

УДК 575.224

## ВЛИЯНИЕ РЕПАРАТИВНОГО ЭНЗИМА MGMT И СОПУТСТВУЮЩЕГО ЕМУ БЕЛКА MARP НА ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ АЛКИЛИРУЮЩИХ СОЕДИНЕНИЙ В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Е.В. КОЦАРЕНКО<sup>1</sup>, О.А. АКУЛЕНКО<sup>2</sup>, В.В. ЛЫЛО<sup>1</sup>, Т.А. РУБАН<sup>1</sup>, Л.Л. МАЦЕВИЧ<sup>1</sup>, А.Я. ГЛАВАЦКИЙ<sup>3</sup>, О.В. МАРКОВА<sup>3</sup>, К.А. КАРДАШ<sup>3</sup>, И.Н. ШУБА<sup>3</sup>, Л.Л. ЛУКАШ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
 Украина, 03680, г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 150  
 e-mail: lukash@imbg.org.ua

<sup>2</sup> Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко  
 Украина, 01601, г. Киев, ул. Владимирская, 64/13

<sup>3</sup> ГУ «Институт нейрохирургии им. Акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины»  
 Украина, 04050, г. Киев, ул. Платона Майбороды, 32

**Цель.** Сравнение влияния алкилирующих соединений различного состава на выживаемость клеток человека, содержащих только белок MARP или одновременно белки MGMT и MARP. **Методы.** В работе использовали линии клеток Нер-2 (рак гортани) и 4BL (взрослые стволовые клетки). Клетки обрабатывали нитрозогуанидином, а также коммерческими препаратами Темодал и Амитозин. Цитотоксическое действие препаратов изучали с помощью метода определения колониеобразования клеток. Наличие белков MGMT и MARP в клетках определяли с помощью Вестерн-блот анализа с использованием моноклональных анти-MGMT антител (клон 23.2). **Результаты.** Зависимость чувствительности клеток Нер-2, содержащих как белок MGMT так и MARP, от действия малых доз изучаемых нами алкиляторов имела нелинейный характер с наличием «плато». Клетки 4BL, содержащие только белок MARP, оказались более чувствительны к действию алкилирующих препаратов, особенно нитрозогуанидина. Однако обработка клеток 4BL препаратами Темодал и Амитозин в относительно низких концентрациях (до 2мкМ и 200мкг/мл соответственно) не приводила к резкому снижению количества жизнеспособных клеток и концентрационная зависимость имела, как и у клеток Нер-2, нелинейный характер. **Выводы.** Зависимость чувствительности клеток Нер-2 и 4BL от действия малых доз алкилирующих препаратов Темодал и Амитозин имела нелинейный характер с наличием «плато». Это свидетельствует в пользу того, что в клетках происходит репарация алкильных аддуктов, вызванных этими препаратами, причем, в ней участвует не только репаративный фермент MGMT, но, возможно, и белок MARP. Однако наличие в клетках MARP не влияло на репарацию поврежденных, вызванных нитрозогуанидином.

**Ключевые слова:** MGMT, MARP, репарация, алкилирующие соединения, жизнеспособность клеток.

**Введение.** ДНК живых организмов постоянно подвергается влиянию различных токсических веществ экзогенного и эндогенного происхождения. В частности, такие мутагенные факторы, как алкилирующие соединения, довольно широко используются в производстве, а также в противоопухолевой терапии. Они входят в состав препаратов, которые часто применяются при лечении опухолей головного мозга и раке кожи (темозоломид, стрептозотоцин, прокарбазин, мюстофоран и др.). Механизм генотоксического действия этих веществ заключается в присоединении алкильных групп к нуклеотидам в молекуле ДНК. Алкилирование может осуществляться в различных сайтах, однако наличие алкильной группы в O<sup>6</sup> позиции гуанина приводит к наиболее сильным мутагенному, канцерогенному и цитотоксическому эффектам. Во время репликации ДНК O<sup>6</sup>-алкилгуанин распознается как аденин и образу-

© Е.В. КОЦАРЕНКО, О.А. АКУЛЕНКО, В.В. ЛЫЛО, Т.А. РУБАН, Л.Л. МАЦЕВИЧ, А.Я. ГЛАВАЦКИЙ, О.В. МАРКОВА, К.А. КАРДАШ, И.Н. ШУБА, Л.Л. ЛУКАШ, 2015

ет пару с тимином вместо цитозина, и таким образом, возникают мутации типа транзиций: G:C→A:T [1, 2]. В случае отсутствия исправления данных повреждений в клетке возникают генные мутации, что может привести к злокачественной трансформации или запуску процесса апоптоза [3].

Клетки прокариот и эукариот, в том числе человека, имеют несколько систем репарации, которые отвечают за восстановление алкильных повреждений ДНК. В первую очередь, это система прямой репарации, где распознавание и удаление повреждений происходит с участием одного энзима – O<sup>6</sup>-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (MGMT), а также имеются системы, которые включают целый комплекс репаративных энзимов. Это – эксцизионная репарация оснований (BER), эксцизионная репарация нуклеотидов (NER) и система неправильно спаренных нуклеотидов (MMR). В отличие от сложных эксцизионных систем репарации, MGMT репарирует алкильные повреждения в ДНК без нарушения её целостности и действует путем переноса алкильной группы на цистеин собственного активного центра. После этого белок подвергается убиквитин-зависимому протеолизу [4, 5]. Наиболее эффективно MGMT репарирует короткие алкильные группы (метильные и этильные). В репарации более длинных алкильных групп, разветвленных и с наличием ароматических колец, которые могут находиться также в других нуклеотидах, принимают участие системы эксцизионной репарации. Механизм их действия состоит в распознавании и удалении повреждения вместе с соседним участком ДНК, который потом заново достраивается [6].

Существуют различия в уровнях экспрессии гена *MGMT*, кодирующего энзим MGMT, как между индивидуумами, так и в разных тканях одного организма [7]. Кроме того, показано, что часто в некоторых видах опухолей экспрессия *MGMT* значительно выше, нежели в нормальных клетках этого же органа (например, меланома, глиома и др.) [7, 8, 9]. Установлено, что клетки, имеющие низкий уровень экспрессии гена *MGMT*, являются высокочувствительными к действию алкилирующих гуанин агентов, в то время как высокие уровни его экспрессии делают клетку резистентной к влиянию таких соединений, в том числе и к противопухолевым алкилирующим препаратам. По-

этому, на данный момент, персонализированный подход к лечению онкобольных относится к наиболее перспективным направлениям и заключается он в подборе лекарственных препаратов в соответствии с индивидуальным профилем экспрессируемых генов пациента. Среди таких генов *MGMT* имеет огромное значение, так как взаимосвязь между уровнем его экспрессии и чувствительностью опухолевых и нормальных клеток к действию алкилирующих препаратов является ключевым фактором в подборе химиотерапии [11].

Долгое время считалось, что действие токсических соединений, в том числе и алкилирующих веществ, имеет линейную зависимость доза-ответ [11, 12]. Однако позднее [13] было показано, что генотоксическое и цитотоксическое действия алкилирующих соединений (метил- и этилметансульфонат, метил- и этилнитрозомочевина) в низких концентрациях проявляют нелинейную зависимость образования мутаций и выживаемости клеток человека от концентрации алкилирующего препарата (так называемое «плато»). Наличие такого «плато» свидетельствует о репарации повреждений. Важную роль в этом процессе играет репаративный энзим MGMT, а его инактивация приводит к повышению чувствительности клеток к мутагенам, и соответственно, к переходу нелинейной зависимости в линейную [13, 14]. Однако в некоторых работах показано, что даже при отсутствии энзима MGMT выживаемость клеток после обработки алкилирующими соединениями может иметь нелинейный характер, что свидетельствует о возможной работе других систем репарации [15].

Ранее нами было обнаружено присутствие в клетках человека не только белка MGMT (24 кДа), а также белка с большей молекулярной массой (48 кДа), который распознавался анти-MGMT антителами и был назван anti-Methyltransferase Antibody Recognizable Protein (MARP). Однако природа этого белка пока малоизучена [16, 17].

Исходя из наших предыдущих результатов следует отметить, что MARP является индуцибельным белком и его количество может изменяться при обработке некоторыми биологически-активными веществами [16–18]. Вероятней всего, что MARP не относится к белкам домашнего хозяйства, так как его экспрессия не является постоянной.

Ввиду возможной гомологии MARP с MGMT (исходя из распознавания одними и теми же моноклональными антителами), можно предположить, что этот белок имеет отношение к репаративным белкам. В ряде работ [19, 20] показано, что в клетках прокариот и низших эукариот присутствуют алкилтрансферазоподобные белки (ATLs), которые распознают как короткие, так и разветвленные алкильные группы, но не способны их репарировать. Предполагают, что белки ATL служат для распознавания алкильных аддуктов и передачи сигнала о их наличии энзимам эксцизионной репарации. В клетках человека такие белки пока не обнаружены, но не исключено, что белок MARP может иметь отношение к алкилтрансферазоподобным белкам или деметилирующим метилтрансферазам. Если же предположить, что функции MARP связаны с репарацией алкильных аддуктов, то при подборе химиотерапевтических препаратов необходимо учитывать наряду с MGMT также наличие белка MARP.

Целью данной работы было сравнительное изучение выживаемости клеток человека, содержащих только белок MARP или одновременно белки MGMT и MARP, под действием различных алкилирующих соединений.

### Материалы и методы

Исследования проводили с использованием стандартной клеточной линии Нер-2 (рак гортани) и линии 4BL, полученной в отделе генетики человека ИМБГ из периферической крови здорового донора (взрослые стволовые клетки). В клетках Нер-2 детектировали как белок MGMT, так и MARP, а в клетках 4BL, в которых в процессе становления клеточной линии на пассажах выше 130 произошел сайленсинг гена MGMT, детектировали только белок MARP [21].

Для обработки клеток использовали темозоломид (коммерческий препарат Темодал, производитель Schering-Plough), препарат Амитозин [22] (любезно предоставленный нам к.б.н. А. И. Потопальським), и алкилирующий препарат N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин или MNNG (синтезированный к.б.н. А. П. Терентьевым). Обработку препаратом Темодал проводили с пересчетом на концентрацию действующего вещества (темозоломид).

Для изучения цитотоксического действия алкилирующих препаратов использовали метод определения эффективности колониеобразования клеток [23]. Для этого клетки высевали по  $1 \times 10^3$  в среде DMEM с 10 % сыворотки на чашки Петри диаметром 30 мм. Стоковые разведения препаратов готовили в ДМСО (Темодал и MNNG) или непосредственно в среде DMEM без сыворотки (Амитозин). Через 30 часов роста клеток проводили их обработку исследуемыми препаратами в бессывороточной среде: MNNG – 1 час, Амитозин – 24 часа, Темодал – 24 часа. После обработки среду заменяли на полноценную с добавлением 20 % сыворотки. Клетки формировали колонии в течение 6–7 дней. Окрашивание метиленовым синим и подсчет колоний проводили, когда количество клеток в каждой колонии составляло более 50 (для контрольного варианта). Для определения наличия белков MGMT и MARP клетки выращивали 48 часов на чашках Петри диаметром 10 см, выделяли белки по методике описанной нами ранее [24], после чего проводили SDS-электрофорез в 12 % полиакриламидном геле и Вестерн-блот анализ с использованием моноклональных анти-MGMT антител, клон 23.2 (Novus Biologicals, USA). Для нормирования нанесения белка проводили анализ денситометрии мембраны, окрашенной Ку-масси с помощью программы Origin 8.1 [25]. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета Microsoft Excel 2010, определяли средние значения и отклонения от них.

### Результаты и обсуждение

В литературе встречаются отдельные работы, в которых показано присутствие MARP в некоторых культурах клеток и тканях человека, но природу этого белка никто не изучал. Нами с помощью

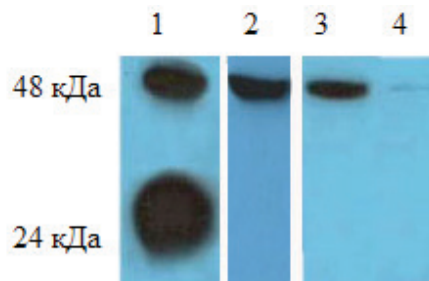
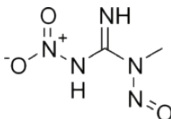
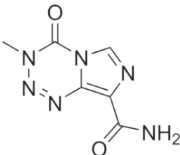
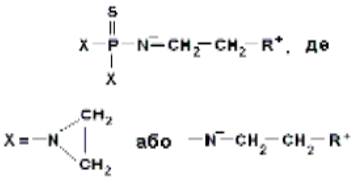


Рис. 1. Вестерн-блот анализ присутствия белков MGMT и MARP в разных типах клеток: 1 – Нер-2, 2 – 4BL, 3 – BKF, 4 – SKF-2

**Таблица.** Характеристика алкилирующих препаратов

Препараты	MNNG	Темодал	Амитозин
Действующее вещество	<i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine	Темозоломид	Тиофосфамид и алкалоиды группы барберина, хелидонина и протопина
Химическая формула			
Алкильная группа	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Положение аддуктов в ДНК	О6 (Гуанин)	О6 (Гуанин), N7 (Аденин), N3 (Аденин), О4 (Тимин)	О6 (Гуанин), N7 (Аденин), N3 (Аденин)

Вестерн-блот анализа также показано наличие в культуре клеток человека белков MGMT и MARP в различных соотношениях (рис. 1).

В серии экспериментов показано, что в клетках Нер-2 присутствуют оба белка, а в клетках линии 4BL, на поздних пассажах (после 130), и в первичных клетках кожи человека ВКФ и SKF-2 – только MARP. Поэтому выбранные для данной работы линии Нер-2 и 4BL использовались в качестве моделей MGMT-содержащих и MGMT-дефицитных клеток соответственно.

Повреждения ДНК, индуцированные действием алкилирующих соединений, в случае отсутствия или неэффективной репарации могут привести к возникновению мутаций и в конечном итоге к злокачественной трансформации клеток или запуску процесса апоптоза.

Алкилирующие препараты, использованные нами в работе, отличались своей химической структурой, алкильной группой и положением образуемых в ДНК аддуктов (таблица).

Особенностью мутагенного в отличие от цитотоксического действия алкилирующих агентов является то, что оно не проявляется сразу и для его реализации необходимо несколько клеточных делений. Таким образом, необходимо некоторое время для накопления мутационных повреждений и полного проявления цитотоксического действия препаратов. Поэтому для данных исследований мы выбрали метод, который позволяет оценить выживаемость клеток на протяжении достаточно длительного периода – определение эффективности колониеобразования клеток.

Действие препарата MNNG с простой алкильной группой, который является сильным мутагеном, на клетки исследуемых линий было неоднозначным (рис. 2, а). Для клеток Нер-2, которые экспрессировали и MGMT и MARP, кривая зависимости выживания в диапазоне низких концентраций мутагена (0,031–1,0 мкМ) имела нелинейную зависимость с наличием дозозависимого участка (плато), что может быть связано с репарирующим действием MGMT. При дальнейшем повышении концентрации алкилирующего агента наблюдалось резкое снижение количества жизнеспособных клеток, формирующих колонии. Это свидетельствует об истощении фермента MGMT в клетках Нер-2, так как после присоединения алкильной группы к белку MGMT он подвергается протеолизу. В отличие от клеток Нер-2, клетки 4BL, в которых нет MGMT, были чрезвычайно чувствительны к действию MNNG (плато на кривой выживания полностью отсутствует) (рис. 2, а).

Следует отметить, что при использовании препаратов с более сложной структурой (Темодал, Амитозин) в клетках Нер-2 мы также наблюдали нелинейную зависимость чувствительности к алкиляторам и наличие ярко выраженного плато при низких концентрациях темозоломида (0,2–2 мкМ) и Амитозина (0,2–20 мкМ) (рис. 2, б, в).

Для клеток 4BL, после обработки низкими концентрациями темозоломида (до 2 мкМ) и Амитозина (до 200 мкг/мл) также было характерно наличие плато (рис. 2, б, в). Хотя следует отметить, что выживаемость клеток была ниже, чем в случае клеток Нер-2.

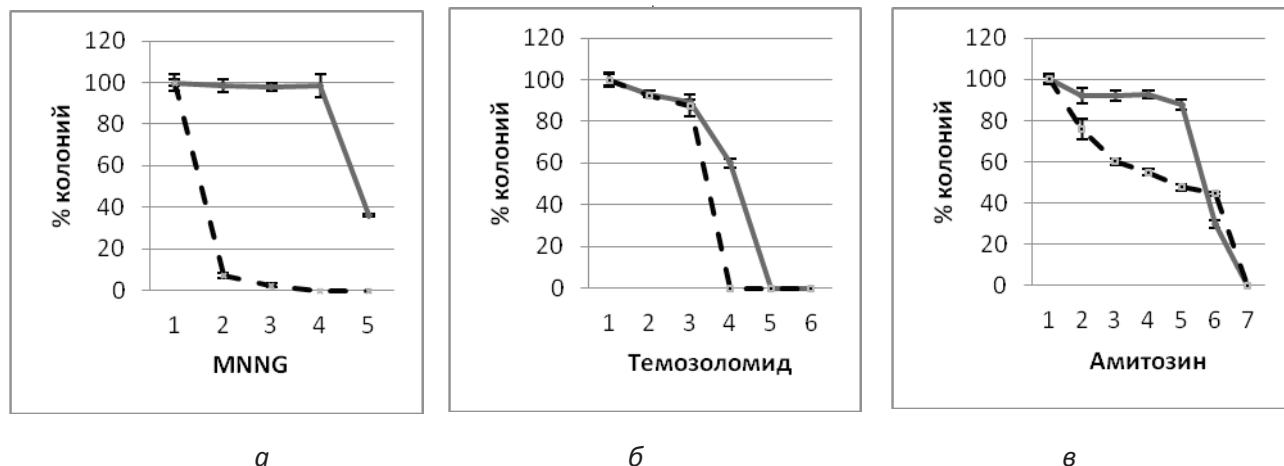


Рис. 2. Анализ эффективности колониеобразования клеток после обработки алкилирующими препаратами: а – MNNG (1–контроль, 2–0,031 мкМ, 3–0,25 мкМ, 4–1 мкМ, 5–6 мкМ), б – Темодал (1–контроль, 2–0,2 мкМ, 3–2 мкМ, 4–20 мкМ, 5–200 мкМ, 6–2000 мкМ), в – Амитозин (1–контроль, 2–0,02 мкг/мл, 3–0,2 мкг/мл, 4–2 мкг/мл, 5–20 мкг/мл, 6–200 мкг/мл, 7–2000 мкг/мл). Прямая линия – клетки Her-2, прерывистая – 4BL

Таким образом, клетки Her-2, которые имели и MGMT, и MARP, были более стойкими к действию всех использованных нами алкилирующих соединений чем клетки 4BL, дефицитные по белку MGMT, но имеющие MARP. Клетки 4BL были чрезвычайно чувствительны к действию MNNG, но при использовании более сложных алкилирующих соединений, которые могут алкилировать ДНК не только в O<sup>6</sup> позиции гуанина, мы наблюдали другой эффект – наличие плато при низких концентрациях препаратов. Это может свидетельствовать об эффективности репарационных систем.

Таким образом, исходя из литературных данных о возможном существовании ATL у млекопитающих и, учитывая возможную гомологию белка MARP с MGMT, так как они оба распознаются анти-MGMT антителами, мы предполагаем, что белок MARP может принимать участие в процессе репарации ДНК. Возможно, что этот белок распознает разветвленные алкильные группы (такие как у Амитозина) или короткие этильные группы в разных нуклеотидах ДНК и способствует репарации этих повреждений.

### Выводы

Зависимость чувствительности клеток Her-2, содержащих и MGMT, и MARP и 4BL, имеющих только MARP, к действию алкилирующих препаратов Темодал и Амитозин имела нелинейный ха-

рактер с наличием «плато». Это свидетельствует в пользу того, что белок MARP может принимать участие в репарации алкильных повреждений, вызванных этими препаратами. Наличие в клетках MARP не влияет на репарацию повреждений, индуцированных нитрозогуанидином.

### Список литературы

1. Pegg A.E., Fang Q., Loktionova N.A. Human variants of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase // DNA repair. – 2007. – Vol. 6, № 8. – P. 1071–1078.
2. Wolf P., Hu Y.C., Doffek K., Sidransky D., Ahrendt S.A. O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase promoter hypermethylation shifts the p53 mutational spectrum in non-small cell lung cancer // Cancer Research. – 2001. – Vol. 61, № 22. – P. 8113–8117.
3. Lukash L.L. Regulation of mutagenesis by exogenous biological factors in the eukaryotic cell systems // Biop. Cell. – 2013. – Vol. 29, № 4. – P. 283–294.
4. 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. – Vol. 24, № 5. – P. 618–639.
5. Kotandeniva D., Murphy D., Yan S., Park S., Seneviratne U., Koopmeiners J.S., Pegg A., Kanugula S., Kassie F., Tretjakova N. Kinetics of O(6)-pyridyloxobutyl-2'-deoxyguanosine repair by human O(6)-alkylguanine DNA alkyltransferase // Biochemistry. – 2013. – Vol. 52, № 23. – P. 4075–4088.
6. Zhang J., Stevens M.F.G., Bradshaw T.D. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance // Current Molecular Pharmacology. – 2012. – Vol. 5. – P. 102–114.
7. Sharma S., Salehi F., Scheithauer B. W., Rotondo F., Syro L.V., Kovacs K. Role of MGMT in tumor development, progression, diagnosis, treatment and prognosis // Anticancer Research. – 2009. – Vol. 29, № 10. – P. 3759–3768.
8. Nitire S. K., Velu C. S., Smith Q. R., Brat G. J., Srivenugopal K. S. Increased expression of the MGMT repair protein mediated by

- cysteine prodrugs and chemopreventative natural products in human lymphocytes and tumor cell lines // *Carcinogenesis*. – 2007. – Vol. 28, № 2. – P. 378–389.
9. Konduri S.D., Ticku J., Bobustuc G.C., Sutphin R.M., Colon J., Isley B., Bhakat K.K., Srivenugopal K.S., Baker C.H. Blockade of MGMT expression by O<sup>6</sup> benzyl guanine leads to inhibition of pancreatic cancer growth and induction of apoptosis // *Clin. Cancer Res.* – 2009. – Vol. 15. – P. 6087–6095.
  10. Henderson L, Albertini S, Aardema M. Thresholds in genotoxicity responses // *Mut. Res.* – 2000. – Vol. 464. – P. 123–128.
  11. Weller M, Stupp R, Hegi M.E., van den Bent M., Tonn J.C., Sanson M., Wick W, Reifenberger G. Personalized care in neuro-oncology coming of age: why we need MGMT and 1p/19q testing for malignant glioma patients in clinical practice // *Neuro Oncol.* – 2012. – Vol.14. – P. 100–108.
  12. Knudson AG. Mutation and cancer. A statistical study of retinoblastoma // *PNAS*. – 1971. – Vol. 68. – P. 820–823.
  13. Thomas A.D., Jenkins G. J.S., Kaina B., Bodger O.G., Tomaszowski K.H., Lewis P.D., Doak S.H., Johnson G.E. Influence of DNA repair on nonlinear dose-responses for mutation // *Toxicological sciences*. – 2013. – Vol. 132. – P. 87–95.
  14. 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'-nitro-N-nitrosoguanidine in the HPRT gene of diploid human fibroblasts // *Mutat. Res.* – 1991. – Vol. 250. – P. 397–409.
  15. Tenori L., Ricci-Vitani L., Muzi A., Ciccarone F., Pelacchi F., Calabrese R., Runci D., Pallini R., Caiafa P., Graziani G. Pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase-1 modulates resistance of human glioblastoma stem cells to temozolomide // *BMC Cancer*. – 2014. – Vol. 14. – P. 151.
  16. 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. – Vol. 47, №. 4. – P. 202–209.
  17. 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- $\alpha$ 2b and its medicinal preparations on the MGMT protein amount in human cells *in vitro* // *Byopolimers and Cell*. – 2014. – Vol. 30, № 6. – P. 448–453.
  18. 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. – Vol. 1061, № 1. – P. 93–102.
  19. 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. At11 regulates choice between global genome and transcription-couple repair of O(6)-alkylguanines // *Mol. Cell*. – 2012. – Vol. 47, №1. – P. 50–60.
  20. 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., Santibañez-Koref M.F. Alkyltransferase-like proteins // *DNA repair*. – 2007. – Vol. 6. – P. 1222–1228.
  21. Macewicz L.L., Kushniruk V.O., Iatsyshyna A.P., Kotsarenko K. V., Lylo V. V., Akopyan G. R., Huleuk N. L., Mykytenko D. O., Lukash L. L. Correlation of mutagenesis level with expression of reparative enzyme O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase during establishment of cell lines *in vitro* // *Biopolymers and Cell*. – 2013. – Vol. 29, № 6. – P. 480–486.
  22. Потопальська Ю.А., Юркевич Л. Н., Негребецька Е. М. Протипухлинна дія препарату амітозин та його аналога амітозинобераміду на пухлини рослин // *Доповіди Національної академії наук України*. – 2010. – № 9. – С. 185–190.
  23. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство; пер. 5-го англ. изд. — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. – 691 с.
  24. Morton E.N., Margison G.P. Increased O<sup>6</sup>Alky1guanine-DNA alkyltransferase activity in chinese hamster V79 cells following selection with chloroethylating agents // *Carcinogenesis*. – 1988. – Vol. 9, № 1. – P. 45–49.
  25. 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. – Vol. 172, № 2. – P. 250–254.

Представлена Н.Г. Горovenko, Э.А. Деминной  
Поступила 24.04.2015

**ВПЛИВ РЕПАРАТИВНОГО ЕНЗИМУ MGMT ТА СУПУТНЬОГО ЙОМУ БІЛКА MARP НА ЦИТОТОКСИЧНУ ДІЮ АЛКІЛУВАЛЬНИХ СПОЛУК В КУЛЬТУРАХ КЛІТИН ЛЮДИНИ**

*К.В. Коцаренко<sup>1</sup>, О.А. Акуленко<sup>2</sup>, В.В. Лило<sup>1</sup>, Т.П. Рубан<sup>1</sup>, Л.Л. Мацевич<sup>1</sup>, О.Я. Главацький<sup>3</sup>, О.В. Маркова<sup>3</sup>, К.А. Кардаш<sup>3</sup>, І.М. Шуба<sup>3</sup> Л.Л. Лукаш<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Інститут молекулярної біології і генетики НАН України Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150 e-mail: lukash@imbg.org.ua

<sup>2</sup> Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Україна, 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13

<sup>3</sup> ДУ «Інститут нейрохірургії ім. Акад. А.П. Ромоданова НАМН України»

Україна, 04050, м. Київ, вул. Платона Майбороди, 32

**Мета.** Порівняння впливу алкілувальних сполук різного складу на виживаність клітин людини, що містять тільки білок MARP чи одночасно білки MGMT та MARP. **Методи.** У роботі використовували лінії Hep-2 (рак гортані) та 4BL (дорослі стовбурові клітини). Клітини обробляли нітросогуанідином, а також комерційними препаратами Темодал та Амітозин. Цитотоксичну дію препаратів вивчали за допомогою методу визначення колонієутворення клітин. Наявність білків MGMT та MARP встановлювали за допомогою Вестерн блот аналізу з використанням моноклональних анти-MGMT антитіл (клон 23.2). **Результати.** Залежність чутливості клітин Hep-2, що містили як білок MGMT, так і MARP, до дії низьких доз досліджуваних нами алкіляторів мала нелінійний характер з наявністю «плато». Клітини 4BL, що містили тільки білок MARP, виявились більш чутливими до дії алкілувальних препаратів, особливо до дії високотоксичного нітросогуанідину. Однак обробка клітин 4BL препаратами Темодал та Аміозин у відносно низьких концентраціях (до 2мкМ та 200мкг/мл відповідно) не призвела до різкого зниження життєздатних клітин та концентраційна залежність мала, як і для клітин Hep-2, нелінійний характер. **Висновки.** Залежність чутливості як клітин Hep-2, так і 4BL до дії малих доз алкілувальних препаратів Темодал та Амітозин мала нелінійний характер з наявністю «плато». Це свідчить на користь того, що в клітинах відбувається репарація алкільних аддуктів, викликаних даними препаратами, причому, у ній бере участь не тільки репаративний ензим MGMT, але, можливо, і білок MARP може брати участь у репарації алкільних аддуктів, викликаних даними препаратами. Однак наявність у клітинах MARP не впливає на репарацію пошкоджень, викликаних нітросогуанідином.

**Ключові слова:** MGMT, MARP, репарація, алкілувальні сполуки, життєздатність клітин.

**THE INFLUENCE OF THE DNA REPAIR ENZYME MGMT AND ASSOCIATED MARP PROTEIN ON CYTOTOXIC EFFECT OF ALKYLATING COMPOUNDS IN HUMAN CELL CULTURES**

*K.V. Kotsarenko<sup>1</sup>, O.A. Akulenko<sup>2</sup>, V.V. Lylo<sup>1</sup>, T.P. Ruban<sup>1</sup>, L.L. Macewicz<sup>1</sup>, A.Ya. Glavatskiy<sup>3</sup>, O.V. Markova<sup>3</sup>, K.A. Kardash<sup>3</sup>, I.M. Shuba<sup>3</sup>, L.L. Lukash<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine Ukraine, 03680, Kyiv, Acad. Zabolotnoho str., 150 e-mail: lukash@imbg.org.ua

<sup>2</sup> Taras Shevchenko National University of Kyiv Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymyrska str., 64/13

<sup>3</sup> SI «Acad. Romodanov Institute of Neurosurgery, NAMS of Ukraine»

Ukraine, 04050, Kyiv, P. Majborody str., 32

**Aim.** To compare the effect of various alkylating compounds on survival of human cells containing the MARP protein only or both MGMT and MARP proteins. **Methods.** The following cell lines were used in this study: Hep-2 (laryngeal carcinoma cells) and 4BL (adult stem cells). The cells were treated with nitrosoguanidine and commercial drugs Temodal and Amitozyn. Cytotoxic effect of the drugs was assessed by cell colony formation assay. The presence of MGMT and MARP proteins was identified by Western-blot analysis using monoclonal anti-MGMT antibody (clone 23.2). **Results.** The dependence of sensitivity of Hep-2 cells containing both MGMT and MARP proteins at low doses of alkylating compounds under study was nonlinear with a «plateau» stage. 4BL cells, containing only the MARP protein, were more sensitive to the action of alkylating compounds, especially of nitrosoguanidine. However, the treatment of 4BL cell line with relatively low concentrations of Temodal and Amitozyn drugs (up to 2 μM and up to 200μg/ml respectively) didn't lead to a sharp decline in the number of viable cells and the concentration dependence was nonlinear, as in the case of Hep-2 cells. **Conclusions.** The dependence of Hep-2 and 4BL cells viability at low concentrations of alkylating compounds Temodal and Amitozyn was nonlinear with a «plateau». This suggests the fact that the repair of alkyl adducts caused by these drugs occurs in the cells, and involves not only MGMT repair enzyme, but possibly MARP. However the presence of the MARP in the cells does not affect the repair of damages caused by the nitrosoguanidine.

**Keywords:** MGMT, MARP, repair, alkylating compounds, cells viability.