

ВПЛИВ СИНТЕЗОВАНОГО В РОСЛИНАХ РЕКОМБІНАНТНОГО ІНТЕРФЕРОНУ $\alpha 2b$ НА ЕКСПРЕСІЮ О⁶-МЕТИЛГУАНІН-ДНК МЕТИЛТРАНСФЕРАЗИ В СОМАТИЧНИХ КЛІТИНАХ ЛЮДИНИ *IN VITRO*

З.М. НІДОЄВА¹, А.А. ПЕТЕРСОН², Т.П. РУБАН¹, Г.В. ДЗЮБА^{1,3}, М.В. КУЧУК², Л.Л. ЛУКАШ¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150

² Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

³ Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Україна, 03127, м. Київ, просп. Академіка Глушкова, 2

E-mail: zarinanidoeva@i.ua, lukash@imbg.org.ua, nkuchuk@icbge.org.ua

В роботі досліджено вплив рекомбінантного інтерферону $\alpha 2\beta$, синтезованого в трансгенних рослинах, на експресію репаративного ензиму O⁶-метилгуанін-ДНК метилтрансферази в клітинах людини пухлинного та непухлинного походження. З цією метою за допомогою Вестерн-блот аналізу було визначено кількісні зміни цього білка після обробки пухлинних клітин людини лінії Нер-2 (рак горла) та клітин людини лінії E8, отриманої з ембріональних гермінативних клітин, очищеним рекомбінантним інтерфероном $\alpha 2\beta$. Встановлено, що обробка рекомбінантним інтерфероном $\alpha 2\beta$ спричиняла зменшення кількості O⁶-метилгуанін-ДНК метилтрансферази у пухлинних клітинах Нер-2 при всіх досліджуваних концентраціях (2-2000 МО/мл) відносно контролю. В клітинах людини E8 непухлинного походження зниження кількості O⁶-метилгуанін-ДНК метилтрансферази виявлено при двох найбільших концентраціях 200 та 2000 МО/мл, хоча статистично достовірний ефект порівняно з контрольним рівнем спостерігався лише за концентрації 200 МО/мл. Таким чином, інгібувальний ефект трансгенного інтерферону був виразнішим в пухлинних клітинах порівняно з клітинами непухлинного походження.

Ключові слова: рекомбінантний інтерферон $\alpha 2\beta$, культура клітин людини, лінія Нер-2, лінія E8, O⁶-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза, рівні експресії.

Вступ. О⁶-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза видає алкільну групу з позиції О⁶-гуаніну, мінорного, проте одного з найнебезпечніших мутагенних та цитотоксичних алкільних аддуктів [1–3]. Експресія цього репаративного ензиму клітинами організму є необхідною умовою для видалення пошкоджень, індукованих алкільувальними сполуками довкілля [4]. В той же час, експресуючись у клітинах пухлин, MGMT відповідним чином «нівелює» цитотоксичний

ефект алкільувальних препаратів, що призводить до зниження ефективності лікування онкозахворювань та виживаності пацієнтів [1]. Сайлентинг промотора гена O⁶-метилгуанін-ДНК метилтрансферази шляхом його гіперметилування, а, отже, і відсутність його білкового продукту, пов’язаний з ефективнішою відповіддю організму на алкільувальну хіміотерапію, а також довшою виживаністю пацієнтів без рецидивів та погіршення стану [5–7]. Аналогічним чином впливають на ефект алкільувальних хіміотерапевтичних препаратів інгібтори MGMT [8], тому рівень експресії гена MGMT та активності його білкового продукту є важливим прогностичним маркером лікування онкозахворювань.

Одним із методів комплексного лікування онкозахворювань є паралельне проведення хіміо- та імунотерапії, в тому числі з використанням інтерферонів. Так, наприклад, інтерферон- β зменшує кількість MGMT в клітинах гліом та підвищує їхню чутливість до алкільувальної сполуки, темозоломіду [9]. Останнім часом з’являється все більше даних стосовно того, що інтерферони мають антіпроліфераційний та апоптичний ефект на так звані стовбурові ракові та пухлиноїніціюальні клітини [10–17]. Раніше нами було показано, що препарати різних виробників, які містять у своєму складі інший цитокін, рекомбінантний інтерферон $\alpha 2\beta$, синтезований в бактеріях, по-різному впливають на експресію гена MGMT в клітинах людини [18]. Оскільки останнім часом описано продукти рекомбінантного інтерферона $\alpha 2\beta$, синтезовані в рослинах [19, 20], метою даної роботи було визначення впливу рекомбінантного інтерферону $\alpha 2\beta$, отриманого з рослин австралійського тютюну *Nicotiana*

© З.М. НІДОЄВА, А.А. ПЕТЕРСОН, Т.П. РУБАН,
Г.В. ДЗЮБА, М.В. КУЧУК, Л.Л. ЛУКАШ, 2019

benthamiana, на експресію репаративного ензиму MGMT в клітинах людини пухлинного та непухлинного походження.

Матеріали і методи. Культури клітин людини пухлинного та непухлинного походження. У роботі використовували клітинну лінію Нер-2 з Російської колекції клітинних культур хребетних (Інститут цитології РАН, Санкт-Петербург) та клітини лінії E8, отриманої у відділі генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України з ембріональних гермінативних клітин людини. Клітини культивували у стандартному ростовому середовищі DMEM (DMEM у порошку (1×) з високим вмістом глюкози (4,5 г/Л) та з L-глутаміном, «PPA») з додаванням 10%-ної інактивованої ембріональної сироватки великої рогатої худоби (FBS, «Biowest», США) та антибіотиків: стрептоміцину (200 мкг/мл) та бензилпеніциліну (200 Од/мл).

Отримання рекомбінантного інтерферону людини $\alpha2\beta$. В експерименті для обробки культур клітин людини використано очищений інтерферон $\alpha2\beta$, отриманий шляхом транзієнтної експресії з рослин австралійського тютюну *Nicotiana benthamiana*. Для експресії інтерферону $\alpha2\beta$ використовували бінарний вектор, що містить 35S промотор вірусу мозаїки цвітної капусти, кодуючу послідовність, яка складається з сигнального пептиду кальретикуліну, зрілого інтерферону людини $\alpha2\beta$ та 6His-tag за загальноприйнятими методиками отримання рекомбінантного інтерферону $\alpha2\beta$ людини, синтезованого в рослинах [19], з деякими модифікаціями.

Рослини *N. benthamiana* вирощували з насіння протягом 5–6 тижнів в торф'яному субстраті уумовах кліматичної камери з використанням світлодіодного освітлення (питомий світловий потік становив 220 ± 30 мкМ фотонів $m^{-2} s^{-1}$ при 12 год світловому періоді) при температурі 26 ± 1 °C та відносній вологості 80 ± 10 %. Після інфільтрації рослини інкубували в кліматичній камері при температурі 22 ± 1 °C та відносній вологості 90 ± 10 % за умов слабкого освітлення (20 ± 10 мкМ фотонів $m^{-2} s^{-1}$) впродовж 16–18 год. Потім для досягнення максимального рівня накопичення цільового білку інфільтровані рослини інкубували при температурі 26 ± 1 °C та відносній вологості 60 ± 20 % при освітленні світлоді-

одними джерелами світла (150 ± 30 мкМ фотонів $m^{-2} s^{-1}$, 16 год на добу).

Агробактерії вирощували в культиваційній ємності об'ємом 4 л, яка містила 1 л живильного средовища АВ, при температурі 28 ± 1 °C при активному перемешуванні протягом 70 ± 2 год, як описано в [19]. Культури агробактерій, що несуть плазміди з генами, які кодують цільовий або репортерний білки, змішували з культурою агробактерій, що несуть плазміду з геном, яка кодує супресор сайленсинга, в співвідношенні 1 : 1 перед інфільтрацією рослин.

Вакуумну інфільтрацію рослин сусpenзією агробактерій проводили згідно [19]. Рослини контрольної групи (6–8 рослин) інфільтрували сумішшю агробактерій, що несе ген репортерного білка та ген супресора сайленсингу. Надземну частину рослин основної групи (35–45 рослин, з розрахунку отримати 100–150 г біомаси) повністю занурювали в стакани із сумішшю агробактерій, що несе ген інтерферону $\alpha2\beta$ та ген супресора сайленсингу.

На четверту добу після інфільтрації у контрольній групі рослин візуально аналізували ступінь зачленення листя рослин у процес транзієнтної експресії. Визначали усереднений діапазон ярусів листя, в якому спостерігалося найбільш повне зачленення у цей процес. Відповідно здійснювали збір листя з рослин основної групи. З листя видаляли центральну жилку, зважували та переносили на лід.

Готовали екстракційний буферний розчин наступного складу: Tris-HCl – 0,2M, pH 8. Розчин додавали до рослинного матеріалу у співвідношенні 5 : 1 та переносили у стакан для помолу від лабораторного блендера («Waring», США), та вносили в нього спиртовий концентрат ПМСФ до кінцевої концентрації 0,5 мМ. Подрібнювання проводили протягом 1 хв за швидкості 22000 об/хв. Гомогенат освітлювали центрифугуванням за 8000 об/хв впродовж 20 хв. Супернатант фільтрували через префільтр («Millipore»). В профільтрований екстракт додавали порцію ПМСФ до кінцевої концентрації 0,5 мМ та переносили в пробірки об'ємом 50 мл.

Хроматографічне очищення рекомбінантного інтерферону з екстракту рослинних білків здійснювали шляхом Ni^{2+} -хелатної хроматографії із використанням твердої фази Ni-NTA

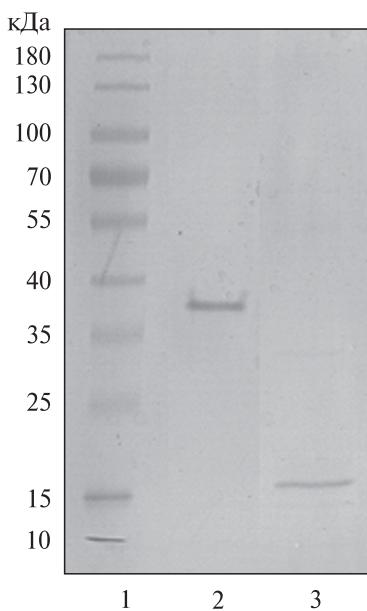


Рис. 1. Електрофореграма хроматографічно очищеного рекомбінантного білку-аналогу інтерферону людини $\alpha 2\beta$ в ДДС-ПААГ гелі: 1 – маркер молекулярної маси; 2 – препарат очищеного рекомбінантного білку GFP, навантаження 3 мкг (наведено для порівняння); 3 – препарат очищеного рекомбінантного інтерферону людини $\alpha 2\beta$

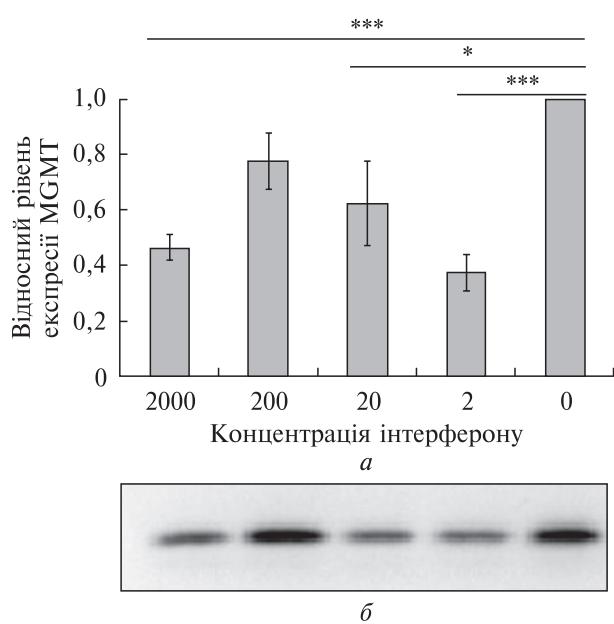


Рис. 2. а – вплив інтерферону $\alpha 2\beta$ на рівень білка MGMT в клітинах Hep-2, *** – $p < 0,0005$, * – $p < 0,05$; б – типова візуалізація хемілюмінесцентного сигналу Вестерн-блотингу

Agarose («Qiagen»). Процес здійснювали згідно до протоколу виробника для методу очищення білків у об'ємі за нативних умов. Препарат очищеного інтерферону мав специфічну біологічну активність 2 млн МО/мл. Тестування препарату рекомбінантного інтерферону, синтезованого в трансгенних рослинах, було проведено фахівцями компанії («Інтерфармбіотек», Київ) у порівнянні з рекомбінантним інтерфероном $\alpha 2\beta$, який синтезується в клітинах бактерій і служить субстратом препарату «Лаферон» («Інтерфармбіотек», Київ), за що автори висловлюють щиру подяку.

Клітини висівали у чашки Петрі діаметром 9 см ($1,8 \times 10^6$ клітин/чашка) та інкубували 24 год у стандартному ростовому середовищі DMEM із 10 % FBS при 37°C та 5 % CO_2 . Потім змінювали середовище на DMEM із інтерфероном у відповідній концентрації, але без сироватки, та інкубували протягом 8 год. Після обробки безсироваткове середовище змінювали на повноцінне ростове (DMEM із додаванням 10 % FBS) і додатково культивували клітини у стандартних умовах. Час постінкубації становив 24 год. Клітини знімали механічним методом без використання протеолітичних ензимів; осад клітин зберігали при -20°C для подальшого видлення білка.

Видлення білків проводили в неденатурувальних умовах за стандартними методиками [21]. Для аналізу експресії білка MGMT лізати клітин розділяли за допомогою вертикального електрофорезу у 12%-ному поліакриламідному гелі з використанням камери FisherBiotech FB-VE10-1 і джерела струму OmniPAC MIDI («Cleaver Scientific», Британія). Розділені білки переносили на полівінілдіфлюоридну мембрانу («Millipore», США) шляхом напівсухого переносу на приладі Semi Dry Blotter фірми («CleaverScientific», Британія) згідно протоколу виробника. Вестерн-блот аналіз проводили, використовуючи моноклональні антитіла проти MGMT в розведенні 1/1000 (MGMT Antibody MT 23.2, «Novus Biologicals», США). Хемілюмінесцентний сигнал отримували за допомогою приладу ChemiDoc™ Imaging Systems («Bio-Rad») та аналізували його інтенсивність, використовуючи відповідне програмне забезпечення. Отримані сигнали від смужок нормалізували відносно тотальної кількості нане-

сеного білка у кожній доріжці. Інтенсивність смужок в кожній доріжці на мембрани, пофарбованій Coomassie 350 G, аналізували з використанням програми Origin 9.1. Статистична обробка результатів виконана з використанням t-test, всі результати представлені як середнє значення \pm стандартне відхилення, значення $p < 0,05$ визначено як статистично достовірне.

Результати дослідження та їх обговорення. Вихід очищеного рекомбінантного білку складав $0,1 \pm 0,02$ мг на 100 г сирої ваги рослинного матеріалу, чистота $>95\%$ (за результатами денситометрії ДДС-ПААГ електрофореграм). Електрофорограма продукту представлена на рис. 1.

Усереднені дані трьох повторів експериментів з дослідження впливу синтезованого в рослинах інтерферону $\alpha 2\beta$ на експресію O^6 -метилгуанін-ДНК метилтрансферази в клітинах лінії Нер-2 (карцинома гортані) за допомогою Вестерн-блот аналізу представлено на рис. 2. Статистично достовірний ефект зниження кількості досліджуваного білку в пухлинних клітинах виявлено при усіх дослідженнях концентраціях інтерферону (2, 20, 200, 2000 МО/мл) відносно контролю. Слід відзначити, що спостерігалась тенденція до зворотної залежності ефекту інгібування експресії MGMT від концентрації інтерферону в певному діапазоні доз (2, 20 та 200 МО/мл). Тож найвищий ефект інгібування виявлено при найменшій із досліджуваних концентрацій інтерферону – 2 МО/мл. Слід відзначити, що така залежність часто спостерігається й при дії інших біологічно активних речовин [18].

Характер впливу рекомбінантного інтерферону $\alpha 2\beta$ на рівень експресії репаративного ензиму MGMT в клітинах лінії E8 непухлинного походження дещо різнився порівняно з його дією на пухлинні клітини Нер-2 (усереднені дані двох повторів експерименту представлено на рис. 3). Так, тенденція до зниження кількості білка MGMT в клітинах E8 була виражена значно слабкіше і спостерігалась лише при двох найбільших із досліджених концентрацій інтерферону 200 та 2000 МО/мл (за концентрації 200 МО/мл ефект був статистично значимий).

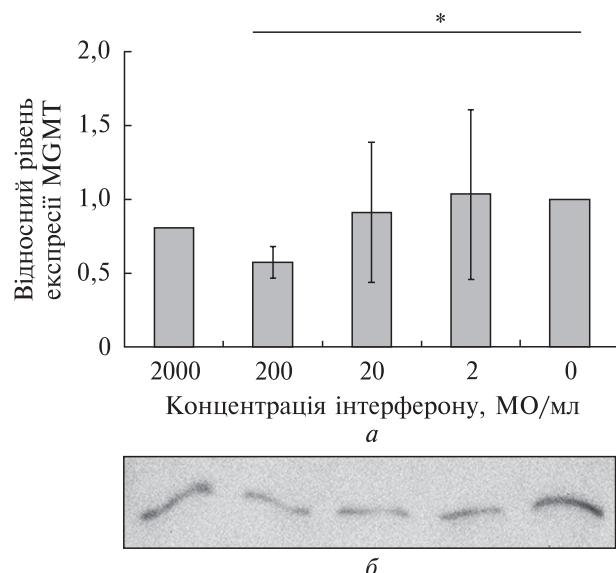


Рис. 3. а – вплив інтерферону $\alpha 2\beta$ на рівень білка MGMT в клітинах E8, * – $p < 0,05$; б – типова візуалізація хемілюмінесцентного сигналу Вестерн-блотингу мембрани

Таким чином, вперше нами виявлено інгібувальний ефект рекомбінантного інтерферону $\alpha 2\beta$, синтезованого в рослинах *N. benthamiana*, на експресію репаративного ензиму MGMT в клітинах людини. Встановлено, що цей інгібувальний ефект був виразнішим у пухлинних клітинах порівняно з клітинами непухлинного походження.

У зв’язку з цим постало питання, яким чином може інгібувати експресію гена MGMT рекомбінантний інтерферон $\alpha 2\beta$ і чому різниеться ефект в клітинах різних ліній? На сьогодні в промоторі гена MGMT людини серед відомих сайтів зв’язування транскрипційних факторів, а також потенційних, передбачених нами біоінформатично [22], елементів відгуку на інтерферон, не виявлено. Однак можна припустити, що інтерферон $\alpha 2\beta$ діє на експресію цього гена опосередковано, і можна виокремити декілька сигнально-регуляторних шляхів його впливу. Відома ціла низка регуляторів експресії гена MGMT, серед яких є як ендогенні, так і екзогенні фактори. На нашу думку, серед індукторів транскрипції слід, в першу чергу, вказати фактори NF-кВ [23], Sp1 [24] та СЕВР [25].

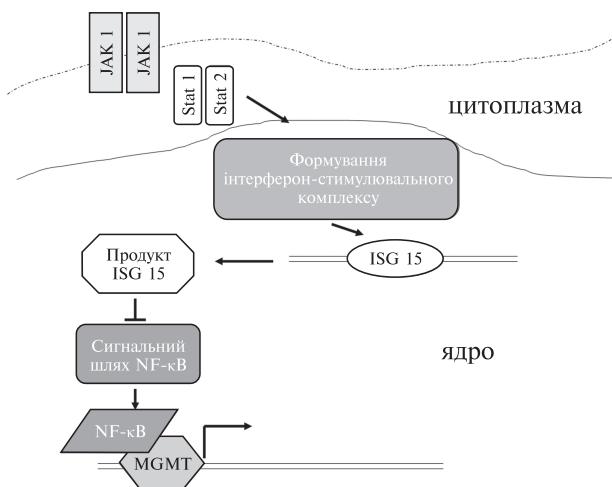


Рис. 4. Схема можливого молекулярного каскаду інгібування експресії гена *MGMT* інтерфероном а2б із зачлененням NF-кВ

Відомо, що загалом інтерферони можуть регулювати експресію більш, ніж 300 генів. Основною функцією інтерферонів є проти-вірусний захист організму, тому продукти більшості з цих генів спрямовані на боротьбу проти вірусів та імуномодуляцію в цілому. Проте інтерферони активують велику кількість генів, які регулюють транскрипцію, трансляцію, сплайсинг РНК, фолдинг білків, міжклітинний сигналінг, апоптоз, онкогенез та багато інших процесів [26]. Тож, в загальному вигляді регуляція, найімовірніше, відбувається за наступним молекулярним каскадом: інтерферон активує претейнінази JAK1 і JAK2, що фосфорилують білки STAT1 та STAT2, в результаті цього останні димеризуються та переносяться в ядро, де формують інтерферон-стимулувальний комплекс, який індукує експресію ряду інтерферон-залежних генів. Зокрема, продукт як мінімум одного з цих генів ISG15 (Interferon-stimulated gene) негативно регулює сигнальний шлях NF-кВ, однією з функцій якого є активація експресії гена *MGMT* (рис. 4).

Оскільки NF-кВ здатен активувати експресію *MGMT*, інгібування NF-кВ інтерфероном призводить до зниження кількості досліджуваного репаративного ензиму, і в результаті – до підвищення чутливості пухлинних клітин до алкілувальних сполук [27]. Зважаючи

на той факт, що *MGMT* є унікальним репаративним ензимом, який здійснює пряму репарацію найшкідливіших O⁶-алкілгуанінових аддуктів, NF-кВ, напевно, відіграє важливу роль в регуляції *MGMT*. В такому випадку саме інгібування NF-кВ під впливом інтерферону а2б призводить до «випадіння» цього фактора з ланцюга регуляції експресії гена *MGMT* та пов’язане з цим зниження кількості відповідного білку, що ми і спостерігали в наших експериментах. Можливо, цей регуляторний шлях менш активний в клітинах людини непухлинного походження.

Очевидно, існують також інші механізми впливу зовнішніх факторів на експресію гена *MGMT*. Як відзначено вище, раніше нами було показано, що препарати різного виробництва, які містили рекомбінантний інтерферон а2б, синтезований в різних системах, по-різному впливали на експресію гена *MGMT* в клітинах людини. Ці факти вказують на те, що ефект може залежати як від структурно-функціональних особливостей самого рекомбінантного інтерферону, так і від композиційного складу препаратів на його основі, але це питання потребує подальших досліджень.

Висновки. Таким чином, показано, що рекомбінантний інтерферон а2б, синтезований в рослинах *N. benthamiana*, спричиняв статистично достовірне зниження кількості репаративного ензиму *MGMT* у клітинах лінії Нер-2 (карцинома гортані) при усіх дослідженіх концентраціях (2–2000 МО/мл). При цьому спостерігалась тенденція до зворотної залежності ефекту інгібування експресії *MGMT* від концентрації рекомбінантного інтерферону. В клітинах лінії Е8 непухлинного походження виявлено тенденцію до зниження кількості білка *MGMT* при використанні двох найбільших концентраціях інтерферону а2б, хоча статистично достовірний ефект порівняно з контролем спостерігався лише за концентрації 200 МО/мл. Також нами виявлено, що інгібувальний ефект інтерферону а2б значно виразніший в пухлинних клітинах людини порівняно з клітинами непухлинного походження, що може бути пов’язано з різним рівнем активності певних регуляторних шляхів. Відповідно, нами висловлено припущення стосовно одного із можливих механізмів

■ Вплив синтезованого в рослинах рекомбінантного інтерферону $\alpha 2\beta$ на експресію O^6 -метилгуанін-ДНК ■

цього впливу: інгібування позитивного регулятора транс每个人的 NF-кВ інтерфероном $\alpha 2\beta$ призводить до його «випадіння» з ланцюга регуляції експресії гена *MGMT*, а це, в свою чергу – до зниження кількості відповідного репаративного білку.

Дотримання етичних стандартів. Усі процедури, виконані в дослідженні з використанням класичних культур клітин людини, відповідають етичним стандартам Національного Комітету з дослідницької етики та Гельсінської декларації 1964 року і її подальших змін або відповідним нормам етики. Довідка регіонального комітету Інституту молекулярної біології та генетичної інженерії НАН України від 27 серпня 2019 р.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Робота виконувалась у рамках проектів «Розробка підходів до оптимізації супроводжувальної терапії при лікуванні онкозахворювань алкіловальними препаратами» наукової програми НАН України «Молекулярно-генетичні і біохімічні механізми регуляції клітинних та системних взаємодій за фізіологічних та патологічних станів», номер держреєстрації 0117U002123 та «Розробка біотехнологій накопичення рекомбінантних мікроРНК та білків в рослинах для потреб медицини» наукової програми НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології», номер держреєстрації 0115U002920

Автори висловлюють щиру подяку директору фірми «Інтерфармбіотек» доктору біологічних наук Черних С.В. за проведення тестування специфічної біологічної активності рекомбінантного інтерферону $\alpha 2\beta$, синтезованого в рослинах *N. benthamiana*.

THE INFLUENCE OF RECOMBINANT INTERFERON $\alpha 2\beta$ SYNTHESIZED IN PLANTS ON THE REPARATIVE ENZYME MGMT EXPRESSION IN HUMAN SOMATIC CELLS *IN VITRO*

Z.M. Nidoieva, A.A. Peterson, T.P. Ruban,
Dzuba G.V., M.V. Kuchuk, L.L. Lukash

Institute of Molecular Biology and Genetics National Academy of Sciences of Ukraine, 150, Zabolotnogo Str., 03143, Kyiv, Ukraine

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, 148

Academika Zabolotnoho St., 03143, Kyiv, Ukraine
ESC Institute of Biology and Medicine of Taras Shevchenko Kyiv National University, 2 Hlushkova Avenue, 03127, Kyiv, Ukraine
E-mail: zarinanidoeva@i.ua, lukash@imbg.org.ua, nkuchuk@icbge.org.ua

The influence of recombinant interferon $\alpha 2\beta$ synthesized in transgenic plants on the expression of human repair protein O^6 -methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in both tumour and non-tumour originated cells was investigated. Human tumour Hep-2 cells (epidermoid carcinoma of the larynx) and non-tumour human E8 cells (originated in our laboratory from embryonic germ cells) were treated with purified recombinant interferon $\alpha 2\beta$ in serum-free medium. Protein levels were determined by Western-blot method. Recombinant interferon $\alpha 2\beta$ caused decrease in MGMT protein amount in tumour Hep-2 cells at all treated concentrations (2, 20, 200, 2000 IU/ml) relatively to the control level. In human non-tumour cells E8 we revealed a decrease in MGMT amount at two of the highest concentrations: 200 and 2000 IU/ml, although a statistically significant effect compared to the control level was observed only at a concentration of 200 IU/ml.

ВЛИЯНИЕ СИНТЕЗИРОВАННОГО В РАСТЕНИЯХ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА $\alpha 2\beta$ НА ЭКСПРЕССИЮ РЕПАРАТИВНОГО БЕЛКА МГМТ В СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Z.M. Нидоева, А.А. Петерсон, Т.П. Рубан,
Г.В. Дзуба, М.В. Кучук, Л.Л. Лукаш

Целью работы было исследование влияния синтезированного в растениях рекомбинантного интерферона $\alpha 2\beta$ на экспрессию репаративного энзима MGMT (O^6 -methylguanine-DNA methyltransferase) в клетках опухолевого и неопухолевого происхождения. Опухолевые клетки линии Нер-2 (рак горла) и клетки человека линии Е8, полученные нами из эмбриональных герминативных клеток, были обработаны очищенным рекомбинантным интерфероном $\alpha 2\beta$ в безсывороточной среде; определение изменений количества белка MGMT с помощью Вестерн-блот анализа. Показано, что рекомбинантный интерферон $\alpha 2\beta$ вызывал уменьшение количества белка MGMT в опухолевых клетках Нер-2 при всех исследуемых концентрациях (2, 20, 200, 2000 МЕ/мл) относительно адекватного контроля. В клетках человека неопухолевого происхождения линии Е8 снижение количества MGMT обнаружено при двух самых высоких концентрации-

ях 200 и 2000 МЕ/мл, хотя статистически достоверный эффект по сравнению с уровнем контроля наблюдался только при концентрации 200 МЕ/мл.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Verbeek, B., Southgate, T.D., Gilham, D.E., and Margison, G.P., O6-Methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy, *Br. Med. Bull.*, 2008, no. 85, pp. 17–33. doi: 10.1093/bmb/ldm036.
2. Salam, T., Premila, Devi S., and Duncan Lyngdoh, R.H., Molecular criteria for mutagenesis by DNA methylation: Some computational elucidations, *Mutat. Res.*, 2018, no. 807, pp. 10–20. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2017.10.004.
3. Paredes, J.A., Ezerskyte, M., Bottai, M., and Dreij, K., Transcriptional mutagenesis reduces splicing fidelity in mammalian cells, *Nucl. Acids Res.*, 2017, vol. 45, no. 11, pp. 6520–9, doi: 10.1093/nar/gkx339.
4. Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallström, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, E., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani S., Szligyarto, C.A., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J.O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P.H., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J.M., Hamsten, M., von Feilitzen, K., Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., von Heijne, G., Nielsen J., and Pontén F. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome, *Science*, 2015, vol. 347, no. 6220, pp.1260419. doi: 10.1126/science.1260419.
5. Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn ,U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., and Mirimanoff, R.O., Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma, *N. Engl. J. Med.*, 2005, no 352, pp. 987–96. doi: 10.1056/NEJMoa043330.
6. Gerson, S.L., Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer, *J. Clin. Oncol.*, 2002, vol. 20, pp. 2388–99. doi: 10.1200/JCO.2002.06.110.
7. Esteller, M., Herman, J.G., Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer, *Oncogene*, 2004, vol. 23, no. 1, pp. 1–8. doi: 10.1038/sj.onc.1207316.
8. 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, pp. 618–39. doi: 10.1021/tx200031q.
9. Shen, D., Guo, C.C., Wang, J., Qiu, Z.K., Sai, K., Yang, Q.Y., Chen, Y.S., Chen, F.R., Wang, J., Panasci, L., and Chen, Z.P., Interferon- α/β enhances temozolamide activity against MGMT-positive glioma stem-like cells, *Oncol. Rep.*, 2015, vol. 34, pp. 2715–21. doi: 10.3892/or.2015.4232.
10. Wang, B.X., Rahbar, R., and Fish, E.N., Interferon: current status and future prospects in cancer therapy, *J. Interfer. Cytok. Res.*, 2011, vol. 31, no. 7, pp. 545–52. doi: 10.1089/jir.2010.0158.
11. Parker, B.S., Rautela, J., and Hertzog, P.J., Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer*, 2016, vol. 16, no. 3, pp. 131–44. doi: 10.1038/nrc.2016.14.
12. Dunn, G.P., Koebel, C.M., and Schreiber, R.D., Interferons, Immunity And Cancer Immunoediting, *Nat. Rev. Immunol.*, 2006, vol. 6, no. 11, pp. 836–48. doi: 10.1038/nri1961.
13. Piconese, S., Pacella, I., Timperi, E., and Barnaba, V., Divergent effects of type-I interferons on regulatory T cells, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2015, vol. 26, no. 2, pp. 133–41. doi: 10.1016/j.cytoogr.2014.10.012.
14. Medrano, R.F.V., Hunger, A., Mendonza, S.A., Barbuto, J.A.M., and Strauss, B.E., Immunomodulatory and antitumor effects of type I interferons and their application in cancer therapy, *Oncotarget.*, 2017, vol. 8, no. 41, pp. 71249–84. doi: 10.18632/oncotarget.19531.
15. Ma, H., Jin, S., Yang, W., Tian, Z., Liu, S., Wang, Y., Zhou, G., Zhao, M., Gvetadze, S., Zhang, Z., and Hu, J., Interferon- α Promotes the Expression of Cancer Stem Cell Markers in Oral Squamous Cell Carcinoma, *J. Cancer*, 2017, vol. 8, no. 12, pp. 2384–93. doi: 10.7150/jca.19486.
16. Vasquez, M., Fioravanti, J., Aranda, F., Paredes, V., Gomar, C., Ardaiz, N., Fernandez-Ruiz, V., Méndez, M., Nistal-Villan, E., Larrea, E., Gao, Q., Gonzalez-Aseguinolaza, G., Prieto, J., and Berraondo, P., Interferon alpha bioactivity critically depends on Scavenger receptor class B type I function, *Oncoimmunology*, 2016, vol. 5, no. 8, pp. e1196309. doi: 10.1080/2162402X.2016.1196309.
17. Yu, Y., Huang, R., Zong, X., He, X., and Mo, W., INF α -2b inhibitory effects on CD4(+)CD25(+) FOXP3(+) regulatory T cells in the tumor microenvironment of C57BL/6 J mice with melanoma xenografts, *BMC Cancer*, 2016, vol. 16, pp. 397. doi: 10.1186/s12885-016-2473-0.
18. Kotsarenko, K., Lylo, V., Ruban, T., Macewicz, L., Lukash, L., Effects of Some Growth Factors and Cytokines on the Expression of the Repair Enzyme MGMT and Protein MARP in Human Cells In Vitro : Effect of Some Growth Factors and

- Cytokines, *Biochem. Genet.*, 2018, vol. 56, no. 5, pp. 459–77. doi: 10.1007/s10528-018-9854-9.
19. Sindarovska, Y.R., Gerasimenko, Y.V., Olevinskaya, Z.M., Spivak, N.Y., and Kuchuk, N.V., Production of human interferon alpha 2b in plants of *Nicotiana excelsior* by *Agrobacterium* – mediated transient expression, *Cytol. Genet.*, 2010, vol. 44, no. 5, pp. 313–6. doi: 10.3103/S0095452710050099.
20. Budzianowski, J., Tobacco – a producer of recombinant interferons, *Przegl. Lek.*, 2014, vol. 71, no. 11, pp. 639–43.
21. Green, S.J., Michael, R., Molecular cloning. NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
22. Nidoieva, Z.M., Samoilenco, I.O., Pidpala, O.V., Lukash, L.L., and Iatsyshyna, A.P., Bioinformatic search of hormone response elements within the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene promoter, *Factors in Exp. Evol. Organ.*, 2015, vol. 17, pp. 74–8. (in Ukr.)
23. Lavon, I., Fuchs, D., Zrihan, D., Efroni, G., Zeilikovitch, B., Fellig, Y., and Siegal, T., Novel mechanism whereby nuclear factor kappaB mediates DNA damage repair through regulation of O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase, *Cancer Res.*, 2007, vol. 67, no. 18, pp. 8952–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3820.
24. Costello, J.F., Futscher, B.W., Kroes, R.A., and Pieper, R.O., Methylation-related chromatin structure is associated with exclusion of transcription factors from and suppressed expression of the O-6-methylguanine DNA methyltransferase gene in human glioma cell, *Mol. Cell Biol.*, 1994, vol. 14, no. 10, pp. 6515–21.
25. Bhakat, K.K., Mitra, S., Regulation of the human O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase gene by transcriptional coactivators cAMP response element-binding protein-binding protein and p300, *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 3, no. 275, pp. 34197–204. doi: 10.1074/jbc.M005447200.
26. de Veer, M.J., Holko, M., Frevel, M., Walker, E., Der, S., Paranjape, J.M., Silverman, R.H., and Williams, B.R., Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays, *J. Leukoc. Biol.*, 2001, vol. 69, no. 6, pp. 912–20.
27. Weaver, K.D., Yeyeodu, S., Cusack, J.C.Jr., Baldwin, A.S.Jr., and Ewend, M.G., Potentiation of chemotherapeutic agents following antagonism of nuclear factor κB in human gliomas, *J. Neurooncol.*, 2003, vol. 61, pp. 187–96.

Надійшла в редакцію 11.09.18

Після доопрацювання 11.02.19

Прийнята до друку 18.11.19