии представлены в таблице 1. Среди них не были обнаружены белки, имеющие сайт фосфорилирования АТМ/АТР киназами. Мы проанализировали также белки AGS клеток после инфекции (рис. 3б*, табл. 2) и обнаружили 2 белка, 1 и 3, которые являются субстратами АТМ/АТР, а именно гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин F [24] и репликационный белок A2 [25]. Репликационный белок A2 имеет м.м. около 32 кДа, что соответствует мм белка, который наиболее сильно фосфорилируется в AGS клетках при *H. pylori* инфекции.

Таблица 1. Результаты MALDI масс-спектрометрического анализа белков клеточного лизата AGS без обработки бактериями.

Номер белка	Результат идентификации
1	предшественник ретикулосамбина 1
2	подобный 40S рибосомальному протеину SA (р 40)
3	TXNDC5 белок
4	пируват киназа мышц человека, цепь A (Pfkfb2)
5	β -субъединица копирующего F-актин белка (CapZ beta)
6	Не определен
7	ассоциированный со старением белок гена 9
8	Гетерогенный нуклеорибонуклеопротеин A2/B1 изоформа B1
9	Гетерогенный нуклеорибонуклеопротеин A2/B1 изоформа B1
10	сплайсинг фактор аргинин/серин 3, изоформа CRA_c
11	сплайсинг фактор аргинин/серин 3, изоформа CRA_c

Таблица 2. Результаты MALDI масс-спектрометрического анализа белков клеточного лизата AGS после 90 мин инфицирования *H. pylori* P12 в концентрации 100 бактерий на клетку.

Номер белка	Результат идентификации
1	гетерогенно ядерный рибонуклеопротеин F *
2	тиоредоксин редуктаза (trxB)**
3	репликационный белок A2, 32kDa *
4	сплайсинг фактор аргинин/серин 3, изоформа CRA_c*
5	сплайсинг фактор аргинин/серин 3, изоформа CRA_c*

Примечание: * - белок *Homo sapiens*, ** - белок *H. pylori*.

Чтобы исключить возможность фосфорилирования белка с м.м. 32 кДа ДНК-ПК (ДНК зависимая протеинкиназа), которая также активируется после появления двойных разрывов ДНК [26], мы инфицировали HeLa и AGS клетки в присутствии ингибитора данной киназы. Вестерн блот анализ лизатов инфицированных клеток показал, что ингибирование ДНК-ПК не снижает уровень фосфорилирования белка с м.м. 32 кДа в обоих типах клеток (рис. 4). Это означает, что этот белок является непосредственным субстратом ATM/ATR.

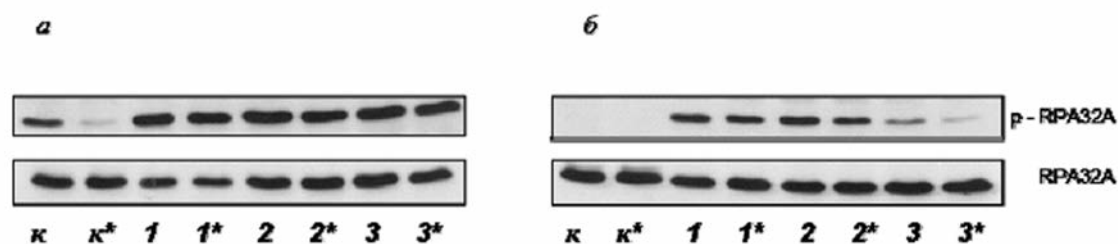


Рисунок 4.

Содержание фосфорилированной формы RPA32A в клетках AGS (а) и HeLa (б) после инфицирования *H. pylori* P12 в концентрации 200 бактерий на клетку. Дорожки: к - клетки без обработки бактериями; * - обработка ДНК-ПК III ингибитором; 1-3 - клетки через 30 мин, 90 мин и 3 ч инфицирования соответственно.

Таким образом, использование методов двумерного гель-электрофореза и MALDI масс-спектрометрии позволяет разделить и идентифицировать белки, являющиеся субстратами ATM/ATR киназ и имеющие высокий уровень фосфорилирования в AGS клетках после *H. pylori* инфекции.

ОБСУЖДЕНИЕ. Ответом клетки на повреждение ДНК является активация определённых сигнальных путей. Один из них ATM/ATR путь, активирование которого происходит в результате двуниевых разрывов ДНК [9, 10]. Включение этого пути приводит к фосфорилированию множества субстратов данных ключевых киназ. Установив активацию ряда субстратов ATM/ATR киназ, мы впервые показали, что инфекция *H. pylori* эукариотических клеток стимулирует ATM/ATR – зависимый сигнальный путь. Повреждения ДНК могут вызывать возникновение мутаций, которые, в свою очередь, могут являться причиной онкогенной трансформации клеток. *H. pylori* штаммы, содержащие *cagPAI*, связывают с возникновением онкологических изменений в клетках хозяина [27]. Наши данные, демонстрирующие, что ATM/ATR киназы активируются независимо от наличия *cagPAI* в геноме патогена, свидетельствуют о том, что и *H. pylori* без *cagPAI* могут вызывать повреждения ДНК, т.е. обладают онкогенным потенциалом. Более того, мы показали, что ATM/ATR киназы активируются при *H. pylori* инфекции в клетках различного происхождения AGS (аденокарцинома желудка) и HeLa (карцинома эндометрия). Следовательно, мы в праве предположить, что *H. pylori* может вызывать повреждения ДНК также и в нетрансформированных клетках желудочного эпителия.

Кроме того, показана активация Chk2 киназы, хорошо изученного субстрата ATM, иной киназой, отличной от ATM и ATR, тогда как активация Chk1 происходит по классической схеме. Также нами было выявлено гиперфосфорилирование белка с м.м. 32 кДа при *H. pylori* инфекции, выходящее за рамки устоявшихся представлений об элементах ATM/ATR-зависимого каскада. Данные масс-спектрометрии однозначно подтверждают наличие активированного белка RPA32A среди компонентов ATM/ATR зависимого сигнального пути, инициированного инфекцией *H. pylori*.

Впервые выявлены новые субстраты АТМ/АТР киназ, относящиеся к группе сплайсинг-факторов, чья роль в сигнальных путях, активируемых этими киназами ещё не изучена.

Полученные нами данные существенно расширяют представление об иницирующем влиянии инфекции *H. pylori* на сигнальные пути клеток эукариот и демонстрируют роль АТМ/АТР каскада в активации ответа клеток хозяина на бактериальную инфекцию.

Результаты нашей работы свидетельствуют о наличии в инфицированных *H. pylori* клетках повреждений генетического материала, что может приводить к возникновению онкологических изменений в клетках хозяина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Webb P.M., Yu M.C., Forman D. (1996) *Int. J. Cancer*, **67**, 603-607.
2. Ивашкин В.Т., Лапина Т.Л. (2000) *PMЖ*, **17**, 697-703.
3. Goldblum J.R., Richter J.E., Vaezi M., Falk G.W., Rice T.W., Peek R.M. (2002) *Am. J. Gastroenterol.*, **97**, 302-311.
4. Kuipers E.J. (1998) *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **12**(1), 25-36.
5. Atherton J.C. (1998) *Br. Med. Bull.*, **54**, 105-120.
6. Keates S, Keates A.C., Warny M., Peek R.M.Jr., Murray P.G., Kelly C.P. (1999) *J. Immunol.*, **163**, 5552-5559.
7. Wessler S., Hucker M., Fischer W., Wang T.C., Rosewicz S., Haas R., Wiedenmann B., Meyer T.F., Naumann M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 3629-3636.
8. Pomorski T., Meyer T.F., Naumann M. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 804-810.
9. Zhou B.B., Elledge S.J. (2000) *Nature*, **408**, 433-439.
10. Elledge S.J. (1996) *Science*, **274**, 1664-1672.
11. Kastan M.B. (2000) *Mol. Cancer Res.*, **6**, 517-524.
12. Shiloh Y. (2003) *Nat Rev Cancer*, **3**, 155-168.
13. Velazquez-Guadarrama N., Olivares A., Valencia P., De los Monteros L., Madrigal-Santillan E., Madrigal-Bujaidar E. (2007) *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, **26**, 39-49.
14. Ding S.Z., Minohara Y., Fan X.J., Wang J., Reyes V.E., Patel J., Diren-Kramer B., Boldogh I., Ernst P.B., Crowe S.E. (2007) *Infect. Immun.*, **75**, 4030-4039.
15. Gorgoulis V.G., Vassiliou L.V., Karakaidos P., Zacharatos P., Kotsinas A., Liloglou T., Venere M., Ditullio R.A.Jr., Kastrinakis N.G., Levy B., Kletsas D., Yoneta A., Herlyn M., Kittas C., Halazonetis T.D. (2005) *Nature*, **434**, 907-913.
16. Schmitt W., Haas R. (1994) *Mol. Microbiol.*, **12**, 307-319.
17. Odenbreit S., Gebert B., Pöls J., Fischer W., Haas R. (2001) *Cell Microbiol.*, **3**, 21-32.
18. Kurz E.U., Douglas P., Lees-Miller ?.?. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 53272-53281.
19. Won J., Kim M., Kim N., Ahn J.H., Lee W.G., Kim S.S., Chang K.Y., Yi Y.W., Kim T.K. (2006) *Nat. Chem. Biol.*, **2**, 369-374.
20. Kashishian A., Douangpanya H., Clark D., Schlachter S.T., Eary C.T., Schiro J.G., Huang H., Burgess L.E., Kesicki E.A., Halbrook J. (2004) *Mol. Cancer Ther.*, **2**, 1257-1264.
21. Laemmli K.U. (1970) *Nature*, **227**, 680-685.
22. Backert S., Ziska E., Brinkmann V., Zimny-Arndt U., Fauconnier A., Jungblut P.R., Naumann M., Meyer T.F. (2000) *Cell. Microbiol.*, **2**, 155-164.
23. Pryor J.L. (1992) *Analytical biochemistry*, **202**, 100-104.
24. Matsuoka S., Ballif B.A., Smogorzewska A., McDonald E.R. 3rd, Hurov K.E., Luo J., Bakalarski C.E., Zhao Z., Solimini N., Lerenthal Y., Shiloh Y., Gygi S.P., Elledge S.J. (2007) *Science*, **316**, 1160-1166.

25. Zou Y., Liu Y., Wu X., Shell S.M. (2006) J. Cell Physiol., **208**, 267-273.
26. Weterings E, Chen D.J. (2007) J. Cell Biol., **179**, 183-186.
27. Blaser M. J., Perez-Perez G.I., Kleanthous H., Cover T.L., Peek R.M., Chyou P.H., Stemmermann G.N., Nomura A. (1995) Cancer Res, **55**, 2111-2115.

Поступила: 21. 10. 2008.

PHOSPHORYLATION OF ATM/ATR SUBSTRATES IN EUKARYOTIC CELLS AFTER INFECTION WITH *HELICOBACTER PYLORI*

M.O. Anikeenok¹, Y.N. Churin², T.F. Meyer², O.N. Ilinskaya¹

¹Kazan State University, Department of microbiology, ul. Kremlevskaya, 18, Kazan, 420008 Russia;
fax: (843) 238-71-21; e-mail: marina.anikeenok@gmail.com

²Department of Molecular Biology, Max Planck Institute for Infection Biology, Berlin, Germany

Infection with *Helicobacter pylori* has been associated with the development of gastric adenocarcinoma in humans, but influence on genetic material of the host cell is still unknown. Here we characterize phosphorylation of ATM-kinase substrates in HeLa and AGS cells in response of *Helicobacter pylori* attack. Infection with wild-type (*cag* PAI-positive) and corresponding isogenic *cag* PAI negative mutant induces activation of Chk1 and Chk2 kinases. Only Chk1 is activated directly by ATM-kinase. We identified group of proteins which are activated by the *Helicobacter pylori* in AGS cells, using MALDI analyze and two-dimentional gel electrophoresis.

Key words: *Helicobacter pylori*, ATM/ATR kinases, phosphorylation, RPA32A, splicing-factor.