

В.В. ЛЫЛО¹, Л.Л. МАЦЕВИЧ¹, Е.В. КОЦАРЕНКО¹,
Л.А. БАБЕНКО^{1,2}, А.И. КОРНЕЛЮК¹,
Е.М. СУХОРАДА¹, Л.Л. ЛУКАШ¹

¹ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев
E-mail: lukash@imbg.org.ua

² Киевский национальный университет им. Т. Шевченко
E-mail: wbabenko_lesia@ukr.net

ИНДУКЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА РЕПАРАТИВНОГО ЭНЗИМА O⁶-МЕТИЛГУАНИН-ДНК МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЦИТОКИНА ЕМАР II В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*



*Цель работы — определить влияние рекомбинантного цитокина ЕМАР II (эндотелиальный и моноцит-активирующий полипептид II) на уровень экспрессии гена MGMT, кодирующего репаративный фермент O⁶-метилгуанин-ДНК метилтрансферазу (MGMT), в культурах клеток человека. Исследование влияния ЕМАР II на пролиферацию клеток проводили с использованием стандартного МТТ-теста. Белок MGMT в клеточном экстракте идентифицировали с помощью Вестерн-блот анализа. Использовались клеточные линии: А102 (фибробласты), ПК-1 (стромальные клетки пуповинной крови) и 4В16 (клетки, полученные из периферической крови). В серии экспериментов показано, что цитокин ЕМАР II вызывает индукцию экспрессии MGMT в клетках человека исследованных линий. При высоких концентрациях этого цитокина наблюдалось снижение количества клеток. Установлено, что присутствие цитокина ЕМАР II в бессывороточной культуральной среде приводит к возрастанию уровня экспрессии репаративного фермента MGMT в клетках человека *in vitro*.*

© В.В. ЛЫЛО, Л.Л. МАЦЕВИЧ, Е.В. КОЦАРЕНКО,
Л.А. БАБЕНКО, А.И. КОРНЕЛЮК, Е.М. СУХОРАДА,
Л.Л. ЛУКАШ, 2011

Введение. Геномы живых организмов подвергаются постоянному воздействию экзогенных и эндогенных факторов, которые с определенной частотой приводят к повреждению структуры ДНК. В восстановлении первичных повреждений ДНК, вызванных алкилирующими соединениями (алкиляторами), которые широко используются в производстве и медицине, решающую роль играет репаративный фермент O⁶-метилгуанин-ДНК метилтрансфераза или O⁶-алкилгуанин-ДНК метилтрансфераза (MGMT или АГТ) [1–3]. Алкилирование азотистых оснований может происходить в разных положениях, однако алкилирование гуанина в O⁶-позиции имеет наиболее выраженный канцерогенный, цитотоксический и мутагенный потенциал. O⁶-алкилгуанин является одним из мутагенно опасных аддуктов, так как с высокой частотой приводит к ошибочному спариванию азотистых оснований при репликации ДНК: вместо цитозина O⁶-алкилгуанин спаривается с тиминном, и в результате возникает транзигация типа G:C→A:T. Другим механизмом реализации мутаций, обусловленных воздействием алкиляторов, является образование поперечных сшивок за счет хлорэтильных групп [4].

В процессе репарации ДНК MGMT переносит алкильную группу из O⁶-позиции гуанина на собственный цистеиновый остаток, при этом необратимо инактивируясь. Таким образом MGMT защищает клетку от мутагенных и цитотоксических повреждений [1, 5]. Уровень экспрессии исследуемой алкилтрансферазы различен у разных индивидуумов, а также в отдельных тканях и органах одного и того же организма, в нормальных и опухолевых клетках одного органа [1, 5]. Благоприятный эффект присутствия MGMT в нормальных клетках — защита от алкилирования ДНК — становится неблагоприятным фактором при проведении химиотерапии опухолей с использованием алкилирующих соединений. Поэтому актуальным является изучение возможности влияния на уровень экспрессии гена MGMT: ингибирования — в опухолевых клетках и восстановления — в здоровых клетках организма.

Известно, что MGMT млекопитающих имеет молекулярную массу около 22–24 кДа [1], но ранее с помощью Вестерн-блот анализа нами было показано также существо-

вание новой молекулярной формы этого репаративного энзима с молекулярной массой 48–50 кДа [6], природа которой в настоящее время изучается.

Как известно, на экспрессию гена *MGMT* могут влиять различные факторы, например, одноцепочечные разрывы ДНК, алкилирующие соединения, состояние гиперметилирования промотора. Регуляция экспрессии этого гена также может осуществляться через различные системы внутриклеточных сигнальных путей, например, опосредованные белком p53 и др. В наших более ранних работах [6, 7] было показано, что в системах *in vitro* индукторами экспрессии гена *MGMT* на уровне белка выступали некоторые лектины растительного и животного происхождения. В литературе также все чаще появляются данные о влиянии на экспрессию гена *MGMT* различных цитокинов [8–11].

Цитокины представляют собой группу полипептидных медиаторов, участвующих в формировании и регуляции защитных реакций организма. К цитокинам относятся интерфероны, колониестимулирующие факторы, интерлейкины, хемокины, трансформирующие ростовые факторы, группа фактора некроза опухолей и некоторые другие. Биологические эффекты цитокинов опосредуются через специфические клеточные рецепторные комплексы [12]. По литературным данным, интерферон β (IFN- β) в определенных концентрациях способен снижать уровень экспрессии гена *MGMT* в клетках глиомы [8] и нейробластомы [9] человека, усиливая тем самым противоопухолевое действие алкилирующего препарата темозоломида. Аналогичные данные получены в работе Zheng et al. [10], где установлено, что интерлейкин-24 (IL-24) при определенных условиях способен снижать уровень экспрессии гена *MGMT* в клетках меланомы человека через активацию белка p53. Кроме того, IL-24 специфически ингибировал экспрессию гена *MGMT*, осуществляя влияние через рецепторы IL-20R/IL-22R в клетках меланомы человека. Cardozo et al. [11] показали, что комбинация двух цитокинов IL-1 β + IFN- γ оказывала обратное дейст-

вие – стимулировала повышение экспрессии гена *MGMT* при кратковременной обработке β -клеток поджелудочной железы крыс. Авторы статьи объясняют это, в частности, ответом репаративной системы на повреждения ДНК, вызванные совместным действием IL-1 β и IFN- γ .

Исследуемый нами цитокин ЕМАР II (endothelial monocyte-activating polypeptide-II) – это мультифункциональный цитокиноподобный белок, который образуется в злокачественных опухолях млекопитающих благодаря альтернативному сплайсингу и посттрансляционному процессингу его предшественника – белка p43. Впервые он был выделен из фибросаркомы мышей, индуцируемой метилхолантроном [13, 14]. Обнаружена способность ЕМАР II подавлять миграцию эндотелиальных клеток, стимулировать их апоптоз, влиять на активность моноцитов, нейтрофилов и макрофагов, способствуя воспалительным процессам в опухолях [14, 15]. На экспериментальных моделях глиомы, саркомы, рака желудка и поджелудочной железы получены доказательства противоопухолевой активности этого цитокина. Авторы объясняют это прежде всего антиангиогенными свойствами [15–17]. При раке простаты обнаружен также эффект торможения рекомбинантным ЕМАР II роста ксенографтов человека, вживленных под капсулу почки мышей, и высказано предположение относительно возможности стимуляции апоптоза как одного из ведущих механизмов действия упомянутого феномена [18, 19].

Цель настоящей работы – определить возможности влияния цитокина ЕМАР II на экспрессию гена репаративного энзима *MGMT* на уровне белка в культурах клеток человека.

Материалы и методы. При проведении экспериментальной работы использовали следующие культуры клеток: A102 – клеточную линию, полученную из фибробластов кожи новорожденного мальчика и любезно предоставленную в наше распоряжение проф. МакКормиком; ПК-1 – линию стромальных клеток, выделенную нами из пуповинной крови человека, и 4BL6 – ли-

нию фибробластоподобных клеток, полученную нами из крови взрослого донора. В качестве позитивного контроля на наличие MGMT использовали линию клеток Нер-2 (рак гортани), в качестве специфического индуктора экспрессии гена *MGMT* – алкилирующий агент нитрозогуанидин.

Клетки культивировали в стандартной ростовой среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота («Sigma», США) и антибиотиков (пенициллин и стрептомицин).

Рекомбинантный ЕМАР II человека получали в бактериальной системе *Escherichia coli* BL21(DE3)*pLysE/pET30a-EMAP II* по описанному ранее методу [20]. Фрагмент ДНК, кодирующий зрелую форму ЕМАР II человека (D146-K312), клонировали в плазмиде рЕТ30а («Novagen», Германия), присутствие соответствующей вставки ДНК подтверждено секвенированием нуклеотидной последовательности. Экспрессию белка проводили в клетках *E. coli* BL21(DE3). Полноразмерный рекомбинантный белок ЕМАР II_п, синтезированный в бактериальной системе (212 аминокислотных остатков, из которых первые 45 кодируются вектором), очищали хроматографией на Ni-NTA агарозе («Qiagen», Германия). Зрелый рекомбинантный белок ЕМАР II_е человека (с отщепленной константной частью, 169 аминокислотных остатков) получали после специфического расщепления полноразмерного ЕМАР II_п энтерокиназой с последующей хроматографической очисткой и идентифицировали по результатам электрофоретического анализа [18]. Чистота белка составила около 98 %, изоэлектрическая точка – $pI = 6.36$, коэффициент поглощения – $8730 \text{ см}^1 \text{ моль}^{-1}$ (0,471 мл/мг) при длине волны 280 нм.

Для определения влияния ЕМАР II на экспрессию MGMT была разработана следующая схема обработки клеток. Поскольку имеются данные об индукции цитокином ЕМАР II апоптоза [18, 19, 21] и генных мутаций [22], можно предполагать, что воздействие на клетки этим цитокином приведет к появлению первичных повреждений ДНК, которые через некоторое время реализуются в генные мутации. Вместе с тем первичные повреждения ДНК являются одним из индук-

торов MGMT. Это позволило нам предположить, что потенциальное влияние ЕМАР II на экспрессию MGMT также может быть опосредовано индукцией первичных повреждений ДНК. В этом случае проявление эффекта будет отсрочено во времени. Поэтому дизайн эксперимента основывался на стандартной схеме, используемой для экспериментов по изучению мутагенеза и предусматривающей постинкубацию клеток (время экспрессии) в ростовой среде после завершения обработки клеток исследуемым веществом. Постинкубация осуществляется в стандартной ростовой среде, поскольку длительное пребывание в бессывороточной среде является стрессорным фактором и нарушает нормальные физиологические процессы в клетке.

Таким образом, в ходе настоящего эксперимента клеточный монослой отмывали от ростовой среды раствором PBS и инкубировали на протяжении 4–8 ч в бессывороточной среде DMEM с добавлением цитокина ЕМАР II. В качестве контроля влияния условий обработки использовали клеточную культуру, подвергавшуюся тем же воздействиям, но без добавления ЕМАР II. После обработки бессывороточную среду удаляли, повторно промывали клетки раствором PBS и добавляли к клеточным культурам стандартную ростовую среду, содержащую 10 % сыворотки. Постинкубацию клеток в стандартных условиях культивирования осуществляли на протяжении 24 ч, после чего клетки снимали с субстрата с помощью раствора версена с добавлением трипсина, промывали, центрифугировали и хранили при $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Белковый экстракт получали согласно описанному ранее методу [23]. SDS-электрофорез белков проводили в 12%-ном полиакриламидном геле по методу Лэммли [24]. Для равномерного нанесения белка в каждой пробе определяли концентрацию общего белка по методу Бредфорд [25] и в каждую лунку наносили равное его количество.

Применяли следующие методы контроля равномерности нанесения: Вестерн-блот гибридизацию по β -актину, Вестерн-блот гибридизацию по GAPDH и денситометрический контроль суммарного количества белка, пере-

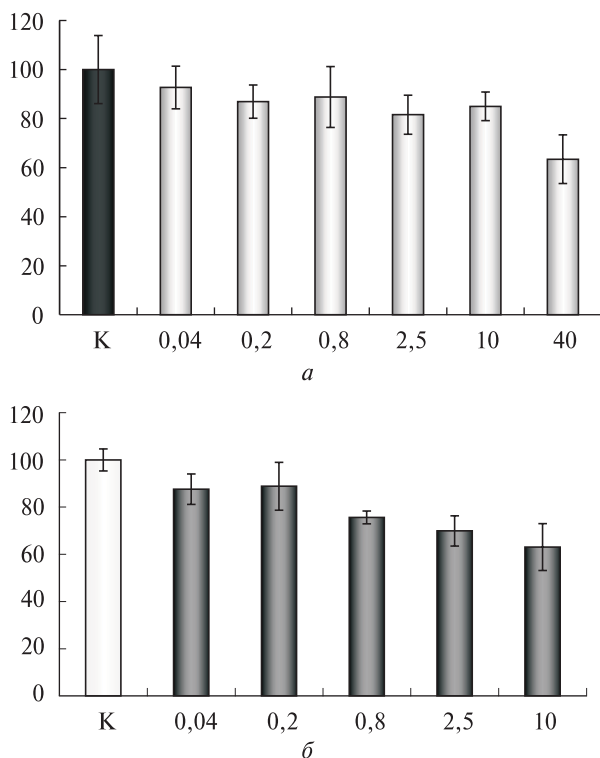


Рис. 1. Влияние ЕМАР II на пролиферацию и выживаемость клеток человека ПК-1 (а) и 4ВL6 (б): по вертикали – количество клеток относительно контроля, %; по горизонтали – концентрация, мкг/мл

несенного на мембрану. При этом β-актин, как выяснилось, не всегда отображал действительное количество белка в пробе, поэтому в дальнейшем использовался либо контроль по GAPDH, либо денситометрия окрашенной гибридационной мембраны, поскольку, как было показано в работе [26], контроль по структурным белкам, несмотря на широкое распространение этого подхода, не всегда дает адекватные результаты.

Идентификацию MGMT в клеточном экстракте проводили с помощью Вестерн-блот анализа. Использовали моноклональные антитела против MGMT производства «Novus Biologicals, Littleton, Co» (США). В качестве вторичных использовали видоспецифические конъюгированные с пероксидазой хрена антитела производства «Jackson ImmunoResearch» (США). Процедуры по идентификации MGMT в наших пробах осуществляли согласно методическим ука-

заниям фирмы – изготовителя моноклональных антител [27].

Влияние ЕМАР II на пролиферацию и выживаемость клеток человека исследовали с использованием реакции трансформации метаболически активными клетками 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромидом (МТТ) в формазан [28]. При этом клетки культивировали в присутствии ЕМАР II в течение 72 ч, после чего производили смену среды и окрашивание. На основании интенсивности полученного окрашивания оценивали примерное количество живых, активно метаболизирующих клеток.

Результаты исследований и их обсуждение. Исследование возможных модулирующих свойств ЕМАР II относительно экспрессии MGMT было предварено изучением влияния этого цитокина на рост клеточной культуры с целью выявления его потенциальной цитотоксичности или ингибирующего действия на пролиферацию. На рис. 1 представлены результаты МТТ-теста для двух исследуемых линий клеток – ПК-1 и 4ВL6.

Как свидетельствуют данные, представленные на диаграмме, цитокин ЕМАР II при высоких концентрациях вызывает снижение количества живых клеток в монослое, что позволяет предположить наличие у этого белка либо цитотоксических свойств, либо способности ингибировать клеточную пролиферацию. Как уже указывалось, известна способность цитокина ЕМАР II индуцировать апоптоз [18, 19, 21] и генные мутации [22]. Для уточнения природы полученного эффекта необходимы дальнейшие исследования.

Для линии ПК-1 (рис. 1, а) не было выявлено значительного снижения количества клеток под влиянием ЕМАР II в диапазоне концентраций от 0,04 до 10 мкг/мл включительно, и лишь обработка клеток цитокином в концентрации 40 мкг/мл приводила к заметному снижению числа клеток (60 % по отношению к контролю). Линия 4ВL6 (рис. 1, б) оказалась более чувствительной к действию цитокина, так как уже при концентрации ЕМАР II 0,8 мкг/мл наблюдалось выраженное снижение числа

клеток в монослое. При концентрации цитокина 10 мкг/мл наблюдалось снижение числа исследуемых клеток до 60 % по отношению к необработанному контролю. Обработка клеток ЕМАР II в концентрациях 0,04–0,2 мкг/мл не приводила к статистически достоверному снижению исследуемого показателя.

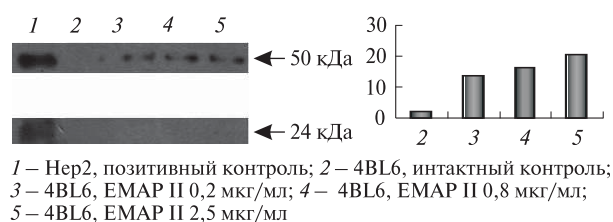
В дальнейших экспериментах нами было изучено влияние цитокина ЕМАР II на экспрессию белка MGMT в исследуемых клеточных линиях.

На рис. 2 представлены результаты Вестерн-блот анализа белковых экстрактов, которые получены из клеток человека линий 4BL6, ПК-1, A102, обработанных цитокином ЕМАР II в разных концентрациях. В качестве позитивного контроля на наличие белка MGMT использовали линию Нер-2 (карцинома гортани человека). Эта линия характеризуется высоким уровнем экспрессии репаративного энзима MGMT, который присутствует в ней как в тяжелой (50 кДа), так и в обычной (23 кДа) формах. В качестве специфического индуктора экспрессии MGMT использовали алкилирующий агент N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (МННГ), который, как показано нами ранее, вызывал сильный мутагенный эффект в клетках человека *in vitro* [29].

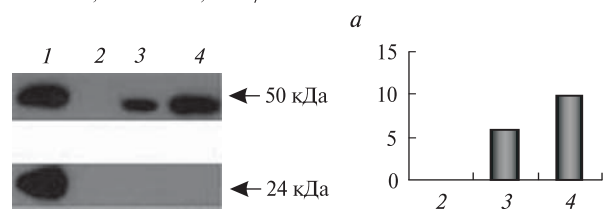
Как свидетельствуют данные, представленные на рис. 2, цитокин ЕМАР II вызывал повышение уровня экспрессии MGMT в клетках человека всех исследованных нами линий.

В интактных клетках линии 4BL6 на 138-м и 140-м пассажах, когда экспрессия MGMT была выражена очень слабо или совсем не выявлялась, обработка клеток цитокином ЕМАР II приводила к появлению «тяжелой» формы MGMT с молекулярной массой 50 кДа (рис. 2, а, б). При этом эффект повышения уровня экспрессии MGMT под влиянием обработки клеток цитокином ЕМАР II в максимальной из исследуемых концентраций (20 мкг/мл) вполне сопоставим с индукцией этого энзима под действием алкилирующего агента МННГ (рис. 2, б).

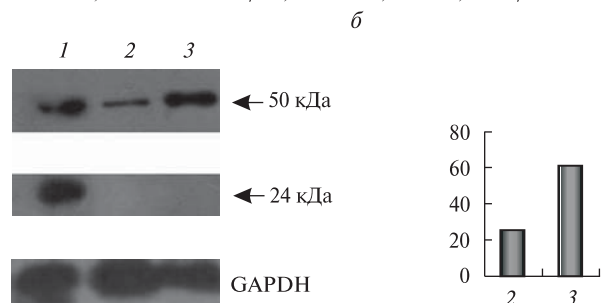
Повышение уровня экспрессии MGMT под влиянием исследуемого цитокина было



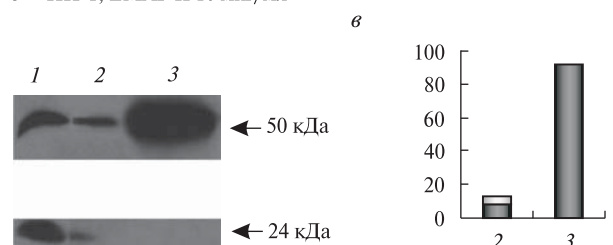
1 – Нер2, позитивный контроль; 2 – 4BL6, интактный контроль; 3 – 4BL6, ЕМАР II 0,2 мкг/мл; 4 – 4BL6, ЕМАР II 0,8 мкг/мл; 5 – 4BL6, ЕМАР II 2,5 мкг/мл



1 – Нер2, позитивный контроль; 2 – 4BL6, интактный контроль; 3 – 4BL6, ЕМАР II 20 мкг/мл; 4 – 4BL6, МННГ 5 мкг/мл



1 – Нер2, позитивный контроль; 2 – ПК-1, интактный контроль; 3 – ПК-1, ЕМАР II 10 мкг/мл



1 – Нер2, позитивный контроль; 2 – А102, интактный контроль; 3 – А102, ЕМАР II 10 мкг/мл

Рис. 2. Данные Вестерн-блот анализа по влиянию цитокина ЕМАР II на экспрессию MGMT в различных линиях клеток человека *in vitro* (на гистограммах представлены результаты денситометрии сигналов): а – линия 4BL6, 138-й пассаж; б – линия 4BL6, 140-й пассаж; в – линия ПК-1; г – линия А102; по вертикали – уровень экспрессии MGMT, усл. ед.
 ■ MGMT в молекулярной форме 23 кДа
 ■ MGMT в молекулярной форме 50 кДа

выявлено и в клетках линии ПК-1 (рис. 2, в, г). Для необработанных клеток этой линии характерно наличие MGMT в молекулярной форме 50 кДа. После обработки клеток

EMAP II репаративный фермент также выявлялся в молекулярной форме 50 кДа, но количество белка, детектируемого с помощью Вестерн-блот анализа, при этом существенно возрастало.

Для клеточной линии A102 характерно присутствие MGMT в интактных клетках как в форме с молекулярной массой 50 кДа, так и 24 кДа (рис. 2, з). Обработка клеток EMAP II приводила к значительному возрастанию уровня MGMT, однако в обработанных клетках, в отличие от контрольных, репаративный фермент был выявлен только в молекулярной форме 50 кДа.

Если сравнить данные по индукции экспрессии MGMT под влиянием цитокина EMAP II и результаты исследования его влияния на пролиферацию и выживаемость клеток, то можно видеть, что возрастание экспрессии MGMT под влиянием EMAP II в исследуемом диапазоне концентраций не находится в очевидной связи с индуцированным снижением количества клеток. Возрастание экспрессии MGMT наблюдалось как под влиянием цитокина в концентрациях, не проявлявших достоверного цитотоксического или цитостатического эффектов (0,2 мкг/мл для клеточной линии 4BL6 и 10 мкг/мл для клеточной линии ПК-1), так и при его действии в концентрациях, приводивших к снижению интенсивности окрашивания клеточного монослоя в МТТ-тесте.

Таким образом, было подтверждено наше предположение о способности еще одного цитокина, EMAP II, оказывать влияние на экспрессию MGMT на уровне белка; по существу в исследованном диапазоне концентраций этот цитокин вызывает индукцию исследуемого репаративного фермента в «тяжелой форме» 50 кДа. Для более детального изучения концентрационной зависимости и природы белка с молекулярной массой 50 кДа планируется проведение дальнейших экспериментов.

Остается, однако, открытым вопрос, является ли опосредованное действие единственным механизмом воздействия EMAP II на экспрессию MGMT и как соотносятся между собой предполагаемые непосредственный и опосредованный механизмы такого влияния.

Для выяснения этого вопроса начата серия экспериментов, предусматривающая изучение влияния EMAP II на экспрессию MGMT при различных сроках обработки и постинкубации.

Выводы. Показано наличие прямой связи между присутствием цитокина EMAP II в бессывороточной культуральной среде и возрастанием экспрессии репаративного фермента MGMT в клетках человека. Однако механизмы, лежащие в основе явления индукции MGMT под влиянием цитокина EMAP II, пока неясны. Не исключено, что выявленный нами эффект обусловлен ответом репаративной системы на повреждение ДНК, вызванные исследуемым цитокином, поскольку известна его способность индуцировать апоптоз и генные мутации. Представляется целесообразным изучение молекулярных механизмов действия EMAP II как потенциального индуктора экспрессии репаративного фермента MGMT в клетках человека, поскольку это открывает новые пути восстановления репаративной активности MGMT после химиотерапии с использованием алкилирующих соединений.

V.V. Lylo, L.L. Macewicz,
K.V. Kotsarenko, L.A. Babenko, A.I. Kornelyuk,
E.M. Suhorada, L.L. Lukash

INDUCTION OF REPAIR ENZYME
O⁶-METHYLGUANINE-DNA
METHYLTRANSFERASE GENE EXPRESSION
UNDER THE INFLUENCE OF CYTOKINE EMAP II
IN HUMAN CELLS *IN VITRO*

The aim of our study was to investigate the effect of recombinant human cytokine EMAP II (endothelial monocyte-activating polypeptide II) on the expression of MGMT gene, encoding repair enzyme O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in human cell cultures. The influence of EMAP II on cell proliferation was performed using routine MTT assay. Identification of MGMT in cell extracts was performed using Western blot analysis. We used cell lines: A102 (fibroblasts), CB-1 (umbilical cord blood stromal cells), 4BL6 (cells derived from peripheral blood). It was shown that cytokine EMAP II caused induction of MGMT expression in studied human cell lines. There was a decrease in cell number at high concentrations of this cytokine. It was found that the presence of cytokine EMAP II in serum-free growth medium leads to increasing of repair enzyme MGMT expression level in human cells *in vitro*.

В.В. Лило, Л.Л. Мацевич,
К.В. Коцаренко, Л.А. Бабенко, О.І. Корнелюк,
О.М. Сухорада, Л.Л. Лукаш

ИНДУКЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА РЕПАРАТИВНОГО
ЕНЗИМУ O⁶-МЕТИЛГУАНИН-ДНК
МЕТИЛТРАНСФЕРАЗИ ПІД ВПЛИВОМ
ЦИТОКІНУ ЕМАР ІІ В КЛІТИНАХ ЛЮДИНИ
IN VITRO

Мета роботи – визначити вплив рекомбінантного цитокіну ЕМАР ІІ (ендотеліальний та моноцитарно-активуючий поліпептид ІІ) на рівень експресії гена *MGMT*, що кодує репаративний ензим O⁶-метилгуанин-ДНК метилтрансферазу (*MGMT*), в культурах клітин людини. Дослідження впливу ЕМАР ІІ на виживання і проліферацію клітин проводили з використанням стандартного МТТ-тесту. Білок *MGMT* у клітинному екстракті ідентифікували за допомогою Вестерн-блот аналізу. Використовувались клітинні лінії: А102 (фібробласти), ПК-1 (стромальні клітини пуповинної крові) і 4ВЛ6 (клітини, отримані з периферійної крові). В серії експериментів показано, що цитокін ЕМАР ІІ спричиняє індукцію експресії *MGMT* в клітинах людини досліджуваних нами ліній. При високих концентраціях цього цитокіну спостерігалось зниження кількості клітин. Встановлено, що присутність цитокіну ЕМАР ІІ в безсироватковому культуральному середовищі призводить до зростання рівня експресії репаративного ензиму *MGMT* в клітинах людини *in vitro*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mitra S.* *MGMT: A personal perspective // DNA Rep.* – 2007. – **6**, № 8. – P. 1064–1070.
2. *Pegg A. E.* Repair of O⁶-alkylguanine by alkyltransferases // *Mutat. Res.* – 2000. – **462**, № 2/3. – P. 83–100.
3. *Lukash L.L., Man'ko V.G., Lylo V.V.* Role of O-alkylguanine-DNA alkyltransferase in repairing lesions, induced by alkylating compounds // *Biopolymers and Cell.* – 2001. – **17**, № 4. – P. 265–277.
4. *Kaina B., Christmann M., Naumann S., Roos W.P.* *MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents // DNA Rep.* – 2007. – **6**, № 8. – P. 1079–1099.
5. *Kyrtopoulos S.A.* O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase: influence of susceptibility to the genetic effects of alkylating agents // *Toxic. Lett.* – 1998. – **102/103**. – P. 53–57.
6. *Lylo V.V.* Revealing the modified form of repair enzyme O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase // Actual problems of obstetrics and gynecology, clinical immunology and medical genetics. Collected Works. Kyiv-Lugansk, 2010. – **19**. – P. 299–305.

7. *Lylo V.V., Piven' O.O., Serebryakova K.V., Macewicz L.L., Lukash L.L.* The influence of lectins on some repair processes in mammalian cells *in vitro* // *Ukr. Biochem. J.* – 2008. – **80**, № 6. – P. 60–65.
8. *Natsume A., Ishii D., Wakabayashi T., Tsuno T., Hatanoh H., Mizuno M., Yoshida J.* 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., McGee M.C., Sims T.L., Tracey L., Zhou J., Fan M., Ng C.Y., Nathwani A.C., Stewart C.F., Pfeiffer L.M., Davidoff A.M.* IFN- β 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., Ekmekcioglu S., Poindexter N., Grimm E.A., Chada S.* 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., Orntoft T., Eizirik D.L.* Identification of novel cytokine-induced genes in pancreatic β -cells by high-density oligonucleotide arrays // *Diabetes.* – 2001. – **50**, № 5. – P. 909–920.
12. *Simbirtsev A.S.* Cytokines as a new system, regulating body defense reactions // *Cytokine and Inflamm.* – 2002. – **1**, № 1. – P. 9–16.
13. *Kao J., Ryan J., Brett G., Chen J., Shen H., Fan Y.G., Godman G., Familletti P.C., Wang F., Pan Y.C.* Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumour-derived polypeptide that activates host-response mechanisms // *J. Biol. Chem.* – 1992. – **267**, № 28. – P. 20239–20247.
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., Li J., Hayward J., Schwarz R.E., Chappey O., Wautier J.L., Chabot J., Gerfo P.L., Stern D.* Endothelial-monocyte activating polypeptide II. A novel antitumour cytokine that suppresses primary and metastatic tumour growth and induces apoptosis in growing endothelial cells // *J. Exp. Med.* – 1999. – **190**, № 3. – P. 341–354.
16. *Schwarz R.E., Schwarz M.A.* In vivo therapy of local tumour progression by targeting vascular endothelium with EMAP II // *J. Surg. Res.* – 2004. – **120**, № 1. – P. 64–72.
17. *Schwarz R.E., Awasthi N., Konduri S., Cafasso D., Schwarz M.A.* EMAP II-based antiangiogenic-anti-endothelial in vivo combination therapy of pancreatic

- cancer // Amer. Surg. Oncol. — 2010. — 17, № 5. — P. 1442–1452.
18. *Reznikov A.G., Chaykovskaya L.V., Polyakova L.I., Kornelyuk A.I.* Antitumor effect of endothelial monocyte-activating polypeptide-II on human prostate adenocarcinoma in mouse xenograft model // Exp. Oncol. — 2007. — 29, № 4. — P. 267–271.
 19. *Vozianov A.F., Reznikov A.G., Kornelyuk A.I., Romanenko A.M., Chaikovskaya L.V., Polyakova L.I., Grigorenko V.N.* Effects of recombinant protein EMAP_II on the growth, histological and histochemical features of the heterotransplants of human prostate cancer // J. Acad. Med. Sci. Ukraine. — 2008. — 14, № 4. — P. 719–730.
 20. *Dubrovsky A.L., Brown J.N., Kornelyuk A.I., Murray J.C., Matsuka G.Kh.* Bacterial expression of full-length and truncated forms of cytokine EMAP-2 and cytokine-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase // Biopolymers and Cell. — 2000. — 16, № 3. — P. 229–235.
 21. *Van Horsen R., Eggermont A. M., ten Hagen T.L.* Endothelial monocyte-activating polypeptide-II and its functions in (patho)physiological processes // Cytokine Growth Factor Rev. — 2006. — 17, № 5. — P. 339–348.
 22. *Kovalenko O.O., Lukash L.L., Lukash S.I.* Induction of gene mutations by lectins of different origin and cytokine EMAPII in somatic mammalian cells *in vitro* // Biopolymers and Cell. — 2007. — 23, № 5. — P. 410–415.
 23. *Morton E.N., Margison G.P.* Increased O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in Chinese hamster V-79 cells following selection with chloroethylating agents // Carcinogenesis. — 1988. — 9, № 1. — P. 45–49.
 24. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — 227, № 5259. — P. 680–685.
 25. *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.
 26. *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.
 27. <http://www.novusbio.com/support/protocols/protocol-specific-for-mgmt-antibody-nb100-168.html>
 28. *Twentyman P.R., Luscombe M.* A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity // Brit. J. Cancer. — 1987. — 56, № 3. — P. 279–285.
 29. *Lukash L.L., Boldt J., Pegg F.E., Dolan M.E., Maher V.M., McCormick J.J.* Effect of O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase on the frequency and spectrum of mutations induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the HPRT gene of diploid human fibroblasts // Mutat. Res. — 1991. — 250, № 1/2. — P. 397–409.

Поступила 18.05.10