

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

НІДОЄВА ЗАРІНА МАНЗАРШІВНА



УДК 577.218

577.113

**РЕГУЛЯЦІЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА *MGMT* ЛЮДИНИ БІОЛОГІЧНО
АКТИВНИМИ РЕЧОВИНАМИ КОМПЛЕКСНОЇ ТЕРАПІЇ ОНКОХВОРИХ**

03.00.22 – молекулярна генетика

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ).

Науковий керівник: кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник
Яцишина Анна Петрівна
Інституту молекулярної біології і генетики
НАН України, відділ генетики людини

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Сиволоб Андрій Володимирович,
Київський національний університет
імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут
біології та медицини»,
професор кафедри загальної та
медичної генетики;

кандидат біологічних наук, доцент
Ніжерадзе Костянтин Олексійович
Національний медичний університет
ім. О.О. Богомольця,
доцент кафедри біоорганічної та
біологічної хімії.

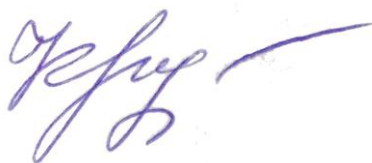
Захист відбудеться “___” квітня 2021 року о 10³⁰ на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: вул. Заболотного, 150, м. Київ, 03143.

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: вул. Заболотного, 150, 03143, м. Київ.

Автореферат розіслано “17” березня 2021 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,

к.б.н., с.н.с.



І.В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. На сьогодні рівень смертності людей від онкологічних захворювань займає друге місце після серцево-судинних хвороб. Пухлинні клітини, які експресують репаративний фермент Об-метилгуанін-ДНК метилтрансферазу (MGMT; EC 2.1.1.63), є стійкими до алкілувальних сполук хіміотерапії. Цей фермент видаляє мутагенні алкільні групи з Оксигену в шостому положенні гуаніну. У нормі ця функція MGMT є надзвичайно важливою, оскільки алкілування ДНК клітини відбувається постійно, за багатьма атомами, під впливом зовнішніх та внутрішніх факторів (Kaina B *et al.*, 2007), а алкілування Об-гуаніну є одним із найбільш мутагенних та цитотоксичних для клітин й призводить до G-A транзицій та до формування поперечних зшивок у ДНК (Tubbs JL *et al.*, 2007). MGMT забезпечує захист організму від негативної дії цього ушкодження, однак експресуючись у клітинах пухлин, даний фермент обмежує ефективність алкілувальної хіміотерапії, що спрямована на їхнє знищення. Саме в цьому полягає важливість вивчення факторів, що впливають на рівень експресії MGMT та на активність даного ферменту в клітині.

З літературних джерел відомо, що експресія MGMT значно варіює, проте молекулярні механізми такої варіації точно не встановлені. На сьогодні відомо лише про позитивну регуляцію транскрипції гена MGMT синтетичним глюкокортикоїдом дексаметазоном (Grombacher T *et al.*, 1996), який використовується для зняття запалень та набряків. Тому одночасне використання глюкокортикоїдів і алкілувальної хіміотерапії значно знижує ефективність останньої. Крім того, є суперечливі дані щодо впливу інтерферонів на експресію MGMT (Natsume A *et al.*, 2005, Kotsarenko KV *et al.*, 2014.). Вплив інших гормонів та біологічно активних речовин, що використовуються при терапії низки онкозахворювань, на рівень експресії даного гена не відомий.

Для підвищення ефективності хіміотерапії алкілувальними сполуками необхідно використовувати й інші підходи, спрямовані на модуляцію експресії гена та/або активності ензиму MGMT. Серед таких сучасних підходів – виснаження MGMT шляхом дозонасичених схем хіміотерапії, комбінації алкілувальних сполук та використання інгібіторів MGMT. Досить перспективним є підхід із використанням інгібіторів MGMT (Pegg AE *et al.*, 1995, Lukash LL *et al.*, 1991, 2003), що дає можливість зменшити дозу хіміопрепарата та підвищити ефективність лікування онкохворих.

На сьогодні основним підходом до розробки нових інгібіторів MGMT досі залишається здебільшого синтез аналогів Об-бензилгуаніна (Об-БГ) та Об(4-бромотієніл)гуаніну, проте ці інгібітори є високотоксичними (Dolan ME *et al.*, 1991, Pegg AE *et al.*, 1995) щодо клітин кісткового мозку та інших нормальних клітин, які швидко діляться, а систематичне використання цих неселективних інгібіторів MGMT в комбінації з алкілувальними сполуками спричиняє мієлосупресію і виникнення вторинних пухлин. Таким чином, необхідний пошук і розробка нових ненуклеозидних нетоксичних інгібіторів MGMT.

Таким чином, пошук нових можливостей регуляції експресії гена MGMT та/або активності відповідного ензиму є досить актуальним завданням, оскільки має як фундаментальне значення, наприклад, у виявленні механізмів, що регулюють процеси

стабілізації геному, так і практичне – зокрема, отримані дані важливі при плануванні комплексного лікування пацієнтів з пухлинами.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і виконувалась в рамках проектів: “Особливості експресії гена репаративного ензиму Об-алкілгуанін-ДНК алкілтрансферази в умовно нормальних та пухлинних клітинах” (№ держреєстрації 0108U008526, 2009-2013 рр.), “Регуляція експресії гена репаративного ензиму MGMT під впливом деяких біологічно активних речовин (гормонів, цитокінів, лектинів та ін.) у клітинах ссавців” (№ держреєстрації 0115U000355, 2014-2018 рр.) та “Вплив нових інгібіторів репаративного ензиму MGMT на ефективність алкілувальної терапії пухлин в модельних системах” (№ держреєстрації 0119U100158, 2019-2023 рр.).

Мета і завдання досліджень. Метою дисертаційної роботи є дослідження впливу деяких біологічно активних речовин комплексної терапії онкохворих, зокрема стероїдних гормонів (β -естрадіолу та прогестерона) й інтерферона $\alpha 2\beta$, на експресію гена *MGMT* людини, а також визначення можливих посттрансляційних модифікацій білка MGMT та пошук його нових інгібіторів.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

1. Проаналізувати промоторну ділянку гена *MGMT* людини щодо наявності цис-регуляторних послідовностей, зокрема елементів відгуку на гормони та інші біологічно активні речовини.
2. Дослідити вплив β -естрадіолу на експресію гена *MGMT* людини на рівні мРНК методом ПЛР в реальному часі та на рівні білка методом вестерн-блотингу в культурах клітин з різним патерном експресії ядерних і мембранних рецепторів.
3. Вивчити вплив прогестерону на рівень транскрипції гена та на кількість білка *MGMT* людини в клітинах *in vitro* з різним патерном експресії ядерних і мембранних рецепторів.
4. Дослідити вплив інтерферону $\alpha 2\beta$ на кількість білка MGMT в культурах клітин.
5. Проаналізувати амінокислотну послідовність білка MGMT щодо наявності сайтів посттрансляційних модифікацій.
6. Протестувати здатність нових потенційних низькомолекулярних нуклеозидних інгібіторів зменшувати кількість білка MGMT в клітинах *in vitro*.

Об'єкт дослідження – регуляція експресії гена *MGMT* людини.

Предмет дослідження – ген *MGMT*, мРНК *MGMT* та білок MGMT людини.

Методи дослідження – культивування еукаріотичних клітин, полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі, електрофорез у поліакриламідному гелі, електрофорез продуктів ПЛР в агарозному гелі, вестерн-блот аналіз, біоінформатичний аналіз, МТТ-тест та ін.

Наукова новизна одержаних результатів. За допомогою біоінформатичного аналізу та метааналізу даних вперше виявлено низку цис-регуляторних сайтів у промоторній ділянці гена *MGMT* людини, сайтів посттрансляційних модифікацій даного білка та білків-партнерів. Вперше виявлено

нові потенційні елементи відгуку на стероїдні гормони (прогестерон, естрогени і глюкокортикоїди), а також елементи відгуку на інші транскрипційні фактори (тиреоїдні гормони, ретиноевий орфановий рецептор, вітамін D, ретиноева кислота, ретиноїд X та рецептор активації проліферації пероксисом). Продемонстровано, що β -естрадіол активує експресію *MGMT* як на рівні мРНК, так і на рівні білка у всіх досліджуваних клітинних лініях 293, 293T і MCF7, які експресують мембранний рецептор естрогенів та відрізняються патерном експресії ядерних рецепторів. Вперше показано позитивну регуляцію експресії гена *MGMT* прогестероном як у клітинах MCF7 та HEp-2, що експресують ядерний рецептор, так і у клітинах 293, які його не експресують. Припущено можливу роль неklasичної регуляції експресії *MGMT* стероїдними гормонами та залучення мембранних рецепторів прогестерона й естрогенів до молекулярних механізмів такої регуляції. Вперше показано інгібувальний ефект високоочищеного рекомбінантного інтерферону $\alpha 2\beta$, синтезованого в рослинах, на кількість білка *MGMT* в клітинах *in vitro*. Виявлено, що цей ефект значно виразніший в пухлинних клітинах людини порівняно з клітинами непухлинного походження. Висловлено припущення щодо молекулярного механізму цього впливу, зокрема інгібування інтерфероном $\alpha 2\beta$ позитивного регулятора транскрипції гена *MGMT* - NF- κ B. Вперше досліджено вплив низки потенційних нуклеозидних інгібіторів білка *MGMT* людини на його кількість в пухлинних та умовно нормальних клітинах *in vitro* та виявлено декілька перспективних сполук.

Таким чином, у дисертаційній роботі досліджено молекулярно-генетичні особливості модуляції експресії гена *MGMT* людини на рівнях мРНК та білка та впливу біологічно активних речовин комплексної терапії онкохворих на кількість його білкового продукту. Отримані результати поглиблюють знання про регуляцію *MGMT* та її механізми й можуть бути використані при плануванні комплексного лікування пухлин у пацієнтів.

Практичне значення одержаних результатів. Ідентифікація нових цис-регуляторних сайтів у промоторі гена *MGMT* людини дозволить розширити наші знання про залучення гормонів різної природи до регуляції експресії даного гена при комплексній терапії онкохворих із залученням гормонотерапії. Дослідження інтерферон-залежної регуляції *MGMT* в клітиннах пухлинного та непухлинного походження також дозволить зрозуміти вплив препаратів інтерферону на подальший терапевтичний ефект комплексного лікування онкохворих. Подальше дослідження передбачених біоінформатично сайтів посттрансляційних модифікацій білка *MGMT* та його білків-партнерів може виявити нові молекулярні механізми регуляції активності даного білка, його нові неканонічні функції. Виявлені потенційні інгібітори білка *MGMT* у подальшому можуть бути хімічно оптимізовані для посилення терапевтичного ефекту, для таргетної доставки у пухлину тощо, й у перспективі можуть бути розроблені як лікарські препарати та використані для оптимізації алкілувальної хіміотерапії онкохворих.

Представлені у дисертаційній роботі результати поглиблюють розуміння молекулярно-генетичних особливостей модуляції експресії гена *MGMT* людини на рівнях транскрипції й трансляції та активності його білкового продукту. Матеріали

дисертації також можуть бути використані для підготовки спецкурсів з молекулярної біології для студентів біологічних і медичних факультетів.

Особистий внесок здобувача. Автор самостійно здійснила підбір та аналіз наукової літератури за темою дисертаційної роботи. Всі дослідження, обробка та аналіз результатів виконані за безпосередньої участі здобувача. Головна ідея та завдання дослідження були сформульовані спільно з науковим керівником – к.б.н. Яцишиною А.П. Автор самостійно проводила роботу з культурами клітинних ліній еукаріот MCF7, HEp-2, 293 та 293T, виділяла РНК та білок з клітин, аналізувала якість виділеної РНК, ставила експерименти РТ-кПЛР та проводила вестерн блот аналіз, обробку клітин рекомбінантним інтерфероном $\alpha 2\beta$ (синтезованого в рослинах *N. benthamiana*) проводили спільно з н.с. Т.П. Рубан та н.с. О.М. Сухорадою. Біоінформатичний аналіз проводили спільно з науковим керівником А.П. Яцишиною. Автор висловлює подяку д.б.н., професорці Л.Л. Лукаш за корисні поради під час планування експериментів та обговоренні отриманих результатів. Автор щиро вдячна науковій керівниці к.б.н., с.н.с. Яцишиній Анні Петрівні за допомогу в розробці стратегії досліджень, аналізі, узагальненні та представленні результатів експериментів у наукових публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації були апробовані на засіданнях відділу генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ. Результати досліджень були обговорені на міжнародних та вітчизняних наукових конференціях: XII Український Біохімічний Конгрес (Україна, м. Тернопіль, 2019), EMBO Young Scientists Forum 2015 (Warsaw, Poland, 2015), IX Annual Conference of Young Scientist of the Institute of Molecular Biology and Genetics NASU (Ukraine, Kyiv, 2015), Opening of the Academic Year 2014/2015 at Biocentrum Ochota (Warsaw, Poland, 2014), VIII Annual Conference of Young Scientist of the Institute of Molecular Biology and Genetics NASU (Ukraine, Kyiv, 2014), XIV Всеукраїнська науково-практична конференція «Молодь, освіта, наука, культура і національна самосвідомість в умовах європейської інтеграції» (Київ, Україна, 2011), II Всеукраїнська науково-практична конференція студентів та молодих вчених «Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих наук» (Запоріжжя, Україна, 2011), V Всеукраїнська науково-практична конференція «Теорія і практика сучасного природознавства» (Херсон, Україна, 2011).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 14 наукових праць, з них 5 статей у фахових журналах, 1 патент та 8 тез доповідей у збірках матеріалів вітчизняних і міжнародних наукових конференцій та з'їздів.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 145 найменувань. Дисертацію викладено на 150 сторінках стандартного машинопису, вона містить 28 рисунків, 7 таблиць та 4 додатки.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень

Клітинні лінії та культивування клітин. У роботі використовували

стандартні клітинні лінії HEP-2, 293, 293T, MCF7 та E8. Рутинне культивування клітин здійснювали в середовищі DMEM (High glucose 4,5 g/L with L-glutamine, «PPA») із додаванням 10 % інактивованої ембріональної сироватки великої рогатої худоби (FBS, «Biowest»), 200 ОД/мл бензилпеніциліну та 200 мкг/мл стрептоміцину (ПАО «Київмедпрепарат») при 37°C та у газовій фазі повітря із 5 % CO₂.

Обробка клітин гормонами. Клітини розсівали та через добу середовище змінювали та проводили обробку клітин гормоном (β -естрадіол #E2758; прогестерон #P8783 «Sigma-Aldrich», США) в DMEM без сироватки протягом 24 год. Клітини знімали механічним методом, без використання протеолітичних ензимів та зберігали при -20°C для подальшого виділення РНК та білка.

Обробка клітин інтерфероном $\alpha 2\beta$. Клітини розсівали та через 24 години обробляли інтерфероном в середовищі без сироватки протягом 8 год, після чого середовище змінювали на стандартне ростове DMEM з додаванням 10% сироватки. Час постінкубації – 24 годин. Клітини знімали механічним методом та зберігали при -20 °C для подальшого виділення білку.

Обробка клітин інгібіторами MGMT. Через 24 год після розсіву до клітин додавали інгібітори в концентрації 10 мкМ. Після 24 год обробки середовище змінювали на DMEM із сироваткою та інкубували ще 24 години. Клітини знімали механічним методом без використання протеолітичних ензимів та зберігали при -80°C для подальшого виділення білку.

Дослідження цитотоксичності сполук *in vitro*. Використовували стандартний МТТ-тест. Обробку клітин біологічно активними речовинами проводили в тих же концентраціях та протягом того ж часу, що і експерименти з вивчення дії гормонів, інтерферону $\alpha 2\beta$ та потенційних інгібіторів.

Виділення тотальної РНК із клітин та синтез кДНК. Тотальну РНК виділяли з клітин з використанням QIAzol Lysis Reagent («QIAGEN», Німеччина, #79306) та TriReagent («Sigma-Aldrich», США, #T9424-200ML) згідно до протоколу виробників. На синтез комплементарної ДНК (кДНК) брали 1000 нг тотальної РНК, обробленої DNaseI («Thermo Scientific», США, #EN0521) згідно до протоколу виробника. В реакційну суміш до РНК додавали зворотну транскриптазу RevertAid («Thermo Scientific», США, #EP0441), інгібітор РНКаз RiboLock («Thermo Scientific», #EO0381), олігонуклеотидні праймери Оліго(дТ)18 («Thermo Scientific», США, #SO131) та рандомні праймери в загальному об'ємі 20 мкл. Реакція здійснювалася за стандартним протоколом, рекомендованим виробником. Синтезовану кДНК зберігали при -20 °C.

Підбір референсних генів. Для дослідження рівня експресії гена MGMT людини в умовах обробки гормонами здійснили підбір референсних генів, на експресію яких не впливала б наявність гормону. Проаналізували вплив β -естрадіолу та прогестерону на експресію 9 генів домашнього господарювання – ACTB, B2M, GAPDH, 18S, TBP, TOP, HMBS, YWHAZ, RPLPO. geNorm-аналіз даних RT-кПЛР референсних генів здійснили за допомогою програм Norm Finder (Andersen CL *et al.*, 2004) й geNorm v3 (Vandesompele J *et al.*, 2002), що працюють як макроси до програми Excel Microsoft Office, а також qBase+ (Biogazelle, free demo lisenсe).

ПЛР у реальному часі. Визначали експресію гена *MGMT* людини, ядерних рецепторів естрогенів ER α , ER β , ядерного рецептору прогестерону PR, та референтних генів у триплетах. Використовували 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (no ROX, «Solis BioDyne», Estonia, #08-25-00001) та 2x Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (Thermo Scientific, cat. #K0241), ампліфікацію проводили відповідно до протоколу виробника протягом 40 циклів. Криві плавлення перевіряли від 65°C до 90°C з кроком у 0,5°C.

Електрофоретичне розділення та візуалізація продуктів ПЛР у поліакриламідному гелі (ПААГ). Із метою аналізу ампліфікованих фрагментів ДНК на наявність неспецифічних продуктів проводили вертикальний електрофорез в 8 % ПААГ. ДНК у ПААГ забарвлювали сріблом.

Електрофоретичне розділення продуктів ПЛР в агарозному гелі. Із метою первинного аналізу підбору умов проведення ПЛР фрагменти ДНК фракціонували методом горизонтального електрофорезу в 0,7% – 1,5% агарозному гелі із додаванням 0,5 мкг/мл етидіум броміду.

Отримання білкових лізатів Виділення білків проводили за стандартними методиками. Концентрацію білку вимірювали за допомогою спектрофотометра NanoDrop 2000 («Thermo Scientific», США) у режимі «Protein A280».

Білковий електрофорез та трансфер. Білки розділяли вертикальним електрофорезом у 3 % концентруючому та 12 % розділяючому гелі. Електрофоретично розділені у ПААГ білки переносили на полівінілдіфлюоридну мембрану («Millipore», США) за допомогою напівсухого переносу на приладі SemiDry Blotter («CleaverScientific», Велика Британія) у режимі 150 мА 30 хв та 100 мА 60 хв та мокрого переносу в системі Mini-PROTEAN Tetra («Bio-Rad», Велика Британія) у режимі 60V 2 год.

Вестерн-блот аналіз проводили за стандартними методиками. Використовували антитіла проти *MGMT* («NovusBiologicals», США, # NB100-168) та вторинні, кон'юговані з пероксидазою хрому («Sigma-Aldrich», США, #A9044). Детектували хемілюмінесценцію на приладі ChemiDoc («Bio-Rad», США), змінюючи експозицію від 10 до 300 с залежно від сили сигналу. Нормалізували відносно бета-актину/ тубуліну, або контроль рівномірності нанесення білка проводили за допомогою денситометричної оцінки сумарної кількості білка, який був перенесений на мембрану, у програмі OriginPro9.1.

Аналіз нуклеотидних послідовностей *in silico*. Нуклеотидну послідовність промотора гена *MGMT* людини (номер доступу X61657.1, 1157 п.н.), та мРНК (NM_002412.5, 4678 п.н.) взяли із бази даних GenBank серверу Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Нуклеотидну послідовність, що виходить за межі промотора отримували із UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu>). Для аналізу локалізації промоторної ділянки у межах гена та на хромосомі вирівнювали нуклеотидні послідовності за допомогою програми BLASTN (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Цис-регуляторні послідовності шукали, використовуючи такі програми: Cis-element Cluster Finder (Cister) (<http://zlab.bu.edu/~mfrith/cister.shtml>), JASPAR (<http://jaspar.genereg.net>), Mapper (<http://genome.ufl.edu/mapper>), LASAGNA-Search

(http://biogrid-head.engr.uconn.edu/lasagna_search), Promoter Analysis and Interaction Network Toolset (PAINT, v 4.0-pre), NUBIScan (<http://www.nubiscan.unibas.ch/cgi-bin/secure/NUBIScan/NUBIScan.cgi>), NHR-scan (http://asp.ii.uib.no:8090/cgi-bin/NHR-scan/nhr_scan.cgi), PROMO (http://algggen.lsi.upc.es/recerca/menu_recerca.html), Tfscan (<http://www.hpa-bioinfotools.org.uk/pise/tfscan.html>), PromoterScan (<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan>), Tfsitescan (<http://www.ifti.org>), SignalScan (<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/signal>), Site recognition by Genetic Algorithm (SiteGA) (<http://wwwmgs.bionet.nsc.ru/cgi-bin/mgs/sitega/index.pl>), TFSEARCH (http://www.usc.edu/hsc/nml/lib-services/bioinformatics/promoter_TF.html), TESS – Transcription Element Search System (<http://www.cbil.upenn.edu/tess>). Наведені програми використовують різні математичні моделі передбачення сайтів зв'язування транскрипційних факторів із певними ділянками ДНК і різні бази даних таких послідовностей.

Біоінформативний аналіз потенційних сайтів посттрансляційних модифікацій MGMT людини. Амінокислотну послідовність протеїну MGMT *Homo sapiens* (2.1.1.63) взяли з бази даних GenBank серверу NCBI (NP_002403.2, 238 aa). Відомих партнерів цього протеїну шукали в базах даних APID, BIND (BOND), BioGRID, 12D, Gene/NCBI, HPRD, MINT, PubMed. Пошук ізоформ MGMT здійснювали за допомогою бази даних ASAP. Пошук потенційних сайтів посттрансляційних модифікацій здійснювали: NetAcet 1.0 (Kiemer L *et al.*, 2005), PAIL (Li A *et al.*, 2006), Phosida (Gnad F *et al.*, 2011), SUMOsp (Ren J *et al.*, 2009), UbPred (Radivojac P *et al.*, 2010) і BDM-PUB (<http://bdmpub.biocuckoo.org/prediction.php>), MeMo 2.0 (Chen H *et al.*, 2006); DISPHOS 1.3 (Uversky VN *et al.*, 2007), GPS 2.1 (Xue Y *et al.*, 2008), KinasePhos (Huang HD *et al.*, 2005), NetPhos 2.0 (Blom N *et al.*, 1999), NetPhosK 1.0 (Blom N *et al.*, 2004), SCANSITE (Obenauer JC *et al.*, 2003). Для визначення доменної організації використали програму SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) (Ponting CP *et al.*, 1999), а для пошуку неструктурованих ділянок як потенційних сайтів фосфорилування та ділянок зв'язування з іншими протеїнами – DISPHOS, IUPred (Dosztányi Z *et al.*, 2005) і Anchor (Dosztányi Z *et al.*, 2009).

Статистичний аналіз. Кожен експеримент повторювали мінімум двічі. Результати експериментів подавали у вигляді середнього арифметичного зі стандартним квадратичним відхиленням. Статистичну достовірність оцінювали за допомогою двовибіркового t-критерію Стьюдента.

Результати досліджень

Біоінформатичний пошук елементів відгуку на гормони у промоторній ділянці гена MGMT людини. Ми проаналізували промотор гена MGMT людини та детектували потенційні цис-регуляторні елементи. Ми виявили елементи відгуку на стероїдні гормони, які зв'язують гомо- та/або гетеродимери рецепторів глюкокортикоїдів, прогестерону та естрогенів, а також інші потенційні цис-регуляторні елементи, зокрема елементи відгуку на рецептор активації проліферації пероксисом, рецептор тиреоїдних гормонів, ретиноєвий орфановий рецептор,

рецептор ретиноїду X, рецептор ретиноєвої кислоти та рецептор вітаміну D (рис. 1, табл. 1). Отримані різними програмами дані ми порівнювали між собою й для подальшого аналізу враховували лише елементи відгуку, локалізація яких підтверджується двома і більше програмами.

У межах дослідженої промоторної ділянки ми передбачили численні елементи відгуку на глюкокортикоїди, окрім вже відомих функціональних сайтів у позиціях 24-50 та 61-79 у межах послідовності промотора X61657.1 (Biswas T *et al.*, 1999), які ми детектували дев'ятьма програмами із десяти, ми передбачили також цілу низку нових. Важливо зазначити, що на сьогодні глюкокортикоїди – єдині відомі гормональні регулятори експресії гена *MGMT* (Grombacher T *et al.*, 1996, Biswas T *et al.*, 1999, Ueda S *et al.*, 2004). Даний факт має важливе значення при лікуванні онкозахворювань. Оскільки глюкокортикоїди та їх синтетичні аналоги широко використовують в медицині як протизапальні та протинабрякові препарати в післяопераційній реабілітації пацієнтів, наприклад, при лікуванні гліом. Синтетичний глюкокортикоїд дексаметазон, який дають пацієнтам після операції, активує експресію *MGMT* через сайт відгуку та зменшує ефективність алкілувальної хіміотерапії, що покликана знищити залишки клітин пухлини. Чотири різних програми виявили елементи відгуку на прогестерон, однак лише два з них в позиціях 35-42 та 72-79 X61657.1 підтвердили усіма програмами (рис. 1). Використовуючи сім різних програм, ми виявили елементи відгуку на естрогени (рис. 1), серед яких лише два потенційні елементи відгуку в позиціях 35-42 та 72-79 підтверджені усіма програмами. Навіть два елементи відгуку, передбачені значною кількістю програм, варті подальшого вивчення їхньої активності, оскільки естрогени сприяють росту гормоночутливих пухлин, регулюючи експресію протоонкогенів *c-fos*, *c-myc* та ін. (Chang C *et al.*, 2012, Mungenast F *et al.*, 2014).

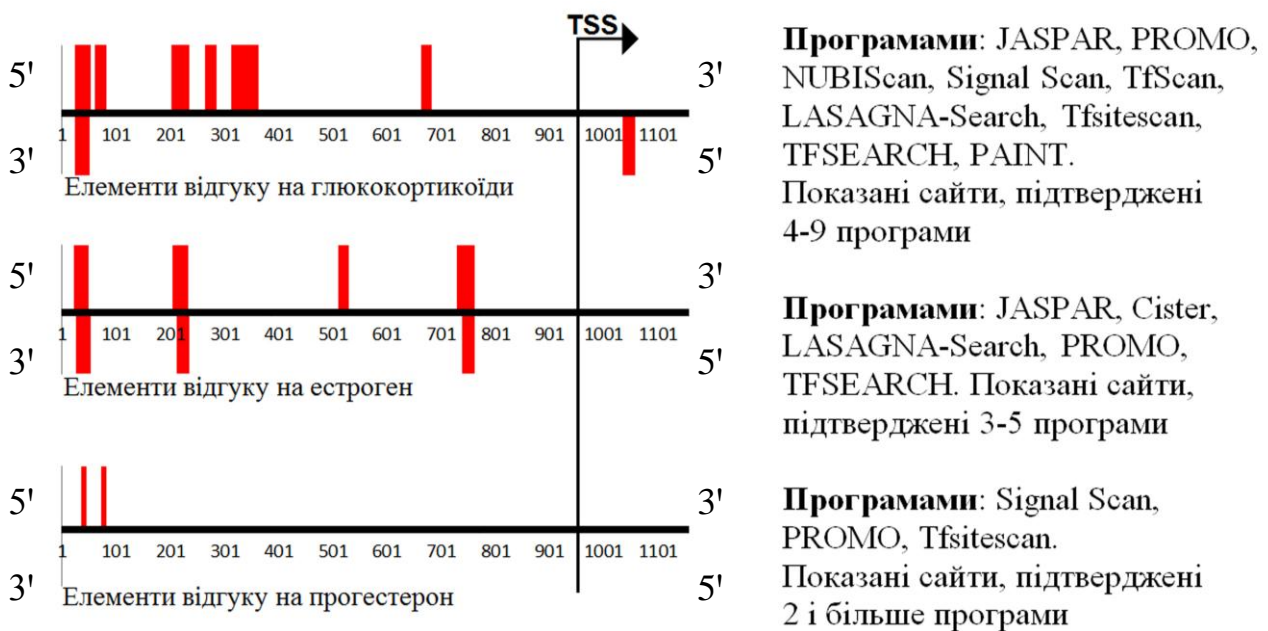


Рис. 1. Позиція сайтів зв'язування рецепторів стероїдних гормонів у промоторі гена *MGMT* людини. Програми, за допомогою яких передбачали, зазначено праворуч. TSS – сайт старту транскрипції. Вісь абсцис – промотор X61657.1, 1157 п.н., нумерація на рисунку в його межах. Вісь ординат – орієнтація елемента відгуку

Стероїдні гормони можуть також впливати і на хроматин навколо регульованих ними генів. Зокрема, після зв'язування з ДНК рецептори залучають безліч кофакторів, які модифікують гістонові білки та ремоделюють нуклеосоми. Набір цих корегуляторів призводить до модифікацій хроматинового волокна, що може змінити 3D-організацію, сприяючи дії подальших регуляторів транскрипції (Dily FL *et al.*, 2018). Також, певні зміни в канонічній послідовності елементів відгуку на естрогени можуть спричинити алостеричні зміни в структурі самого рецептора, впливаючи на здатність комплексу залучати коактиватори та фактори транскрипції, які можуть сприяти біологічній активності ER (Fuentes N *et al.*, 2019).

Серед восьми програм, якими детектували елемент відгуку на рецептор активації проліферації пероксисом, шістьма програмами визначили елемент відгуку в позиції 360-389, п'ятьма – в позиції 193-221 (табл. 1). Також ще шість PPAREs виявили в позиціях 34-65, 58-77, 261-283, 588-614, 716-747 та 739-758 з допомогою чотирьох програм.

Таблиця 1

Виявлені біоінформатично регуляторні елементи та їх позиція в промоторі гена *MGMT* людини X61657.1.

Рецептор	Ліганд	Позиція
естрогенів ER	естрогени	21-45(+); 25-49(-); 204-229(+); 212-233(-); 510-527(+); 729-758(+); 738-759(-)
прогестерону PR	прогестерон	35-42 (+); 72-79 (+)
глюкокортикоїдів GR	глюкокортикоїди	24-48(-); *24-50(+); *61-79(+); 204-233(+); 265-283(+); 313-341(+); 438-461(+); 1037-1057(-)
ретиноєвий орфановий ROR	холестерол та його похідні	207-220(+); 360-373(+); 666-679(+); 733-746(+)
тиреоїдних гормонів TR	тиреоїдні гормони	199-220(+); 211-232(-); 274-294(+); 371-379(+); 937-958(+); 945-966(+); 1110-1118(+)
ретиноєвої кислоти RAR	транс- і 9-цис-ретиноєві кислоти	275-291(-); 286-302(-); 423-442(-); 739-753(+); 964-986(-); 992-1008(-); 1057-1073(-)
активації проліферації пероксисом PPAR	жирні кислоти, простагландини	34-65(-); 58-77(+); 193-221(+); 261-283(+); 360-381(389)(+); 588-614(+); 716-747(+); 739-758 (+)
вітаміну D VDR	вітамін D	731-745(+); 952-966(+)
X ретиноїду RXR	9-цис ретиноєва кислота	56-73(+); 360-379(+); 593-617(+); 729-747(+)

Примітка. * Жирним позначено вже підтвержені елементи відгуку

Елементи відгуку на тиреоїдні гормони у промоторі гена *MGMT* людини виявили трьома програмами. Лише один елемент відгуку детектований двома різними програмами – в позиції 211-232. Також ми виявили один елемент відгуку поза межами реферованого промотора X61657.1 в положенні -1205 -1182 від сайту старту транскрипції з використанням програми MAPPER.

Елементи відгуку на рецептор ретиноєвої кислоти детектували чотирма програмами, три із яких виявили один RARE в позиції 739-753, дві програми – шість

елементів відгуку в позиціях 275-291, 286-302, 423-442, 739-753, 964-986, 992 – 1008 та 1057 – 1073 (табл. 1).

У промоторі даного гена також передбачили елементи відгуку на рецептор ретиноїду X за допомогою чотирьох програм, із них елемент відгуку в позиції 729-747 виявлено всіма програмами (табл. 1). Хоча механізми дії ретиноїдів у лікуванні раку недостатньо вивчені, синтетичні сполуки, що є лігандами лише RXR, проходять клінічні дослідження. Наприклад, синтетичний ретиноїд LGD1069 (bexarotene, Targretin) пройшов клінічні дослідження щодо лікування однієї з форм шкірної лімфоми та досліджується щодо лікування раку легень (Germain P *et al.*, 2006).

Елементи відгуку на ретиноєвий орфановий рецептор в промоторі *MGMT* передбачили чотирма програмами (табл. 1). Цікаві дані щодо ролі даного рецептора при лікуванні раку грудей, оскільки він прямо активує експресію ароматази через елемент відгуку в промоторі гена. Це призводить до збільшення кількості ферменту ароматази та, внаслідок його дії з перетворення андрогенів на естрогени, до підвищення концентрації естрогенів в пухлині та її росту (Odawara H *et al.*, 2009). Лише дві програми передбачили наявність двох елементів відгуку на вітамін D в позиціях 730-745, 951-966 (табл. 1).

Варто зазначити, що ми виявили багато елементів відгуку, а також їхніх напівсайтів, тільки однією із зазначених в методах програм (дані не наведено). Багато з виявлених елементів відгуку мають однакову локалізацію (рис. 1, табл. 1), що пояснюється зв'язуванням рецепторів стероїдних гормонів зі схожими консенсусними послідовностями. Також, мотиви елементів розпізнаються моно- та димерами рецепторів. Показано, що рецептори стероїдних гормонів можуть зв'язуватися як із відповідними елементами відгуку в ДНК, так і з консенсусними напівсайтами даного елемента. Відомо, що навіть недосконалі елементи відгуку в промоторах можуть виконувати регуляторну роль (Khorasanizadeh S *et al.*, 2001, Claessens F *et al.*, 2004). Питання щодо функціональної активності виявлених потенційних елементів відгуку на гормони та регуляції експресії гена *MGMT* гормонами в клітинах потребує подальших експериментальних досліджень.

Експресія генів ядерних рецепторів у досліджуваних клітинах та підбір концентрацій гормонів. Для дослідження впливу гормонів на експресію гена *MGMT* людини підбирали клітинну модель експерименту: перевірили клітинні лінії на експресію *MGMT*, ядерних рецепторів, підбрали концентрації гормонів та перевірили їх можливу токсичність на клітини методом МТТ, а також умови обробок клітин гормонами (рис. 2, табл. 2). Ми підбрали та дослідили вплив фізіологічних концентрацій β -естрадіолу та прогестерона (табл. 2). Варто зазначити, що ці дані є усередненими, оскільки концентрації гормонів можуть сильно варіювати. За результатами статистичної обробки даних МТТ-аналізу, прогестерон та β -естрадіол в досліджуваному діапазоні концентрацій не чинили цитотоксичного впливу на життєдіяльність клітин MCF7 людини.

Стероїдні гормони можуть впливати на клітину різними шляхами. Розрізняють класичний, або генетичний шлях дії гормону – через відповідний ядерний рецептор, що проникає в ядро та зв'язується зі своїм елементом відгуку у промоторі, та

некласичний (негенетичний), або ж швидкий шлях – через рецептор на плазматичній мембрані клітини (Boonyaratanakornkit V *et al.*, 2007, Garg D *et al.*, 2017, Gellersen B *et al.*, 2009). За даними літератури, усі обрані клітинні лінії експресують як мембранний рецептор прогестерону – Progesterone Receptor Membrane Component 1 – PGRMC1 (Garg D *et al.*, 2017, Gellersen B *et al.*, 2009), так і мембранний рецептор естрогенів – G protein-coupled estrogen receptor 1 – GPER (<https://www.proteinatlas.org>).

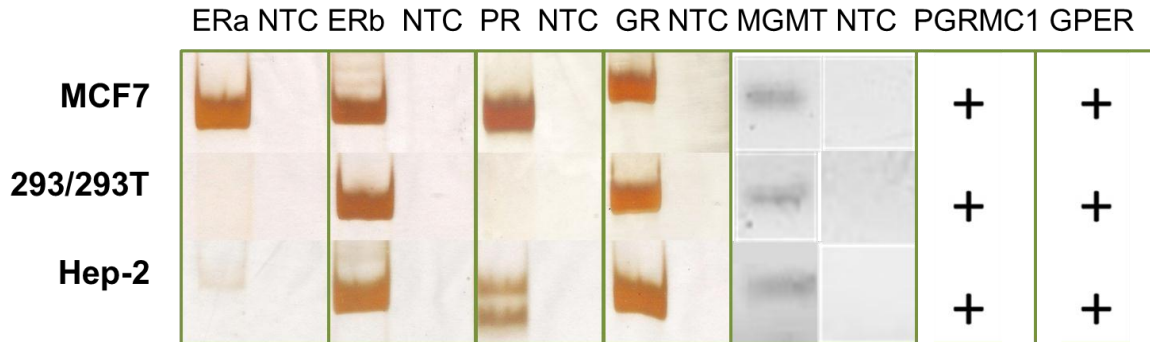


Рис.2. Підбір клітинної моделі для дослідження впливу стероїдних гормонів на експресію гена *MGMT* людини. Статус експресії ядерних рецепторів: глюкокортикоїдів GR, прогестерону PR та естрогенів ERα та ERβ, а також мембранних рецепторів в клітинах 293, 293T, MCF7 та Hep-2. Продукти РТ-кПЛР розділені в ПААГ й забарвлені сріблом та в 1,5% агарозному гелі й візуалізовано етидій бромідом; NTC – контроль, суміш реактивів без матриці кДНК. PGRMC1 - Progesterone receptor membrane component 1, GPER1 - G protein-coupled estrogen receptor 1

Таблиця 2.

Фізіологічні концентрації (у нмоль/л) гормонів в організмі і відповідні репрезентативні концентрації, обрані для проведення обробок клітин людини *in vitro*

Гормон	Жінки (стадія циклу)				Чоловіки/ Діти/ жінки (менопауза)
	фоліку- лярна	передовуля- ційний пік*	лютеїнова	вагітність	
β-естрадіол	0,07-0,22	0,7-1,4	0,07-0,22	36-73	<0,18
Репрезентативні концентрації	0,05; 0,5	1; 5	0,05; 0,5	10; 50	0,05; 0,5
Прогестерон	<5	5-10	~ 50	~500	<5
Репрезентативні концентрації	1; 5	5	50	100; 500, 1000	1; 5

Примітка. * при супровідній гормонотерапії концентрація естрогенів 1-1,4 нмоль/л

Регуляція експресії гена *MGMT* β-естрадіолом. Згідно даних ПЛР в реальному часі, β-естрадіол впливає на рівень транскрипції *MGMT* у клітинах 293T і MCF7. Даний гормон має тенденцію активувати транскрипцію гена *MGMT* в концентраціях, аналогічних таким у крові жінок до та після передовуляційного піку (0,5 нмоль/л) й під час вагітності (10, 50 нмоль/л) (табл. 1). При концентрації 0,05 нмоль/л, що характерна

для крові чоловіків, дітей та базального рівня у жінок, а також при концентраціях 2,5 та 5 нмоль/л, що спостерігаються в крові жінок перед овуляцією (передовуляційний пік) кількість транскрипту *MGMT* знаходиться приблизно на рівні контролю (рис. 3). В клітинних лініях 293Т та MCF7 із різним патерном експресії ізоформ ядерних рецепторів естрогенів спостерігали схожий ефект (рис. 3). Клітини MCF7 експресують обидві ізоформи – ERa та ERb, тоді як 293Т експресують лише ERb, що виявляє антагоністичну дію щодо ERa, відповідального за класичну дію естрогенів. Тож точно відповісти, чи регулюється експресія гена *MGMT* β-естрадіолом через елемент відгуку в промоторі, не можна. Для цього потрібні подальші експерименти.

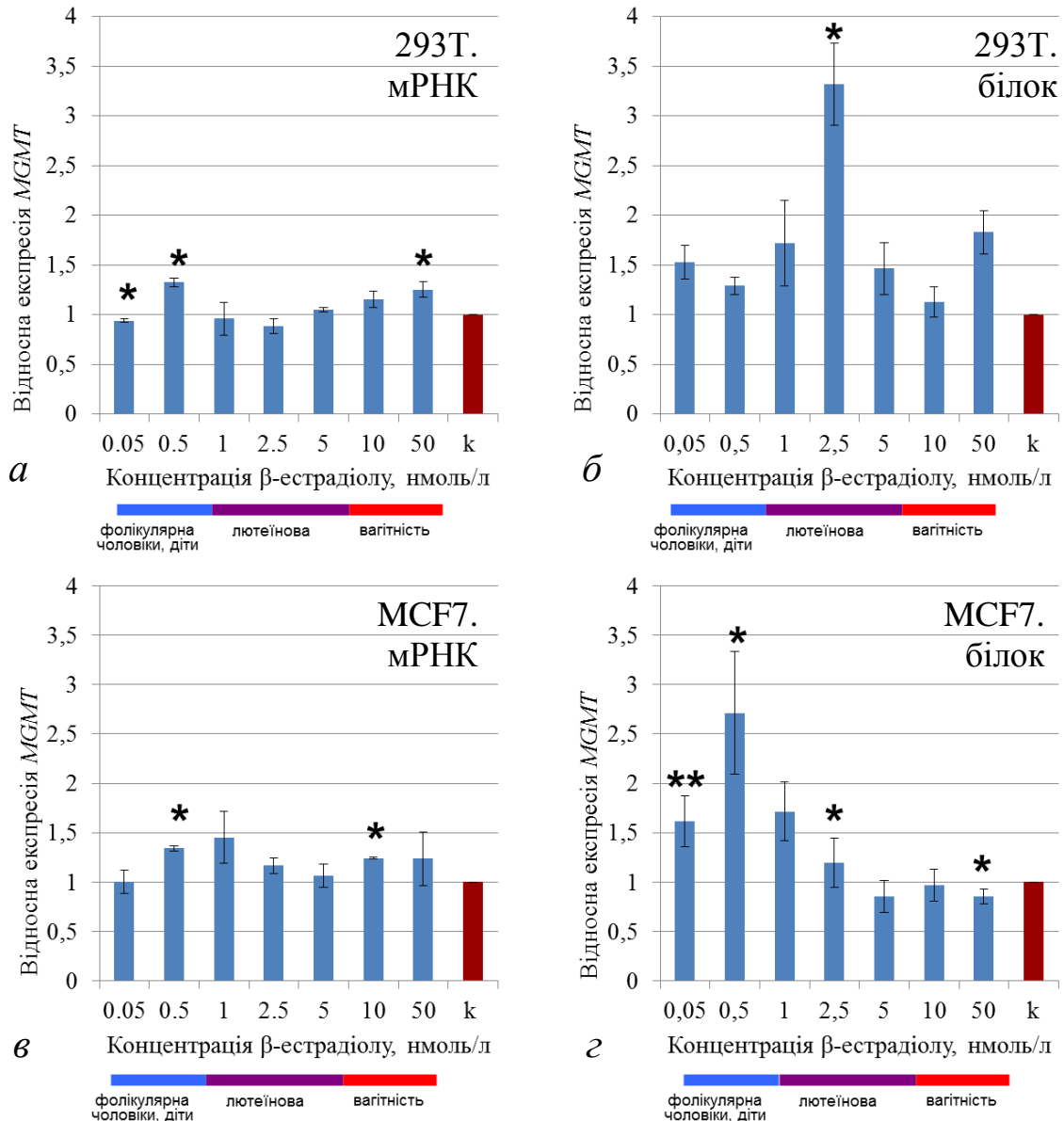


Рис. 3. Регуляція експресії гена *MGMT* людини естрогенами у клітинах з різним патерном експресії ядерних рецепторів. Вплив β-естрадіолу на: **а** – кількість транскрипту *MGMT*/(*RPLPO*+*HMBS*) в клітинах 293Т; **б** – кількість білку *MGMT* в клітинах 293Т. Кількість *MGMT* нормалізована відносно бета-актину та тубуліну, обраховане середнє геометричне; **в** – кількість транскрипту *MGMT*/(*RPLPO*+*HMBS*) в клітинах MCF7; **г** – кількість білку *MGMT* в клітинах MCF7. Кількість *MGMT* нормалізована відносно бета-актину. Різниця порівняно з контролем * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$

Також дослідили вплив естрогенів на експресію гена *MGMT* на рівні білка. В клітинах MCF7 та 293T β -естрадіол призводить до зростання кількості *MGMT* в клітинах. Зокрема, в клітинах MCF7 спостерігали тенденцію до підвищення експресії при базальних рівнях естрогенів – найбільше білка *MGMT* виявляли при концентрації β -естрадіолу 0,5 нмоль/л, де спостерігається також і зростання у кількості мРНК (рис. 3). В клітинах 293T найбільше білка *MGMT* виявляли при концентрації β -естрадіолу 2,5 нмоль/л.

З огляду на виразніший вплив естрогенів на кількість білка *MGMT*, ніж на кількість транскрипту, можна припустити, що естрогени активують синтез білка або ж сповільнюють його деградацію. Тому питання стосовно механізмів, що призводять до таких тенденцій впливу естрогенів на експресію *MGMT* людини на рівнях мРНК та білка, залишається дискусійним та потребує подальшого дослідження.

Регуляція експресії гена *MGMT* прогестероном. Ми спостерігали зростання кількості мРНК досліджуваного гена під впливом прогестерону при усіх досліджуваних концентраціях у клітинах лінії MCF7, що експресують і ядерний, і мембранний рецептори прогестерону. Найбільше зростання кількості транскрипту спостерігали при концентрації прогестерону 500 нмоль/л, що відповідає концентрації прогестерону в крові вагітних (рис. 4.а). На основі цих результатів можна припустити, що це має значення для захисту організму жінки під час вагітності, оскільки кількість ендогенно індукованих алкільних ушкоджень може зростати (Marnett LJ *et al.*, 1993, Georgiadis P *et al.*, 2000). Також ми спостерігали значне збільшення кількості білка *MGMT* в клітинах при усіх досліджуваних концентраціях, і аж до 17 разів порівняно із контролем при концентрації 100 нмоль/л (рис. 4.б).

Також ми порівняли вплив прогестерону на кількість транскрипту *MGMT* людини в клітинах HEp-2 (ядерний і мембранний рецептори прогестерону) та 293 (лише мембранний рецептор прогестерону). На відміну від MCF7, у клітинах HEp-2 ми не спостерігали значного збільшення чи зменшення кількості транскрипту (рис.4.а.,г.), тоді як в клітинах 293 без ядерного рецептору прогестерону ми спостерігали значніше зростання вмісту транскрипта гена *MGMT* людини при концентрації 500 нмоль/л (рис.4.в). Подібне збільшення кількості транскрипта при концентрації 500 нмоль/л ми спостерігали і в клітинах MCF7, що мають ядерний рецептор прогестерону (рис. 4.а), тож можна припустити, що це пов'язане із неklasичною регуляцією.

Відомо, що в клітинах 293 прогестерон спричиняє значні зміни у статусі посттрансляційних модифікацій білка PGRMC1 (Sabbir MG. 2019, Thejer VM *et al.*, 2020) та, отже, у його здатності взаємодіяти із білками-партнерами (Sabbir MG. 2019). Також в клітинах 293 при наявності прогестерону PGRMC1 запускає сигнальні шляхи, що змінюють базовий метаболізм клітини (Sabbir MG. 2019, Thejer VM *et al.*, 2020), а також епігенетичний статус клітини (Thejer VM *et al.*, 2020), що веде до подальших змін в експресії генів. Таким чином, прогестерон здатний опосередковано через даний мембранний рецептор впливати на експресію генів, й на експресію *MGMT* в тому числі (рис. 4.б).

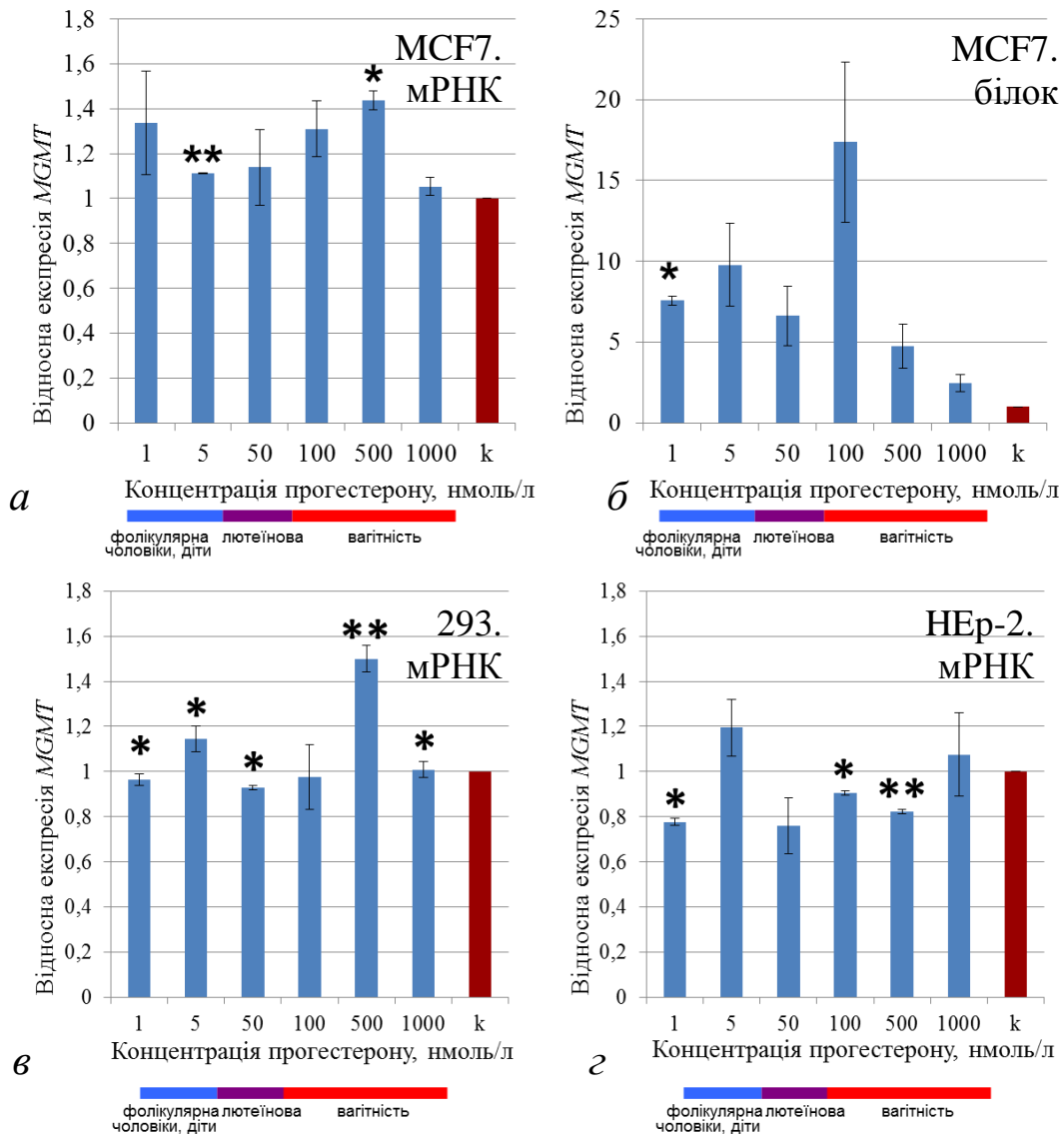


Рис. 4. Регуляція експресії гена *MGMT* людини прогестероном. Вплив прогестерону на: **а** – кількість транскрипту *MGMT/(ACTB+YWHAZ)* в клітинах MCF7, різниця порівняно з контролем * $p < 0,06$; ** $p < 0,003$; **б** – кількість білку *MGMT* в клітинах MCF7. Вміст білку *MGMT* нормалізовано відносно бета-актину, різниця порівняно з контролем * $p < 0,06$; **в** – кількість транскрипту *MGMT/(ACTB+YWHAZ)* в клітинах 293, різниця порівняно з контролем * $p < 0,005$; ** $p < 0,001$; **г**. кількість транскрипту *MGMT/(ACTB+YWHAZ)* в клітинах HEP-2, різниця порівняно з контролем * $p < 0,02$; ** $p < 0,01$

Також варто зазначити, що хоча MCF7 та HEP-2 мають ядерний рецептор PR, а 293 – ні, ми спостерігали значну подібність впливу прогестерону у клітинах MCF7 та 293 на кількість транскрипту *MGMT*. Ми припускаємо, що це пов'язано не лише з наявністю/відсутністю ядерного PR та роллю мембранного рецептора PGRMC1 в даній регуляції, а також із впливом ядерного рецептору естрогенів. Показано, що PGRMC1 може фосфорилуватися естроген-регульованими кіназами (Neubauer H *et al.*, 2008), що може впливати на його активність та сигнальні каскади, які він може запускати. Тож питання стосовно механізмів, що призводять до різного впливу прогестерону на експресію гена *MGMT* людини на рівнях мРНК та білка, залишається дискусійним та потребує подальшого дослідження.

Вплив синтезованого в рослинах рекомбінантного інтерферону $\alpha 2\beta$ на експресію MGMT. Ми дослідити вплив синтезованого в рослинах *N. benthamiana* рекомбінантного інтерферону $\alpha 2\beta$ на експресію репаративного ензиму MGMT в клітинах пухлинного (HEp-2) та непухлинного (E8) походження (рис.5).

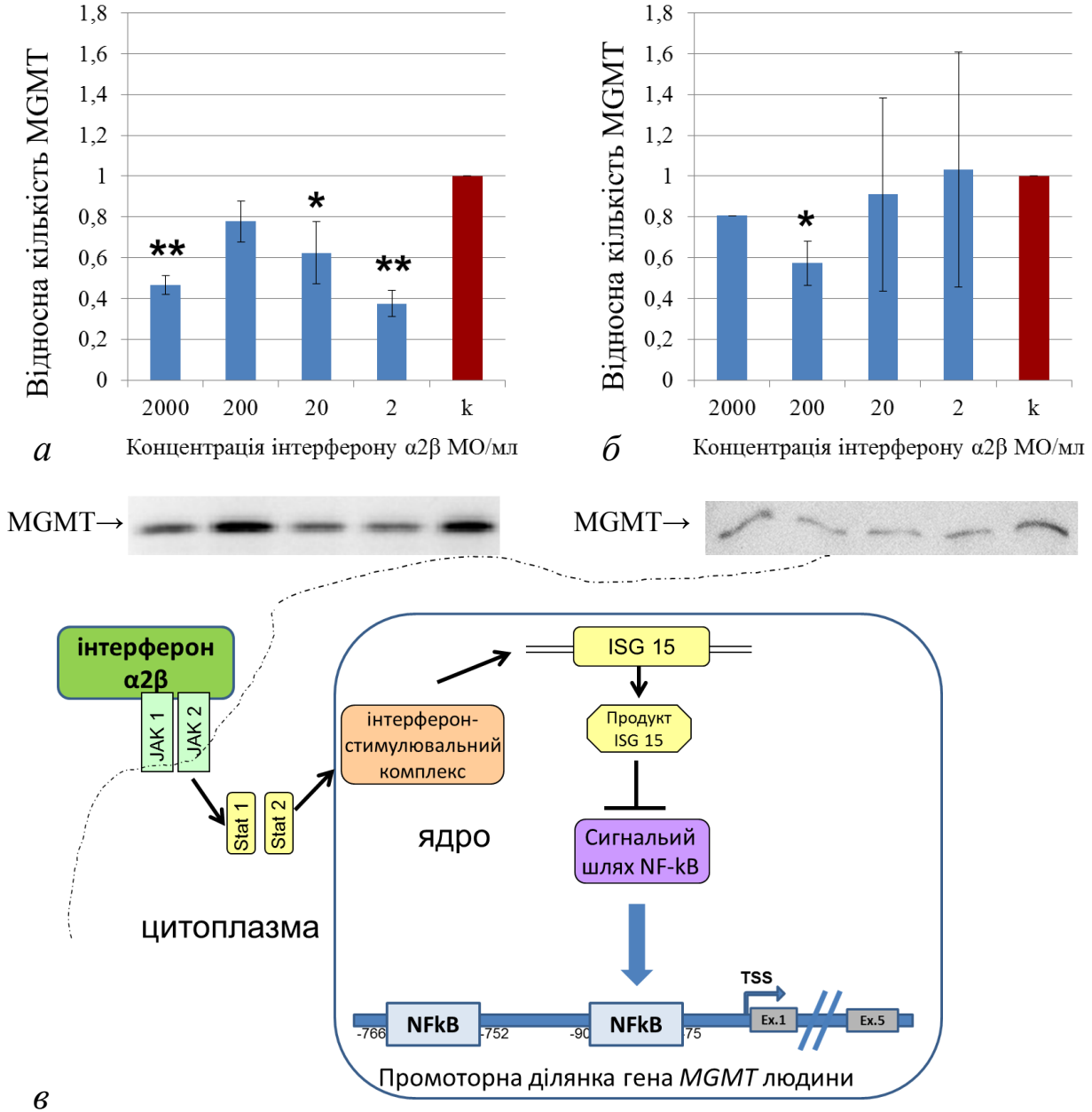


Рис.5. Вплив інтерферону $\alpha 2\beta$ на кількість білка MGMT. Діаграми результатів вестерн-блот аналізу та типова візуалізація хемілюмінесцентного сигналу вестерн-блотингу в клітинах: **а** – HEp-2; **б** – E8. Різниця порівняно з контролем ** $p < 0,0005$, * $p < 0,05$; **в** – запропонована нами схема можливого молекулярного каскаду інгібування експресії гена *MGMT* інтерфероном $\alpha 2\beta$ із залученням NF- κ B. Інтерферон активує протеїнкінази JAK1 і JAK2, що фосфорилують STAT1 та STAT2. В результаті фосфорилювання STAT1 та STAT2 димеризуються та переносяться в ядро, формуючи інтерферон-стимульований комплекс, який індукує експресію гена *ISG15* (Interferon-stimulated gene 15). *ISG15* негативно регулює сигнальний шлях NF- κ B, який є підтвердженим позитивним регулятором *MGMT*.

Статистично достовірний ефект зниження кількості досліджуваного білку в пухлинних клітинах виявлено при усіх досліджених концентраціях інтерферону відносно контролю. Слід відзначити, що ми спостерігали тенденцію до зворотної залежності ефекту інгібування експресії *MGMT* від концентрації інтерферону в 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 (Kotsarenko KV *et al.*, 2014.). Характер впливу дослідженого інтерферону на рівень експресії репаративного ензиму *MGMT* в клітинах лінії E8 непухлинного походження дещо різнився порівняно з його дією на пухлинні клітини HEp-2 (рис.5а). 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).

Таким чином, ми вперше виявили інгібувальний ефект рекомбінантного $INF\alpha2\beta$, синтезованого в рослинах *N. benthamiana*, на експресію ензиму *MGMT* в клітинах людини. Встановили, що цей інгібувальний ефект був виразнішим у пухлинних клітинах порівняно з клітинами непухлинного походження. Оскільки на сьогодні про елементи відгуку на інтерферон в промоторі гена *MGMT* не відомо і ми не виявляли їх біоінформатично (Nidoieva ZM *et al.*, 2015), припускаємо, що $INF\alpha2\beta$ впливає опосередковано (рис.5б). Інгібування NF- κ B, відомого позитивного регулятора транскрипції *MGMT* (Lavon I *et al.*, 2007), інтерфероном призводить до його «випадіння» з ланцюга регуляції транскрипції *MGMT*, а це в свою чергу - до зниження кількості відповідного білкового продукту.

Відомі білкові партнери та сайти посттрансляційних модифікацій білка *MGMT* людини. У результаті проведеного аналізу літератури та інформації із баз даних ми виявили 75 описаних білкових партнерів *MGMT* людини (Niture SK *et al.*, 2005, Тео АК *et al.*, 2001, Srivenugopal KS *et al.*, 2000, Srivenugopal KS *et al.*, 1996). Більшість цих білків (24) належить до класу білків, що зв'язуються з нуклеїновими кислотами – DDX5, DDX24, EEF1B2, H2BFM, HIST1H2AM, HIST1H4A, HIST3H3, HNRNPA2B1, HNRNPC, MCM2, MCM3, MSH2, NCL, ORC1L, PABPC3, PCNA, POLD1, PRPF4, RPLP1, RPS15A, SMC1A, TOP1, UBB, XRCC6. Також серед білків-партнерів *MGMT* людини зустрічається значна кількість (12) кіназ – CDK1, CDK2, CDK10, CDK12, CDKL5, CSNK2A1, CSNK2A2, PKM2, PRKACA, PRKCA, PRKCH, PRKDC, що наводить на думку про участь цих білків у фосфорилюванні *MGMT*.

На сьогодні відомо 8 сайтів посттрансляційної модифікації білка *MGMT* людини, наведених на рис. 6 (Srivenugopal KS *et al.*, 2000, Beausoleil S. A *et al.*, 2004, Imami K *et al.*, 2008). Положення S176 алкілується, що пов'язано з репаративною функцією білка (Tubbs JL *et al.*, 2007). Інші сайти фосфорилюються (T41, T42, S45, S53, S70, Y145, S176, S232). Вважають, що фосфорилювання, яке є одним з шляхів регуляції внутрішньоклітинних процесів, знижує або інактивує ферментну активність білка.

В межах білка MGMT людини за допомогою програми SMART ми виявили 2 домени: метилтрансферазний (позиції амінокислот 37-121) та ДНК-зв'язувальний (позиції амінокислот 123-208) домени. З використанням Anchor, що передбачає неструктуровані ділянки та ділянки, просторово доступні для зв'язування з іншими білками (Dosztányi Z *et al.*, 2009), у білку MGMT людини передбачили дві потенційні ділянки зв'язування з іншими білками. Найбільш доступними є N-кінець білка перед метилтрансферазним доменом (позиції амінокислот 22-29) та C-кінець білка після ДНК-зв'язувального домена (позиції амінокислот 221-223).

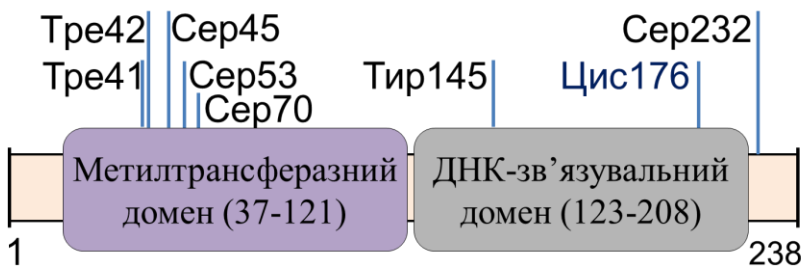


Рис.6. Відомі підтверджені сайти посттрансляційних модифікацій білка MGMT. Положення цистеїн 176 алкілується. Всі інші фосфорилуються. Доменна організація білка MGMT людини за даними програми SMART

Пошук нових сайтів ацетилювання та метилювання MGMT людини. Ми перевірили, чи має MGMT амінокислотні залишки, які потенційно можуть ацетилюватися. Також провели пошук потенційних сайтів метилювання MGMT з використанням програми MeMo 2.0. Дана програма не визначила жодного сайту потенційного метилювання білка MGMT людини. Проте ми виявили 14 потенційних сайтів ацетилювання білка MGMT людини, з яких найбільш ймовірні сайти модифікації з найвищими рахунками - це лізини K132 та K135 (рис.7).

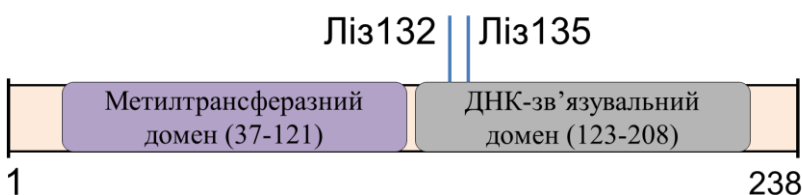


Рис.7. Найімовірніші потенційні сайти ацетилювання білка MGMT людини, виявлені в результаті біоінформатичного аналізу

Аналіз білкової молекули MGMT на можливість SUMOїлування. Ми отримали дані щодо можливого SUMOїлування білка MGMT. Програмою SUMOsp визначили 13 залишків лізину, що потенційно можуть SUMOїлуватися (K31, K34, K39, K49, K63, K67, K132, K135, K138, K156, K196, K209, K224), тоді як з використанням Phosida - лише один лізин в позиції 63. Проте, аналізуючи рахунок, обчислений SUMOsp для лізину в кожному положенні, можна говорити про їхню нерівноцінність в даній реакції. Сайт K63 передбачений двома програмами і є найімовірнішою модифікацією (рис. 8).

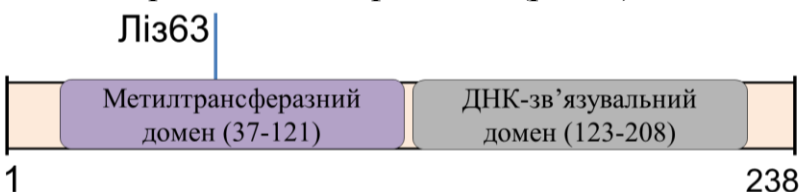


Рис.8. Найімовірніші потенційні сайти SUMOїлування білка MGMT людини, виявлені в результаті біоінформатичного аналізу

Детекція сайтів убіквітинування. Показано, що алкільована форма білку MGMT після репарації ДНК зазнає конформаційних змін, що розпізнаються убіквітиною лігазою, та убіквітується (Xu-Welliver M *et al.*, 2002). Проте, убіквітинування може мати й інші наслідки для білка. Тож ми вирішили перевірити можливість убіквітинування неалкільованої, активної форми білку MGMT, оскільки це може свідчити про інші, неканонічні функції цього білка.

У результаті біоінформатичного аналізу можливості убіквітинування білка MGMT людини за допомогою програм UbPred та BDM-PUB виявили 13 сайтів можливої модифікації. Порівнюючи результати, можна зробити висновок, що з найбільшою ймовірністю модифікується сайт K209, хоча не можна відкидати й інші результати – сайти K39, K67 та K156 (рис. 9).

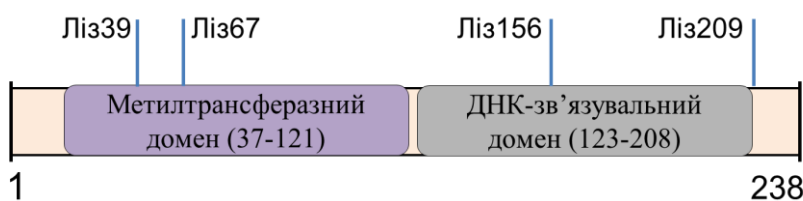


Рис.9. Найімовірніші потенційні сайти убіквітинування білка MGMT людини, виявлені в результаті біоінформатичного аналізу

Пошук нових сайтів фосфорилювання. Фосфорилювання протеїнів є поширеним механізмом регуляції активності протеїнів та регуляції/зміни їхніх функцій (Ciesla J *et al.*, 2011). Точно встановлено та підтверджено лише три сайти фосфорилювання MGMT у клітинах тканин, тоді як решта сайтів досліджена із використанням рекомбінантного MGMT *in vitro* (Beausoleil SA *et al.*, 2004, Imami K *et al.*, 2008). Показано, що це зменшує репаративну активність рекомбінантного білка (Srivenugopal KS *et al.*, 2000). Проте, можливе й фосфорилювання за іншими сайтами з іншим впливом на функціонування білку. Тож ми проаналізували амінокислотну послідовність MGMT щодо можливості фосфорилювання, використовуючи низку програм.

Провівши біоінформатичний аналіз можливого фосфорилювання білка MGMT, отримали 28 потенційних сайтів такої модифікації. Всіма 7 програмами передбачили три сайти – T42, S45, S230, два з яких описані (T42, S45). Також цікавими для дослідження є амінокислотні залишки білка в положеннях, що були визначені більшістю програм. Серед трьох потенційних сайтів фосфорилювання – S13, S53, S232, визначені з використанням 6 програм із 7, один з яких (S232) є експериментально підтвердженим. Серед 6 сайтів, передбачених п'ятьма програмами – T41, T69, S70, S124, T126, S216, T229 – теж є підтверджені (T41, S70) (рис. 10). Цікаво, що тирозин в положенні 145 детектували лише 2 програми – GPS 2.1 та DISPHOS, хоча на сьогодні доведено, що ця модифікація здійснюється у клітинах (Srivenugopal KS *et al.*, 2000).

Таким чином, майже всі відомі сайти фосфорилювання також передбачені в нашому аналізі більшістю програм. Зважаючи на це, й інші потенційні сайти, визначені більшістю програм, з високою ймовірністю можуть фосфорилюватися та цю модифікацію необхідно дослідити експериментально

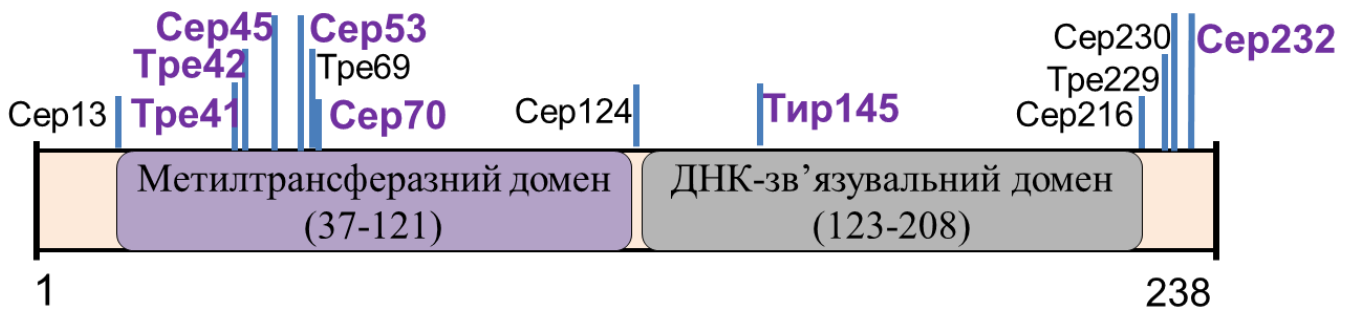


Рис.10. Найімовірніші потенційні сайти фосфорилювання білка MGMT людини, виявлені в результаті біоінформатичного аналізу. Фіолетовим кольором крупніше підписано вже відомі сайти, а чорним і дрібніше – передбачені нами

Дослідження здатності потенційних інгібіторів MGMT зменшувати його кількість. Одним із підходів до підвищення чутливості пухлинних клітин до цитотоксичного впливу алкілувальних сполук хіміотерапевтичних препаратів є зменшення активності та інактивація фермента MGMT за допомогою дозонасичених схем хіміотерапії та використання низькомолекулярних інгібіторів. Оскільки відомі на сьогодні два інгібітори активності MGMT Об-БГ та Об-(4-бромотієніл)гуанін, не зважаючи на ефективність інгібування даного фермента, мають низку побічних ефектів (Naumann SC *et al.*, 2009, Dolan ME *et al.*, 1991, Pegg AE *et al.*, 1995), нашим наступним завданням був пошук нових нетоксичних нуклеозидних інгібіторів MGMT та їхнє дослідження. Дані інгібітори розроблені і синтезовані у відділі біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ. Для зручності роботи ми згрупували їх за фізико-хімічними властивостями та пронумерували. Вони принципово відрізняються від усіх описаних на сьогодні – вони є низькомолекулярними нуклеозидними органічними сполуками, які можна надалі модифікувати для досягнення бажаних ефектів. Оскільки MGMT є суїцидальним білком, зв'язування інгібітору в активному центрі направляє білок на протеасомну деградацію та призводить не лише до інактивації фермента, але й до зменшення кількості білку в клітині. У даному підрозділі наведено результати дослідження даних сполук методом вестерн-блотингу.

Ми дослідили здатність низки потенційних інгібіторів білку MGMT людини зменшувати його кількість в клітинах HEp-2 та у клітинах непухлинного походження E8. Здатність знижувати кількість білка MGMT його потенційними інгібіторами порівнювали із вже відомим інгібітором MGMT – Об-БГ. У результаті проведених досліджень виявили декілька потенційних низькомолекулярних інгібіторів білка MGMT людини. Хоча, поки що жоден із досліджених інгібіторів не знижує кількість MGMT настільки ж ефективно, як і Об-БГ, їх можна надалі модифікувати для покращення інгібуючих властивостей. Наприклад, результати щодо сполук №89 та №46 досить обнадійливі; сполука №41 знижує кількість MGMT найкраще з усіх потенційних інгібіторів (рис.11).

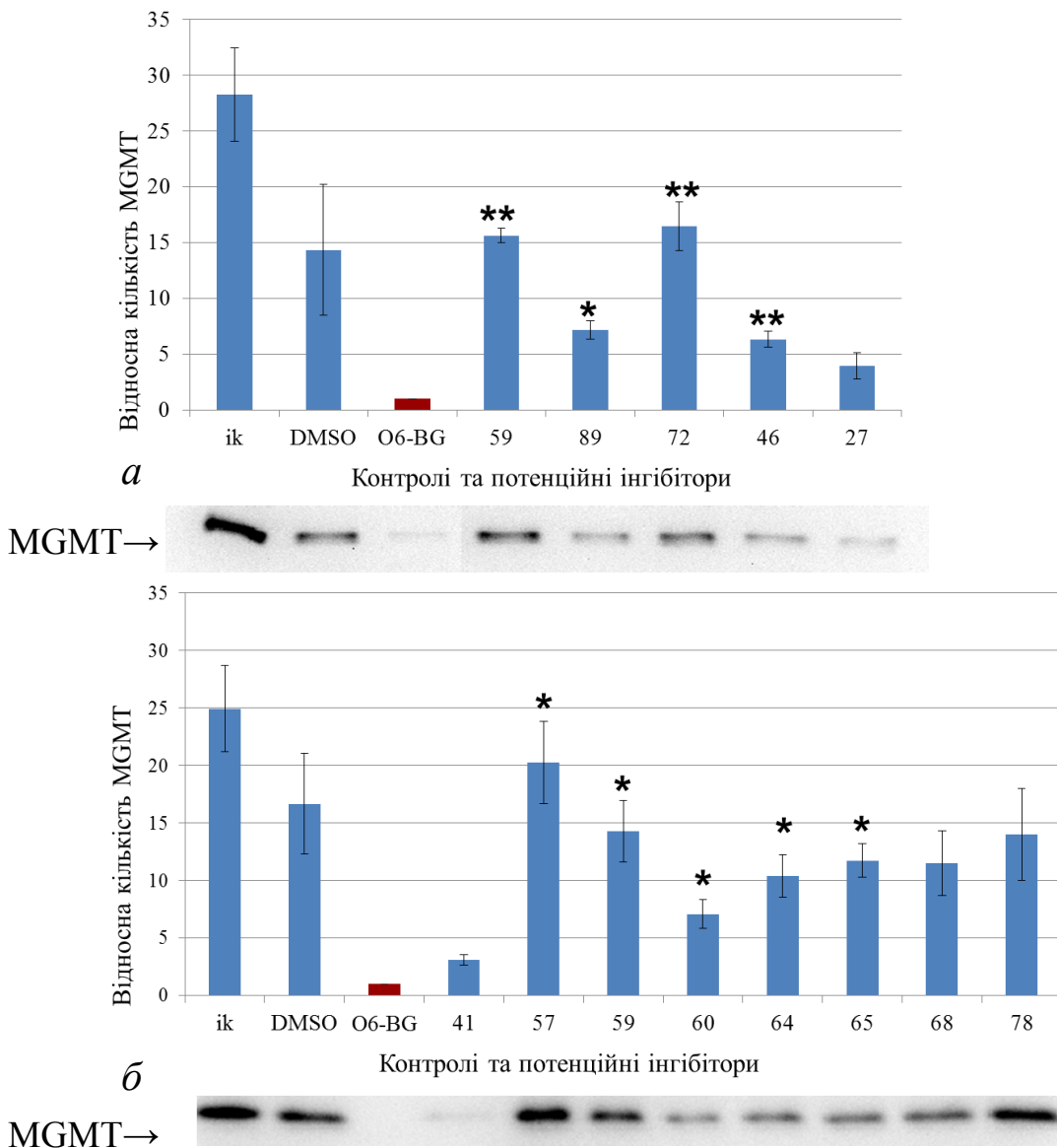


Рис. 11. Здатність нових потенційних нуклеозидних інгібіторів зменшувати кількість білка MGMT в клітинах ліній: **а** – HEp-2 та **б** – E8. Дані вестерн-блот аналізу. Різниця порівняно з O6-BG ** $p < 0,005$, * $p < 0,05$. DMSO - контроль, додавання до клітин розчинника диметилсульфоксиду у кількості, що і у зразках з інгібітором, ik – інтактний контроль, що імітував обробки, але без додавання інгібіторів чи їх розчинників, O6-BG – O6-бензилгуанін, позитивний контроль (відомий інгібітор MGMT). 27, 41, 46, 57, 59, 60, 64, 65, 68, 72, 78, 89 – нові потенційні інгібітори

Отже, використання таких нових низькомолекулярних інгібіторів може бути ще одним методом модуляції активності білка MGMT в клітинах пухлин. На сьогодні ці сполуки ще потребують подальших досліджень, проте напрями цих досліджень вже намічені. Надалі можна проводити подальші модифікації досліджуваних низькомолекулярних інгібіторів білка MGMT для покращення їх спорідненості до активного центру білка та пришивати мітки, що направляли б їх в клітини пухлин. При тестуванні виявили кілька потенційних інгібіторів фермента MGMT: сполуки №89, №41, №27. Сполука №41 виглядає найперспективнішою, проте потребує подальших досліджень.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі виявлено низку цис-регуляторних сайтів у промоторній ділянці гена *MGMT* людини та сайтів посттрансляційних модифікацій білка. На клітинних лініях людини *in vitro* показано, що β -естрадіол, прогестерон і інтерферон $\alpha 2\beta$ впливають на експресію *MGMT*. Досліджено інгібувальну активність нових потенційних інгібіторів даного фермента.

1. Методом біоінформатичного аналізу виявлено нові елементи відгуку на гормони у промоторі гена *MGMT* людини. Зокрема, серед них елементи відгуку на низку рецепторів тиреоїдних гормонів та стероїдних гормонів (прогестерон, β -естрадіол і глюкокортикоїди), в тому числі і два вже відомі елементи відгуку на глюкокортикоїди.
2. Показано, що β -естрадіол активує експресію *MGMT* як на рівні мРНК, так і на рівні білка в усіх досліджених клітинних лініях (293, 293Т і MCF7), які експресують мембранний рецептор естрогенів та відрізняються патернами експресії ядерних рецепторів.
3. Вперше виявлено позитивну регуляцію експресії гена *MGMT* прогестероном як у клітинах MCF7 та HEp-2, що експресують ядерний рецептор, так і у клітинах 293, які його не експресують. Усі досліджені клітини експресують мембранний рецептор прогестерона. Отримані дані є підґрунтям для припущення щодо можливої ролі неklasичної регуляції експресії *MGMT* стероїдними гормонами та залучення мембранних рецепторів прогестерона й естрогенів в молекулярних механізмах такої регуляції.
4. Показано інгібувальний ефект рекомбінантного високоочищеного інтерферону $\alpha 2\beta$, синтезованого в трансгенних рослинах *N. benthamiana*, на кількість білка *MGMT* в клітинах *in vitro*. Виявлено, що інгібувальний ефект інтерферону $\alpha 2\beta$ значно виразніший в пухлинних клітинах людини порівняно з клітинами непухлинного походження. Висловлено припущення щодо молекулярного механізму цього впливу, зокрема інгібування інтерфероном $\alpha 2\beta$ позитивного регулятора транскрипції гена *MGMT* - NF- κ B.
5. За результатами біоінформатичного аналізу виявлено найвірогідніші сайти модифікації у амінокислотній послідовності *MGMT*: K132 та K135 для ацетилювання, K63 для SUMOїлування, K209 для убіквітинуювання та T42, S45 й S230 для фосфорилювання (T42 і S45 є відомими сайтами). Модифікація цих сайтів потребує подальших експериментальних досліджень.
6. Досліджено вплив низки нових низькомолекулярних нуклеозидних органічних сполук на кількість фермента *MGMT* людини в клітинах HEp-2 і E8 *in vitro*. Із застосуванням вестерн-блот аналізу виявлено декілька перспективних сполук, що здатні знижувати кількість ферменту.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Нідоєва З.М.**, Яцишина А.П. Вплив прогестерону на експресію гена *MGMT* людини у клітинах MCF7, HEP-2 та 293. Вісник генетиків та селекціонерів. 2021;18(1,2):16-21. (Особистий внесок: власноруч поставлено всі експерименти, обробка та узагальнення результатів експериментів, написання рукопису та подання до друку)
2. **Нідоєва З.М.**, Петерсон А.А., Рубан Т.П., Дзюба Г.В., Кучук М.В., Лукаш Л.Л. Вплив синтезованого в рослинах, рекомбінантного інтерферону $\alpha 2\beta$ на експресію Об-метилгуанін-ДНК метилтрансферази в соматичних клітинах людини *in vitro*. Цитология и генетика. 2019;53(6):36-43. (Особистий внесок: участь в експерименті з культурами клітин, виділення білку та вестерн-блот аналіз, обробка та аналіз результатів досліджень, написання статті та подання до друку)
3. **Нідоєва З.М.**, Яцишина А.П. Регуляція експресії гена *MGMT* естрогеном у клітинах людини *in vitro*. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017;20:79-83. (Особистий внесок: власноруч поставлено всі експерименти, обробка та узагальнення результатів експериментів, написання рукопису та подання до друку)
4. **Нідоєва З.М.**, Самойленко І.О., Підпала О.В., Лукаш Л.Л., Яцишина А.П. Біоінформатичний пошук елементів відгуку на гормони у промоторі гена Об-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза (*MGMT*). Фактори експериментальної еволюції організмів. 2015;17:74-78. (Особистий внесок: проведено біоінформатичний аналіз нуклеотидної послідовності промотора гена *MGMT* людини на наявність потенційних сайтів зв'язування із рецепторами, обробка та узагальнення результатів експериментів, написання рукопису та подання до друку)
5. Яцишина А.П., **Нідоєва З. М.**, Підпала О.В., Лукаш Л.Л. Біоінформативний аналіз потенційних сайтів посттрансляційних модифікацій Об-метилгуанін-ДНК метилтрансферази (*MGMT*) людини. Український біохімічний журнал. 2012;84(6):74-85. (Особистий внесок: проведено біоінформатичний аналіз амінокислотної послідовності білка Об-метилгуанін-ДНК метилтрансферази (*MGMT*) людини на наявність потенційних сайтів пост трансляційних модифікацій, участь у аналізі результатів та написанні статті)
6. Волинець Г.П., Яцишина А.П., Рубан Т.П., Мацевич Л. Л., **Нідоєва З.М.**, Баланда А.О., Бджола В. Г., Ярмолук С. М., Лукаш Л. Л. Застосування сполуки 5-(5-хлоро-2-гідроксibenзиліден)-4-тіоксотіазолідин-2-ону як інгібітора *MGMT*: Патент на винахід № 122373; заявл. 31.01.2019, Опубл. 25.06.2019. (Особистий внесок: виділення білків з клітин, весь Вестерн блот аналіз впливу потенційного інгібітора на кількість *MGMT* у клітинах людини *in vitro*, а також порівняння деплетування репаративного ензиму *MGMT* потенційним інгібітором із Об-БГ).
7. **Нідоєва З.М.**, Яцишина А.П., Волинець Г.П., Рубан Т.П., Мацевич Л.Л., Баланда А.О., Бджола В.Г., Ярмолук С.М., Лукаш Л.Л. Розробка нових низькомолекулярних органічних сполук з інгібувальною дією щодо репаративного ензиму Об-метилгуанін-ДНК метилтрансферази. XII

- Український Біохімічний Конгрес 30 вересня – 4 жовтня 2019, м. Тернопіль. (Опубл. Медична та клінічна хімія. 2019. 21(3) (додаток) ст. 226)
8. **Nidoieva Z.**, Lukash L.L., Iatsyshyna A.P. Steroid hormones as regulators of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) transcription. EMBO Young Scientists Forum 2 - 3 July, Warsaw, Poland (Опубл. в Book of Abstracts, 2015 Page 214)
 9. **Nidoieva Z. M.**, Iatsyshyna A.P., Lukash L.L. Regulation of the O6 -methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) transcription by hormones. Materials of IX Annual Conference of Young Scientist of the Institute of Molecular Biology and Genetics NASU 26-27 may 2015. (Опубл. Biopolym. Cell., 2015, Special Issue 31, 8).
 10. **Nidoieva Z.**, Samoilenko I., Pidpala O., Iatsyshyna A. *In silico* identification of hormone response elements in the promoter region of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) gene. Opening of the Academic Year 2014/2015 at Biocentrum Ochota, Warsaw, Poland, 17-18 october (постерна доповідь)
 11. **Nidoieva Z. M.**, Iatsyshyna A.P., Lukash L.L. Regulation of the O6 -methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) transcription by hormones. Materials of VIII Annual Conference of Young Scientist of the Institute of Molecular Biology and Genetics NASU 20-21 may. (Опубл. Biopolym. Cell., 2014, Special Issue 30, 12).
 12. **Нідоєва З.** Репаративний фермент O6-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза. XIV Всеукраїнська науково-практична конференція «Молодь, освіта, наука, культура і національна самосвідомість в умовах європейської інтеграції» 12-13 травня 2011 в Києві. (Опубл. в Зб. наук. праць, 2011. том 3. с. 95-97)
 13. **Нідоєва З.М.**, Яцишина А.П. Пошук потенційних сайтів посттрансляційних модифікацій білка O6-метилгуанін-ДНК метилтрансферази людини. II Всеукраїнська науково-практична конференція студентів та молодих вчених «Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих наук» Запоріжжя, 2011. (Опубл. в Зб. наук. праць, 2011. том 3. с. 185-187)
 14. **Нідоєва З.М.**, Яцишина А.П., Підпала О.В., Лукаш Л.Л. Білок O⁶-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза людини. Регуляція експресії. V Всеукраїнська науково-практична конференція «Теорія і практика сучасного природознавства» 24-25 листопада 2011 в Херсоні (Опубл. в Зб. наук. праць, 2011. Секція «Хімічні та біохімічні науки і технології», 10)

АНОТАЦІЯ

Нідоєва З.М. Регуляція експресії гена *MGMT* людини біологічно активними речовинами комплексної терапії онкохворих. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.22 «Молекулярна генетика». – Інститут молекулярної біології і генетики Національної Академії Наук України, Київ, 2021.

Робота присвячена вивченню нових шляхів регуляції експресії гена *MGMT* людини стероїдними гормонами і інтерфероном та тестуванню нових потенційних інгібіторів білка *MGMT*. В результаті біоінформатичного аналізу промоторної

ділянки гена *MGMT* виявили цілу низку нових потенційних цис-регуляторних послідовностей. Показано, що β -естрадіол та прогестерон позитивно регулюють експресію досліджуваного гена як на рівні мРНК, так і на рівні кількості білка. Також показано, що трансгенний інтерферон $\alpha 2\beta$ має тенденцію знижувати кількість білку *MGMT* в клітинах, що культивуються *in vitro*, і ця тенденція більш виражена в клітинах пухлинного походження. За допомогою біоінформатичного аналізу виявлено нові потенційні сайти посттрансляційних модифікацій *MGMT*. Досліджено вплив низки нових синтетичних сполук на кількість *MGMT* в клітинах. Отримані результати є важливими як для розуміння механізмів регуляції експресії *MGMT*, так і можуть слугувати підґрунтям для покращення існуючої терапії онкохворих.

Ключові слова: O6-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза (*MGMT*), регуляція транскрипції, біоінформатичний аналіз, посттрансляційні модифікації, прогестерон, β -естрадіол, інтерферон, інгібітори.

SUMMARY

Nidoeva ZM. Regulation of human *MGMT* gene expression by biologically active substances of complex therapy of cancer patients. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, speciality 03.00.22. – *Molecular Genetics*. – *Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.*

The exogenous factors and the endogenous metabolic products can generate reactive species for DNA alkylation, O6-guanine in particular. The enzyme O6-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) protects cells from such disorders. It functions in cells to restore the native DNA structure in a one-step irreversible and suicidal reaction by transferring the alkyl group from the Oxygen in the DNA to a cysteine residue in the catalytic pocket of *MGMT*. This protects cells from cytotoxic, carcinogenic and oncogenic DNA alkylation lesions, allowing preservation and transmission of correct and unaltered genetic information during cell division. An unrepaired O6-methylguanine causes point mutations due to mis-pair with thymine during replication, leading to G: C \rightarrow A: T transition. Significant number of such errors could affect the cell viability and lead to cell death. Therefore, the expression of this protein in cells is crucial.

On the other hand, the *MGMT* expressed in tumor cells limits the effectiveness of alkylating chemotherapy. Thus there is a demand for *MGMT* expression regulators or for the modulators of its protein product activity, and many articles are devoted to this issue every year. It is known that the *MGMT* expression varies considerably, but the reasons for this variation are not well established. It has been shown that the synthetic glucocorticoid dexamethasone, which is used to relieve inflammation and edema in the postoperative period, activates *MGMT* expression. Thus the effectiveness of the concomitant or subsequent alkylating chemotherapy is significantly reduced. It is unknown how the other drugs used in the cancer treatment influence on the *MGMT* expression.

Combination of the chemotherapy and the hormone- and immunotherapy is widely-used for the treatment of many types of cancer. However, a little is known about effects of these drugs on the *MGMT* expression. Therefore, we analysed the *MGMT* promoter

region for the *cis*-regulatory elements. We predicted novel potential hormone response elements, including such for steroid hormones and thyroid hormone receptor-like factors. The first to be tested are estrogen response elements and progesterone response elements, as these hormones are important in the treatment of hormone-sensitive tumors. Therefore, the knowledge about the effect of these hormones on the MGMT as one of the alkylating chemotherapy limiting factor could help to plan the correct and effective treatment for the patient.

We found that both β -estradiol and progesterone positively regulate MGMT expression *in vitro* on mRNA and protein level. However, we cannot provide a clear answer as to whether this regulation occurs through the *cis*-regulatory element in the promoter or through the membrane receptor. This question needs further study.

We investigated the influence of the recombinant interferon $\alpha 2\beta$ synthesized in transgenic plants *N. benthamiana* on MGMT quantity in both cancer (HEp-2) and non-cancer (E8) originated human cells. We found that the interferon $\alpha 2\beta$ tended to reduce the amount of MGMT protein in all the cells studied. However, compared to tumor HEp-2 cells, this effect was weaker in E8 cells and was observed only at the two highest interferon concentrations (200 and 2000 IU / ml). Thus, we first identified inhibitory effect of the recombinant interferon $\alpha 2\beta$ (synthesized in plants *N. benthamiana*) on the expression of the DNA repair enzyme MGMT in human cells. We revealed that the effect of inhibition by interferon $\alpha 2\beta$ was stronger in cancer cells than in non-cancer cells.

We proposed a mechanism of this effect. In particular, interferon $\alpha 2\beta$ inhibits MGMT through NF- κ B transcription factor, which positively regulates the *MGMT* expression through the response element in the promoter.

To limit the tumor cell resistance to chemotherapy it is possible not only affect the MGMT protein or mRNA amount, but also the activity of the enzyme itself. So, by using bioinformatics we investigated the possibility to alter the MGMT protein activity by certain post-translational modifications. We found numerous potential sites of acetylation, ubiquitination, SUMOylation, and phosphorylation within the protein molecule.

Also another promising method for reducing the MGMT amount in tumor cells during chemotherapy is the use of enzyme inhibitors. O6-benzylguanine and O6 (4-bromothienyl) guanine (Lomeguatrib) in combination with various alkylating agents are undergoing stage II and III clinical trials to treat temozolomide- or carmustine-resistant tumors. However, these inhibitors have toxic side effects, so the development and testing of new less toxic inhibitors are relevant. Therefore, we investigated a number of low molecular weight non-nucleoside organic compounds (designed and synthesized in the Department of Biomedical Chemistry of the Institute of Molecular Biology and Genetics of NASU) for their ability to reduce the amount of MGMT enzyme in cells *in vitro* and identified some of the most promising potential MGMT inhibitors.

Key words: O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), regulation of transcription, bioinformatic analysis, post-translational modification, progesterone, β -estradiol, interferon, inhibitors.