

Е.В. КОЦАРЕНКО, В.В. ЛЫЛО, Л.Л. МАЦЕВИЧ,
Л.А. БАБЕНКО, А.И. КОРНЕЛЮК, Т.А. РУБАН, Л.Л. ЛУКАШ

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев
E-mail: lukash@imbg.org.ua

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *MGMT* ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭКЗОГЕННЫХ ЦИТОКИНОВ В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Исследовано влияние цитокинов LIF, SCF, IL-3, EMAP II и препарата Лаферобион (IFN- α 2b) на экспрессию гена репаративного энзима MGMT в культурах клеток человека. Показано, что экзогенные цитокины модулируют экспрессию гена MGMT на уровне белка. EMAP II способен повышать или понижать уровень экспрессии гена MGMT в зависимости от условий эксперимента. Цитокины LIF, SCF, IL-3 и Лаферобион, как правило, вызывали снижение экспрессии гена MGMT в исследуемых клетках человека. Определены условия, которые способствуют разрушению белкового комплекса MGMT.

Ключевые слова: культура клеток человека, репаративный энзим MGMT, регуляция экспрессии, цитокины, белковые димеры.

Введение. В репарации первичных повреждений ДНК, вызванных действием алкилирующих соединений, важную роль играет репаративный энзим O⁶-метилгуанин-ДНК метилтрансфераза (MGMT), кодируемый геном *MGMT* [1]. Алкилирование ДНК может происходить в разных сайтах, однако наиболее выраженный канцерогенный, цитотоксический и мутагенный потенциал имеет появление алкильных групп в O⁶-позиции гуанина [2]. Метилтрансфераза переносит алкильную группу с O⁶-метилгуанина на собственный цистеиновый остаток в активном центре, при этом ДНК восстанавливается, а MGMT необратимо инактивируется [1, 3].

Поскольку действие энзима MGMT является одним из ключевых механизмов в защите организма от влияния алкилирующих агентов, важно определить факторы, влияющие на его экспрессию. Изучение регуляции экспрессии гена репаративного энзима MGMT имеет как фундаментальное значение (понимание путей регуляции экспрессии гена и структуры/функций белка), так и практическое (разработка эф-

фективных ингибиторов/активаторов MGMT) [3]. Так, например, снижение уровня экспрессии гена *MGMT* в клетках опухоли является актуальной проблемой для онкологии, поскольку это повышает их чувствительность к действию химиопрепаратов на основе алкилирующих соединений [4]. В то же время повышение уровня экспрессии важно для защиты нормальных клеток от действия алкилирующих агентов.

На уровень экспрессии гена *MGMT*, по данным литературы [5–7], влияют различные факторы: алкилирующие соединения, одноцепочечные разрывы ДНК, факторы транскрипции и др. Особую роль при этом играет состояние гиперметилирования промотора гена *MGMT*. Регуляция экспрессии может осуществляться и опосредованно через различные внутриклеточные сигнальные пути, например такие, в которые вовлечен белок p53 [6]. В литературе встречаются единичные сведения о том, что некоторые цитокины также могут влиять на экспрессию гена *MGMT* (таблица).

В последнее время изучение влияния цитокинов на экспрессию гена *MGMT* перешло на более высокий уровень – от клеточных культур к целому организму. Так, при лечении пациентов с недавно диагностированными первичными глиобластомами введение IFN- β параллельно с использованием химиотерапевтического препарата темозоломида способствовало благоприятному исходу, особенно у пациентов с неметилированным промотором гена *MGMT* [12].

Для нашей работы мы выбрали целый ряд цитокинов с различным направлением биологического действия, которые принимают участие в различных сигнально-регуляторных путях. Рекombинантный интерферон α 2b (IFN- α 2b) благодаря своей противовирусной и противоопухолевой активности широко используется в медицине, в частности онкологии. Поэтому огромный интерес представляет возможность

© Е.В. КОЦАРЕНКО, В.В. ЛЫЛО, Л.Л. МАЦЕВИЧ,
Л.А. БАБЕНКО, А.И. КОРНЕЛЮК, Т.А. РУБАН,
Л.Л. ЛУКАШ, 2013

использования указанного цитокина с целью регуляции экспрессии гена *MGMT* как в нормальных, так и опухолевых клетках человека. По некоторым данным литературы экспрессия гена этого репаративного энзима в клетках может изменяться во время их дифференцировки [13]. Поэтому для изучения возможностей влияния на его экспрессию были выбраны такие цитокины, как LIF, IL-3 и SCF, принимающие непосредственное участие в процессах деления, роста и дифференцировки клеток. Кроме перечисленных цитокинов, мы продолжили исследование цитокиноподобного белка ЕМАР II, который характеризуется множеством выполняемых в клетке функций. Так, например, он обладает способностью подавлять миграцию эндотелиальных клеток, стимулировать их апоптоз, влиять на активность моноцитов, нейтрофилов и макрофагов, способствуя воспалительным процессам в опухоли [14, 15], а также, по нашим предыдущим данным [16], он стимулирует экспрессию *MGMT* в клетках человека. Биологические свойства перечисленных цитокинов уже давно известны, однако их возможная роль в процессе регуляции экспрессии гена *MGMT* не изучена.

Целью нашей работы было исследование влияния ряда экзогенных цитокинов на уровень экспрессии гена *MGMT* в культурах клеток человека.

Материалы и методы. В настоящей работе использовали культуры клеток человека, полученные в нашей лаборатории (4ВL — линия фибробластоподобных клеток из крови взрослого донора; СВ1 — фибробластоподобные

клетки из пуповинной крови), стандартную клеточную линию Нер-2 (рак гортани) и линию А102 (фибробласты кожи), любезно предоставленную проф. МакКормиком. Клетки культивировали в стандартной ростовой среде ДМЕМ («Sigma», США) с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота («Sigma», США), а также антибиотиков пенициллина и стрептомицина.

Использовали коммерческие препараты цитокинов: Лаферобион («Биофарма», Украина), LIF, IL-3 и SCF («Sigma», США). Цитокиноподобный белок ЕМАР II получали в бактериальной системе *Escherichia coli BL21(DE3)pLysE/pET30a-EMAP II* по описанному ранее методу [17]. Условия обработки клеток цитокинами в бессывороточной культуральной среде описаны нами ранее [16].

Клеточные лизаты получали согласно описанному ранее методу [18]. SDS-электрофорез белковых экстрактов проводили в 12%-ном полиакриламидном геле по методу Лэммли [19]. Для разрушения димеров белковые экстракты перед проведением SDS-электрофореза обрабатывали несколькими способами в стандартном буфере для образцов 2X (250 мМ Трис-HCl (pH 6,8), 2 % SDS, 5 % β-меркаптоэтанол, 0,5 % бромфеноловый синий, 20 % глицерин) с пятиминутным кипячением на водяной бане. Для равномерного нанесения белка в каждой пробе определяли концентрацию общего белка по методу Бредфорда [20] и в каждую лунку наносили по 50 мкг белковых экстрактов. Изменение экспрессии гена *MGMT* исследовали на уровне белка с помощью Вестерн-блот ана-

Цитокины, влияющие на экспрессию гена *MGMT*

Цитокины	Результат	Источник литературы
IFN-β (100 МЕ/мл)	Снижает уровень экспрессии гена <i>MGMT</i> и повышает чувствительность клеток глиомы человека к темозоломиду	[8]
Рекомбинантный человеческий IFN-β (50 МЕ/мл)	Снижает уровень экспрессии гена <i>MGMT</i> в клетках нейробластомы человека	[9]
IL-24 (от 0 до 39 нг/мл)	Снижает уровень экспрессии гена <i>MGMT</i> дозозависимым способом в клетках меланомы человека	[10]
IL-1β (50 ЕД/мл) + INF-γ (1000 ЕД/мл)	При комбинированном действии цитокинов IL-1β + INF-γ установлено повышение экспрессии гена <i>MGMT</i> в β-клетках поджелудочной железы крыс	[11]

лиза согласно методическим указаниям фирмы-изготовителя моноклональных антител против человеческого *MGMT* (клон 23.2) «Novus Biologicals, Littleton, Co», США [21]. В качестве вторичных антител использовали видоспецифические антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена («Sigma», США). Для контроля нанесения производили денситометрический анализ окрашенной мембраны [22]. Анализ изображений осуществляли при помощи программного обеспечения ScionImage 4.0.2 и Origin 8.1; в результаты денситометрического анализа сигнала вносили поправку на контроль нанесения.

Результаты исследований и их обсуждение. В ходе наших предыдущих исследований установлено, что при Вестерн-блот анализе моноклональные анти-*MGMT* антитела (клон 23.2) распознают не только белок с молекулярной массой 24 кДа, что соответствует массе белка *MGMT* согласно данным литературы, но и белок в области 48 кДа [23]. По нашим предположениям так называемая модифицированная форма белка (48 кДа) представляет собой гомодимер классического белка *MGMT* (24 кДа). В настоящей работе проводились эксперименты для проверки этой гипотезы с использованием термической (кипячение 1 ч) или химической обработки (0,5 М дитиотреитол (ДТТ) или 8 М мочевины) белковых экстрактов.

Результаты эксперимента, представленные на рис. 1, показали, что воздействие перечисленных факторов на белковые экстракты привело к полному (дорожки 2 и 7) или частичному (дорожки 3–5, 8) разрушению модифицированной формы (48 кДа) белка *MGMT* и увеличению количества белка в немодифицированной форме (24 кДа). Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют в пользу представления о том, что сигнал в области 48 кДа при Вестерн-блот анализе соответствует димерной форме нашего белка, а сигнал в области 24 кДа – его мономеру. В дальнейших исследованиях обработку белковых экстрактов для SDS-электрофореза проводили в обычных условиях и анализировали как немодифицированную, так и модифицированную формы белка.

Прежде чем проводить эксперименты с цитокинами, мы изучили некоторые условия по-

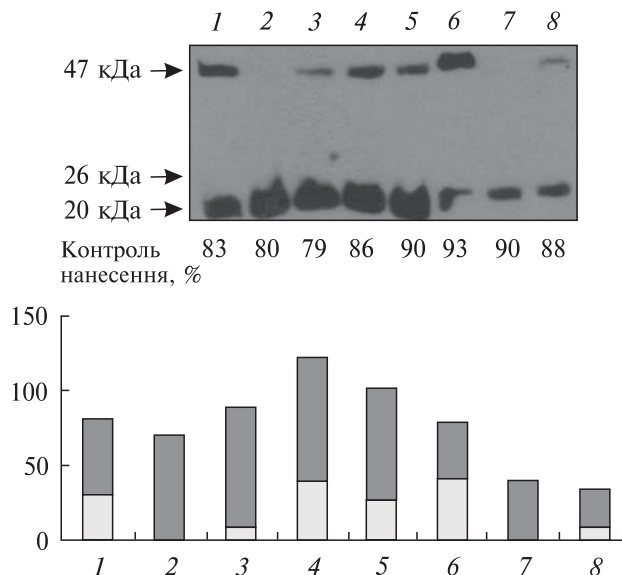


Рис. 1. Изменение соотношения модифицированной и немодифицированной форм *MGMT* в белковых экстрактах под действием температурной и химической обработки (на гистограмме представлены результаты денситометрии сигналов): 1 – Нер-2, 5 мин кипячения (pH 6,8); 2 – Нер-2, 60 мин кипячения (pH 6,8); 3 – Нер-2, 4 ч инкубации с 0,5 М ДТТ (pH 6,8), 5 мин кипячения; 4 – Нер-2, 4 ч инкубации с 0,5 М ДТТ (pH 8,0), 5 мин кипячения; 5 – Нер-2, 60 мин инкубации с 8 М мочевиной (pH 6,8), 5 мин кипячения; 6 – 4BL, 5 мин кипячения (pH 6,8); 7 – 4BL, 4 ч инкубации с 0,5 М ДТТ (pH 6,8), 5 мин кипячения; 8 – 4BL, 4 ч инкубации с 0,5 М ДТТ (pH 8,0), 5 мин кипячения. На рис. 1–7 ■ – немодифицированная форма; □ – модифицированная форма

становки эксперимента. Так, одной из важных задач являлся подбор оптимальных условий культивирования клеток и их последующей обработки экзогенными цитокинами. Поэтому вначале провели исследования, позволяющие определить, на каком этапе после посева клеток различных линий в культуральную среду синтезируется больше всего белка *MGMT*, так как это имеет значение для адекватного анализа результатов. В одном из опытов сравнивали изменение экспрессии гена *MGMT* на уровне белка в клетках 4BL и Нер-2 в течение одного пассажа при 24–96 ч культивирования (рис. 2).

Максимальный уровень экспрессии гена *MGMT* в клетках 4BL наблюдали при 48 ч, а в Нер-2 – при 72 ч культивирования. Следует

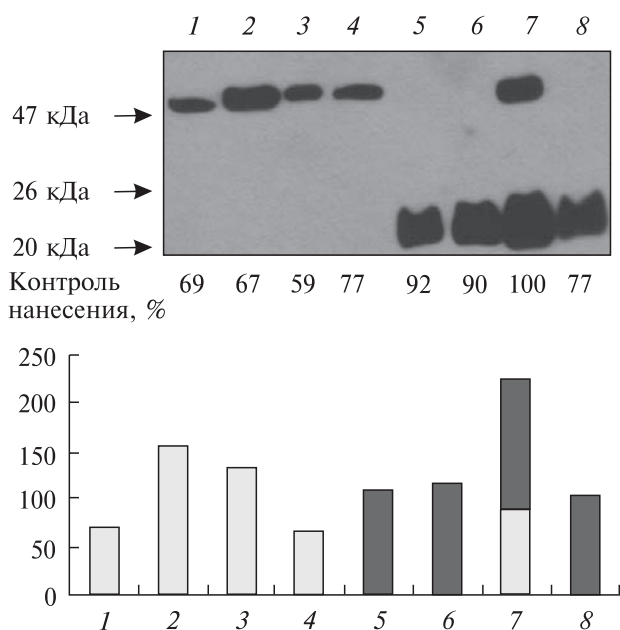


Рис. 2. Вестерн-блот анализ зависимости уровня экспрессии гена *MGMT* от длительности культивирования клеток линии 4BL и Her-2: 1 – 4BL (24 ч); 2 – 4BL (48 ч); 3 – 4BL (72 ч), 4 – 4BL (96 ч); 5 – Her-2 (24 ч); 6 – Her-2 (48 ч); 7 – Her-2 (72 ч); 8 – Her-2 (96 ч)

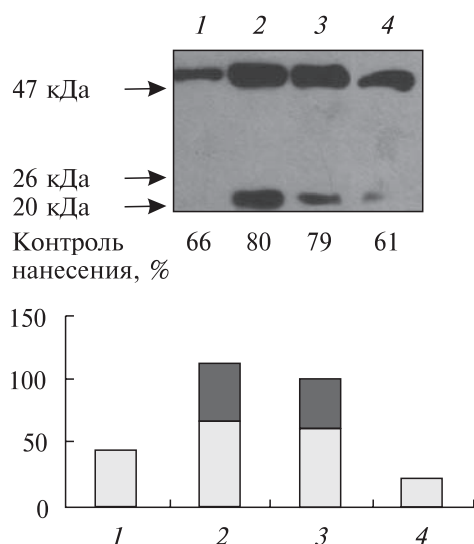


Рис. 3. Вестерн-блот анализ зависимости уровня экспрессии гена *MGMT* от времени инкубации клеток 4BL с препаратом EMAP II: 1 – 4BL, контроль; 2 – 4BL + EMAP II (2 мкг/мл) 8 ч; 3 – 4BL + EMAP II (2 мкг/мл) 16 ч; 4 – 4BL + EMAP II (2 мкг/мл) 32 ч

отметить, что в клетках 4BL белок *MGMT* на всех сроках исследования выявляли только в модифицированной форме, а в клетках Her-2 – почти на всех сроках (1, 2, 4-е сутки) в немодифицированной форме. Только через 72 ч в клетках Her-2 обнаружен белок в модифицированной форме. Таким образом, оптимальным сроком для выявления экспрессии гена *MGMT* следует признать 2–3-и сутки культивирования клеток после их посева.

В ходе наших экспериментов отмечена также важность подбора среды для культивирования клеток. В среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л) клетки не только лучше растут, но и уровень экспрессии *MGMT* выше, чем при выращивании клеток в среде с низким содержанием глюкозы (1 г/л). Этот факт мы учитывали в наших последующих опытах.

Большое значение имеет длительность инкубации клеток с исследуемыми экзогенными цитокинами. Результаты, приведенные на рис. 3, свидетельствуют о том, что стимуляция экспрессии гена *MGMT* на уровне белка под действием цитокиноподобного белка EMAP II наблюдалась на протяжении 8–32 ч обработки клеток. Обработка клеток EMAP II не только повлияла на общий уровень экспрессии *MGMT*, но и вызвала появление белка в классической немодифицированной форме, которая в данных условиях практически не выявлялась в контрольном варианте. При этом 8-часовая обработка приводила к более выраженному эффекту по сравнению с более длительными сроками (16 и 32 ч). Возможно, это обусловлено снижением уровня экспрессии гена при длительном пребывании клеток в обедненной бессывороточной среде.

Далее мы изучили характер влияния EMAP II на уровень экспрессии гена *MGMT* в опухолевых клетках, сравнивая с результатами, которые получены на культивируемых клетках от здоровых доноров [16]. Клетки Her-2 обрабатывали EMAP II в концентрации 2 мкг/мл в течение 8 ч. После обработки установлено значительное снижение экспрессии гена *MGMT*, при этом выявлялось лишь незначительное количество белка в немодифицированной форме (рис. 4).

Как показано нами ранее [16], препарат EMAP II вызывал повышение уровня экспрессии гена *MGMT* в клетках человека 4BL в диа-

пазоне концентраций от 0,2 до 20,0 мкг/мл, при этом прослеживалась тенденция прямой зависимости эффекта от концентрации. Аналогичный эффект ЕМАР II выявлялся также при использовании других линий клеток человека. Эти данные свидетельствуют о том, что действие ЕМАР II зависит как от его концентрации, так и от природы клеток, а также, вероятно, от исходного уровня экспрессии *MGMT* в исследуемых клетках.

Влияние цитокинов IL-3 и SCF исследовали с использованием клеточной линии 4BL.

Как показано на рис. 5, белок, который находился в немодифицированной форме, после обработки цитокинами полностью исчезал, а его количество в модифицированной форме значительно снижалось. Подобные результаты получены при обработке первичных фибробластов кожи человека и опухолевых клеток Нер-2 цитокином LIF [24]; результаты одного из опытов представлены на рис. 6.

Полученный результат свидетельствует о том, что цитокин LIF, вероятно, также способен ингибировать экспрессию исследуемого гена, причем белок в немодифицированной форме полностью исчезал, а количество белка в модифицированной форме сопоставимо с уровнем контроля.

Как показано нами ранее, цитокин IFN- α 2b, который является действующим веществом препарата Лаферобион, вероятно, также способен модулировать экспрессию гена *MGMT* на уровне белка в культурах клеток человека [25]. В настоящей работе после обработки клеток 4BL препаратом Лаферобион в широком диапазоне концентраций значительное снижение количества белка *MGMT* в модифицированной форме происходило при концентрациях 20 и 2000 ЕД/мл (рис. 7).

После обработки клеток Нер-2 практически при всех концентрациях препарата (2–2000 ЕД/мл), кроме концентрации 20 ЕД/мл (рис. 7, дорожка 8), снижалось количество белка *MGMT* в немодифицированной форме, а в модифицированной форме выявлялось примерно на таком же уровне, как и в контроле. Таким образом, препарат Лаферобион, по-видимому, способен влиять на экспрессию гена *MGMT*, хотя прямая зависимость эффекта от его концентрации не прослеживалась. Такой

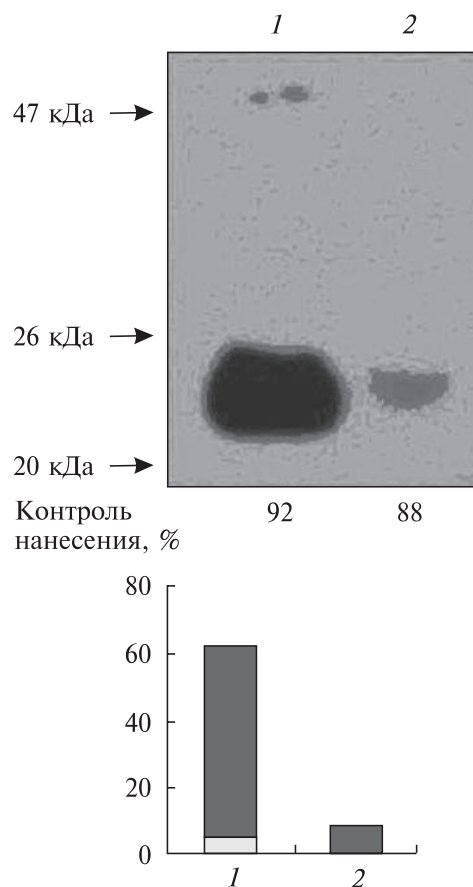


Рис. 4. Вестерн-блот анализ влияния препарата ЕМАР II на экспрессию гена *MGMT* в опухолевых клетках Нер-2: 1 – Нер-2, контроль; 2 – Нер-2 + ЕМАР II (2 мкг/мл)

сложный характер влияния, возможно, определяется тем, что цитокин IFN- α 2b в разных концентрациях действует на различные сигнально-регуляторные пути.

При использовании клеточной линии СВ-1 выявлено снижение количества белка *MGMT* в модифицированной форме при концентрации препарата Лаферобион 200 ЕД/мл [25]. Однако в случае клеточной линии А102 обработка этим препаратом в концентрации 20 ЕД/мл приводила к повышению количества белка *MGMT* в модифицированной форме. По нашему мнению, требуются более детальные исследования медицинского препарата Лаферобион, так как он реально применяется в схеме лечения онкологических больных, и важно понимать последствия его влияния на репа-

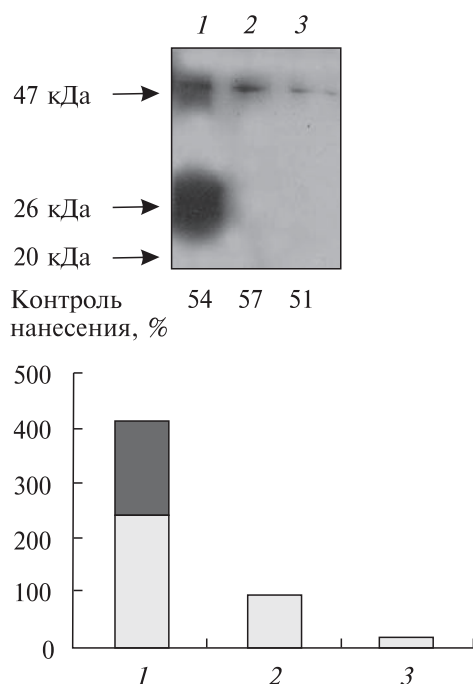


Рис. 5. Вестерн-блот анализ влияния цитокинов IL-3 и SCF на экспрессию гена *MGMT* в иммортализованных клетках человека *in vitro*: 1 – 4BL, контроль; 2 – 4BL + IL-3 (20 нг/мл); 3 – 4BL + SCF (20 нг/мл)

ративный фермент, от которого зависит успешность применения химиотерапевтических алкилирующих агентов.

Таким образом, нам удалось подтвердить данные других авторов о способности экзогенных цитокинов влиять на количество исследуемого репаративного фермента в клетках человека [8–11], а также расширить спектр цитокинов, потенциальных регуляторов экспрессии гена *MGMT*. Следующим этапом наших исследований будет определение уровня, на котором происходит регуляция экспрессии (на уровне белка или РНК), и изучение регуляторных путей, вовлеченных в этот процесс.

Обсуждение полученных данных. В литературе ежегодно появляются сотни статей, посвященных изучению репаративного фермента *MGMT*. Со времен открытия этого уникального белка выяснения его важнейшей функции – удаления алкильных групп на молекуле ДНК – исследователи существенно продвинулись в понимании этой системы репарации [26]. Однако некоторые вопросы, касающиеся строе-

ния и функций самого белка, до сих пор остаются открытыми.

В нашей статье мы затронули один из важных аспектов – возможность регулирования экспрессии гена *MGMT* под действием различных экзогенных биологически активных веществ. До нашей работы было известно, что цитокины IFN- β , IFN- γ , IL-1 β , IL-24 способны влиять на регуляцию экспрессии гена *MGMT* [8–11]. Как предположили авторы упомянутых работ, в качестве факторов, непосредственно осуществляющих регуляцию, могут выступать разрывы ДНК или же белок p53.

Известно, что цитокины в высоких дозах способны вызывать разрушение ДНК, а это в свою очередь является одним из главных пусковых механизмов для стимуляции репаративных систем. Согласно данным литературы уровень экспрессии белка p53 находится в обратной зависимости от уровня экспрессии *MGMT* [27]. Однако в некоторых работах отрицается возможность регуляции экспрессии гена *MGMT* под влиянием цитокина IFN- β .

В исследованиях, проведенных на клетках меланомы человека, положительный эффект влияния IFN- β на повышение чувствительности клеток меланомы к темозоломиду объясняется авторами работы участием этого цитокина в процессе восстановления прокаспазы-8, что приводит к запуску апоптозного каскада [28]. Однако мы склоняемся к мысли, что регуляция *MGMT* под влиянием цитокинов вполне возможна, и в этот процесс, по-видимому, вовлечены целые каскады сигнально-регуляторных путей, которые запускаются теми или иными цитокинами. Так, например, известно, что интерфероны обладают противовирусной и противоопухолевой активностью. Противовирусное действие этих цитокинов проявляется в подавлении белкового синтеза. Клетки в ответ на воздействие интерферона вырабатывают большое количество протеинкиназы R, в результате уровень белкового синтеза в клетке снижается. После протеинкиназы R активируется синтез рибонуклеазы L, которая расщепляет клеточные РНК и еще больше снижает уровень белкового синтеза. В целом зависимое от интерферона подавление трансляции является губительным как для вируса, так и для клетки-хозяина.

Помимо влияния на трансляцию, интерфероны способны активировать сотни других генов, играющих роль в защите клетки от вирусов [29]. Кроме того, интерферон лимитирует распространение вирусных частиц с помощью активации белка p53, что ведет к апоптотической смерти инфицированной клетки [30].

Учитывая данные литературы, в которых показана обратная зависимость между уровнем экспрессии белка p53 и *MGMT*, можно предположить, что именно эти сигнальные пути вовлечены в процесс регуляции экспрессии гена репаративного энзима.

Второй аспект, получивший освещение в нашей работе, – наличие модификации белка *MGMT*. Как показывают данные литературы, самоассоциация белков с образованием димеров и олигомеров более высокого порядка является весьма распространенным явлением. При этом встречаются как гомодимеры, построенные из одинаковых субъединиц, так и гетеродимеры, построенные из разных субъединиц [31]. Недавние структурные и биофизические

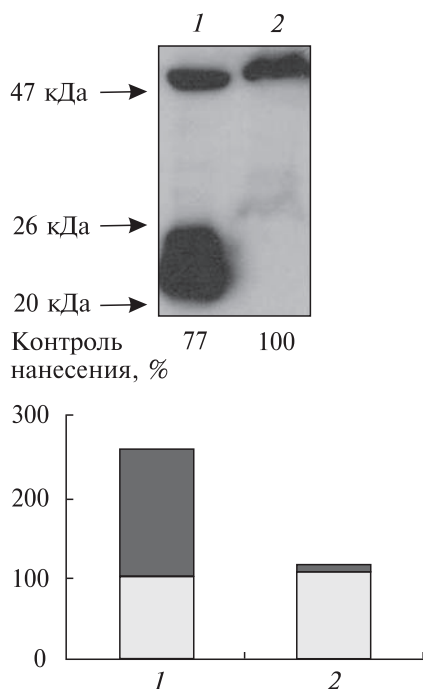


Рис. 6. Вестерн-блот анализ влияния цитокина LIF на уровень экспрессии гена *MGMT* в клетках Hep-2 (на гистограмме представлены результаты денситометрии сигналов): 1 – Hep-2, контроль; 2 – Hep-2 + LIF (20 нг/мл)

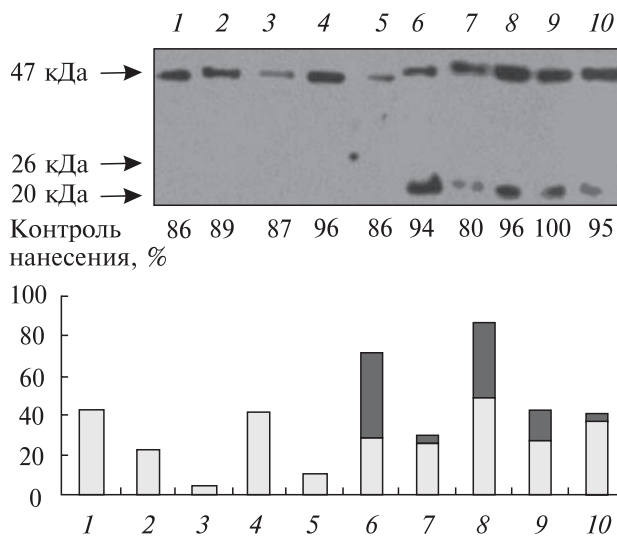


Рис. 7. Влияние препарата Лаферобион на уровень экспрессии гена *MGMT* в клетках 4BL и Hep-2 (время инкубации 8 ч): (1–5) 4BL: 1 – контроль; 2 – IFN- α 2b (2 ЕД/мл); 3 – IFN- α 2b (20 ЕД/мл); 4 – IFN- α 2b (200 ЕД/мл); 5 – IFN- α 2b (2000 ЕД/мл); (6–10) Hep-2: 6 – контроль; 7 – IFN- α 2b (2 ЕД/мл); 8 – IFN- α 2b (20 ЕД/мл); 9 – IFN- α 2b (200 ЕД/мл); 10 – IFN- α 2b (2000 ЕД/мл)

исследования показали, что димеризация и/или олигомеризация являются одним из ключевых факторов в регуляции различных белков, таких как ферменты, ионные каналы, рецепторы и транскрипционные факторы. Следует отметить, что самоассоциация в каком-то смысле помогает свести к минимуму размер генома, и при этом сохраняются преимущества формирования модульных комплексов [32].

Несмотря на то, что применение при электрофорезе белков таких денатурирующих условий, как β -меркаптоэтанол, SDS, а также кипячение, как правило, приводит к разрушению интер- и интрамолекулярных дисульфидных связей, существуют стабильные белковые комплексы, для разрушения которых необходимы дополнительные дестабилизирующие факторы (рН, денатурирующие агенты, высокое давление, высокая ионная сила, изменение температуры и др.) [33, 34]. Некоторые из этих факторов использованы нами для разрушения белка с молекулярной массой 48 кДа, поскольку при стандартном SDS-электрофорезе разрушение исследуемого белкового комплекса не происходило.

Таким образом, полученные нами данные о разрушении белкового комплекса MGMT с молекулярной массой 48 кДа при термической и химической обработке белковых экстрактов, в результате чего образуется белок с молекулярной массой 24 кДа, свидетельствуют в пользу предположения о возможном формировании стабильного гомодимера, т.е. белок-белкового взаимодействия между двумя молекулами белка MGMT. Теоретическим подтверждением наших результатов служит осуществление димеризации MGMT в бесклеточной системе [35], а также тот факт, что в образовании димеров важную роль играют такие структурные элементы белка, как цистеиновые остатки и ионы цинка, которые имеются в структуре молекулы MGMT [36]. Мы запланировали дальнейшее изучение обеих форм белка на молекулярно-генетическом уровне.

Выводы. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что целый ряд экзогенных цитокинов SCF, LIF, IL-3, EMAP II и IFN- α 2b (препарат Лаферобион) способны влиять на экспрессию гена репаративного фермента MGMT в клетках человека *in vitro*. Показано, что характер действия этих цитокинов может меняться в зависимости от концентрации самих цитокинов, типа клеток и уровня экспрессии исследуемого гена в клетках. Однако механизмы, с помощью которых осуществляется регуляция, до сих пор не ясны и нуждаются в дальнейшем изучении. Выдвинуто предположение, что модифицированная форма MGMT с молекулярной массой 48 кДа представляет собой белковый комплекс.

Мы благодарим проф. Джастина МакКормика (Justin McCormick) из Мичиганского государственного университета (США) за предоставленную клеточную линию A102.

K.V. Kotsarenko, V.V. Lylo, L.L. Macewicz,
L.A. Babenko, A.I. Kornelyuk, T.A. Ruban, L.L. Lukash

Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS
Ukraine, Kyiv
E-mail: lukash@imbg.org.ua

CHANGE OF THE MGMT GENE EXPRESSION UNDER INFLUENCE OF EXOGENOUS CYTOKINES IN HUMAN CELLS *IN VITRO*

The influence of cytokines LIF, SCF, IL-3, EMAP II and the medication Laferobion (IFN- α 2b) on MGMT

gene expression in human cell cultures has been studied. It was shown that exogenous cytokines can modulate the MGMT gene expression at the protein level. EMAP II is able to increase or decrease the MGMT level, depending on the experimental conditions. Cytokines LIF, SCF, IL-3 and Laferobion decreased the MGMT expression level in human cells *in vitro*. Some conditions leading to the destruction of the MGMT protein complex were identified.

K.V. Kotsarenko, V.V. Lylo, L.L. Macewicz,
L.A. Babenko, O.I. Kornelyuk, T.A. Ruban, L.L. Lukash

ЗМІНА ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА MGMT ПІД ДІЄЮ ЕКЗОГЕННИХ ЦИТОКІНІВ В КЛІТИНАХ ЛЮДИНИ *IN VITRO*

Досліджено вплив цитокинів LIF, SCF, IL-3, EMAP II і препарату Лаферобіон (IFN- α 2b) на експресію гена репаративного фермента MGMT в культурах клітин людини. Встановлено, що екзогенні цитокини здатні модулювати експресію гена MGMT на рівні білка. EMAP II підвищував або знижував рівень експресії гена MGMT в залежності від умов експерименту. Цитокини LIF, SCF, IL-3 і Лаферобіон, як правило, спричиняли зниження експресії гена MGMT в досліджуваних клітинах людини. Визначено умови, які сприяють руйнуванню білкового комплексу MGMT.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Margison G., Povey A., Kaina B., Santibáñez Koref M. Variability and regulation of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase // *Carcinogenesis*. – 2003. – **24**, № 4. – P. 625–635.
2. Fang Q., Noronha A.M., Murphy S.P. et al. Repair of O⁶-G-alkyl-O⁶-G interstrand cross-links by human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase // *Biochemistry*. – 2008. – **47**, № 41. – P. 10892–10903.
3. Kaina B., Christmann M., Naumann S., Roos W. MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents // *DNA Rep.* – 2007. – **6**. – P. 1079–1099.
4. Sabharwal A., Middleton M.R. Exploiting the role of O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) in cancer therapy // *Curr. Opin. Pharm.* – 2006. – **6**. – P. 355–363.
5. Sharma S., Salehi F., Scheithauer B.W. et al. Role of MGMT in tumor development, progression, diagnosis, treatment and prognosis // *Anticancer Res.* – 2009. – **29**, № 10. – P. 3759–3768.
6. Verbeek B., Southgate T.D., Gilham D.E., Margison G.P. O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy // *Brit. Med. Bul.* – 2008. – **85**. – P. 17–33.
7. Niture S.K., Doneanu C.E., Velu C.S. et al. Proteomic

- analysis of human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase by affinity chromatography and tandem mass spectrometry // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – **337**. – P. 1176–1184.
8. *Natsume A., Ishii D., Wakabayashi T. et al.* IFN- β down-regulates the expression of DNA repair gene MGMT and sensitizes resistant glioma cells to temozolomide // *Cancer Res.* – 2005. – **65**, № 17. – P. 7573–7579.
 9. *Rosati S.F., Williams R.F., Nunnally L.C. et al.* IFN-beta sensitizes neuroblastoma to the antitumor activity of temozolomide by modulating O⁶-methylguanine DNA methyltransferase expression // *Mol. Cancer Ther.* – 2008. – **7**, № 12. – P. 3852–3858.
 10. *Zheng M., Bocangel D., Ramesh R. et al.* Interleukin-24 overcomes temozolomide resistance and enhances cell death by down-regulation of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in human melanoma cells // *Mol. Cancer Ther.* – 2008. – **7**, № 12. – P. 3842–3851.
 11. *Cardozo A.K., Kruhoffer M., Leeman R. et al.* Identification of novel cytokine-induced genes in pancreatic β -cells by high-density oligonucleotide arrays // *Diabetes.* – 2001. – **50**. – P. 909–920.
 12. *Motomura K., Natsume A., Kishida Y. et al.* Benefits of interferon- β and temozolomide combination therapy for newly diagnosed primary glioblastoma with the unmethylated MGMT promoter // *Cancer.* – 2011. – **117**, № 8. – P. 1721–1730.
 13. *Briegert M., Enk A. H., Kaina B.* Change in expression of MGMT during maturation of human monocytes into dendritic cells // *DNA Rep.* – 2007. – **6**. – P. 1255–1263.
 14. *Ivakhno S.S., Kornelyuk A.I.* Cytokine-like activities of some aminoacyl-tRNA synthetases and auxiliary p43 cofactor of aminoacylation reaction and their role in oncogenesis // *Exp. Oncol.* – 2004. – **26**, № 4. – P. 250–255.
 15. *Schwarz M.A., Kandel J., Brett J. et al.* Endothelial-monocyte activating polypeptide II, a novel anti-tumour cytokine that suppresses primary and metastatic tumor growth and induces apoptosis in growing endothelial cells // *J. Exp. Med.* – 1999. – **190**, № 3. – P. 341–354.
 16. *Lylo V.V., Matsevich L.L., Kotsarenko E.V. et al.* Activation of gene expression of the O⁶-methylguanine-DNA transferase repair enzyme upon the influence of EMAP II cytokine in human cells in vitro // *Cytology and Genetics.* – 2011. – **45**, № 6. – P. 373–378.
 17. *Dubrovsky A.L., Brown J.N., Kornelyuk A.I. et al.* Bacterial expression of full-length and truncated forms of cytokine EMAP-2 and cytokine-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase // *Biopolym. Cell.* – 2000. – **16**, № 3. – P. 229–235.
 18. *Morton E.N., Margison G.P.* Increased O⁶-alkyl-guanine-DNA alkyltransferase activity in Chinese hamster V-79 cells following selection with chloroethylating agents // *Carcinogenesis.* – 1988. – **9**, № 1. – P. 45–49.
 19. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – **227**, № 5259. – P. 680–685.
 20. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – **72**, № 1/2. – P. 248–254.
 21. http://www.novusbio.com/MGMT-Antibody-MT-232_NB100-168.html
 22. *Aldridge G.M., Podrebarac D.M., Greenough W.T., Weiler I.J.* The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting // *J. Neurosci Meth.* – 2008. – **172**, № 2. – P. 250–254.
 23. *Лыло В.В.* Выявление модифицированной формы репаративного фермента O⁶-алкилгуанин-ДНК алкилтрансферазы // *Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клітинної імунології та медичної генетики.* – 2010. – Вип. 19. – С. 299–305.
 24. *Коцаренко Е.В., Лыло В.В., Мацевич Л.Л. и др.* Цитокин LIF как модулятор экспрессии гена MGMT в клетках человека in vitro // *Фактори експериментальної еволюції організмів* : 36. наук. пр. – Київ, 2011. – Т. 11. – С. 489–493.
 25. *Коцаренко Е.В., Шапошник Л.А., Лыло В.В. и др.* Интерфероны как возможные регуляторы экспрессии гена MGMT // *Укр. біохім. журн.* – 2010. – **82**. – С. 35.
 26. *Pegg A.E.* Multifaceted roles of alkyltransferase and related proteins in DNA repair, DNA damage, resistance to chemotherapy, and research tools // *Chem. Res. Toxicol.* – 2011. – **24**, № 5. – P. 618–639.
 27. *Blough M.D., Zlatescu M.C., Cairncross J.G.* O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase regulation by p53 in astrocytic cells // *Cancer Res.* – 2007. – **67**, № 2. – P. 580–584.
 28. *Roos W.P., Jöst E., Belohlavek C. et al.* Intrinsic anticancer drug resistance of malignant melanoma cells is abrogated by IFN- β and valproic acid // *Cancer Res.* – 2011. – **71**, № 12. – P. 4150–4160.
 29. *De Veer M.J., Holko M., Frevel M. et al.* Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays // *J. Leuk. Biol.* – 2001. – **69**, № 6. – P. 912–920.
 30. *Takaoka A., Hayakawa S., Yanai H. et al.* Integration of interferon- α/β signaling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence // *Nature.* – 2003. – **424**. – P. 516–523.
 31. *Traut T.W.* Dissociation of enzyme oligomers : A mechanism for allosteric regulation // *Crit. Rev.*

- Biochem. and Mol. Biol. — 1994. — **29**, № 2. — P. 125–163.
32. *Marianayagam N.J., Sunde M., Matthews J.M.* The power of two: protein dimerization in biology // Trends Biochem. Sci. — 2004. — **29**, № 11. — P. 618–625.
33. *Henriksen U., Fog J.U., Litman T., Gether U.* Identification of intra- and intermolecular disulfide bridges in the multidrug resistance transporter ABCG2 // J. Biol. Chem. — 2005. — **280**, № 44. — P. 36926–36934.
34. *Kolodziejewski P.J., Rashid M.B., Eissa N.T.* Intracellular formation of «undisruptable» dimers of inducible nitric oxide synthase // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2003. — **100**, № 24. — P. 14263–14268.
35. *Adams C.A., Melikishvili M., Rodgers D.W. et al.* Topologies of complexes containing O⁶-alkylguanine–DNA alkyltransferase and DNA // J. Mol. Biol. — 2009. — **389**. — P. 248–263.
36. *Duguid E.M., Rice P.A., He C.* The structure of the human AGT protein bound to DNA and its implications for damage detection // J. Mol. Biol. — 2005. — **350**. — P. 657–666.

Поступила 14.05.12