

УДК 575.224+577.218

АКУЛЕНКО О.А.<sup>1</sup>✉, КОЦАРЕНКО К.В.<sup>2</sup>, ЛИЛО В.В.<sup>2</sup>, ЧЕРНИХ С.І.<sup>2</sup>, ЛУКАШ Л.Л.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка,  
Україна, 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13

<sup>2</sup>Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: lukash@imbg.org.ua

✉ o.a.stolyar@gmail.com, (096) 101-77-94

## ЗМІНА ЕКСПРЕСІЇ РЕПАРАТИВНОГО ЕНЗИМУ MGMT ТА БІЛКА MARP ПРИ СПІЛЬНІЙ ДІЇ ЦИТОКІНУ IFN- $\alpha$ 2b ТА АЛКІЛУВАЛЬНОЇ СПОЛУКИ MNNG НА КЛІТИНИ ЛЮДИНИ *IN VITRO*

O<sup>6</sup>-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза (MGMT) – це унікальний ензим, який найефективнішим чином порівняно з іншими репаративними системами виправляє алкільні аддукти в O<sup>6</sup>-позиції гуаніну, які є специфічними субстратами для цього ензиму в молекулі ДНК. Останні відрізняються від інших пошкоджень такого типу найвиразнішим мутагенним, цитотоксичним та канцерогенним ефектами [1, 2]. Слід відзначити, що MGMT належить до системи прямої репарації, тобто видаляє алкільні групи з молекули ДНК без руйнування її цілісності. Тож високі рівні експресії і активності ензиму MGMT забезпечують захист клітин від шкідливого впливу алкільувальних сполук, однак, у той же час, знижують ефективність протиопухлинних алкільувальних препаратів [3].

Регуляція експресії гена *MGMT* може здійснюватися на багатьох рівнях – на епігенетичному (наприклад, метилування промотора гена), за допомогою деяких транскрипційних факторів та за участю різних сигнально-регуляторних шляхів, які активуються певними екзогенними та ендogenous чинниками хімічної, фізичної та біологічної природи [1, 3, 4]. Із літератури відомо, що використання інтерферону бета (IFN- $\beta$ ) у комбінації з алкільувальною хіміотерапією поліпшує прогноз для пацієнтів з гліомами, порівняно з використанням однієї лише хіміотерапії за рахунок інгібування експресії гена *MGMT* [5, 6].

Одним із специфічних індукторів MGMT є алкільувальний агент N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин (MNNG), і серед пошкоджень, які він спричиняє, домінує приєднання метильної групи саме в O<sup>6</sup>-позиції гуаніну [7, 8]. Високі дози MNNG є токсичними для клітин, оскільки система прямої репарації виснажується після переносу алкільної групи на власний активний сайт MGMT, бо після цього репаративний ензим

піддається протеосомній деградації [1]. У наших попередніх роботах було показано здатність іншого інтерферону IFN- $\alpha$ 2b, який часто використовується у схемах лікування онкохворих, підвищувати рівень експресії MGMT [9–11]. У цій роботі ми вирішили дослідити можливий сумісний вплив MNNG та IFN- $\alpha$ 2b на експресію репаративного ензиму MGMT.

Раніше нами було показано, що при Вестерн-блот аналізі анти-MGMT антитіла розпізнають не тільки білок MGMT (24 кДа), а і білок з більшою молекулярною масою (48 Да), який отримав назву anti-Methyltransferase Antibody Recognizable Protein (MARP) [9, 12]. Також було встановлено, що MARP, як і MGMT, є індукбельним білком, і його кількість змінювалася при обробці клітин деякими біологічно активними речовинами [9, 12, 13]. З огляду на певну гомологію між MGMT та MARP (виходячи з розпізнавання одними і тими самими моноклональними антитілами) ми припустили, що MARP може мати відношення до репаративних процесів. У попередній роботі ми показали його ймовірну роль у репарації пошкоджень, спричинених дією алкільувальних препаратів Темодал і Амітозин на клітини людини. Однак виявилось, що виживання клітин лінії 4BL, у яких MGMT був відсутній і виявлявся лише MARP, після обробки MNNG було гіршим, порівняно з клітинами Нер-2, які експресують і MGMT, і MARP. Наявність «плато» спостерігалася лише при концентраціях MNNG порядку  $1 \times 10^{-4}$ . Не виключено, що у клітинах 4BL така можлива репарація пошкоджень, індукованих MNNG [14]. Тому у цій роботі ми також поставили за мету дослідити зміни експресії білка MARP при комбінованій обробці клітин людини препаратами інтерферону  $\alpha$ 2b та нітрозогуанідину.

## Матеріали і методи

У роботі використовували стандартну лінію клітин людини Нер-2 (карцинома гортані), що експресують як MGMT, так і MARP. Клітини культивували у середовищі DMEM з додаванням 10% сироватки та антибіотиків пеніциліну (100 Од/мл) і стрептоміцину (100 мкг/мл) при 37 °С та 5% CO<sub>2</sub>. Для детекції цитотоксичної дії MNNG визначали ефективність колонієутворення клітин за описаною раніше схемою [14]. Рекombінантний білок IFN- $\alpha$ 2b надано фірмою Інтерфармбіотек (Україна), алкілувальний агент MNNG синтезовано А.П. Терентьевим (ІМБГ НАН України). Клітини висівали у кількості  $8 \times 10^5$  на чашки Петрі d=10 см, через 8 годин додавали IFN- $\alpha$ 2b в концентрації 2 МО/мл. Через 24 години середовище замінювали на безсироваткове з додаванням MNNG у трьох концентраціях (0,02/0,1/0,5 мкг/мл). Тривалість обробки алкілувальним агентом становила одну годину, після чого середовище замінювали на повноцінне. Через 24 години після обробки нітрозогуанідином клітини відмивали, трипсинізували, центрифугували (3 хвилини, 5 тис. об./хв) і осад зберігали за -20 °С. У контрольному варіанті проводили відповідні заміни середовища без додавання досліджуваних сполук. Загальний білок виділяли з клітин, як було описано раніше [9], і його концентрацію визначали спектрофотометрично [15]. Розділення білків за масою проводили з використанням SDS-електрофорезу у 12% гелі за методом Леммлі [16]. Для виявлення MGMT і MARP користувалися Вестерн-блот аналізом із застосуванням анти-MGMT моноклональних антитіл (клон 23.3, NovusBiologicals, США). Для контролю нанесення проводили денситометрію забарвлених мембран із застосуванням програмного забезпечення ScionImage 4.0.2 та OriginPro 8.5 [17].

## Результати та обговорення

Для підбору оптимальних концентрацій MNNG ми встановлювали цитотоксичність даної сполуки за методом визначення ефективності колонієутворення оброблених клітин. Цей метод зручний тим, що дозволяє кількісно оцінити виживання клітин протягом достатньо тривалого часу. Це важливо, оскільки особливістю дії алкілувальних сполук є те, що мутагенний і цитотоксичний ефекти проявляються не одразу: для їхньої реалізації необхідні декілька клітинних поділів.

Було показано, що крива залежності виживання при низьких концентраціях MNNG (до 0,1 мкг/мл) мала нелінійну залежність з наявніс-

тю «плато», що найімовірніше пов'язано з репаративною активністю MGMT, який експресується клітинами лінії Нер-2 (рис. 1). При подальшому підвищенні концентрації MNNG спостерігалось різке зниження кількості колоній, сформованих життєздатними клітинами. Це, ймовірно, свідчило про виснаження ензиму MGMT у клітинах Нер-2. Раніше нами вже було показано таку залежність цитотоксичного ефекту MNNG від концентрації в диплоїдних клітинах людини [18]. Тож у цій роботі для обробки пухлинних клітин Нер-2 в наступних експериментах ми обрали три концентрації MNNG: 0,02/0,1/0,5 мкг/мл.

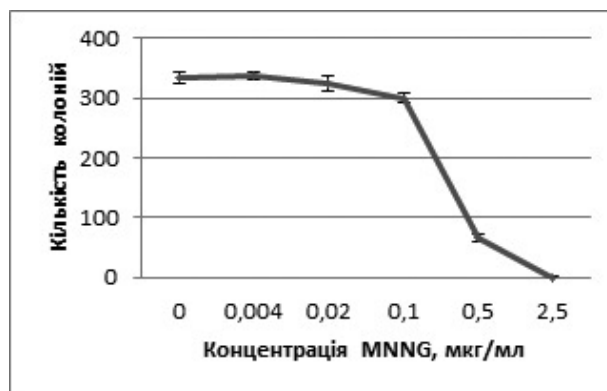
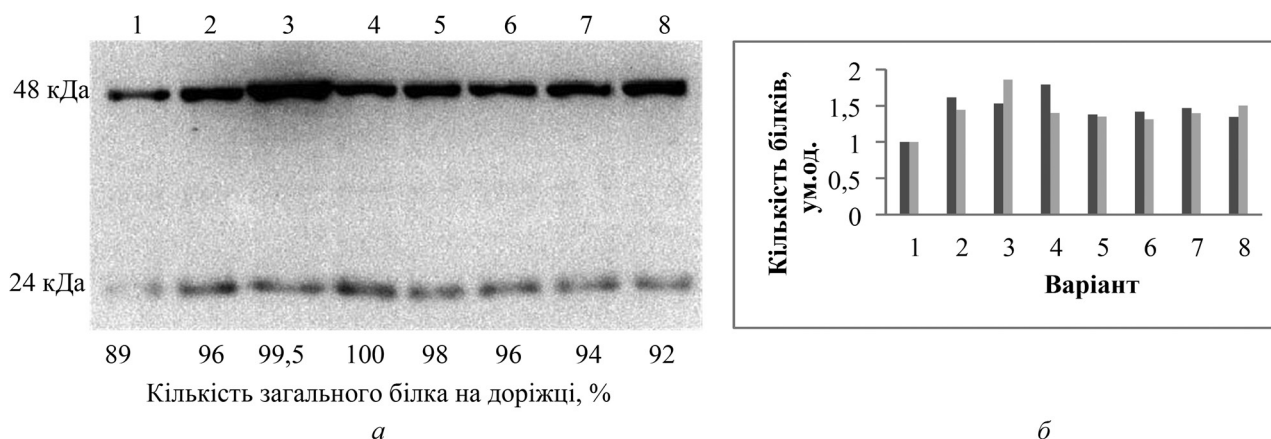


Рис. 1. Залежність виживання пухлинних клітин Нер-2 від концентрації алкілувальної сполуки MNNG

Вестерн-блот аналіз впливу рекombінантного білка IFN- $\alpha$ 2b на експресію білків MGMT та MARP показав, що IFN- $\alpha$ 2b у концентрації 2 МО/мл спричиняв одночасне підвищення експресії як репаративного ензиму MGMT, так і супутнього йому білка MARP на 62 та 44% відповідно (рис. 2, доріжка 2). Кількість як білка MGMT, так і MARP у контрольному варіанті умовно приймалася за одиницю.

Алкілувальний агент MNNG також спричиняв підвищення експресії обох досліджуваних білків. Для MGMT найвиразніший індуквальний ефект виявлено при концентрації MNNG 0,1 мкг/мл, у той час як для MARP такий ефект спостерігався при найменшій з обраних концентрацій 0,02 мкг/мл: збільшення на 80 та 86% порівняно з контролем для MGMT та MARP відповідно (рис. 2, доріжки 4 та 3).

Сумісне застосування досліджуваних чинників також сприяло підвищенню експресії білків MGMT та MARP. Найбільше зростання кількості MGMT спостерігалось при комбінації IFN- $\alpha$ 2b та MNNG у концентрації 0,1 мкг/мл: на 47% порівняно з контролем (рис. 2, доріжка 7).



**Рис. 2.** Зміна кількості білків MGMT та MARP у клітинах Нер-2 під впливом досліджуваних сполук: *a* – результати Вестерн-блот аналізу: 1 – контроль, 2 – IFN- $\alpha$ 2b (2 МО/мл), 3 – MNNG (0,02 мкг/мл), 4 – MNNG (0,1 мкг/мл), 5 – MNNG (0,5 мкг/мл), 6 – IFN- $\alpha$ 2b (2 МО/мл) + MNNG (0,02 мкг/мл), 7 – IFN- $\alpha$ 2b (2 МО/мл) + MNNG (0,1 мкг/мл), 8 – IFN- $\alpha$ 2b (2 МО/мл) + MNNG (0,5 мкг/мл); *б* – результати денситометрії сигналів, нормовані відносно кількості загального білка на доріжках: ■ – MARP, ▒ – MGMT

Для білка MARP найефективнішою була комбінація IFN- $\alpha$ 2b з MNNG у концентрації 0,5 мкг/мл: зростання на 50% (рис. 2, доріжка 8).

Тож IFN- $\alpha$ 2b і MNNG, як окремо, так і в комбінації один з одним, призводили до підвищення кількостей MGMT та MARP (від 31 до 86% відносно контролю) у всіх дослідних варіантах. Слід відзначити, що окремо IFN- $\alpha$ 2b та MNNG у певних концентраціях спричиняли дещо виразніший ефект підвищення кількості досліджуваних білків (рис. 2, доріжки 2–4), ніж при спільній дії досліджуваних чинників. При цьому MNNG у найвищій концентрації (0,5 мкг/мл) спричиняв менший ефект зростання кількості MGMT порівняно із застосуванням відносно малих концентрацій (0,02 та 0,1 мкг/мл). Такі спостереження підтверджуються і даними літератури. Існує ряд робіт [7, 8], у яких показано, що алкілувальні сполуки є специфічними індукторами експресії MGMT саме при низьких концентраціях. Зменшення кількості MGMT при високих концентраціях алкіляторів можна пояснити його виснаженням, оскільки після зв'язування алкільної групи з активним сайтом ензим піддається протеолізу [1].

У нашій роботі виявлено збільшення кількості MARP після обробки клітин Нер-2, які експресують обидва досліджуваних білки, даним алкілувальним агентом. Раніше нами було показано, що клітини 4BL, у яких MGMT був відсутній і виявлявся лише MARP, могли репарувати пошкодження, викликані застосуванням MNNG тільки у низьких концентраціях [14]. Ці спостереження дозволяють припустити, що MARP є схожим до алкілтрансферазоподібних білків (ATLs), які були

знайдені у прокаріот та нижчих еукаріот. Ці білки розпізнають алкільні групи різної довжини, але не здатні їх репарувати. Ймовірно, механізм дії ATLs полягає в тому, що вони впізнають алкільні аддукти та передають сигнал про їхню присутність у клітинах різним системам репарації: прямій, ексцизійній тощо, які видаляють ці пошкодження за допомогою тих чи інших механізмів, якщо останні працюють у клітинах [19, 20].

### Висновки

У пухлинних клітинах людини лінії Нер-2 IFN- $\alpha$ 2b і алкілувальний агент MNNG, як окремо, так і в комбінації один з одним, виявили здатність підвищувати кількість (від 31 до 86% відносно контролю) репаративного ензиму MNNG та білка MARP, який розпізнається моноклональними анти-MNNG антитілами. Сумісне застосування IFN- $\alpha$ 2b та алкілувальної сполуки призводило до зростання експресії білків MGMT та MARP відносно інтактного контролю. Найбільше підвищення кількості досліджуваних білків спостерігалось: для MGMT при дії IFN- $\alpha$ 2b і MNNG у концентрації 0,1 мкг/мл та для MARP – при дії IFN- $\alpha$ 2b і MNNG у концентрації 0,5 мкг/мл (відповідно зростання на 47 та 50% порівняно з контролем).

*Колектив авторів висловлює подяку науковим співробітникам відділу генетики людини ІМБГ НАН України Мацевич Л.Л. за роз'яснення тонкощів роботи з програмним забезпеченням та Рубан Т.П. за допомогу у культивуванні клітин.*

## ЛІТЕРАТУРА

- Mitra S. MGMT: A Personal Perspective // DNA Repair (Amst). – 2007. – 6, № 8. – P. 1064–1070.
- Pegg A.E., Fang Q., Loktionova N.A. Human variants of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase // DNA repair. – 2007. – 6, № 8. – P. 1071–1078.
- Liu L., Gerson S.L. Targeted Modulation of MGMT: Clinical Implications // Clin Cancer Res. – 2006. – 12. – P. 328–331.
- 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.
- Natsume A., Wakabayashi T., Ishii D., Maruta H., Fujii M., Shimato S., Ito M., Yoshida J. A combination of IFN-beta and temozolomide in human glioma xenograft models: implication of p53-mediated MGMT downregulation // Cancer Chemother Pharmacol. – 2008. – 61, № 4. – P. 653–659.
- Rosati S.F., Williams R.F., Nunnally L.C., McGee M.C., Sims T.L., Tracey L., Zhou J., Fan M., Nathwani A.C., Stewart C.F., Pfeffer L.M., Davidoff A.M. IFN-beta sensitizes neuroblastoma to the antitumor activity of temozolomide by modulating O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase expression // Mol Cancer Ther. – 2008. – 7, № 12. – P. 3852–3858.
- Lefebvre P., Laval F. Potentiation of N-methyl-N<sup>7</sup>-nitro-N-nitrosoguanidine-induced O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyltransferase activity in a rat hepatoma cell line by poly (ADP-ribose) synthesis inhibitors // Biochem Biophys Res Commun. – 1989. – 163, № 1. – P. 599–604.
- Lefebvre P., Zak P., Laval F. Induction of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyltransferase and N<sup>3</sup>-methyladenine-DNA-glycosylase in human cells exposed to DNA-damaging agents // DNA Cell Biol. – 1993. – 12, № 3. – P. 233–241.
- Kotsarenko K.V., Lylo V.V., Ruban T.P., Macewicz L.L., Kornelyuk A.I., Chernykh S.I., Lukash L.L. Influence of EMAP II, IFN-2b and its medicinal preparations on the MGMT protein amount in human cells *in vitro* // Biopolymers and Cell. – 2014. – 30, № 6. – P. 448–453.
- Shepherd J., Waugh N., Hewitson P. Combination therapy (inter-feron alfa and ribavirin) in the treatment of chronic hepatitis C: a rapid and systematic review // Health Technol Assess. – 2000. – 4, № 33. – P. 1–67.
- Kotsarenko K.V., Lylo V.V., Macewicz L.L., Ruban T.P., Luchakivska Yu.S., Kuchuk M.V., Lukash L.L. Influence of some biologically active substances on amount of MGMT and MARP proteins in human cells *in vitro* // Biopolymers and Cell. – 2014. – 30, № 3. – P. 203–208.
- Kotsarenko K.V., Lylo V.V., Macewicz L.L., Babenko L.A., Kornelyuk A.I., Ruban T.A., Lukash L.L. Change in the MGMT Gene Expression under the Influence of Exogenous Cytokines in Human Cells *In Vitro* // Cytology and Genetics. – 2013. – 47, № 4. – P. 202–209.
- Karpova I.S., Lylo V.V., Macewicz L.L., Kotsarenko K.V., Palchykovska L.G., Ruban T.O., Lukash L.L. Lectins of Sambucus nigra as Biologically Active and DNA-Protective Substances // Acta Hort. (ISHS). – 2015. – 1061, № 1. – P. 93–102.
- Коцаренко Е.В., Акуленко О.А., Лыло В.В., Рубан Т.П., Мацевич Л.Л., Главацкий А.Я., Маркова О.В., Кардаш К.А., Шуба И.Н., Лукаш Л.Л. Влияние репаративного энзима MGMT и сопутствующего ему белка MARP на цитотоксическое действие алкилирующих соединений в культурах клеток человека // Вісник Українського товариства генетиків та селекціонерів. – 2015. – 13, № 1. – С. 39–45.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal Biochem. – 1976. – 72. – P. 248–254.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – 227, № 5259. – P. 680–685.
- 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 Methods. – 2008. – 172, № 2. – P. 250–254.
- Lukash L.L., Boldt J., Pegg A.E., Dolan M.E., Maher V.M., McCormick J.J. Effect of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase on the frequency and spectrum of mutations induced by N-methyl-N<sup>7</sup>-nitro-N-nitrosoguanidine in the HPRT gene of diploid human fibroblasts // Mutat. Res. – 1991. – 250, № 1–2. – P. 397–409.
- Latypov V.F., Tubbs J.L., Watson A.J., Marriott A.S., McGown G., Thorncroft M., Wilkinson O.J., Senthong P., Butt A., Arvai A.S., Millington C.L., Povey A.C., Williams D.M., Santibanez-Koref M.F., Tainer J.A., Margison G.P. At1l regulates choice between global genome and transcription-couple repair of O(6)-alkylguanines // Mol. Cell. – 2012. – 47, № 1. – P. 50–60.
- Margison G.P., Butt A., Pearson S.J., Wharton S., Watson A.J., Marriott A., Caetano C.M.P.F., Hollins J.J., Rukazenkova N., Begum G., Santibáñez-Koref M.F. Alkyltransferase-like proteins // DNA repair. – 2007. – 6. – P. 1222–1228.

AKULENKO O.A.<sup>1</sup>, KOTSARENKO K.V.<sup>2</sup>, LYLO V.V.<sup>2</sup>, CHERNYKH S.I.<sup>2</sup>, LUKASH L.L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymyrska str., 64/13

<sup>2</sup> Institute of Molecular Biology and Genetics NAS Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 150, e-mail: lukash@imbg.org.ua

## CHANGES IN EXPRESSION OF REPAIR ENZYME MGMT AND PROTEIN MARP UNDER THE MUTUAL ACTION OF CYTOKINE IFN- $\alpha$ 2b AND ALKYLATING AGENT MNNG ON HUMAN CELLS *IN VITRO*

**Aim.** To study the effect of IFN- $\alpha$ 2b and alkylating agent MNNG on the amount of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) protein in human cells *in vitro*. **Methods.** The human cells of Hep-2 line were treated with the purified recombinant protein IFN- $\alpha$ 2b and alkylating agent MNNG. Changes in the MGMT gene expression were studied at a protein level by Western blot analysis. **Results.** Joint application of IFN- $\alpha$ 2b and MNNG, as well as the separate ones, led to the growth of MGMT and MARP (anti-Methyltransferase Antibody Recognizable Protein) amounts. The most significant increase of studied proteins expression was observed during joint application of MNNG (0.1  $\mu$ g/ml and 0.5  $\mu$ g/ml) in combination with IFN- $\alpha$ 2b at 2 IU/ml (for MGMT and MARP respectively). **Conclusions.** IFN- $\alpha$ 2b and MNNG caused increasing MGMT and MARP amounts in all studied concentrations from 31 to 86% compared to the intact control.

**Keywords:** human cells *in vitro*, MGMT, MARP, cytokine IFN- $\alpha$ 2b, alkylating agent MNNG.