

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

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**НІДОЄВА ЗАРІНА МАНЗАРШІВНА**

УДК 577.218

577.113

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

03.00.22 – молекулярна генетика

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ **З.М. Нідосєва**

Науковий керівник: **Яцишина Анна Петрівна**, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник.

Київ – 2021

## АНОТАЦІЯ

**Нідосва 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.*

Вплив зовнішніх факторів і внутрішніх продуктів метаболізму створюють сприятливе середовище для алкілування ДНК [1], зокрема атомів Об-гуаніну. Захист клітини від такого пошкодження здійснює фермент Об-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза (*MGMT*). Його функція в клітині полягає у відновленні нативної структури ДНК в ході необоротної та суїцидальної реакції перенесення алькільного залишку з Об-гуаніну ДНК на свій залишок цистеїну в активному центрі фермента. Це захищає клітини від такого цитотоксичного, канцерогенного та онкогенного пошкодження, як алкілування ДНК, збереження та передачу правильної, незміненої генетичної інформації при поділі клітин. Нерепарований Об-метилгуанін є причиною точкових мутацій через невідповідне спарювання з тиміном під час реплікації, що призводить до трансзиції G:C → A:T [2]. Значна кількість таких помилок негативно впливає на життєздатність клітини та може призводити до її смерті [3]. Тож експресія цього білка в клітинах є дуже важливою.

З іншого боку, в клітинах пухлин *MGMT* обмежує ефективність алкілувальної хіміотерапії. Тому йде пошук факторів, що впливають на експресію *MGMT* або на модуляцію активності його білкового продукту, цьому питанню щорічно присвячується немало статей. Відомо, що експресія *MGMT* значно варіює, проте причини такої варіації точно не встановлені. Показано, що синтетичний глюкокортикоїд дексаметазон, який використовується для зняття запалень та набряків в післяопераційний період, спричиняє зростання рівня експресії *MGMT* в клітинах [4], тому одночасне або наступне використання

алкілувальної хіміотерапії буде малоефективним. Вплив інших препаратів, що використовуються при терапії низки онкозахворювань, на рівень експресії даного гена не відомий.

Щоб дізнатися, чи можуть речовини, які використовуються при гормоно- та імунотерапії, впливати на експресію гена *MGMT*, ми дослідили його промоторну ділянку на наявність цис-регуляторних послідовностей. Ми виявили нові потенційні елементи відгуку, зокрема на стероїдні гормони та на низку рецепторів інших біологічно активних речовин. Найпершими для перевірки є елементи відгуку на естрогени та прогестерон, оскільки ці гормони є важливими при лікуванні гормоночутливих пухлин. Тож дані щодо їх впливу на один із обмежуючих факторів алкілувальної хіміотерапії може допомогти в плануванні коректної ефективної терапії пацієнта.

Перевіряючи вплив цих гормонів на експресію *MGMT in vitro*, ми виявили що і  $\beta$ -естрадіол, і прогестерон позитивно регулюють як кількість транскрипту даного гена, так і кількість білкового продукту. Проте надати чітку відповідь, чи дана регуляція відбувається через елемент відгуку в промоторі чи через мембранний рецептор, ми наразі не можемо і це питання потребує подальших досліджень.

Ми також перевірили вплив рекомбінантного інтерферону  $\alpha 2\beta$ , синтезованого в трансгенних рослинах *N. benthamiana*, на кількість білку *MGMT* в клітинах лінії E8 непухлинного походження та у клітинах HEp-2 пухлинного походження. Ми виявили тенденцію даного інтерферону знижувати кількість білка *MGMT* в досліджених клітинах, проте порівняно з клітинами пухлинного походження HEp-2, даний ефект в клітинах E8 був слабкішим і спостерігався лише при двох найбільших із досліджених концентрацій інтерферону 200 та 2000 МО/мл. Таким чином, нами вперше виявлено інгібувальний ефект рекомбінантного інтерферону  $\alpha 2\beta$ , синтезованого у рослинах *N. benthamiana*, на експресію репаративного ензиму *MGMT* в клітинах людини й встановлено, що цей інгібувальний ефект був виразнішим у пухлинних клітинах порівняно з клітинами непухлинного походження.

Ми запропонували механізм такого ефекту через вплив інтерферону на транскрипційний фактор NF- $\kappa$ B, який позитивно регулює експресію *MGMT* через елемент відгуку в промоторі [5].

Оскільки, щоб подолати ефект резистентності клітин пухлини до хіміотерапії, можна не лише впливати на кількість білка чи мРНК, але й на активність самого фермента, ми біоінформатично дослідили також потенційну можливість зміни активності білка *MGMT* за рахунок певних післятрансляційних модифікацій. Ми виявили численні потенційні сайти ацетилювання, убіквітинування, SUMOїлування та фосфорилювання.

Також ще одним перспективним методом зниження кількості *MGMT* в клітинах пухлин при хіміотерапії є використання інгібіторів цього ферменту. Об-бензилгуанін та Об(4-бромотієніл)гуанін (Lomeguatrib) в поєднанні з різними алкілувальними речовинами проходять II, III стадії клінічних досліджень в лікуванні стійких до темозоломідів чи кармустину пухлин [6,7,8]. Проте ці інгібітори мають токсичні побічні впливи, тож розробка та тестування нових, менш токсичних інгібіторів є актуальними. Тож ми дослідили низку низькомолекулярних нуклеозидних органічних сполук (розроблені і синтезовані у відділі біомедичної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ) щодо їх здатності зменшувати кількість ферменту *MGMT* в клітинах *in vitro* та виявили декілька найперспективніших потенційних інгібіторів *MGMT*.

**Ключові слова:** Об-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза (*MGMT*), регуляція транскрипції, біоінформатичний аналіз, післятрансляційні модифікації, прогестерон,  $\beta$ -естрадіол, інтерферон  $\alpha 2\beta$ , інгібітори.

#### **Список публікацій здобувача:**

##### **Статті у наукових фахових виданнях:**

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 здобувача – власноруч

поставлено всі експерименти, обробка та узагальнення результатів експериментів, написання рукопису та подання до друку)

2. **Нідосва З.М.**, Петерсон А.А., Рубан Т.П., Дзюба Г.В., Кучук М.В., Лукаш Л.Л. Вплив синтезованого в рослинах, рекомбінантного інтерферону  $\alpha 2b$  на експресію Об-метилгуанін-ДНК метилтрансферази в соматичних клітинах людини *in vitro*. Цитология и генетика. 2019. 53(6): 36-43. (Особистий внесок здобувача – участь в експерименті з культурами клітин, виділення білку та вестерн-блот аналіз, обробка та аналіз результатів досліджень, написання статті та подання до друку)

3. **Нідосва 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 здобувача – власноруч поставлено всі експерименти, обробка та узагальнення результатів експериментів, написання рукопису та подання до друку)

4. **Нідосва 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 здобувача – 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., **Нідосва 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 здобувача – 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)

## Патент

6. Волинець Г.П., Яцишина А.П., Рубан Т.П., Мацевич Л. Л., **Нідоєва З.М.**, Баланда А.О., Бджола В. Г., Ярмолюк С. М., Лукаш Л. Л. Застосування сполуки 5-(5-хлоро-2-гідроксибензиліден)-4-тіоксотіазолідин-2-ону як інгібітора MGMT: Патент на винахід № 122373; заявл. 31.01.2019, Опубл. 25.06.2019. (Особистий внесок здобувача – 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).

## Тези наукових доповідей на конференціях

7. **Нідоєва З.М.**, Яцишина А.П., Волинець Г.П., Рубан Т.П., Мацевич Л.Л., Баланда А.О., Бджола В.Г., Ярмолюк 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 Ob-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 Ob - 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 Ob-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 O<sup>6</sup>-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 O<sup>6</sup>-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 післятрансляційних модифікацій білка O<sup>6</sup>-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. с. 185-187)

14. **Нідоєва З.М., Яцишина А.П., Підпала О.В., Лукаш Л.Л.** Білок O<sup>6</sup>-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)

## 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 [1], 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 → A: T transition [2]. Significant number of such errors could affect the cell viability and lead to cell death [3]. 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 [4]. 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  $\beta$ -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- $\kappa$ B transcription factor, which positively regulates the MGMT expression through the response element in the promoter [5].

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-bromothieryl) guanine (Lomeguatrib) in combination with various alkylating agents are undergoing stage II and III clinical trials to treat temozolomide- or carmustine-resistant tumors [6,7,8]. 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,  $\beta$ -estradiol, interferon, inhibitors.

### **List of scientific publications published on the topic of the dissertation:**

#### **Articles:**

1. **Nidoieva Z. M.**, Iatsyshyna A. P. Effect of progesterone on the MGMT gene expression in MCF7, HEP-2 and 293 cells. The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine. 2021. 18(1,2): 16-21.
2. **Nidoieva Z.M.**, Peterson A.A., Ruban T.P., Dzuba G.V., Kuchuk M.V., Lukash L.L. The influence of recombinant interferon  $\alpha 2\beta$  synthesized in plants on the reparative enzyme MGMT expression in human somatic cells *in vitro*. Cytology and Genetics. 2019. 53(6): 36-43.
3. **Nidoieva Z. M.**, Iatsyshyna A. P. Human *MGMT* expression is regulated by estrogen *in vitro*. Factors in Experimental Evolution of Organisms. 2017. 20: 79-83.

4. **Nidoieva Z.M.**, Samoilenko I.O., Pidpala O.V., Lukash L.L., Iatsyshyna A.P. Bioinformatic search of hormone response elements within the human O6-Methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) gene promoter. Factors in Experimental Evolution of Organisms. 2015. 17: 74-78.

5. Iatsyshyna A.P., **Nidoieva Z.M.**, Pidpala O.V., Lukash L.L. Bioinformatic analysis of potential post -translational modification sites of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) protein. The Ukrainian Biochemical Journal. 2012. 84(6): 74-85.

#### **Patent:**

6. Volynets G.P., Iatsyshyna A. P., Ruban T.P., Macewicz L.L., **Nidoieva Z.M.**, Balanda A.O., Bdzhola V.G., Yarmoluk S.M., Lukash L.L. Use of 5-(5-chloro-2-hydroxybenzylidene) -4-thioxothiazolidin-2-one as an *MGMT* inhibitor: Patent for invention № 122373; application. 31.01.2019, publication. 25.06.2019.

#### **Conference abstracts:**

7. **Nidoieva Z.M.**, Iatsyshyna A. P., Volynets G.P., Ruban T.P., Macewicz L.L., Balanda A.O., Bdzhola V.G., Yarmoluk S.M., Lukash L.L. Development of new low molecular weight organic compounds with inhibitory effect on the reparative enzyme O6-methylguanine-DNA methyltransferase. XII UKRAINIAN BIOCHEMICAL CONGRESS September 30 – October 4, 2019, Ternopil XII (published: Medical and Clinical Chemistry. 2019. 21(3) (annex) p. 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 (published: 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. (published: Biopolym. Cell., 2015, Special Issue 31, 8).

10. **Nidoieva Z.**, Samoylenko 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 (poster)

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. (published: Biopolym. Cell., 2014, Special Issue 30, 12).

12. **Nidoieva Z.M.** Reparative enzyme O6-methylguanine-DNA methyltransferase. XIV All-Ukrainian scientific-practical conference "Youth, education, science, culture and national identity in the context of European integration" 12-13 May 2011, Kyiv (published: Collection of scientific works, 2011. 3. p. 95-97)

13. **Nidoieva Z.M.**, Iatsyshyna A.P. Bioinformatic search for potential posttranslational modifications of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase protein. II All-Ukrainian scientific-practical conference of students and young scientists "Actual problems and development prospects of natural sciences" Zaporizhzhia (published: Collection of scientific works, 2011. – p. 185-187)

14. **Nidoieva Z.M.**, Iatsyshyna A.P., Pidpala O.V., Lukash L.L O6-methylguanine-DNA human methyltransferase protein. Regulation of expression. V All-Ukrainian scientific-practical conference "Theory and practice of modern natural sciences " 24-25 November, 2011 in Kherson (published: Collection of scientific works, 2011. Section "Chemical and biochemical sciences and technologies", 10)

**ЗМІСТ**

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	17
ВСТУП	19
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	26
1.1. Репарація пошкоджень ДНК	27
1.1.1. Пряма репарація пошкоджень ДНК	27
1.1.2. Роль алкілтрансфераз і алкілтрансферазоподібних білків в репарації ДНК	28
1.1.3. Структура та механізм репарації алкілованої ДНК за допомогою ферменту MGMT ссавців	32
1.1.4. Роль MGMT в захисті клітини від токсичного, мутагенного та онкогенного впливу Об-алкілгуаніну	38
1.2. Варіація експресії MGMT ссавців та її регуляція	39
1.2.1. Епігенетична регуляція MGMT	39
1.2.2. Генетична регуляція MGMT	48
1.3. Комплексна терапія онкохворих	52
1.3.1. Інтерферони в терапії раку та MGMT	52
1.3.2. Вплив гормональних препаратів на експресію гена MGMT	54
1.3.3. Регуляція активності MGMT інгібіторами	56
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	59
2.1. Клітинні лінії та культивування клітин.	59
2.2. Обладнання	59

2.3. Обробка клітин біологічно активними речовинами	60
2.3.1. Обробка клітин гормонами.	60
2.3.2. Обробка клітин інтерфероном $\alpha 2\beta$	60
2.3.3. Обробка клітин новими потенційними інгібіторами MGMT в порівнянні із вже відомим інгібітором Об -БГ	61
2.4. Дослідження цитотоксичності сполук <i>in vitro</i> . МТТ-тест.	61
2.5. Молекулярно-генетичні методи	61
2.5.1. Виділення тотальної РНК із клітин.	61
2.5.2. Синтез кДНК.	62
2.5.3. Підбір референсних генів.	62
2.5.4. ПЛР у реальному часі.	63
2.5.5. Електрофоретичне розділення та візуалізація продуктів ПЛР у поліакриламідному гелі (ПААГ).	63
2.5.6. Електрофоретичне розділення продуктів ПЛР в агарозному гелі.	64
2.5.7. Виділення білкових лізатів	64
2.5.8. Білковий електрофорез.	64
2.5.9. Трансфер.	65
2.5.10. Вестерн-блот аналіз.	65
2.6. Біоінформатичний аналіз	66
2.6.1. Аналіз нуклеотидних послідовностей <i>in silico</i> .	66
2.6.2. Дизайн олігонуклеотидів-праймерів.	67

2.6.3. Біоінформативний аналіз потенційних сайтів післятрансляційних модифікацій MGMT людини.	67
2.6.3. Статистичний аналіз	67
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ	69
3.1. Біоінформатичний пошук елементів відгуку на гормони у промоторній ділянці гена <i>MGMT</i> людини	69
3.2. Експресія генів ядерних рецепторів у досліджуваних клітинах та підбір концентрацій гормонів	78
3.3. Регуляція експресії гена <i>MGMT</i> $\beta$ -естрадіолом	82
3.4. Регуляція експресії гена <i>MGMT</i> прогестероном	86
3.5. Вплив синтезованого в рослинах рекомбінантного інтерферону $\alpha 2b$ на експресію <i>MGMT</i>	89
3.6. Регуляція активності білка <i>MGMT</i> за рахунок післятрансляційних модифікацій.	93
3.6.1. Відомі білкові партнери та сайти післятрансляційних модифікацій білка <i>MGMT</i> людини	93
3.6.2. Пошук нових сайтів ацетилювання та метилювання <i>MGMT</i> людини	95
3.6.3. Аналіз білкової молекули <i>MGMT</i> на можливість SUMOїлування	97
3.6.4. Детекція сайтів убіквітинування	98
3.6.5. Пошук нових сайтів фосфорилювання	100
3.7. Дослідження здатності потенційних інгібіторів <i>MGMT</i> деплетувати його кількість	109

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	114
ВИСНОВКИ	124
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	126
ДОДАТКИ	141



**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

MGMT – O6-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза

O6-БГ – O6-бензилгуаніна

HREs – hormone response elements – елементи відгуку на гормони

GREs – glucocorticoid response elements – елементи відгуку на глюкокортикоїди.

PREs – progesterone response elements – елементи відгуку на прогестерон

EREs – estrogen response elements – елементи відгуку на естрогени

SHBG – Sex hormone-binding globulin – глобулін, що зв'язує статеві гормони

INF  $\alpha 2\beta$  – інтерферон  $\alpha 2\beta$

SUMO – small ubiquitin-related modifier – малий модифікатор, схожий на убіквітин

A – аланін

C – цистеїн

F – фенілаланін

G – гліцин

I – ізолейцин

K – лізин

L – лейцин

M – метіонін

H – гістамін

N – аспарагін

N – аспарагінова кислота

P – пролін

Q – глютамін

R – аргінін

S – серин

T – треонін

V – валін

W – триптофан

Y – тирозин

aa – amino acid, амінокислоти

ОНП – одиночний нуклеотидний поліморфізм

СПС- мотив – «спіраль-поворот-спіраль» ДНК-зв'язуючий мотив

ПААГ – поліактиламідний гель

кПЛР – кількісна полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі

## ВСТУП

**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 [1], 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 [2]. 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 як у клітинах одного організму у різних тканинах, так і міжіндивідуально, проте молекулярні механізми такої варіації точно не встановлені. Одним із механізмів регуляції транскрипції є зв'язування комплексу ядерний рецептор - гормон із відповідною ділянкою промотора гена. На сьогодні відомо лише про позитивну регуляцію транскрипції гена *MGMT* синтетичним глюкокортикоїдом дексаметазоном [4], 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* [9, 10]. 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 [8, 11, 12], 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)гуаніна, проте ці інгібітори є високотоксичними [6, 7, 8] 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.

Отже, 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 ( $\beta$ -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  $\beta$ -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, ретиноєвий орфановий рецептор, вітамін D, ретиноєва кислота, ретиноїд X та рецептор активації проліферації пероксисом). Продемонстровано, що  $\beta$ -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- $\kappa$ 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 глибше вивчити регуляцію експресії гена через відповідні ліганди. Зокрема, передбачені елементи відгуку на гормони дозволять розширити наші знання про залучення гормонів різної природи до регуляції експресії даного гена. Визначення ролі гормонів естрогену та прогестерону у регуляції експресії гена *MGMT* дозволить розширити наші знання про механізми модуляції його експресії при комплексній терапії онкохворих із залученням гормонотерапії, що може сприяти розробці нових терапевтичних підходів для лікування пацієнтів. 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 післятрансляційних 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 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.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Генетичний матеріал клітини постійно зазнає впливів зовнішніх та внутрішніх факторів, що створюють сприятливе середовище для алкілювання ДНК за багатьма атомами [1]. Алкілювання атома О6-гуаніну та атома О4-тиміну є мутагенним та цитотоксичним для клітин [3]. Захист організму від негативної дії О6-алкілгуаніну та О4-алкілтиміну здійснює фермент О6-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза (MGMT; EC 2.1.1.63), що репарує дані пошкодження. Таким чином, MGMT забезпечує захист клітин від алкілювання ДНК, збереження та передачу правильної, неушкодженої генетичної інформації при мітозі та мейозі. З іншого боку даний фермент, експресуючись у клітинах пухлин, обмежує ефективність алкілувальної хіміотерапії, що спрямована на їхнє знищення. Саме в цьому полягає важливість вивчення факторів, що впливають на рівень експресії *MGMT* в клітині та на активність даного ферменту.

Рівень експресії *MGMT* варіює в широких межах як у клітинах одного організму в різних тканинах, так і міжіндивідуально. Ймовірно, така варіація обумовлена складною регуляцією експресії гена *MGMT* людини.

Регуляція експресії гена *MGMT* людини відбувається на двох рівнях – генетичному та епігенетичному.

Генетична регуляція зумовлена послідовністю нуклеотидів регуляторної та білоккодувальної ділянок гена. До неї належать мутації, одиночні нуклеотидні поліморфізми та цис-регуляторні елементи в промоторі гена та інших його послідовностях. На епігенетичному рівні регулюються зміна структури хроматину, метилування промотора та тіла гена, трансляція та активність і функції білка за рахунок післятрансляційних модифікацій.

Відомі на сьогодні дані про регуляцію експресії гена *MGMT* не пояснюють значної варіації в транскрипції даного гена та активності ензиму. Тому вивчення молекулярних механізмів регуляції *MGMT* має не лише важливе фундаментальне

значення, а й практичне для застосування в клініці при лікуванні онкохворих пацієнтів.

### **1.1. Репарація пошкоджень ДНК**

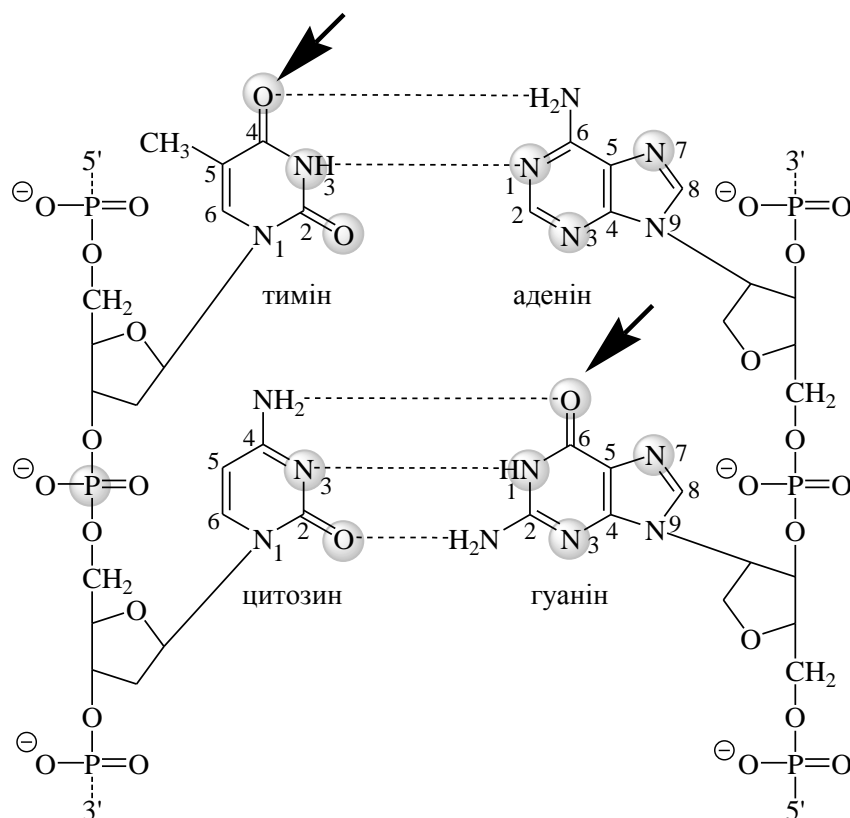
Протягом життя клітини ДНК зазнає впливу багатьох стресових чинників. Різноманітні ендогенні фактори, наприклад, продукти метаболізму, та екзогенні, серед яких зовнішні токсини, іонізуюче випромінювання, препарати хіміотерапії, призводять до пошкоджень ДНК. У ссавців відомі різні шляхи репарації ДНК: пряма репарація, репарація помилково спарених основ, ексцизійна репарація пошкоджених нуклеотидів та ексцизійна репарація пошкоджених основ, а також репарація дволанцюгових розривів ДНК і поперечних зшивок шляхом гомологічної рекомбінації та негомологічного з'єднання кінців ДНК.

**1.1.1. Пряма репарація пошкоджень ДНК.** При прямій репарації пошкодження ДНК виправляються шляхом прямого вилучення алкільного адукту з ДНК. Це, ймовірно, найефективніший механізм репарації, тому що він здійснюється без вирізання пошкодженої азотистої основи та її заміни, а отже й без потреби її повторного синтезу. Наприклад, пряма репарація за допомогою MGMT відрізняється від інших шляхів репарації наступними особливостями:

1. MGMT може діяти самостійно, тобто без залучення інших ферментів;
2. MGMT є і трансферазою, і акцептором алкільної групи;
3. MGMT є суїцидальним білком (інактивується після виправлення пошкодження);
4. MGMT каталізує стехіометричну репарацію [13].

Отже, для захисту нативної структури ДНК у клітині є різні системи репарації, проте пряма репарація є однією із найефективніших.

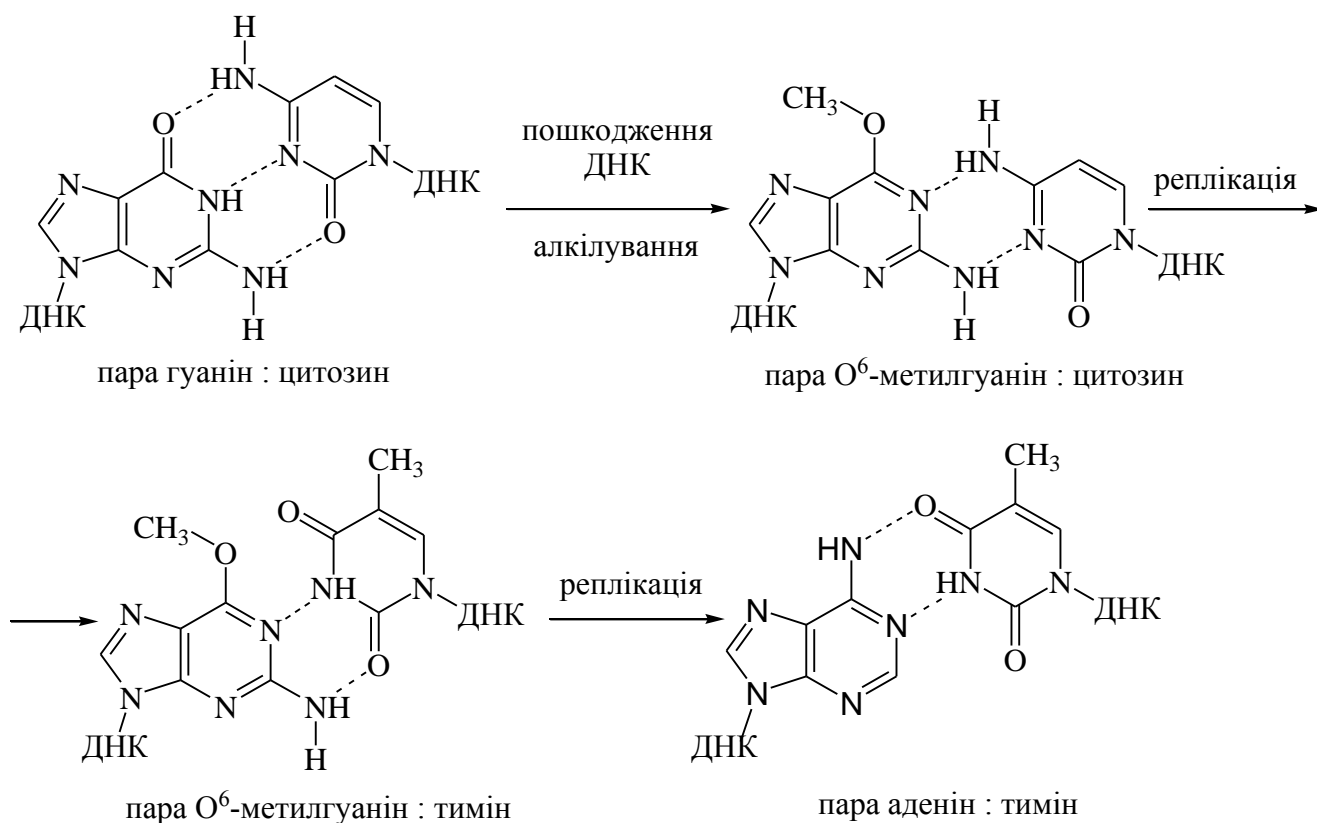
**1.1.2. Роль алкілтрансфераз і алкілтрансферазоподібних білків в репарації ДНК.** Геном кожного організму постійно зазнає атак з боку як екзогенних, так і ендогенних факторів. Токсичні речовини навколишнього середовища, наприклад, тютюнового диму, їжі та внутрішні продукти метаболізму створюють сприятливе середовище для алкілування ДНК по багатьох атомах [1; 3]. Серед сайтів алкілування азотистих основ в ДНК аденін, алкілований по атому N1, гуанін, алкілований по атомах N1 та O6, цитозин, алкілований по атому N3, та тимін алкілований по атомах N3 та O4 (рис. 1.1.). Однак один із найтоксичніших ефектів виявляється при алкілуванні гуаніну [1], незважаючи на мінорність такого пошкодження. Дане пошкодження виправляється за допомогою білка MGMT.



**Рис. 1.1.** Численні сайти алкілування ДНК (адаптовано з [1]), сайти репарації MGMT помічені стрілками. Об-алкілгуанін є основним субстратом фермента, тоді як репарація O4-алкілтиміну є значно повільнішою

У клітинах пошкодження нативної структури ДНК негативно впливає на процеси життєдіяльності та може призвести до апоптозу, тому мають постійно

репаруватися для збереження цілісності геному. Проте дане явище знайшло практичне застосування в лікуванні онкологічних захворювань. При використанні алкілувальної хіміотерапії ракові клітини атакуються алкілувальними сполуками, що призводять до значної кількості пошкоджень та апоптозу тих клітин, які діляться [3]. Хіміотерапія токсична для клітин, що активно діляться, оскільки вони не встигають виправляти пошкодження ДНК та інших полімерів та накопичують їх. Тому окрім ракових уражаються також й інші клітини, які активно діляться, в тому числі і гематопоетичні клітини та ін. Об-метилгуанін є причиною точкових мутацій внаслідок неправильного спарювання з тиміном під час реплікації, що призводить до трансзиції G:C  $\rightarrow$  A:T (рис. 1.2.) [2]. Даний процес є мутагенним та цитотоксичним [3]. Тому для нормальних клітин важлива своєчасна репарація, що відбувається в тому числі і з залученням білка прямої репарації MGMT.



**Рис. 1.2.** Спрощена схема появи трансзиції G:C  $\rightarrow$  A:T, спричинена Об-метилгуаніном. При реплікації ДНК Об-метилгуанін помилково спарюється із тиміном

Пошкодження ДНК, спричинені алкілуванням, репаруються ферментами-алкілтрансферазами. Спочатку було описано два білки, що мали алкілтрансферазну активність та були виділені з бактеріальних клітин, зокрема *ada* та *ogt* [14,15]. Першою детально вивченою була алкілтрансфераза, отримана при клонуванні та секвенуванні гена *ada* *E. coli*. Білковий продукт даного гена складається з двох доменів, розділених чутливою до протеаз ділянкою. При обробці малими дозами трипсину відбувається розпад *ada* на домени, внаслідок чого було виявлено, що С-кінцевий домен є акцептором метильних груп Об-метилгуаніну. В геномі *E. coli* також виявлено ген *ogt*, що кодує білковий продукт, здатний репарувати Об-алкілгуанін і О4-алкілтимін та має значний рівень гомології з С-кінцевим доменом *ada* (до 29%) (рис. 1.3.) [14]. На сьогодні відомий лише один гомолог *ogt* людини – алкілтрансферазний ген *MGMT* [15].

Алкілтрансферази широко поширені в організмах, відомі гомологи з еубактерій, архей та еукаріот (рис. 1.3.) [16]. Проте досі жодного алкілтрансферазного гена не виділено з рослинних організмів, *Schizosaccharomyces pombe* та *Deinococcus radiodurans* [16]. Натомість в даних організмах знайдено алкілтрансферазоподібні білки, що виявляють значний рівень подібності до амінокислотної послідовності відомих алкілтрансфераз, проте там, де мав би бути цистеїн активного центру, знаходиться залишок іншої амінокислоти, здебільшого, триптофану [17]. Показано, що алкілтрансферазоподібні білки теж зв'язуються із Об-алкілгуаніном. Проте після зв'язування субстрату ДНК, алкілтрансферазоподібні білки не виявляють алкілтрансферазної, ендонуклеазної чи глікозилазної ензиматичної активності, тому надалі утворений комплекс видаляється із залученням ексцизійної репарації нуклеотидів [18].

Вивчення та порівняння структури алкілтрансфераз, отриманих з різних організмів, зокрема людини, *E. coli*, археобактерії *Pyrococcus kodakaraensis* та термофіла *Methanococcus jannaschii*, дозволило встановити значну гомологію даних алкілтрансфераз, зокрема 14% амінокислотної послідовності ідентичні між собою та 26% – схожі (рис. 1.3.). Та попри це загальна топологічна структура

мотивів та складок залишається майже ідентичною [3]. Алкілтрансферазні білки містять 25 високоспецифічних залишків, на яких зосереджена увага для вивчення структурної та біохімічної природи білка. Більшість з них беруть участь у зв'язуванні ДНК, полегшенні трансферу алкільної групи та підтриманні структури MGMT (рис. 1.3.) [3].

	160	170	180	190
Homo_sapiens	KATRAVGGAMRGNPVPILIP	CHR	VVCSSGAVGNYSGG	
Canis_familiaris	KAARAVGGAMRSNPVPILIP	CHR	VVCSSGAMGNVTGG	
Cricetulus_griseus	KAARAVGGAMRNNPVPILIP	CHR	VICSNGSIGNYSGG	
Cricetus_cricetus	KAARAVGGAMRNNPVPILIP	CHR	VICSNGSIGNYSGG	
Drosophila_melanogaster	TAVRAVASAVAKNELAILIP	CHR	VVSQNGASK.YHWG	
Mus_musculus	KAARAVGGAMRSNPVPILIP	CHR	VVRSDGAIGHYSGG	
Oryctolagus_cuniculus	KAARAVGGAMRSNPVPILIP	CHR	VICSSSGAVGNYSGG	
Rattus_norvegicus	KAARAVGGAMRSNPVPILIP	CHR	VIRSDGAIGNYSGG	
Xenopus_laevis	KAVRAVGGAMRSNPIPILIP	CHR	VICSNGSLGNYIGG	
Xenopus_tropicalis	KAVRAVGGAMRNNPVPILIP	CHR	VICSNGSVGNYIGG	
Saccharomyces_cerevisiae	TAARSVGRACGSNNLALLVP	CHR	IVGSNRKLTGYKWS	
Aquifex_aeolicus	LHPRFVGYCKINPFPV IIP	CHR	VISKR.DLGGFNQG	
Bacillus_subtilis	AAVRAVGA AIGANPVLITVP	CHR	VIGKNGSLTGYRGG	
Enterobacter_cloacae	GAARAVGAANGSNPVSIVVP	CHR	VIGRNGTMTGYAGG	
Escherichia_coli	KAVRAVASACAANKLAI IIP	CHR	VVRGDGTLGTYRGG	
Helicobacter_pylori	KSCRAIGNANRNNPISLIVP	CHR	VVRKNGALGGYNGG	
Listeria_monocytogenes	TASRAVARANGANQLSLIVP	CHR	VINTNGALGGYGGG	
Methanocaldococcus_jannaschii	TSPRAVGMALKRNPLPLI IIP	CHR	VVAKN.SLGGYSYG	
Methanococcoides_burtonii	KAVRAVGA AIGANPISTI IIP	CHR	VSSSGKLTGFSSG	
Mycobacterium_avium	GAARAVGLANGHNP IAI VVP	CHR	VIGASGKLTGYGGG	
Pseudoalteromonas_tunicata	KAVRAVGGANGRNPLTI IVP	CHR	VIGANGKLTGYAGG	
Pseudomonas_aeruginosa	NAVRAVGAANGRNPLSIVAP	CHR	VIGASGGLTGFAGG	
Pseudomonas_fluorescens	TAVRAVGAANGRNPI SIVAP	CHR	VIGASGSLTGFAGG	
Pseudomonas_putida	RAVRAVGAANGRNPI SIVAP	CHR	VIGASGSLTGFAGG	
Salmonella_enterica	GAARAVGAANGANPI SIVVP	CHR	VIGRNGTTLTGYAGG	
Salmonella_typhimurium	TAVRAVASACGANKLAMVIP	CHR	VVRDGLSGYRGG	
Thermococcus_kodakarensis_KOD1	TSPRAVGGAMKRNPYP IVP	CHR	VVAHD.GIGYYSSG	
Vibrio_cholerae	KAVRAVGLANGKNPISI IVP	CHR	VVGKNGQLTGYAGG	

ДНК-зв'язувальний РСНР-мотив із  
мотив активним сайтом

**Рис. 1.3.** Гомологія ДНК-зв'язувального та активного доменів алкілтрансфераз різних організмів. Жовтим виділено «аргініновий палець» R 159, аспарагіновий шарнір N168 та активний сайт C 176 (за [3])

Таким чином, алкілтрансферази – висококонсервативні білки, що здійснюють пряму репарацію в організмах багатьох видів про- та еукаріот, захищаючи від впливу мінорного, проте цитотоксичного та мутагенного Об-алкілгуаніну. В рослинних клітинах замість алкілтрансфераз зустрічаються алкілтрансферазоподібні білки, що також зв'язують Об-алкілгуанін, але надалі

видалення пошкоджень здійснює система ексцизійної репарації пошкоджених нуклеотидів.

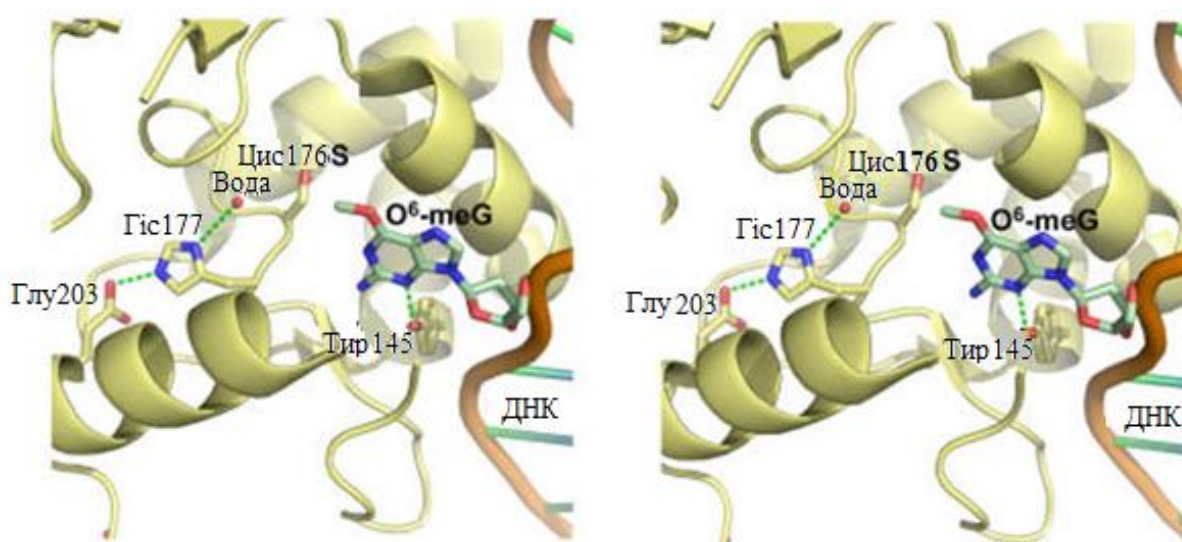
**1.1.3. Структура та механізм репарації алкілованої ДНК за допомогою ферменту MGMT ссавців.** Головний компонент родини ферментів прямої репарації в клітинах ссавців – білок алкілтрансфераза, що переміщує алкільну групу з O6-позиції гуаніну і, рідше, з O4-позиції тиміну на власний залишок цистеїну в активному центрі. В організмі людини пряму репарацію здійснює фермент MGMT (NP\_002403.2, 238 амінокислот).

Алкілтрансферази мають в своєму складі N-кінцевий та C-кінцевий домени. N-кінцевий домен (залишки амінокислот приблизно 1-116) не має характерної гомології у первинній структурі серед білків людини, бактерій, архебактерій та термофілів, але характеризується  $\alpha/\beta$  складчастою структурою. Проте усі ці білки мають триланцюгові антипаралельні  $\beta$ -складки та дві чи три спіралі. Таким чином, вторинна структура даного домену маловаріативна щодо довжини та орієнтації [3].

Топологія C-кінцевого домену абсолютно подібна у всіх відомих структурах алкілтрансфераз. Цей домен (залишки приблизно 116 – 238) складається з короткої дволанцюгової паралельної  $\beta$  – складки, чотирьох  $\alpha$ -спіралей та 3<sub>10</sub> спіралі. Цей домен містить в собі активний сайт із PCHR-мотивом, O6-алкілгуанінозв'язувальний канал та «спіраль-поворот-спіраль» (СПС) ДНК-зв'язувальний мотив (рис. 1.4.).

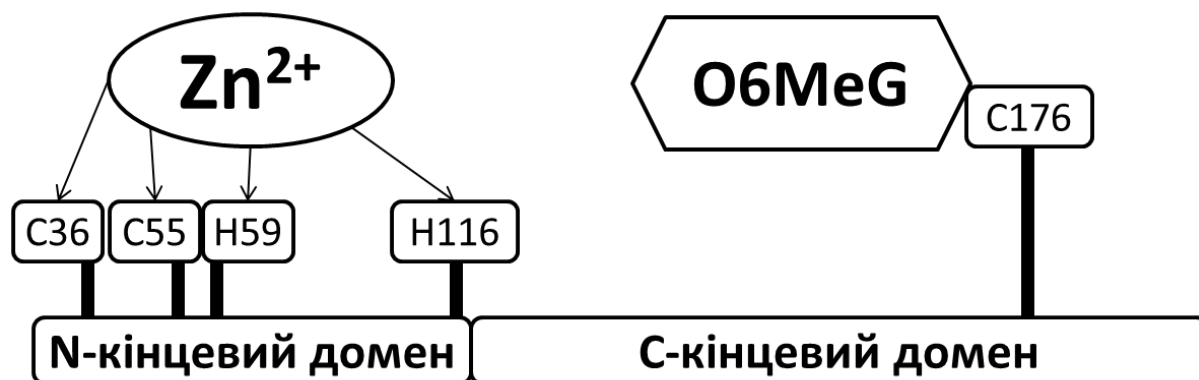
Останні дослідження кристалічних структур білка MGMT людини та комплексів MGMT з ДНК показують, що він містить  $\alpha/\beta$  складки в двох доменах та зв'язаний йон  $Zn^{2+}$  (рис. 1.5.), якого не виявлено в жодного з бактеріальних гомологів.  $Zn^{2+}$  зв'язаний лігандами C36, C55, H59, H116 в тетраедричній конформації та з'єднує три нитки  $\beta$ -складкок N-кінцевого домену зі спіраллю (рис. 1.5.), стабілізуючи структуру білка та підвищуючи його стійкість.





**Рис.1.4.** Кристалічна структура активного центру фермента MGMT людини. Об'ємне зображення комплексу MGMT-ДНК, що демонструє активний сайт, субстрат O6-метилгуанін та комплекс водневих зв'язків ( за [3])

Вилучення  $Zn^{2+}$  не інактивує білок, а лише сповільнює швидкість реакції, зв'язування ДНК при цьому не порушується [3] (рис. 1.5.).



**Рис. 1.5.** Схематична будова білка MGMT людини. На рисунку відмічені N-кінцевий та С-кінцевий домени білка, а також сайти, що з'язують  $Zn^{2+}$  (С36, С55, Н59, Н116), алкільний адукт (метильна група в позиції O6-гуаніну залишу С176)

Загальний розмір білка людини приблизно  $20 \times 35 \times 40$  Å. Нуклеофільний цистеїн є частиною інваріантного активного сайту PC $\underline{N}$ HR мотиву  $3_{10}$  спіралі. Залишки Y145 – A152 та A158 – G167 формують відповідно першу та другу спіралі СПС-мотиву. Друга спіраль СПС-мотиву, яку ще називають

розпізнавальна спіраль, взаємодіє з ДНК. Активний сайт та СПС-мотив зв'язані з аспарагіновим шарніром (N168). Аспарагіновий шарнір має водневі зв'язки з головним ланцюгом через V170, I174 та тіолові – через C176 та забезпечує контакт інтердоменної щілини з N-кінцевим доменом [3].

Геометрія СПС-ДНК-зв'язувального мотиву, аспарагінового шарніру та спіралі активного сайту в основному ідентична для всіх алкілтрансфераз (рис.1.4).

MGMT використовує СПС-мотив для зв'язування із малою боріздкою ДНК. Надалі алкілований гуанін репарується, а алкільний залишок переноситься на C176 активного сайту MGMT. «Аргініновий палець» (R159) стабілізує комплементарний алкілованому гуаніну нуклеотид під час репарації, забезпечуючи вивертання алкілованого гуаніну в позаспіральну конформацію ДНК [3].

Якщо С-кінцевий домен MGMT містить необхідні структури для зв'язування з ДНК та алкільного трансферу, функція N-кінцевого домена полягає в орієнтуванні С-кінцевого домену для надання властивої йому каталітичної активності [3].

СПС-мотив є спільним елементом для майже третини родини білків, що зв'язуються із ДНК [19]. На основі кристалічних структур комплексу MGMT-ДНК виявили, що СПС-мотив білків репарації ДНК взаємодіє з великою боріздкою ДНК завдяки послідовність-специфічному розпізнаванню. Кристалічна ж структура MGMT людини показує, що її СПС-мотив має неklasичне зв'язування з малою боріздкою ДНК. Стабільна, невелика та гідрофобна природа залишків амінокислот розпізнавальної спіралі (A157, A158, A160, G162, Q163) надає можливість їй щільно упаковуватися в малу боріздку ДНК, зменшуючи до мінімуму послідовність-специфічну взаємодію, що є вигідним для репарації ДНК та переміщення вздовж нуклеотидів [3].

Перша модель репарації ДНК за допомогою MGMT передбачала важливу конформаційну зміну білкової молекули, зокрема  $\alpha$ -спіралі С-кінцевого домену, що призводило б до вивертання цистеїну активного сайту. Проте на кристалічних структурах MGMT із ДНК було показано, що навпаки, назовні зі спіралі ДНК

може вивертатиться сам алкілований гуанін. Структури алкілтрансфери бактериї *ada* в комплексі з ДНК, демонструють, що для зв'язування з метилованою ДНК конформаційні зміни білка мають бути мінімальними, тобто для репарації ДНК необхідне вивертання пошкодженої основи. Структура комплексу MGMT-ДНК підтверджує необхідність вивертання алкілованого гуаніну назовні від інших основ ДНК. Зв'язування із ДНК не призводить до значних структурних змін білка MGMT людини, але значно змінює структуру ДНК. Зв'язування MGMT із ДНК призводить до розширення малої боріздки [19]. Ці зміни допомагають MGMT вивернути пошкоджену основу зі спіралі ДНК, розпізнавати та вилучити пошкодження, переносячи алкільний адукт із ДНК на активний сайт MGMT.

На основі кристалічних структур MGMT у комплексі з ДНК припущено, що вивертання нуклеотиду відбувається за рахунок повороту навколо 3' фосфатного зв'язку за рахунок залишків Y114 та R128, що є консервативними для білку MGMT. Y114 бічного ланцюга є конформаційно обмеженим і тому через стеричне наближення і важке відштовхування може сприяти вивертанню нуклеотида та повороту 3' фосфату [19]. Вивертання основи нуклеотида з поворотом 3' фосфату виявлено також в кристалічних структурах ДНК з іншими білками репарації ДНК [3].

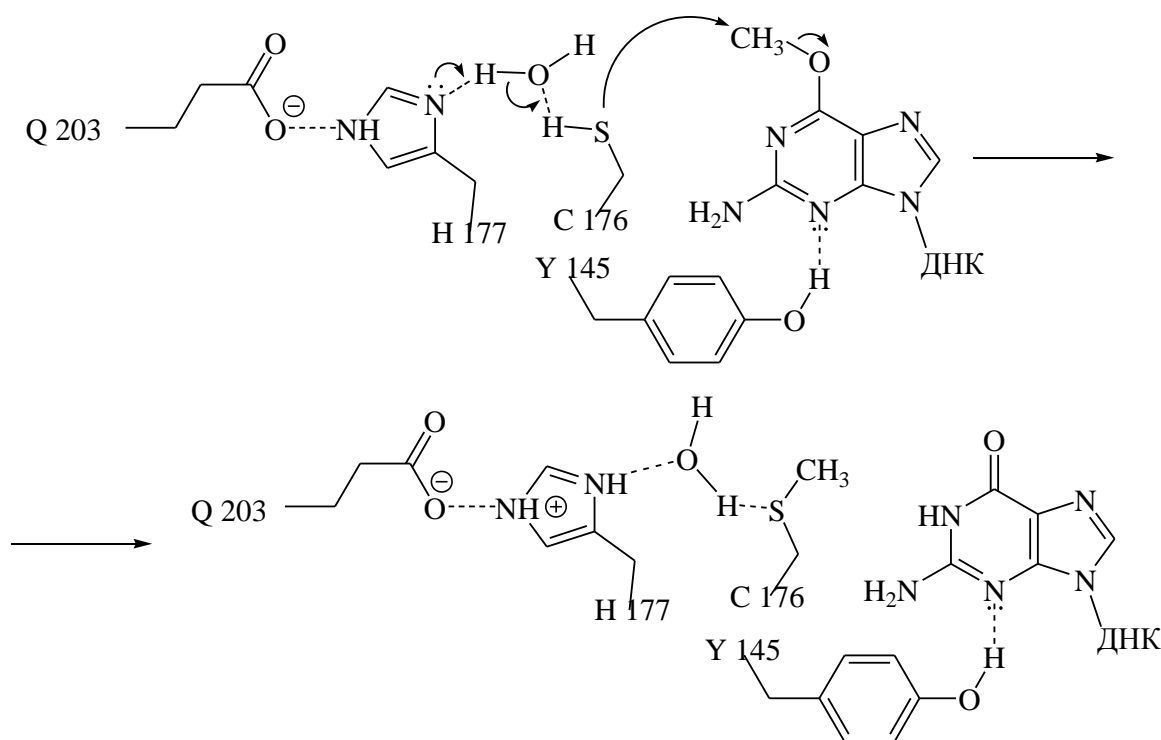
R159, або «аргініновий палець» розміщений на початку розпізнавальної спіралі СПС-мотиву. Він взаємодіє з азотистою основою ДНК на іншому боці від субстратного гуаніну [19], тобто з цитозином, що зв'язаний з метилованим гуаніном полярним водневим зв'язком, щоб стабілізувати позаспіральну конформацію ДНК. «Аргініновий палець» також може брати активну участь в скануванні наявності пошкоджених основ, виштовхуючи їх назовні з фосфодіестерного остову [3].

Показано, що мутації R159 призводять до втрати активності ензиму, при цьому довжина цього бічного ланцюга прямопропорційна до рівня втрати репаративної функції [20]. Наприклад, заміна аргініну на лізин (R159K мутація) призводить до незначної втрати активності ферменту при взаємодії з метилованою ДНК [20]. Заміна аргініну на лейцин (R159L мутація) призводить до

зменшення активності в 5 разів, а заміна на ще меншу за розмірами амінокислоту – до ще більшої втрати активності. Заміна аргініну на гліцин (R159G) призводить до зменшення активності до 0,02% від активності ензиму дикого типу [19].

PCHR-мотив (175 – 178 aa в MGMT людини) ідентичний у всіх алкілтрансферазах, містить активний сайт цистеїну (C176 в MGMT людини). Цей цистеїн має високу реакційну здатність. Тіолова група цистеїну та метильна ДНК розміщуються у вигідному положенні для деалкілувальної реакції, практично один навпроти одного [19]. Комплекс водневих зв'язків Q-H-вода-S подібний до каталітичної тріади N-H-S серинових протеаз та може підвищувати реакційність C145 білка MGMT (рис. 1.6). Комплекс водневих зв'язків стабілізований в різних MGMT, включаючи ада бактерій [3]. Вважають, що низьке значення  $pK_a$  та висока реакційна здатність алкілтрансфераз важливі для утворення тіолат-аніона завдяки перенесенню протона даним комплексом. Реакція деалкілування відбувається за  $S_N1$  [1] механізмом. Вода каталізує реакцію H146 як основи, що сприяє тіоловій групі C145 реагувати як нуклеофіл та атакувати карбон алкільного адукуту. Імідазольний іон гістидину стабілізується карбонільним аніоном Q203 [3]. Y145 стабілізує лактамну таутомерну форму, характерну для гуаніну, на відміну від лактимної, яка характерна Об-алкілгуаніну. Реакційну здатність також може стимулювати зменшення негативного заряду на гуаніні, що репарується, внаслідок утворення водневого зв'язку між N3 Об-метилгуаніну та Y114 [19].

Таким чином, алкілтрансфераза MGMT каталізує репарацію Об-алкілованого гуаніну завдяки стехіометричному та необоротному перенесенню алкільної групи на власний активний сайт цистеїну, не спричиняючи розриву ланцюга ДНК, тобто за механізмом прямого вилучення пошкодження. Ця реакція є суїцидальною, оскільки алкілований фермент нестабільний та швидко деградує шляхом убіквітин-протеасомної системи з залученням 26S-протеосоми. Конформаційна зміна, що призводить до стеричного зближення S-алкілцистеїну та M134, сприяє убіквітинуванию [3].



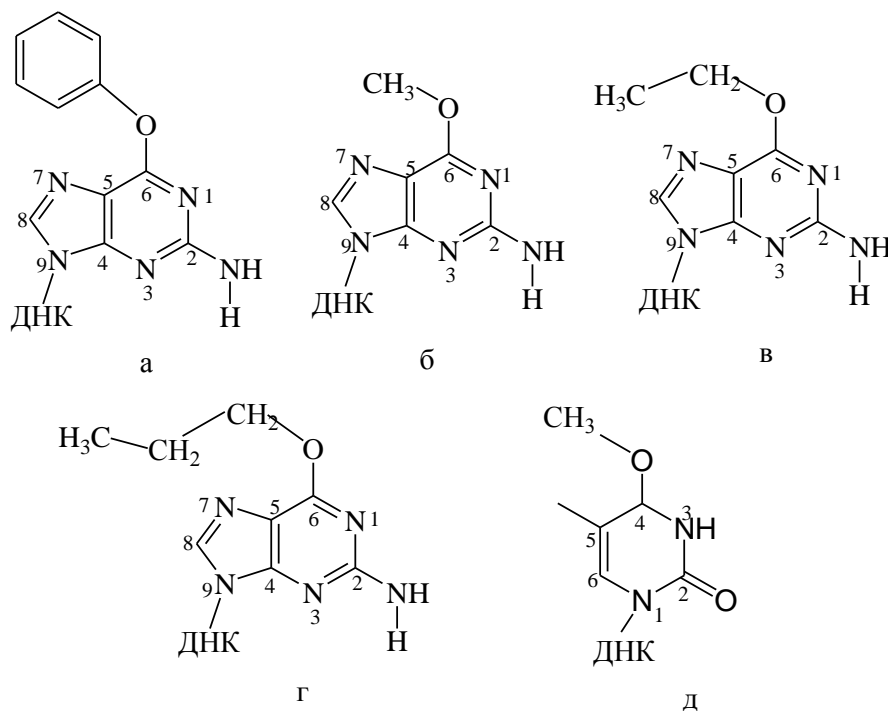
**Рис. 1.6.** Активний сайт MGMT, комплекс водневих зв'язків та механізм реакції MGMT. Для полегшення атаки карбону Об-алкільного адуку, Н177 реагує як основа, що каталізується водою, щоб депротонувати С176. В результаті імідазольний іон стабілізується Q203. (адаптовано з [3])

Отже, в молекулі алкілтрансфераз виділяють N-кінцевий та С-кінцевий домени. Амінокислотна послідовність N-кінцевого домену різних алкілтрансфераз не виявляє гомології, тоді як первинна структура С-кінцевого домену подібна у всіх відомих структурах даних ферментів. С-кінцевий домен MGMT містить структури, необхідні для зв'язування ДНК та алкільного трансферу, функція N-кінцевого домена полягає в орієнтуванні С-кінцевого домену для надання властивості йому каталітичної активності [3].

Модель репарації ДНК за допомогою MGMT передбачає конформаційну зміну лише ушкодженої основи – її розворот навколо 3' фосфатного зв'язку, що вивертає нуклеотид [3] з остову ДНК та направляє в активний центр фермента, де відбувається перенесення алкільного адуку на цистеїн РСНR-мотиву (175 – 178 аа MGMT людини), що ідентичний у всіх алкілтрансферазах. Реакція деалкілювання відбувається за  $S_N1$  механізмом [1].

**1.1.4. Роль MGMT в захисті клітини від токсичного, мутагенного та онкогенного впливу Об-алкілгуаніну.** Алкілування атома Об-гуаніну та атома О4-тиміну є мутагенним та цитотоксичним для клітин. [3]. Захист клітин й організму людини в цілому від негативної дії Об-алкілгуаніну та О4-алкілтиміну здійснює фермент MGMT, який здатний репарувати пошкодження, спричинені різними адуктами, проте швидкість репарації зменшується зі зростанням їхнього розміру (рис. 1.7.) [14].

Таким чином, MGMT забезпечує захист клітин від негативних наслідків алкілування ДНК, а також збереження та передачу правильної, непошкодженої генетичної інформації при мітозі та мейозі. З іншого боку, даний фермент, експресуючись у клітинах пухлин, обмежує ефективність алкілувальної хіміотерапії, що спрямована на їхнє знищення. Тому пошук факторів, що модулюють рівень експресії MGMT або його активності в клітині є важливим.



**Рис. 1.7.** Субстратна специфічність білка MGMT людини в порядку швидкості репарації: а - Об-бензилгуанін, б – Об-метилгуанін, в - Об-етилгуанін, г - Об-пропілгуанін, д - О4-метилтимін. MGMT людини репарує пошкодження, спричинені різними алкільними адуктами, проте швидкість такої репарації корелює з розміром алкільного пошкодження – чим більший замісник, тим повільніше йде реакція (за [1])

## 1.2. Варіація експресії *MGMT* ссавців та її регуляція

Рівень експресії *MGMT* дуже різниться в різних тканинах одного організму та у представників одного виду. Експерименти з використанням 1,2 kb 5'-фрагментів гена *MGMT* з промоторною активністю показують варіацію активності експресії в 1000 разів у різних клітинних лініях. Причина такої варіації не відома. Ймовірно, вона пов'язана зі складною регуляцією експресії, до якої входять структура хромосом, метилування промоторів і тіла гена, одиночні нуклеотидні поліморфізми і т. д [21].

Експресія *MGMT* сильно варіює як в нормальних тканинах, так і в пухлинних клітинах. Частина первинних пухлинних клітин і 20% клітинних ліній пухлин людини характеризуються відсутністю експресії *MGMT* (*MGMT*<sup>-</sup>). Різні *MGMT*<sup>-</sup> клітинні лінії дуже чутливі до алкілувальних сполук і ліків (наприклад, нітрозосечовини). І навпаки, деякі пухлинні клітини експресують *MGMT* на високому рівні і мають високу стійкість до хіміотерапії алкілувальними сполуками. Тобто, з'ясування молекулярних механізмів впливу на експресію *MGMT* має важливе клінічне значення [22], в тому числі й для розробки терапевтичних стратегій зниження експресії *MGMT* у ракових клітинах та подолання резистентності до лікування алкілувальними сполуками [23].

Отже, в клітинах спостерігають значну варіацію експресії *MGMT* що, пов'язано з її складною регуляцією. Високий рівень *MGMT* в клітинах пухлин є причиною їхньої резистентності до алкілувальних сполук хіміотерапії, тому розуміння механізмів, що впливають на рівень експресії *MGMT*, є важливим для покращення терапевтичних методів лікування онкозахворювань.

**1.2.1. Епігенетична регуляція *MGMT*.** Даний тип регуляції здійснюється за рахунок метилування промотора та тіла гена, зміни структури хроматину за рахунок модифікацій білків гістонів, регуляції трансляції (РНК-інтерференція), а також післятрансляційних модифікацій білка *MGMT*.

### 1.2.1.1. Метилування промотора гена *MGMT* і структура хроматину.

Експресія значної частини активних генів не є тканиноспецифічною [24]. Приблизно 60% усіх генів людини (так звані гени «домашнього господарювання») містять у своїй 5'-регуляторній ділянці GC-багату ДНК, відому як CpG-острівці [25]. CpG-острівці мають довжину 100 – 2000 п.н., та, на відміну від решти геному, збагачені CpG-динуклеотидами із метилованим/неметилованим цитозином [24; 25].

Гени «домашнього господарювання» конститутивно експресуються в усіх клітинах, проте в ракових клітинах деякі з цих генів можуть випадково вимикатися [24]. Ймовірно, внаслідок метилування цитозину в динуклеотидах CpG пригнічується зв'язування з транскрипційними факторами та/або зміна структури хроматину.

Взаємозв'язок між метилуванням цитозину та сайленсингом CpG-вмісних генів показано в експериментах як на первинних, так і культивованих клітинах пухлин. Гени із неметилованими CpG-острівцями експресувалися, а при метилуванні цитозину в CpG-острівках спостерігали відсутність експресії [24].

Зв'язок між метилуванням ДНК і структурою хроматину досі вивчається. Неметировані CpG-острівки регуляторних ділянок генів «домашнього господарювання», що експресуються, надчутливі до нуклеаз, і тому така структура була названа "відкритою" структурою хроматину. В той же час, в сайленсованих генах частково/повністю метировані CpG-острівки були недоступними для екзогенних нуклеаз та, ймовірно, ендогенних факторів транскрипції. На основі даних спостережень припущено, що механізм «вимкнення» CpG-вмісних генів (включаючи і *MGMT*), пов'язаний з метилуванням ДНК промотора і втратою структури «відкритого» хроматину та здатності зв'язувати транскрипційні фактори [24].

Можливо, метилування сайтів зв'язування транскрипційних факторів прямо блокує транскрипцію, або ж метилування CpG-острівців сприяє взаємодії з послідовність-неспецифічними ДНК-зв'язувальними білками, що й перешкоджають зв'язуванню з транскрипційними факторами [24; 26]. У



декількох  $MGMT^-$  клітинних лініях метилування CpG-острівців виявлено в ділянках, що оточують сайти зв'язування факторів транскрипції, але не в самих цих сайтах. Виходячи з цих даних, припущено, що замість прямого впливу на приєднання фактора транскрипції, метилування CpG-острівців впливає опосередковано, через вплив на структуру хроматину [24].

Сайленсинг експресії  $MGMT$ , що спостерігається в 20-30% ліній пухлин людини, тісно пов'язаний з метилуванням в 5' CpG-острівцях гена  $MGMT$ . Спостерігають так звані «hot-spots» (гарячі точки) та проміжні регіони з дуже незначними випадками метилування. При визначенні статусу метилування окремих гарячих точок CpG-острівців підтверджено, що в клітинах, де спостерігається сайленсинг  $MGMT$ , вони метиловані, в той час, коли в клітинах з експресією  $MGMT$  метилування практично відсутнє [27].

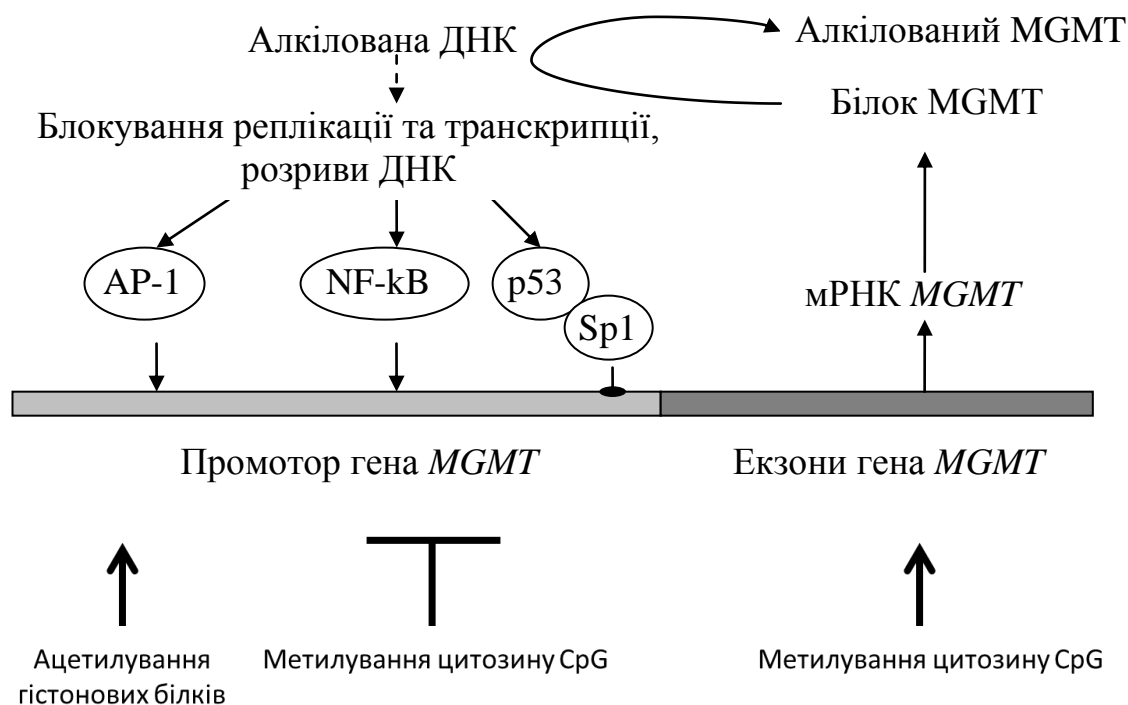
В результаті аналізу промоторної ділянки  $MGMT$  виявлено, що з -249 до +259 п.н. від точки старту транскрипції в клітинах лінії  $MGMT^+$  (HT29, аденокарцинома товстого кишечника людини) CpG-острівок практично неметилований, тоді як в клітинах  $MGMT^-$  (BE, клітини раку кишечника людини; HeLa S3, рак шийки матки) вони були значно метиловані по «гарячим точкам» від -249 до -103 та від +107 до +196. Такі «гарячі точки» є потенційними маркерами сайленсингу гена [26].

Також показано, що в  $MGMT^+$  клітинах, шість CpG-динуклеотидів у ділянці від -245 п.н. до +225 п.н. (відносно сайту старту транскрипції) були повністю неметилованими, тоді як в  $MGMT^-$  клітинах вони були хоча б частково метилованими. Статус метилування CpG-динуклеотидів вгору по ДНК не корелює з рівнем експресії  $MGMT$ . Таким чином, зв'язок між метилуванням CpG і пригніченням активності гена  $MGMT$  обмежений центральною ділянкою промотора [28]. Також показано, що в  $MGMT^+$  клітинних лініях (HeLa CCL2, HT29, Raji), порівняно з  $MGMT^-$  (HeLa S3, BE, і TK6) спостерігається вищий рівень ацетилювання гістонів, а метилування ДНК пригнічує експресію  $MGMT$  сильніше, ніж деацетилювання гістонів. Даний ефект продемонстровано на  $MGMT^-$  клітинних лініях з допомогою 5-аза-2'-деоксицитидину (інгібітора

метилування ДНК), що призводить до зростання експресії *MGMT*, та трихостатину А – інгібітора гістонової деацетилази, що призводив до зниження експресії *MGMT* [21].

Методом іммунопреципітації хроматину показано, що метил-СрG-зв'язувальні білки MeCP2, MBD1, і CAF-1 взаємодіють з промотором *MGMT* в *MGMT*<sup>-</sup> клітинах [29]. Дані білки зв'язуються із метилованою ДНК та сприяють сайленсингу генів.

Отже, зниження рівня експресії *MGMT* в клітинах може бути пов'язаним з метилуванням промотора даного гена (рис. 1.8).



**Рис. 1.8.** Схематична структура гена *MGMT* та регуляції його експресії. Масштаб не витримано (за [21])

**1.2.1.2. Метилування тіла гена.** Виявлено, що метилування тіла гена *MGMT* призводить до підвищення експресії білка [21].

Дані результати підтверджують також дослідження молекулярних механізмів набутої в умовах *in vitro* резистентності до хлороетилювального протиракового препарату фотемустину у клітинах меланоми людини MeWo [30].

Набута стійкість до хіміотерапевтичних препаратів є поширеною перешкодою в протипухлинній терапії [6]. Злоякісні клітини меланоми особливо відомі своєю нечутливістю до хіміотерапії, і лише близько 30% пухлин демонструють нестійку клінічну відповідь на лікування. Показано, що набута стійкість до фотемустину при повторній обробці пов'язана з високою активністю MGMT, тоді як у вихідній клітинній лінії MGMT не виявлено. Окрім цього, набута стійкість до фотемустину надає клітинам перехресної резистентності й до інших Об-алкілувальних препаратів, таких як N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин. Набута стійкість до фотемустину може бути знята шляхом обробки клітин інгібітором MGMT Об-бензогуаніном. Це демонструє, що реактивація *MGMT* є основною причиною набуття стійкості до алкілувальних лікарських препаратів [6].

Порівнюючи контрольні MGMT<sup>-</sup> клітини MeWo з клітинами з набутою резистентністю, виявлено лише незначну різницю в картині метилування CpG-острівців промотора *MGMT*, тоді як в тілі гена резистентних клітин спостерігалось чітке гіперметилування. Обробка резистентних гіперметилованих клітин 5-азациитидином, призводила до гіпометилування ДНК, зниження активності *MGMT* та відновлення MGMT<sup>-</sup> фенотипу клітин [30].

**1.2.1.3. РНК-інтерференція.** РНК-інтерференція – процес сайленсингу клітинами експресії певних генів, зокрема пригнічення трансляції малими інтерферуючими РНК. Як метод, вона може бути використана й для регуляції експресії гена *MGMT*. Такі дослідження, наприклад, проведено з використанням клітинних ліній раку носоглотки людини HONE-1 і гліоми. При використанні малих інтерферуючих РНК, специфічних до *MGMT*, дані ракові клітини стали більш чутливими до алкілувальної хіміотерапії, зокрема HONE-1 до кармустину, а клітини гліоми до темозоломідю [31].

Проте перед впровадженням в широку клінічну практику необхідно вирішити низку проблем, пов'язаних з використанням даного методу. Серед них неспецифічні імунні відповіді, проблема доставки малих інтерферуючих РНК до цільових клітин та неповне «вимкнення» необхідного гена (обговорено в [32]).

**1.2.1.4. Післятрансляційні модифікації білка MGMT.** До епігенетичних факторів також належить регуляція активності та стабільності білків за рахунок післятрансляційних модифікацій, наприклад, алкілування, ацетилювання, метилювання, убіквітинування, фосфорилювання, сумоїлування та ін. Алкілування білку MGMT людини є найдослідженішою модифікацією, яка пов'язана з його репаративною функцією. Раніше вважали, що це єдина функція цього ферменту й після приєднання алкільної групи MGMT убіквітується та деградує за рахунок протеолізу [33].

Експериментально показано, що білок MGMT людини фосфорилюється за певними амінокислотними залишками [34; 35; 36] й убіквітується [37], проте сайти останньої модифікації не визначено. Фосфорилювання білків – важливий зворотній механізм регуляції активності білків, зміни їхніх функцій, а також один з основних молекулярних механізмів передачі позаклітинних стимулів від рецепторів клітинної мембрани через компоненти сигнальних шляхів до відповідних компартментів клітини. Тобто передача сигналу від факторів росту, гормонів тощо опосередковується каскадом послідовних фосфорилювань/дефосфорилювань сигнальних молекул клітини [38]. Показано, що фосфорилований рекомбінантний MGMT людини втрачає до 30–65% своєї репаративної активності, тоді як дефосфорилювання лужними фосфатазами відновлює його активність [34]. Припускають, що втрата ензиматичної активності модифікованого білку пов'язана з тим, що він убіквітується та деградує [34]. Однак на сьогодні показано, що протеасомна убіквітинозалежна деградація MGMT відбувається після репарації ДНК. Зокрема, приєднання алкільної групи до цистеїну в активному центрі ензиму призводить до конформаційних змін, які розпізнаються убіквітиною лігазою та завершуються деградацією білкової молекули [39]. На відміну від нього, фосфорилований MGMT щура виявляє підвищену стійкість до протеїназ [40]. Проте спостерігається брак даних щодо функціонального значення фосфорилювання MGMT.

Беручи до уваги те, що посттрансляційні модифікації білків здатні не лише змінювати їхню активність, надавати інших функцій в клітині, а й регулювати

білок-білкові взаємодії, ідентифікація нових сайтів модифікації та білків-партнерів MGMT людини є актуальною. Це дасть змогу виявити нові неканонічні функції цього білку та нові функціональні зв'язки в різних процесах клітини.

На сьогодні відомо 8 сайтів післятрансляційної модифікації білка MGMT людини. Серед них T41, T42, S45, S53, S70, Y145, C176, S232 (в межах білкової молекули довжиною 238 амінокислот, NP\_002403.2) [34; 35; 36] (табл. 1.1.).

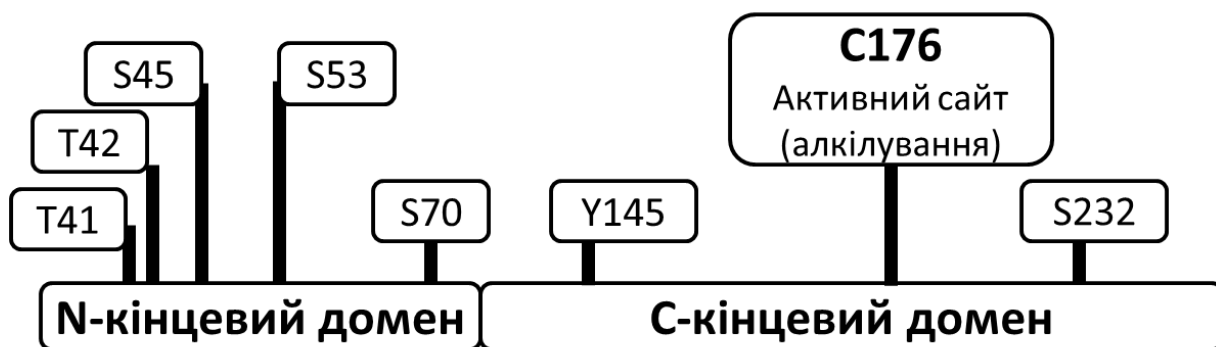
Таблиця 1.1.

**Відомі сайти післятрансляційних модифікацій білка MGMT людини (за [35])**

Сайт	Модифікація	Роль модифікації
T41	фосфорилювання	Не показано
T42	фосфорилювання	Пригнічення або інактивація активності / Не показано
S45	фосфорилювання	Пригнічення або інактивація активності
S53	фосфорилювання	Пригнічення або інактивація активності
S70	фосфорилювання	Пригнічення або інактивація активності
Y145	фосфорилювання	Пригнічення або інактивація активності
C176	алкілювання	Інактивація репаративної функції та протеоліз
		Транскрипційний регулятор
S232	фосфорилювання	Пригнічення або інактивація активності / Не показано

C176 – його модифікація визначається самою функцією білка – приєднання алкільної групи від дефектного гуаніну. Це призводить до інактивації репаративної функції білка та його деградації.

Сайти T41, T42, S45, S53, S70, Y145, S232 – фосфорилюються, проте функціональне значення такої модифікації для MGMT та кінази невідомі (рис. 1.9.). Показано, що фосфорилювання MGMT може зменшувати активність ферменту [21], яка відновлюється *in vitro* після додавання лужної фосфатази [34].



**Рис. 1.9.** Схематичне зображення білка MGMT людини (NP\_002403.2) та відомі сайти післятрансляційних модифікацій MGMT – фосфорилювання та алкілування

Серед даних сайтів фосфорилювання локалізацію лише трьох виявлено та підтверджено експериментально, зокрема T41, T42, S232 [35, 36]. Для решти сайтів (S45, S53, S70, і Y145) експериментально показано лише саму можливість фосфорилювання рекомбінантного та ендогенного MGMT по амінокислотних залишках серину, тирозину та треоніну [34].

Інтригуючими є експериментальні дані, що алкілований MGMT людини не обов'язково убіквітинується та деградує, а може виконувати роль в регуляції транскрипції генів у відповідь на пошкодження ДНК [13]. Зокрема показано, що модифікований білок може зв'язуватися з рецептором естрогенів і ефективно пригнічувати його функцію як транскрипційного активатора генів, які сприяють клітинному поділу. Виявлено, що він змінює свою конформацію та перемикає функцію ензима репарації ДНК на транскрипційний регулятор, вказуючи на існування іншої неканонічної, тобто напряду не пов'язаної з репарацією ДНК, функції. Алкілований MGMT людини виконує роль індукованого алкілуванням ДНК транскрипційного супресора, даючи можливість клітині відреагувати на алкілувальні сполуки [13].

Селективну деградацію багатьох білків в еукаріотичних клітинах здійснює убіквітинова системи [41].

В убіквітиновій системі білок-мішень модифікується убіквітином або убіквітин-подібним білком. Ця модифікація трансформує поверхню цільового

білка, що впливає, зокрема, на його властивості, стійкість, взаємодію з іншими білками, активність і внутрішньоклітинну локалізацію. На сьогодні описано близько 10 різних модифікаторів в клітинах ссавців і взаємодія кожного з них зі своєю мішенню може приводити до різних біологічних ефектів. У багатьох випадках до білків приєднується кілька молекул убіквітину, які створюють розгалужений поліубіквітиновий ланцюг. Для більшості білків, ця модифікація приводить до їхньої деградації 26S протеасомою. Тим не менш, залежно від характеру внутрішніх зв'язків між фрагментами убіквітину, він може призвести до інших ефектів. Модифікація одним залишком убіквітину може направляти білки для деградації в лізосоми. З іншого боку, приєднання убіквітину або убіквітин-подібних білків може активувати інші непротеолітичні функції, такі як активація ферментів, модуляція динаміки мембранних процесів або направлення мічених білків на виконання їх внутрішньоклітинних функцій. Убіквітування клітинних білків є дуже складним, контрольованим в часі й просторі та жорстко регульованим процесом. Воно здійснюється з високою специфічністю та виникло як критично важлива післятрансляційна модифікація, яка відіграє важливу роль в регуляції широкого спектру основних клітинних процесів, таких як клітинний поділ, диференціація, сигнальні процеси і т.д. Відхилення в даній системі виявлені в патогенезі багатьох захворювань, в тому числі злоякісних новоутворень [42].

Родина білків SUMO (small ubiquitin-related modifier, малий модифікатор, схожий на убіквітин), не лише структурно, а й функціонально пов'язана з убіквітином в тому, що вони здійснюють післятрансляційну модифікацію інших білків, зв'язуючись з ними. Як і убіквітин, SUMO ковалентно зв'язаний з своїм субстратом за допомогою пептидних зв'язків, утворених між його С-кінцевим залишком гліцину і  $\epsilon$ -аміногрупою внутрішніх залишків амінокислоти лізину цільового білка. Ферменти, які беруть участь в оборотному приєднанні SUMO, аналогічні таким убіквітину.

З моменту відкриття у 1996 році, SUMO опинився в центрі уваги науковців. Це викликано зацікавленістю його основними функціями в клітині, а також тим,

що його субстратами є різні білки, важливі в медичній практиці, такі як супресори пухлин p53, c-Jun та ін. Вважають, що SUMOїлування відіграє важливу роль в різних процесах клітини, таких як сегрегація хромосом і поділ клітин, імпорту ядерних білків, мічення білків для їх подальшого залучення в біохімічні каскади і регулювання різних інших процесів, включаючи запальні реакції в ссавців і регулювання циклу цвітіння рослин [43].

Також варто особливо відмітити участь SUMO в реплікації і репарації ДНК, адже саме основна функція білка MGMT людини – репарація пошкодженої ДНК.

Таким чином, післятрансляційні модифікації білка MGMT людини впливають на даний ензим та потребують детального вивчення.

Отже, епігенетична регуляція експресії гена *MGMT* здійснюється на різних рівнях. На рівні ДНК – за рахунок метилування промотора та тіла гена, зміни структури хроматину, та на рівні білка – за рахунок РНК-інтерференції та післятрансляційних модифікацій білка MGMT.

**1.2.2. Генетична регуляція MGMT. Цис-регуляторні елементи в промоторній ділянці гена.** Промоторна ділянка гена *MGMT* подібна до промоторів багатьох так званих генів «домашнього господарювання», експресія яких необхідна у всіх клітинах і не залежить від зовнішнього контролю. Промотори цих генів GC-збагачені і, на відміну від більшості інших генів, у них рідко зустрічається ТАТА-бокс [44].

Описано, що 5'-фланкуюча ділянка гена *MGMT* людини не містить ТАТА- та СААТ-бокси, тоді як GC-багаті ділянки, включаючи десять GC-гексануклеотидних мотивів 5'CCGCCS, зустрічаються часто, особливо у двох ділянках між 823 - 936 п.н. (89%) і 979-1031 п.н. (90%) у межах 1157 п.н. (X61657 в GenBank).

Послідовність, що може вважатися мінімальним промотором, знаходиться між нуклеотидами в позиціях 886-955 п.н. і містить більшу частину першої GC-



багатої ділянки. Друга GC-багата ділянка зустрічається на 3'-кінці від точки старту транскрипції всередині першого нетрансльованого екзону (рис. 1.10).

За відсутності ТАТА-боксу, який зазвичай визначає початок транскрипції, в гені *MGMT* повинні бути інші послідовності, що виконують ту ж функцію і допомагають зв'язувати ДНК-полімеразуII.

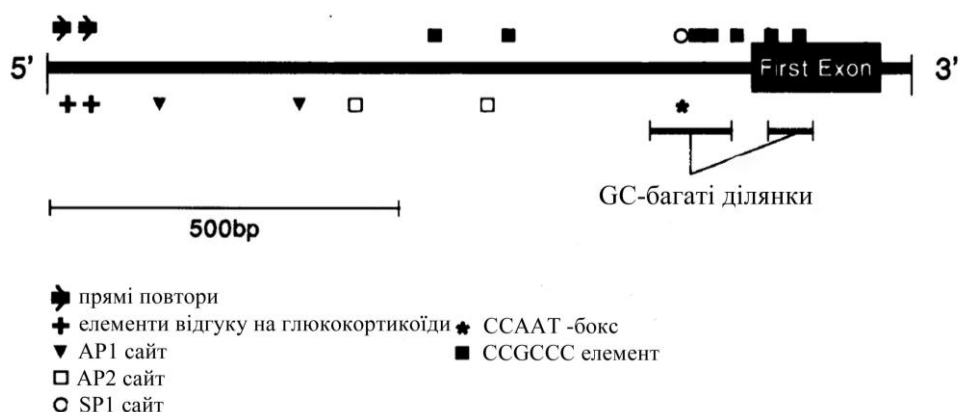
Передбачений ССААТ (АСАССС)-бокс представлений в позиціях 870-876 п.н. за його гомологією до промотора гена бета глобіну кролика [44]. Прямі повтори знайдені в положенні 6-32 і 41-67, хоча їхнє значення в даний час не з'ясоване. Послідовність ССГССС, яка тандемо присутня також в промоторах SV40 (мавпячого вірусу ) і HSV (вірусу бичачої папіломи), зустрічається п'ять разів у межах 53 п.н. послідовності 875-928 [44]. Показано, що такі ділянки можуть бути елементами типу промотора / енхансера у цих вірусів, але також присутні і в еукаріотичних промоторах генів, наприклад, 3-гідрокси-3-метилглутарил-коензим А-редуктази і рецептора епідермального фактора росту. Структури типу шпильки може формуватися в послідовності 862-868 і 874-880, що може мати важливе значення в регуляції транскрипції [44].

Послідовність ДНК промотора гена *MGMT* проаналізована також на наявність відомих сайтів зв'язування з факторами транскрипції для визначення потенційних регуляторних елементів транскрипції. Виявлено два сайти AP1 (TGAGTCAG), один знаходиться в позиції 344-351 п.н., інший – в позиції 151-156 п.н. та має 6/8 гомології. Сайт AP2 (G (CG) (CG) (TA) G (GC) CC) виявлено в позиції 420-427 п.н. і 602-609 п.н., 6/8 гомології. AP1 та AP2 відповідають за активацію експресії через тканинний активатор плазміногену або циклоаденозинмонофосфат [26; 44].

Сайт SP1 (GGGCGG) виявлено в позиції 862-867 п.н. (в межах реферованої послідовності промотора X61657.1). Також виявлено ділянки з частковою гомологією до глюкокортикоїдного елемента (GGTACANNNTGTTCT) в позиціях 28-42 і 63-77 та до консенсусної послідовності промоторних елементів генів теплового шоку еукаріот (CNNGAANNNTTCNNGA) в положенні 577-591 п.н. Тим не менше, мало що відомо про клітинну відповідь гена *MGMT* на гормони або

стрес. Схематичне розташування всіх перелічених елементів наведено на рис. 1.8, 1.10 [44].

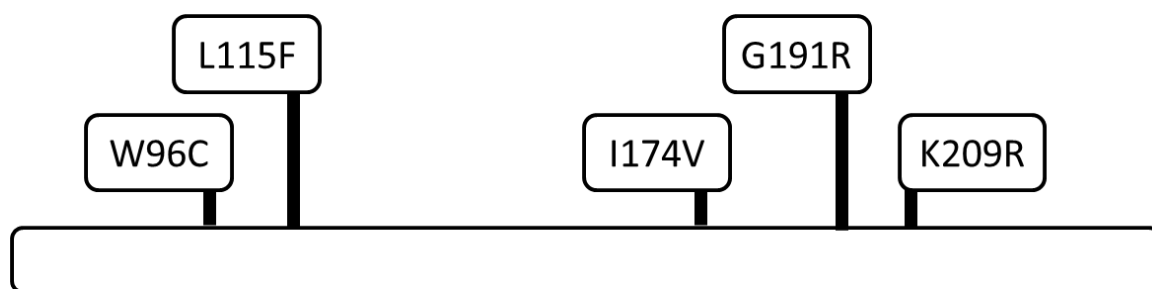
Також у межах промотора даної алкілтрансферази виявлено потенційний енхансер довжиною 59 п.н. в позиції з +144 до +202 від точки старту транскрипції [45]. Даний фрагмент відповідає загальним критеріям енхансера на основі спостережень, що його функція не залежить від положення або орієнтації.



**Рис. 1.10.** Потенційні регуляторні елементи в 5'-нетрансльованій ділянці гена *MGMT* (за [45])

**Одиночні нуклеотидні поліморфізми.** Генетична регуляція здійснюється також завдяки наявності одиночних нуклеотидних поліморфізмів (ОНП) в білоккодуєчих та в некодуєчих ділянках генів.

Для гена *MGMT* описані ОНП, які знаходяться і в білоккодуєчій ділянці гена: W96C, L115F, I174V, G191R та K209R (рис. 1.11) [46, 47].



**Рис. 1.11.** Схематичне зображення локалізації ОНП в білоккодуєчій ділянці гена *MGMT* людини

Два ОНП знаходяться біля активного сайту S176, це – I174V та G191R. Головний ланцюг I174, утворює водневі зв'язки з Аспарагіновим шарніром

(N168), що об'єднує активний сайт та ДНК-зв'язувальний мотиви, тому заміна I174 на V може впливати на субстратну специфічність ензиму. G191R надає MGMT стійкості до Об-БГ [48]. Заміна гліцину на довший аргініновий бічний ланцюг в даному положенні перешкоджає зв'язуванню великих субстратів через стеричні перешкоди та зближення зарядів.

Поліморфізм W96C приводить до нестабільності білка. W96 розміщується між С-кінцевим та N-кінцевим доменами. Заміна великого громіздкого триптофану на менший за розмірами цистеїн призводить до зменшення стабільності через зникнення  $\pi$  – взаємодії між W96 та Y100 N-кінцевого домену та перешкоджає гідрофобній взаємодії з N168 С-кінцевого домену [46].

ОНП L115F може впливати на здатність зв'язувати йон  $Zn^{2+}$ , оскільки даний залишок пов'язаний з утворенням зв'язку між  $Zn^{2+}$  та лігандом His116. Як і у випадку W96C поліморфізму, залишок H116 знаходиться між С- та N-кінцевим доменами, але великий залишок фенілаланіну замінює менший залишок лейцину.

Таким чином, на прикладі перелічених ОНП можна спостерігати приклад впливу структури MGMT на її здатність до репарації ДНК [47].

**Мутації гена *MGMT* і хромосомні аберації.** Оскільки MGMT відповідає за виправлення пошкоджень в ДНК, то порушення його діяльності призводить до накопичення пошкоджень та призводити до хромосомних аберацій. Було показано, що рак стравоходу, спричинений алкілувальними речовинами навколишнього середовища, може бути наслідком зменшення активності *MGMT* в клітинах. Аналіз клітин пухлин та клітин донорів з високим ризиком захворіти на рак показав значний рівень мутацій, хоч в гоноцитах їх не виявлено. Таким чином, рівень експресії *MGMT* в клітинах раку стравоходу корелює з частотою мутацій в їх геномі [49].

Отже, генетична регуляція експресії гена *MGMT* включає в себе мутації, одиночні нуклеотидні поліморфізми та цис-регуляторні елементи в промоторі гена.

### **1.3. Комплексна терапія онкохворих. Регуляція експресії гена *MGMT* екзогенними та ендогенними чинниками**

Питання використання комплексної терапії онкохворих постало в той час, коли стало відомо про стійкість деяких типів раку до хімічних препаратів, що використовувались для їхнього лікування. Комплексна терапія, тобто використання більше, ніж одного препарату та способу лікування, має на меті збільшити ефективність терапії та побороти стійкість ракових клітин до хіміотерапевтичних препаратів. [50].

Механізми дії препаратів, що використовуються комбіновано, можуть полягати в декількох типах ефектів: перекритті мішеней, взаємодії метаболічних шляхів препаратів і, власне, взаємодії цих препаратів. Це значно ускладнює роботу при комплексній терапії. Для успішного проведення лікування необхідно досліджувати всі нюанси взаємодії сполук всередині клітини з метою уникнення взаємонейтралізації – ефекту, що призведе до посилення пухлинної стійкості до лікування [50].

Слід зазначити, що комплексна терапія включає в себе не лише одночасне введення хіміопрепаратів, але й різноманітні комбінації до- та після- операційних методів лікування, націлених як локально, так і на дію поза вогнищами захворювання, використання імунотерапевтичних методів у боротьбі з хворобою та багато інших.

**1.3.1. Інтерферони в терапії раку та *MGMT*.** Одним із широковідомих методів комплексного лікування онкозахворювань є поєднання хіміотерапії та імунотерапії з використанням препаратів інтерферонів [51]. При послідовному введенні препаратів інтерферону- $\alpha$  після дакарбазину спостерігалася краща відповідь на препарат та підвищення середньої тривалості життя [52].

Оскільки сигнальні шляхи інтерферонів у ракових клітинах можуть призводити як до імуносупресії і, як наслідок, стимулювання росту пухлини, так і

до посилення імунної відповіді [51], дослідження в даній області є надзвичайно важливими.

Інтерферони – родина сигнальних білків, об'єднана у три групи –  $\alpha$ ,  $\beta$  і  $\gamma$ . Історично їх пов'язують з противірусною активністю, але зараз відомо, що, зв'язуючись з поверхневими рецепторами клітини, інтерферони запускають сигнальні каскади, що регулюють експресію генів, пов'язаних не лише з противірусною, але й імуномодуючою та антипроліферативною активністю клітин [53]. Це були перші білки людини, для яких була відкрита протипухлинна активність [54].

INF- $\alpha$  (interferon-alfa) підвищує ефективність темозоломідом в  $MGMT^+$  клітинах гліоми. Можливий механізм негативної регуляції експресії  $MGMT$  інтерфероном може бути опосередкований через NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) шлях. Тобто, INF- $\alpha$  призводить до зменшення рівня NF- $\kappa$ B, який, як відомо, індукує транскрипцію  $MGMT$  через два сайти зв'язування з NF- $\kappa$ B у його промоторі [5], а це в свою чергу спричиняє й зменшення рівня  $MGMT$  в клітинах. Комбінована обробка темозоломідом і INF $\alpha$ -2b призводить до подальшого зниження транскриптів обох генів. Результати підтверджені з використанням лабораторних тварин [55]. Подібні результати отримано також для INF- $\beta$  [9, 56].

Комбінована обробка ракових клітин, що експресують  $MGMT$ , INF- $\beta$  та темозоломідом призводить до значного зростання чутливості клітин до алкілувальних сполук. Смертність клітин зростає більш, ніж на 50% порівняно з обробкою лише темозоломідом [57]. Комплексна терапія інтерфероном та темозоломідом значно уповільнює ріст як чутливих, так і нечутливих до темозоломідом пухлин [56]. І, нарешті, комплексна терапія значно подовжує середній час життя пацієнтів з гліобластомою [58].

Попри практичні успіхи використання препаратів інтерферонів у рамках комплексних методів терапії онкохворих, все ще лишається ризик токсичності такого лікування, саме тому необхідним є дослідження доз препаратів та схем проведення лікування.

**1.3.2. Вплив гормональних препаратів на експресію гена *MGMT*.** У схемах лікування багатьох типів раку, наприклад раку грудей, яєчників, яєчок, ендометрію та ін., практикують поєднання алкілувальної хіміотерапії із гормонотерапією, зокрема такими сполуками як глюкокортикоїди, естрогени, прогестерон та їхні антагоністи. Глюкокортикоїди, наприклад, використовують для зменшення набряків та запалення, прогестагени та антиестрогенні засоби - у комбінованій терапії раку грудей та ендометрію, а антиандрогени та естрогени – при раку передміхурової залози [59, 60].

Гормони та подібні до них біологічно активні речовини є відомими регуляторами експресії генів [59, 61, 62]. На сьогодні показано, що застосування синтетичного глюкокортикоїду дексаметазону активує експресію гена *MGMT* як *in vitro* [4, 63], так й *in vivo* [64], що значно знижує ефективність паралельної алкілувальної хіміотерапії при лікуванні гліом [65]. Тобто причиною резистентності ракових клітин до алкілувальних сполук є індукція експресії гена *MGMT* внаслідок зв'язування дексаметазону з відповідними елементами відгуку у промоторі гена [44, 65].

Вплив решти гормонів на транскрипцію гена *MGMT* і, відповідно, на ефективність алкілувальної хіміотерапії не відомий. Тому питання щодо регуляції *MGMT* біологічно активними речовинами, в тому числі й гормональної природи, що використовуються у терапії онкохворих і можуть бути лігандами ядерних рецепторів, є актуальним. Також, постає питання щодо пошуку шляхів диференційованого впливу на експресію гена *MGMT* людини: зниження його транскрипції в клітинах пухлин з метою підвищення їхньої чутливості до хіміотерапії та активації транскрипції в нормальних клітинах для зменшення токсичного впливу хіміотерапевтичних сполук на організм пацієнта.

Стероїдні гормони можуть впливати на клітини 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, або ж негенетичний, або ж швидкий шлях – через

рецептор на мембрані [66, 67, 68, 69, 70]. Некласичний шлях зазвичай здійснюється через мембранний рецептор, що надалі впливає на сигнальні каскади та запускає швидку відповідь клітини на гормон. Поєднання класичного та некласичного шляхів, а також наявність різних сигнальних посередників в різних клітинах сприяє тканино- та клітинспецифічній дії стероїдних гормонів [68].

Варіабельність біологічної дії гормонів залежить від багатьох чинників: типу тканини чи клітини; етапу розвитку організму; наявності специфічних білків-корегуляторів чи інших факторів транскрипції, що взаємодіють із ядерними рецепторами; доступність цільових генів у межах хроматину; специфічні для кожного типу клітин сигнальні шляхи, які або самі впливають на активність ядерних рецепторів, або ж є посередниками дії ядерних рецепторів на цільові гени [71, 72].

Відомо, що естрогени впливають як на експресію різних регуляторів клітинного циклу, таких як *c-fos*, *c-myc*, *HER2/neu*, ростові фактори, цикліни [73], які впливають як на проліферацію, так і на диференціацію клітин. При класичній дії естрогени регулюють експресію генів, зв'язуючись через рецептори  $ER\alpha$  та  $ER\beta$  із своїм елементом відгуку в промоторі [62, 69, 70], впливаючи на транскрипцію. За даними літератури одна з ізоформ ядерного рецептора естрогенів –  $ER\beta$  в основному є негативним регулятором експресії генів [74, 75], тоді як  $ER\alpha$  зазвичай є позитивним регулятором [72, 73, 76]. При некласичній дії естрогени можуть діяти значно швидше, обминаючи етап регуляції транскрипції, через свій мембранний рецептор  $GPER1$ , одразу вмикати активацію вторинних посередників [77, 78].

Прогестерон через ядерні рецептори прогестерону  $PR\alpha$  та  $PR\beta$  (експресуються із одного гена, але з різних промоторів) регулює експресію цілого пулу генів, що контролюють як розвиток, диференціювання та проліферацію тканин-мішеней, так і патологічні процеси при гормоночутливих формах раку [79]. На сьогодні тривають дослідження та дискусії щодо можливих кандидатів на роль мембранних рецепторів прогестерону. Серед декількох потенційних

претендентів Progesterone Receptor Membrane Component 1 - PGRMC1 [64, 65] є найвірогіднішим. Проте ще досі є питання, чи дійсно саме PGRMC1 при певних післятрансляційних модифікаціях зв'язує прогестерон та запускає сигнальний каскад, чи є партнером білка, що зв'язує гормон [80, 81, 82].

**1.3.3. Регуляція активності фермента MGMT інгібіторами.** Як уже зазначалось, MGMT відіграє важливу роль у забезпеченні стійкості нормальних клітин організму до пошкоджувальної дії алкілувальних сполук. Однак, у випадку пухлинних клітин, висока активність ензиму MGMT зумовлює резистентність останніх до протипухлинної алкілувальної хіміотерапії. Тому на даний час постає питання про можливість регулювання активності MGMT у нормальних і пухлинних клітинах.

Також висловлюється думка, що, маніпулюючи рівнями експресії та активності MGMT, можна припинити онкогенез [83]. Так, через інактивацию ензиму MGMT можна значно підвищити чутливість клітин до цитотоксичного впливу алкілувальних сполук, які входять до складу протипухлинних препаратів [84]. Існує декілька методів інактивации MGMT: прямі методи з використанням інгібіторів активності MGMT (Об-БГ та ін.) та непрямі методи з використанням метилувальних агентів, які опосередковано знижують рівень алкілтрансферазної активності, утворюючи велику кількість Об-метилгуанінів у ДНК.

Використання низькомолекулярних псевдосубстратів MGMT людини наразі досліджується як підхід до покращення терапії онкохворих, оскільки такі сполуки як Об-БГ та Об-(4-бромотієніл)гуанін зв'язуються з активним центром ферменту та інактивують його, збільшуючи чутливість клітин до алкілувальних сполук [6, 7, 8]. У досліджах на культурах клітин людини (A375M, SL68, XP12BE та ін.) показано, що Об-БГ і Об-(4-бромотієніл) гуанін різко підвищують чутливість пухлинних клітин до цитотоксичного впливу метилувальних і хлороетилувальних сполук, у тому числі темозоломід у [7, 11, 85].

Об-(4-бромотієніл)гуанін (Ломегуатріб або PaTrin-2) є у 10 разів потужнішим, ніж Об-бензилгуанін. У досліджах *in vitro* показано, що PaTrin-2



значно підвищує чутливість пухлинних клітин до цитотоксичної дії темозоломідом [85]. Він є сильнодіючим та малотоксичним інгібітором MGMT, який відносно недавно введено у схеми клінічних досліджень [84]. Інгібітор PaTrin-2 використовують у комбінації зі сполуками тріазену для того, щоб збільшити їхню ефективність проти пухлинних клітин із високим рівнем активності MGMT.

Існують інгібітори іншої природи, наприклад, ДНК-спрямований інгібітор MGMT – катіонний порфірин 5,10,15,20-тетракіс(диізопропіл-гуанідин)-21Н,23Н-порфін (DIGPor), який селективно зв'язується з ДНК, що містить Об-метилгуанін і таким чином пригнічує MGMT [86], однак їх недоліком є те, що для них неможлива подальша спрямована хімічна оптимізація для доведення до рівня терапевтичного використання.

На сьогодні посилення чутливості пухлинних і нормальних клітин до алкілувальних сполук внаслідок інактивації MGMT інгібіторами показано як в експериментах на клітинних лініях, так і на ксенотрансплантантних моделях різних типів раку, а також у клінічних дослідженнях. Об-БГ та Об-(4-бромотієніл)гуанін вже проходить III стадію клінічних випробувань [84].

Різні поєднання інгібіторів MGMT та алкілувальних сполук у хіміотерапевтичних схемах тестуються у клінічних випробуваннях. Наприклад, вивчається використання Об-БГ з кармустином (BCNU, 1,3-біс(2-хлороетил)-1-нітрососечовина), темозоломідом (4-метил-5-оксо-2,3,4,6,8-пентазабіцикло [4.3.0]нона-2,7,9-триєн-9-карбоксамід) і Gliadel® (імплантант з поліфепросаном 20 та BCNU), а також Об-(4-бромотієніл)гуаніну з темозоломідом і дакарбазином. Використання Об-БГ та кармустину досліджується в США при лікуванні солідних пухлин та лімфом [87], а його комплекс із темозоломідом - для терапії прогресуючих злоякісних гліом [88].

Ефективність Об-(4-бромотієніл)гуаніну досліджується в комплексі з дакарбазином (5-(3,3-диметил-1-триазеніл)імідазол-4-карбоксимід) для лікування меланом в США (Middleton et al., 2000), із темозоломідом – при терапії лейкемії в Італії [89] та Великій Британії, при лікуванні раку молочної залози [90], солідних пухлин [91], раку прямої та товстої кишок 4 стадії з метастазами [92].

Проте, незважаючи на ефективність методів інгібування активності MGMT, які застосовуються при лікуванні онкологічних захворювань, існує ряд недоліків, які слід враховувати. На першому місці серед них - висока токсичність алкілувальної хіміотерапії, особливо стосовно клітин кісткового мозку та інших нормальних клітин, які швидко діляться, а систематичне використання низькомолекулярних інгібіторів MGMT в комбінації з алкілувальними сполуками обумовлює мієлосупресію і виникнення вторинних пухлин [1]. Боротьба з таким недоліком як висока токсичність хіміотерапії полягає у синтезі нових алкілтрансферазних інгібіторів, які б діяли вибірково на певні типи новоутворень [3].

Таким чином, пошук та дослідження нових пухлиноспецифічних і малотоксичних для нормальних клітин інгібіторів MGMT є вельми актуальним завданням.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Клітинні лінії та культивування клітин

У роботі використовували стандартні клітинні лінії HEP-2 (карцинома гортані людини), 293 (лінія ембріональної нирки людини, трансформована аденовірусом), 293T (похідна від клітинної лінії 293 з високою ефективністю трансфекції, містить T-антиген SV40), MCF7 (аденокарцинома молочної залози), – із Російської колекції клітинних культур хребетних. Використовували також оригінальну клітинну лінію, отриману у відділі генетики людини з гермінативних стовбурових клітин людини – E8.

Рутинне культивування клітин здійснювалося в середовищі Ігла в модифікації Дюльбекко – DMEM (DMEM Powder (1×) High glucose (4,5 g/L) with L-glutamine, «PPA») із додаванням 10 % інактивованої ембріональної сироватки великої рогатої худоби (FBS, «Biowest», США), 200 ОД/мл бензилпеніциліну та 200 мкг/мл стрептоміцину (ПАО «Київмедпрепарат», Україна) в невентильованих скляних флаконах при 37 °С або у вентильованому культуральному посуді при 37°С та 5 % CO<sub>2</sub>.

#### 2.2. Обладнання

При виконанні цієї роботи використано прилади і обладнання таких марок та виробників: термостат ТС-80 (Україна), CO<sub>2</sub> інкубатор IGO-150 «Cell Life» («Jouan», Франція), холодова центрифуга «Centrifuge 5415R» («Eppendorf», Німеччина), низькотемпературна морозильна камера для зберігання біологічних зразків та ензимів «MDF-U52-V» («Sanyo», Японія), мікроспектрофотометр для вимірювання концентрацій білків і нуклеїнових кислот «NanoDrop 2000» («Thermo Fisher Scientific Inc.», США), ультразвуковий дезінтегратор серії 4710 («Cole-Parmer», США), гель-документатор з системою охолодження для точної

фіксації нечітких, розмитих та блідих смуг Chemidoc («Bio-Rad», Велика Британія), джерело струму OmniPAC MIDI («Clever Scientific», Велика Британія); камери для горизонтального електрофорезу DYCP-31A («Zhengzhou Nanbei Instrument Equipment Co. Ltd. », Китай) / multiSUB Choice («Clever Scientific», Велика Британія), система із камери для вертикального електрофорезу та блоттингу Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra («Bio-Rad», Велика Британія), рН-метр / універсальний іономір ЭВ-74 (Білорусь), ваги Acculab VIC-212 та вага торсійна ВТ-500мг (ЗМА київ, Україна), автоматичні піпетки та дозатори «Eppendorf» («Eppendorf», Німеччина), роторний шейкер Stuart (Латвія), морозильники «Indesit», холодильники «Днерп-2», «Норд» (Україна), водяна баня (BIOSAN, Литва), ампліфікатор Real-Time CFX96 («Bio-Rad», США).

### **2.3. Обробка клітин біологічно активними речовинами**

**2.3.1. Обробка клітин гормонами.** Перед обробкою клітини висівали в чашки Петрі по 0,8 млн клітин на чашку та інкубували в DMEM. Через 24 год середовище змінювали на DMEM без сироватки та проводили обробку клітин. Обробляли клітини  $\beta$ -естрадіолом («Sigma-Aldrich», США, #E2758) і прогестероном («Sigma-Aldrich», США, #P8783). Інкубація клітин з гормоном тривала 24 год. Клітини знімали механічним методом, без використання протеолітичних ензимів, осад клітин ділили та зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$  для подальшого виділення РНК та білка.

**2.3.2. Обробка клітин інтерфероном  $\alpha 2\beta$ .** Клітини розсівали на чашки Петрі з розрахунку по  $\sim 1,8$  млн клітин на чашку та обробляли інтерфероном  $\alpha 2\beta$ . Після 24-годинної інкубації у стандартному ростовому середовищі після посіву, клітини обробляли інтерфероном в середовищі без сироватки протягом 8 годин. Після обробки клітин, середовище змінили на стандартне ростове DMEM з додаванням 10% FBS. Час постінкубації – 24 годин. Клітини знімали з субстрату механічно та зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$  для подальшого виділення білків.

**2.3.3. Обробка клітин новими потенційними інгібіторами MGMT в порівнянні із вже відомим інгібітором Об-БГ.** Клітини висівали по 1,5 млн на чашки Петрі. Через 24 год. додавали інгібітори в концентрації 10 мкМ, обробка тривала 24 години. Після обробки середовище змінювали на DMEM із сироваткою та інкубували ще 24 години. Після цього з культурального посуду відбирали середовище, клітини тричі промивали охолодженим PBS (рН 7.4), знімали клітини механічним методом без використання протеолітичних ензимів. Осад клітин зберігали при -80 °С для подальшого виділення білку.

#### **2.4. Дослідження цитотоксичності сполук *in vitro*. МТТ-тест**

Використовували стандартний МТТ-тест. Живі клітини висівали в 96-лункові плашки по 5-10 тис. клітин в об'ємі 200 мкл на лунку та інкубували протягом 24 год (37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>). Потім середовище змінювали на DMEM без ЕСТ–з β-естрадіолом / прогестероном («Sigma-Aldrich», США) до сумарного об'єму вмісту лунки 100 мкл та інкубували протягом 24 год (37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>). Кожна плашка містила контрольні лунки – лише культуральне середовище. Потім у кожен лунку додавали по 15 мкл розчину МТТ-реагента (3-(4,5-диметил-тіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-тетразоліум броміду («Sigma-Aldrich», США), в PBS у концентрації 5 мг/мл та інкубували протягом 4 год в термостаті за тих же умов. Надалі у кожен лунку додавали по 200 мкл ДМСО та розчиняли забарвлений продукт реакції. Вимірювання оптичної густини проводили на спектрофотометрі для мікропланшетів MR 700 Microplate Reader («Dynatech», Великобританія).

#### **2.5. Молекулярно-генетичні методи**

**2.5.1. Виділення тотальної РНК із клітин.** Із культурального посуду повністю відбирали DMEM, клітини на чашках Петрі тричі промивали холодним PBS від залишків ростового середовища, знімали механічним методом без використання протеолітичних ферментів, збирали в мікропробірки на 1,5 мл та

осаджували в центрифугі при кімнатній температурі 7 хв при 7000 g із наступною ще однією промивкою холодним PBS. Осад клітин зберігали для виділення РНК при -20 °C не довше тижня. Тотальну РНК виділяли з використанням QIAzol Lysis Reagent («QIAGEN», Німеччина, #79306) та TriReagent («Sigma-Aldrich», США, #T9424-200ML) згідно до протоколу виробників. Визначали концентрацію отриманої РНК за допомогою спектрофотометра NanoDrop 2000 («Thermo Scientific», США) при 260, 280 нм, а також при 230 нм для контролю чистоти зразку. Контроль якості отриманої РНК здійснювали методом електрофорезу в 1 % агарозному гелі (TAE буфер, 1 год, 60-70 V).

**2.5.2. Синтез кДНК.** На синтез комплементарної ДНК (кДНК) брали 1000 нг тотальної РНК, обробленої DNaseI («Thermo Scientific», США, #EN0521) згідно 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 випадкові праймери в загальному об'ємі 20 мкл. Реакція здійснювалася за стандартним протоколом, що рекомендований виробником. Синтезовану кДНК зберігали при -20 °C. кДНК розбавляли в 10 разів для geNorm і кількісної ПЛР в реальному часі та в п'ятеро для зворотньютранскриптазної ПЛР (ЗТ-ПЛР).

**2.5.3. Підбір референсних генів.** Для дослідження рівня експресії гена *MGMT* людини в умовах обробки гормонами здійснили підбір референсних генів, на експресію яких не впливала наявність β-естрадіолу / прогестерону. Проаналізували вплив цих гормонів на експресію 9 генів домашнього господарювання – *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *18S*, *TBP*, *TOP*, *HMBS*, *YWHAZ*, *RPLPO*. geNorm-аналіз даних кПЛР референсних генів здійснили програмами Norm Finder [93] й geNorm v3 [94], що працюють як макрос до програми Excel Microsoft Office, а також qBase+ (Biogazelle, free demo lisenсe; <https://www.biogazelle.com/qbaseplus>).

**2.5.4. кПЛР у реальному часі.** Визначали експресію гена *MGMT* людини, ядерних рецепторів естрогенів  $\alpha$  та  $\beta$  ( $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ ), ядерного рецептору прогестерону ( $PR$ ), та генів домашнього господарювання (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *18S*, *TBP*, *TOP*, *HMBS*, *YWHAZ*, *RPLPO*). Кожен зразок ампліфікували у триплетах. На реакцію брали по 150 нг кДНК із синтезованої суміші та по 7,5 пмоль прямого і зворотного праймерів, 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). ПЛР в реальному часі проводили на ампліфікаторі CFX96 та iQ5 («Bio-Rad», США) згідно до протоколу виробника протягом 40 циклів. Криві плавлення перевіряли від 65°C до 90°C з кроком у 0,5°C. Криві плавлення показали наявність цільового продукту (основний пік) і відсутність сторонніх продуктів.

**2.5.5. 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 у x1 буфері TBE. Для нанесення зразків у лунки гелю використовували 6x буфер для нанесення із додаванням 1 % SDS та ДНК-маркер FastRuler low range («Fermentas», Литва, #SM1103).

ДНК у ПААГ забарвлювали сріблом. Усі розчини готували із використанням деіонізованої води. Для цього гелі фіксували у 10 % розчині етанолу протягом 20 хв. Після промивки деіонізованою водою інкубували з 1 % азотною кислотою протягом 3-4 хв. Гелі двічі промивали у воді та інкубували в темному місці в 0,012 М розчині нітрата срібла протягом 20 хв. Після чого гелі промивали тричі та на світлі проявляли у декількох порціях свіжоприготовленого 0,28 М розчину карбонату натрію. Швидко промивали водою та нейтралізували проявник у розчині 10 % оцтової кислоти. Фотографували гелі, а також сканували в системі візуалізації ChemiDoc («Bio-Rad», США) для подальших підрахунків виходу продуктів ПЛР.

### **2.5.6. 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. Для нанесення зразків у лунки гелю використовували х6 буфер для нанесення із додаванням 1 % SDS та ДНК-маркер FastRuler low range («Fermentas», Литва, #SM1103). Електрофорез проводили в міні-камері для горизонтального електрофорезу. Фотографували ДНК в ультрафіолетовому світлі системи візуалізації ChemiDoc («Bio-Rad», США).

**2.5.7. Виділення білкових лізатів** Виділення білків проводили в за стандартними методиками. До клітин додавали лізуючий розчин, осад гомогенізували та піддавали дії ультразвуку тричі по 10 с. Гомогенат центрифугували 30 хв при +4 °С та 16,2 g. Концентрацію білку вимірювали за допомогою спектрофотометра NanoDrop 2000 («Thermo Scientific», США) у режимі «Protein A280».

**2.5.8. Білковий електрофорез.** Для аналізу експресії білка MGMT білкові лізати клітин розділяли вертикальним електрофорезом у 3 % концентруючому та 12 % розділяючому поліакриламідному гелях у камерах FisherBiotech FB-VE10-1 та системи із камери для вертикального електрофорезу та блоттингу Mini-PROTEAN Tetra («Bio-Rad», Велика Британія) і джерела струму OmniPAC MIDI («Cleaver Scientific», Велика Британія). До досліджуваних лізатів додавали 2× або 6× буфер для зразків (500 мМ трис-НС1, рН 6,8; 2 % додецилсульфату натрію; 10 % дитіотреїтолу; 0,1 % бромфенолового синього) та витримували 5 хв. у водяній бані 80-95 °С. Зразки наносили в гель з розрахунку 50-100 мг тотального білкового лізату на лунку. Вносили маркер молекулярної ваги



**2.5.9. Трансфер.** Поліакриламідний гель із електрофоретично розділеними білками промивали у дистильованій воді, а далі в буфері для трансферу. Полівінілдіфлюоридну мембрану («Millipore», США) активували протягом 30-60 с в метанолі, з наступним відмиванням в буфері для трансферу. Трансфер здійснювали 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; також використовували пасивний перенос в буфері PBS при +4 °C під пресом протягом 2-3 днів.

**2.5.10. Вестерн-блот аналіз.** Мембрану інкубували 1 год при постійному помішуванні у буфері для блокування неспецифічного зв'язування, що містив 5 % сухого знежиреного молока у TBS. Далі проводили інкубацію з моноклональними антитілами проти MGMT в розведенні 1/1000 («NovusBiologicals», США, # NB100-168) 1-3год при кімнатній температурі або протягом ночі на + 4°C. Далі мембрану промивали від залишків антитіл тричі по 10 хв при постійному помішуванні розчином TBST (25 mM Трис-НСl рН 7,4-7,6, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 0,01 % Tween-20). Інкубацію з вторинними видоспецифічними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому («Sigma-Aldrich», США, #A9044) проводили аналогічно первинним, після чого знову відмивали мембрану від залишків неспецифічно зв'язаних антитіл в розчині TBST. Для детектування хемілюмінесцентного сигналу специфічного зв'язаних вторинних антитіл мембрану інкубували протягом 1 хв в 1-1,5 мл розчину складу: 100 mM Трис-НСl рН 8,6, 1,3mM люмінол («Fluka», #09253) та 0,6 mM пара-кумарової кислоти («Fluka», #28200) та 0,001% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Далі мембрану переносили на спеціальний екран та детектували хемілюмінесценцію на приладі ChemiDoc («Bio-Rad», США), змінюючи експозицію від 10 до 300 с залежно від сили сигналу. Нормалізували дані відносно бета-актину або тубуліну, або ж контроль рівномірності нанесення білка проводили за допомогою денситометричної оцінки

сумарної кількості білка, який був перенесений на мембрану, у програмі OriginPro9.1.

## 2.6. Біоінформатичний аналіз

**2.6.1. Аналіз нуклеотидних послідовностей *in silico*.** Для одержання та аналізу нуклеотидної послідовності ДНК промотора та мРНК гена *MGMT* людини, дизайну олігонуклеотидних праймерів, для біоінформатичного пошуку регуляторних послідовностей, які потенційно здатні регулювати транскрипцію даного гена використали on-line бази даних і програми, доступ до яких вільний і безоплатний.

Нуклеотидну послідовність промотора гена *MGMT* людини (номер доступу X61657.1, 1157 п.н.) і 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, розміщеної на сервері NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Елементи відгуку на гормони (hormone response elements, HREs) шукали, використовуючи такі програми: Cis-element Cluster Finder (Cister) (<http://zlab.bu.edu/~mfrith/cister.shtml>), JASPAR (<http://jaspar.genereg.net>), LASAGNA-Search ([http://biogrid-head.engr.uconn.edu/lasagna\\_search](http://biogrid-head.engr.uconn.edu/lasagna_search)), Mapper (<http://genome.ufl.edu/mapper>), NUBIScan (<http://www.nubiscan.unibas.ch/cgi-bin/secure/NUBIScan/NUBIScan.cgi>), Promoter Analysis and Interaction Network Toolset (PAINT, v 4.0-pre), NHR-scan ([http://asp.ii.uib.no:8090/cgi-bin/NHR-scan/nhr\\_scan.cgi](http://asp.ii.uib.no:8090/cgi-bin/NHR-scan/nhr_scan.cgi)), PROMO ([http://algggen.lsi.upc.es/recerca/menu\\_recerca.html](http://algggen.lsi.upc.es/recerca/menu_recerca.html)), PromoterScan (<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan>), SignalScan (<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/signal>), Site recognition by Genetic Algorithm (SiteGA)

(<http://www.mgs.bionet.nsc.ru/cgi-bin/mgs/sitega/index.pl>), TfsScan (<http://www.hpa-bioinfotools.org.uk/pise/tfscan.html>), TFSEARCH ([http://www.usc.edu/hsc/nml/lib-services/bioinformatics/promoter\\_TF.html](http://www.usc.edu/hsc/nml/lib-services/bioinformatics/promoter_TF.html)), Tfsitescan (<http://www.ifti.org>), 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.

**2.6.2. Дизайн олігонуклеотидів-праймерів.** Дизайн олігонуклеотидів-праймерів для ампліфікації фрагментів і повнорозмірної кДНК здійснювали за допомогою програми Primer3, ver 0.4.0 (<http://primer3.sourceforge.net>). Олігонуклеотиди синтезували на приладі АКТА Oligopilot 10 (“Amersham Biosciens”) у відділі геноміки людини ІМБГ НАН України. При аналізі запропонованих пар праймерів надавали перевагу олігонуклеотидам з мінімальною різницею температур гібридизації. Для нівелювання можливого неспецифічного синтезу всі праймери перевіряли шляхом пошуку гомологій проти баз даних нуклеотидних послідовностей за допомогою BLASTN.

**2.6.3. Біоінформативний аналіз потенційних сайтів післятрансляційних модифікацій MGMT людини.** Амінокислотну послідовність білку MGMT *Homo sapiens* (2.1.1.63) взяли з бази даних GenBank серверу NCBI (NP\_002403.2, 238 амінокислотних залишків). Відомих партнерів цього білка шукали в базах даних APID, BIND (BOND), BioGRID, 12D, Gene/NCBI, HPRD, MINT, PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Пошук ізоформ MGMT здійснювали за допомогою бази даних ASAP. Для пошуку потенційних сайтів післятрансляційних модифікацій цього білка використали такі програми та бази даних: NetAcet 1.0 [95], PAIL [96] і Phosida [97] для передбачення сайтів ацетилювання, SUMOsp [98] і Phosida – сумоїлювання, UbPred [99] і BDM-PUB (<http://bdmpub.biocuckoo.org/prediction.php>) – убіквітинування, MeMo 2.0 [100] – метилювання; DISPHOS 1.3 [101], GPS 2.1 [102], KinasePhos [103], NetPhos 2.0

[104], NetPhosK 1.0 [105], Phosida, SCANSITE [106] – фосфорилювання білка. Для визначення доменної організації використали програму SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) [107], а для пошуку неструктурованих ділянок як потенційних сайтів фосфорилювання та ділянок зв'язування з іншими протеїнами – DISPHOS, IUPred [108] і Anchor [109].

**2.6.4. Статистичний аналіз.** Кожен експеримент повторювали не менш, ніж двічі. Результати експериментів подавали у вигляді середнього арифметичного зі стандартним квадратичним відхиленням. Статистичну достовірність між експериментами оцінювали за допомогою двовибіркового t-критерію Стьюдента.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 3.1. Біоінформатичний пошук елементів відгуку на гормони у промоторній ділянці гена *MGMT* людини

Щоб визначити, чи можуть гормони та інші біологічно активні речовини прямо регулювати транскрипцію гена *MGMT* людини, в тому числі через свої рецептори, що зв'язуються з відповідними елементами відгуку в промоторі, ми провели біоінформатичний аналіз промоторної ділянки досліджуваного гена.

Проаналізувавши промотор гена *MGMT* людини, ми детектували цілу низку цис-регуляторних елементів. Ми виявили елементи відгуку на стероїдні гормони, які зв'язують гомо- та/або гетеродимери рецепторів глюкокортикоїдів, прогестерону та естрогенів (рис. 3.1, табл. 3.1), а також потенційні сайти зв'язування з рецепторами до різних біологічно активних речовин, серед них рецептор активації проліферації пероксисом (лігандами є жирні кислоти, простагландини), рецептор тиреоїдних гормонів (тиреоїдні гормони), ретиноєвий орфановий рецептор (холестерол та його похідні), рецептор ретиноїду X (9-цис ретиноєва кислота), рецептор ретиноєвої кислоти (транс- і 9-цис-ретиноєві кислоти) та рецептор вітаміну D (рис. 3.2, рис. 3.3 табл. 3.1).

Отримані різними програмами дані порівнювали між собою й для подальшого аналізу не враховували елементи відгуку, які передбачені лише однією програмою. Як результат, ми передбачили кілька нових цис-регуляторних елементів у межах досліджуваного промотора, локалізація яких підтверджується двома і більше програмами.

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

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

Примітка. \* Жирним позначено вже підтвержені елементи відгуку

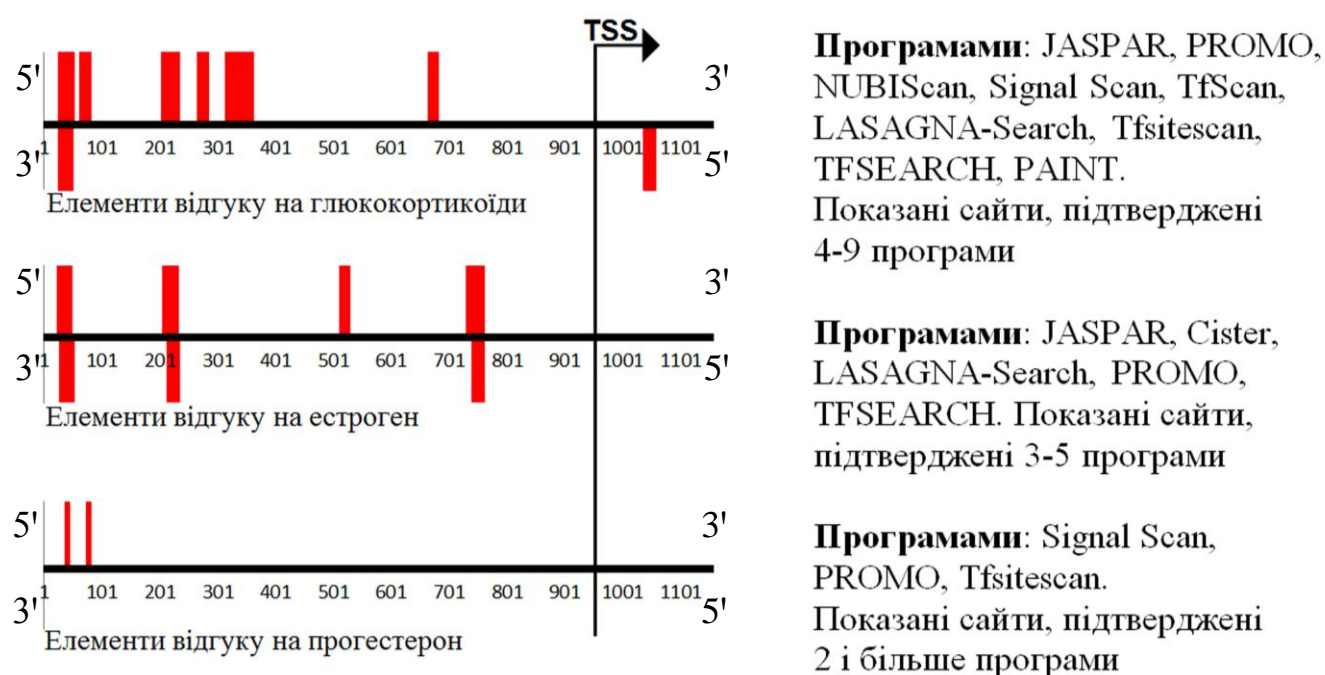
У межах даної промоторної ділянки передбачили численні GREs (елементи відгуку на глюкокортикоїди). Окрім вже відомих функціональних сайтів у позиціях 24-50 та 61-79 [63], ми виявили також нові потенційні GREs. Зокрема, сайти в позиціях 313-341, 438-461 та 1037-1057 виявили чотирма програмами із десяти, сайт 265-283 – шістьма, 24-48 та 204-233 – п'ятьма, а 24-50 і 61-79 – дев'ятьма програмами. На рис. 3.1. наведено GREs, детектовані щонайменше чотирма різними програмами. Варто також зазначити, що за допомогою проведеного аналізу ми також виявили вже відомі в промоторі гена елементи відгуку на глюкокортикоїди, локалізація яких підтверджена дев'ятьма програмами із десяти. Це дає надію на функціональну активність решти передбачених нами елементів відгуку. Окрім цього, важливо зазначити, що на сьогодні глюкокортикоїди – єдині відомі гормональні регулятори експресії гена *MGMT* [4, 63, 65]. Даний факт має важливе значення при лікуванні онкозахворювань.

Глюкокортикоїди та їх синтетичні аналоги широко використовують в медицині, зокрема як протизапальні та протинабрякові в післяопераційній реабілітації пацієнтів. Наприклад, при лікуванні гліом хіміотерапію застосовують після операції видалення пухлини. Синтетичний глюкокортикоїд дексаметазон, який дають пацієнтам після операції, активує експресію *MGMT* через GREs та зменшує ефективність алкулувальної хіміотерапії, що покликана знищити залишки клітин пухлини.

Чотири різних програми із зазначених в методах виявили PREs (елементи відгуку на прогестерон), однак лише два потенційні елементи відгуку в позиціях 35-42 та 72-79 в межах промоторної ділянки X61657.1 ми підтвердили усіма програмами (рис. 3.1).

Використовуючи сім різних програм, ми виявили в промоторній ділянці *MGMT* EREs (елементи відгуку на естрогени) (рис. 3.1). Цікаво, що ERE у позиції 204-229 даного промотора підтверджено за допомогою шести різних програм, а в позиції 729-758 – п'яти (рис. 3.1). Серед виявлених у досліджуваному промоторі EREs лише два потенційні елементи відгуку в позиціях 35-42 та 72-79

підтвержені усіма програмами (рис. 3.1). 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. [73, 76]. Ядерні рецептори естрогенів також індуюють експресію генів, що регулюються AP-1, за допомогою білково-білкових взаємодій. А *MGMT* якраз і має ділянки зв'язування із цим фактором транскрипції в промоторній ділянці [110].



**Рис. 3. 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 [111] (Dily FL *et al.*, 2018).

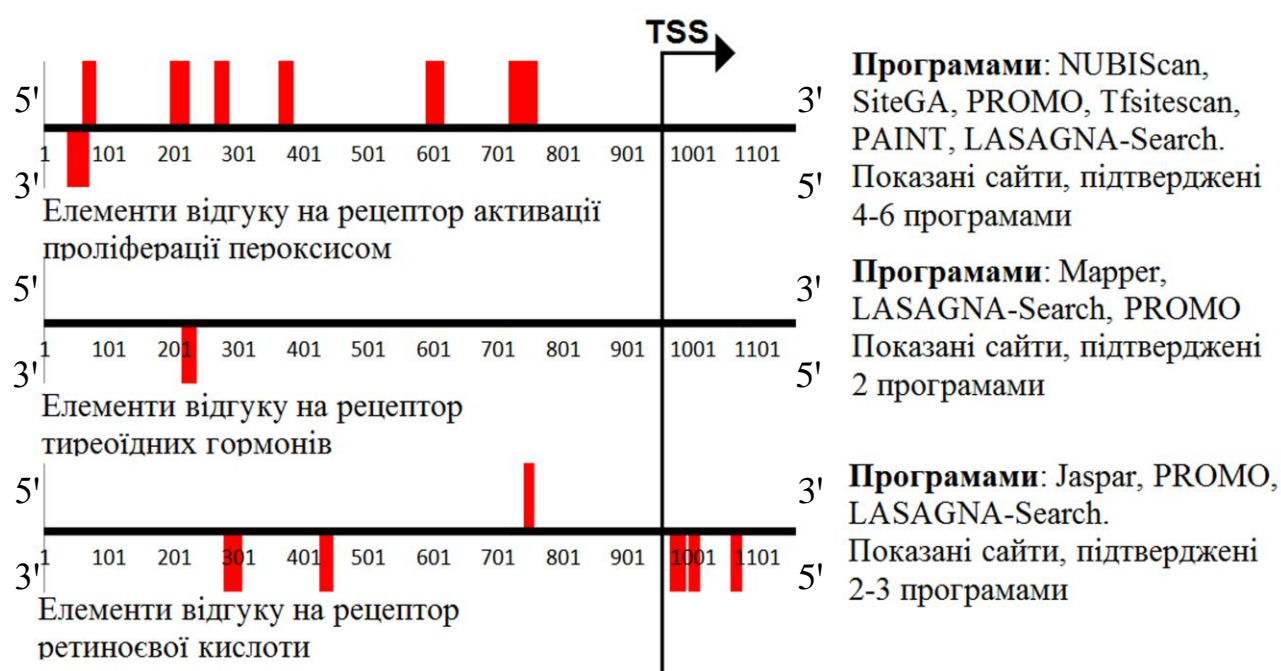
Наприклад, показано, що ER $\alpha$  має високу спорідненість до канонічної послідовності ERE, розташованої всередині гена вітелогеніну A2, і меншу до ERE в гені окситоцину. Це частково пояснює, чому відмінності в послідовностях ERE, такі як ті, що виникають внаслідок міндивідуальної мінливості генів або мутацій, можуть впливати на активацію експресії генів. Крім того, певні зміни в канонічній послідовності ERE можуть спричинити алостеричні зміни в структурі самого рецептора впливаючи на здатність комплексу залучати коактиватори та фактори транскрипції, які можуть сприяти біологічній активності ER [110]

Також, у промоторі гена *MGMT* людини виявили сайти зв'язування з такими транскрипційними факторами, як рецептор активації проліферації пероксисом, рецептор тиреоїдних гормонів, ретиноєвий орфановий рецептор, рецептор ретиноїду X, рецептор ретиноєвої кислоти та рецептор вітаміну D (рис. 3.2, рис. 3.3 табл. 3.1).

Серед восьми програм, якими детектували елемент відгуку на рецептор активації проліферації пероксисом (peroxisome proliferator-activated receptor response elements, PPAREs), шістьма програмами визначили елемент відгуку в позиції 360-389, п'ятьма – в позиції 193-221 (рис. 3.2). Також ще шість PPAREs виявили в позиціях 34-65, 58-77, 261-283, 588-614, 716-747 та 739-758 з допомогою чотирьох програм. Рецептор активації проліферації пероксисом експресується в різних тканинах, а його ліганди регулюють експресію цілої низки генів, відповідальних за ріст та диференціацію клітин, відповідь на оксидативний стрес, запалення та багато інших біологічних функцій [112].

Елементи відгуку на тиреоїдні гормони (thyroid hormone response elements, TREs) у промоторі гена *MGMT* людини виявили трьома програмами. Лише один елемент відгуку детектований двома різними програмами – в позиції 211-232. Інші дев'ять елементів відгуку виявлені лише однією програмою та не підтверджувалися іншими. Також цікаво, що ми виявили один елемент відгуку поза межами реферованого промотора X61657.1 в положенні 1205 -1182 від сайту

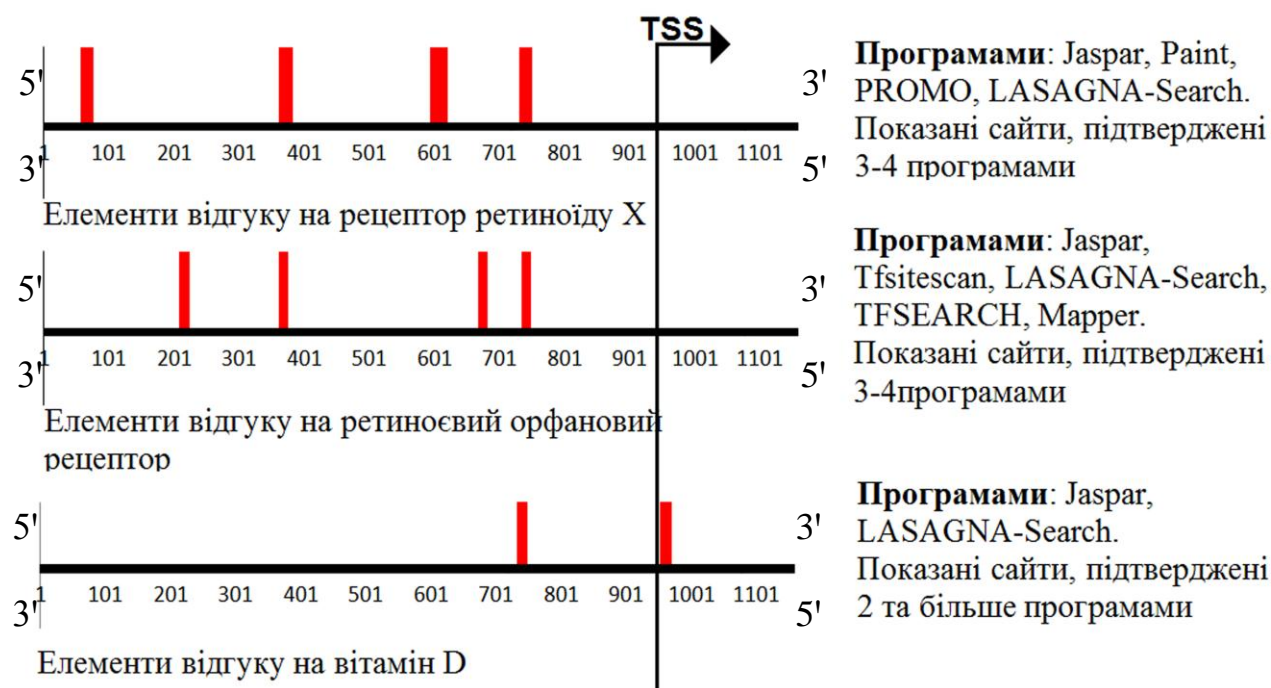
старту транскрипції з використанням програми MAPPER. Зокрема показано, що тиреоїдні гормони відіграють важливу роль у проліферації клітин, що походять від пухлин грудей [113], гліом/гліобластом [114], раку щитовидної залози [115], а також нормальних клітин підшлункової залози та острівців Ларгенганса [116]. Елементи відгуку на рецептор ретиноєвої кислоти (retinoic acid receptor response elements, RAREs) детектували чотирма програмами, три із яких виявили один RARE в позиїї 739-753, дві програми – шість елементів відгуку в позиціях 275-291, 286-302, 423-442, 739-753, 964-986, 992 – 1008 та 1057 – 1073 (рис. 3.2).



**Рис. 3.2.** Позиція сайтів зв'язування рецепторів: активації проліферації пероксисом, тиреоїдних гормонів, ретиноєвої кислоти 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

У промоторі даного гена також передбачили елементи відгуку на рецептор ретиноїду X (retinoid X receptor response elements, RXREs) за допомогою чотирьох програм, із них елемент відгуку в позиції 729-747 виявлено всіма програмами, а в позиціях 593-617, 360-379, 56-73 – трьома (рис. 3.3). Дані щодо потенційної ролі

ретиноїдів у лікуванні онкозахворювань наразі суперечливі [117, 118, 119]. 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 [120].



**Рис. 3.3.** Позиція сайтів зв'язування рецепторів ретиноїду X, ретиноєвого орфанового рецептору та рецептору вітаміну D 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

Наявність елементів відгуку на ретиноєвий орфановий рецептор (RAR-related orphan receptor response elements, ROREs) в промоторі *MGMT* передбачили чотири програми. На рис. 3.3 наведено елементи відгуку, які виявлено щонайменше трьома програмами. Зокрема, ROREs в позиціях 207-220 і 733-746 промотора передбачили всіма програмами, а елементи в позиціях 360-373 і 666-679 – трьома. Є дуже 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 [121].

Лише дві програми передбачили наявність двох елементів відгуку на вітамін D (Vitamin D receptor-like response elements, VDREs) в позиціях 730-745, 951-966 (рис. 3.3). Показано роль рецептору вітаміну D в захисті від раку. Наприклад, інгібування ним проліферації через негативну регуляцію транскрипції *c-myc*, (відомий протоонкоген), проте дане питання дискусивне через складний спосіб дії даного рецептора [122].

Варто зазначити, що ми виявили багато елементів відгуку, а також їхніх напівсайтів тільки однією із зазначених в методах програм (дані не наведено). Також, багато з виявлених нами елементів відгуку мають однакову локалізацію (рис. 3.1, табл. 3.1), 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 *in vivo* можуть виконувати регуляторну роль [123, 124].

Питання щодо функціональної активності виявлених потенційних елементів відгуку на гормони та регуляції експресії гена *MGMT* гормонами в клітинах потребує подальших експериментальних досліджень.

Отже, в результаті біоінформатичного аналізу виявили нові потенційні сайти зв'язування з ядерними рецепторами стероїдних гормонів, зокрема елементи відгуку на прогестерон, естрогени і глюкокортикоїди. Підтвердили два відомих елементи відгуку на глюкокортикоїди. Також передбачили елементи відгуку на рецептороподібні фактори тиреоїдних гормонів, зокрема сайти зв'язування із ретиноєвим орфановим рецептором, рецепторами тиреоїдних гормонів, вітаміну D, ретиноєвої кислоти, ретиноїду X та рецептором активації проліферації

пероксисом. В нашому біоінформатичному аналізі ми не лише детектували нові потенційні HREs, але і вже відомі, з підтвердженою функціональною активністю.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

**Нідоєва З.М.,** Самойленко І.О., Підпала О.В., Лукаш Л.Л., Яцишина А.П. (2015) Біоінформатичний пошук елементів відгуку на гормони у промоторі гена O6-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза (MGMT). Фактори експериментальної еволюції організмів, 17, 74-78.

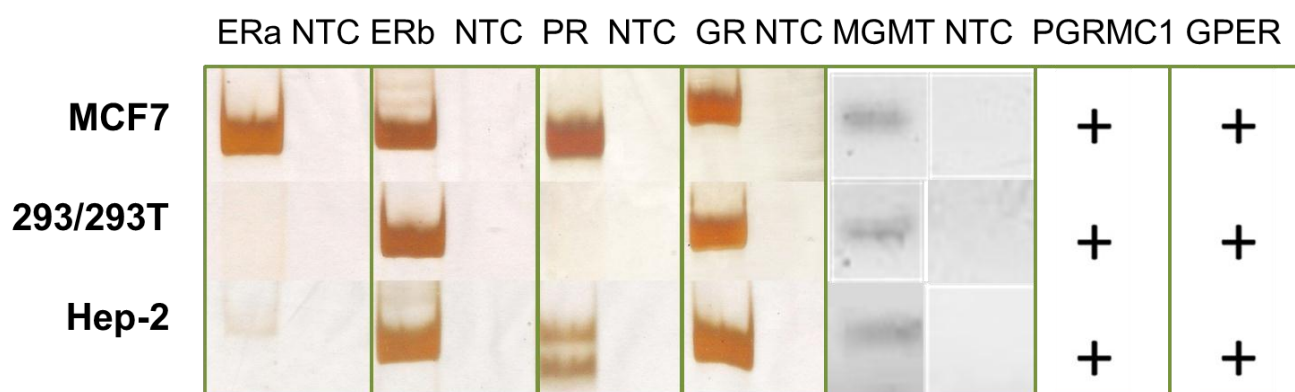
**Nidoieva Z.,** Samoilenko I., Pidpala O., Iatsyshyna A. (2014 October) In silico identification of hormone response elements in the promoter region of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene. Opening of the Academic Year 2014/2015 at Biocentrum Ochota, Warsaw, Poland, 17-18 october

**Nidoieva Z. M.,** Iatsyshyna A.P., Lukash L.L (2014 May) 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.

### 3.2. Експресія генів ядерних рецепторів у досліджуваних клітинах та підбір концентрацій гормонів

Для дослідження впливу гормонів на експресію гена *MGMT* людини ми підбирали клітинну модель експерименту та умови обробок клітин гормонами: перевірили клітинні лінії на експресію ядерних рецепторів, підбрали фізіологічні концентрації гормонів та перевірили їх можливу токсичність на клітини методом МТТ.

Ми перевірили клітинні лінії 293, 293Т, МСF7, НЕр-2 на експресію *MGMT*, ядерних та мембранних рецепторів – посередників передачі сигналу гормону. Зокрема, проаналізували експресію рецептора естрогенів альфа та бета, що експресуються з різних генів (ERa та ERb), рецептора глюкокортикоїдів (GR) та рецепторів прогестерону (PR), що експресуються з одного гена, але різних промоторів (рис. 3.4).



**Рис. 3.4.** Підбір клітинної моделі для дослідження впливу стероїдних гормонів на експресію гена *MGMT* людини. Статус експресії ядерних рецепторів: глюкокортикоїдів GR, прогестерону PR та естрогенів ERa та ERb, а також мембранних рецепторів в клітинах 293, 293Т, МСF7 та НЕр-2. Продукти 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, GPER - G protein-coupled estrogen receptor 1

Клітинна лінія MCF7 експресує всі перевірені нами ізоформи рецепторів, тоді як 293, HEp-2 та 293T лише PR, одну із ізоформ рецептору естрогенів – ER $\beta$ .

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 [66, 67, 68].

За даними літератури усі обрані клітинні лінії експресують як мембранний рецептор прогестерону – Progesterone Receptor Membrane Component 1 – PGRMC1 [67, 68], так і мембранний рецептор естрогенів– G protein-coupled estrogen receptor 1– GPER [<https://www.proteinatlas.org>].

Для роботи підібрали фізіологічні концентрації стероїдних гормонів естрогенів та прогестерону (табл. 3.2), що відповідають таким у плазмі крові жінок на різних етапах менструального циклу, після менопаузи, а також у дітей і чоловіків. Варто зазначити, що ці дані є усередненими, оскільки концентрації гормонів можуть сильно варіювати.

Таблиця. 3.2

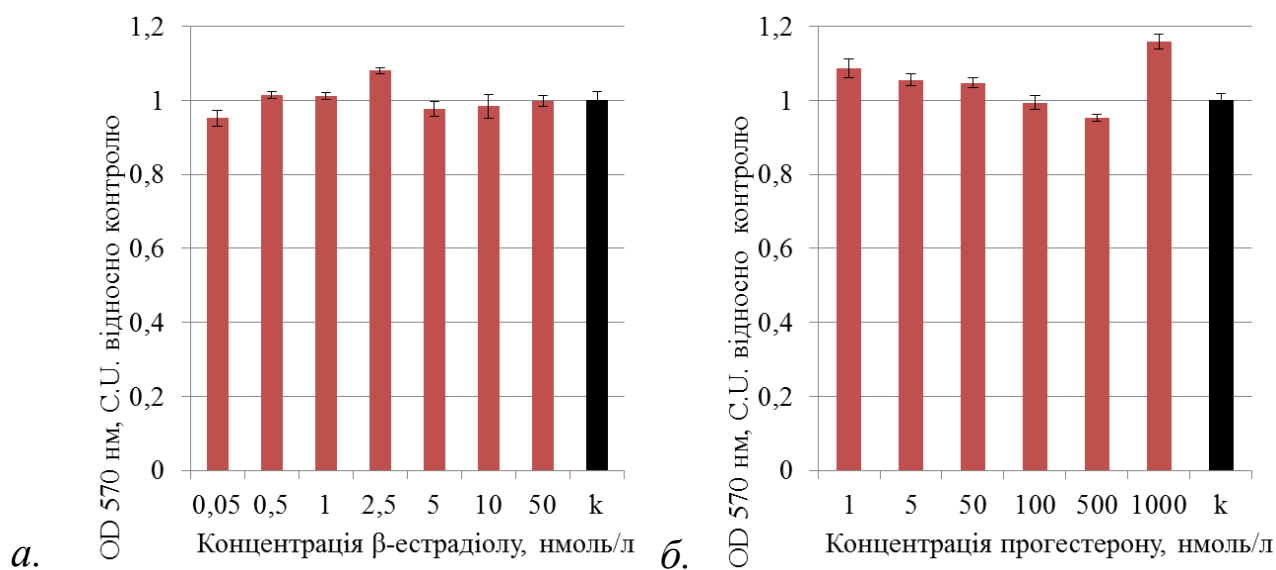
**Фізіологічні концентрації (у нмоль/л) гормонів в організмі і відповідні репрезентативні концентрації, обрані для проведення обробок клітин людини *in vitro***

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

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

Відомо, що стероїдні гормони циркулюють у крові здебільшого зв'язаними з білками сироватки крові. Найбільшу спорідненість до стероїдних гормонів має глобулін, що зв'язує статеві гормони (Sex hormone-binding globulin), що й зв'язує основну кількість стероїдних гормонів, тоді як лише незначна їх кількість є зв'язаною із іншими альбумінами. Лише 1-2 % гормонів, що залишається у вільному стані, не зв'язані з білками, виявляє свою фізіологічну дію [125]. Тож, щоб точно визначити, яка концентрація гормону чинить той чи інший ефект, клітини обробляють гормоном в безсироватковому середовищі.

Для аналізу можливого токсичного впливу гормонів на життєдіяльність клітин людини провели МТТ-тест, щоб виключити чи врахувати даний ефект в аналізі подальших результатів. За результатами статистичної обробки даних МТТ аналізу, гормони прогестерон та  $\beta$ -естрадіол в широкому діапазоні концентрацій не чинили цитотоксичного впливу на життєдіяльність клітин MCF7 людини (рис.3.5.).



**Рис.3. 5.** Перевірка цитотоксичності досліджуваних гормонів: *а* – естрогену та *б* – прогестерону на клітинах MCF-7. За результатами МТТ-тесту прогестерон та естроген в діапазоні досліджених нами фізіологічних концентрацій не чинили вираженого цитотоксичного впливу на життєдіяльність клітин MCF7 людини

Отже, ми підбрали фізіологічні концентрації гормонів та обрали клітинні моделі для експериментів. Щоб дослідити вплив  $\beta$ -естрадіолу на експресію гена



*MGMT* ми обрали клітинні лінії MCF7 та 293T. MCF7 експресує обидві ізоформи мембранного рецептора ERa та ERb, а 293T лише ERb. Обидві клітинні лінії експресують мембранний рецептор естрогенів. Тож порівнюючи дані, отримані між MCF7 та 293T, можемо спекулювати через який із рецепторів відбувається той чи інший ефект. Вплив прогестерону на експресію гена *MGMT* ми визначали на клітинах MCF7, 293T та HEp-2. MCF7 та HEp-2 мають ядерний рецептор, а 293T – ні. Всі ці клітини експресують мембранний рецептор прогестерону. Тож порівнюючи дані, ми могли б диференціювати вплив через ядерні або через мембранні рецептори.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

**Нідоєва З.М., Яцишина А.П. (2020)** Вплив прогестерону на експресію гена *MGMT* людини у клітинах MCF7, HEp-2 та 293. Вісник генетиків та селекціонерів, 18(1,2), 16-21.

**Нідоєва З.М., Яцишина А.П. (2017)** Регуляція експресії гена *MGMT* естрогеном у клітинах людини *in vitro* Фактори експериментальної еволюції організмів, 20, 79-83.

**Nidoieva Z., Lukash L.L., Iatsyshyna A.P. (2015 July)** Steroid hormones as regulators of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) transcription. EMBO Young Scientists Forum 2 - 3 July, Warsaw, Poland

**Nidoieva Z. M., Iatsyshyna A.P., Lukash L.L (2015 May)** 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.

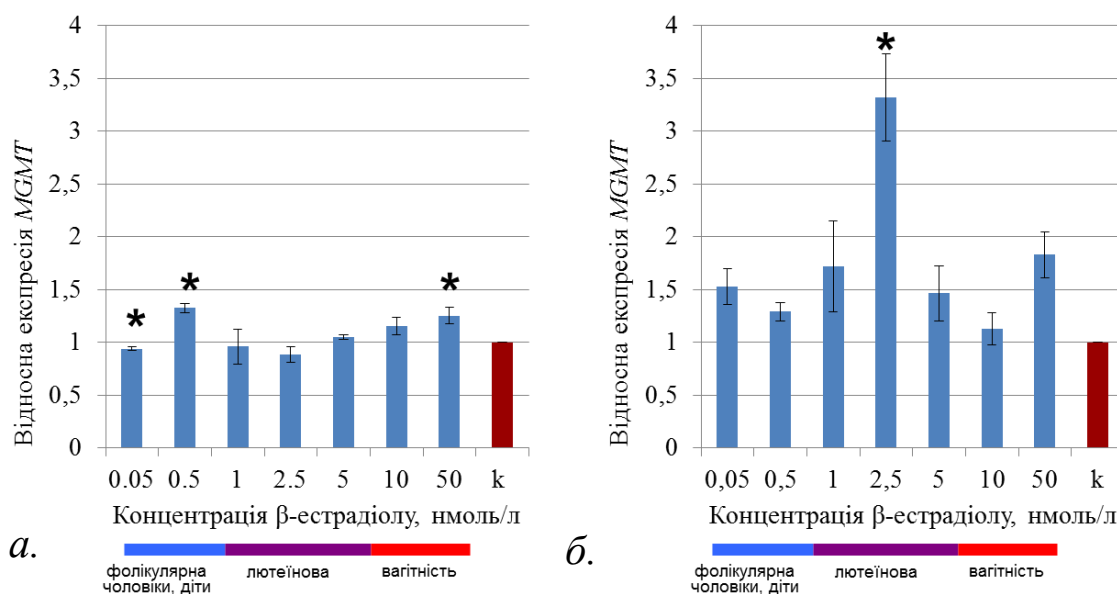
### 3.3. Регуляція експресії гена *MGMT* β-естрадіолом

Відомо, що естрогени впливають як на експресію різних регуляторів клітинного циклу й проліферації, наприклад на *c-fos*, *c-myc*, *HER2/neu*, ростові фактори, цикліни, так і на диференціацію клітин [73]. Таку різноманітну дію на клітини β-естрадіол проявляє через так звані класичні та неklasичні механізми [69, 70]. В першому варіанті естрогени регулюють експресію генів, зв'язуючись через рецептори ERα та ERβ зі своїм елементом відгуку в промоторі [62], впливаючи на транскрипцію таргетного гена. При неklasичній дії естрогени можуть діяти значно швидше, оминаючи етап регуляції транскрипції, через свій мембранний рецептор GPER1, одразу вмикати активацію вторинних посередників [78].

Згідно даних ПЛР в реальному часі β-естрадіол впливає на рівень транскрипції *MGMT* у клітинах 293T і MCF7 (рис 3.6, 3.7). Варто зазначити, що β-естрадіол має тенденцію активувати транскрипцію гена *MGMT* в концентраціях, що репрезентують такі в крові жінок до та після передовуляційного піку (0,5 нмоль/л) й під час вагітності (10, 50 нмоль/л). 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. 3.6а, 3.7.а). Цікаво, що в клітинних лініях 293T та MCF7 із різним патерном експресії ізоформ ядерних рецепторів естрогенів спостерігали схожий ефект (рис. 3.6а, 3.7.а). Клітини MCF7 експресують обидві ізоформи – ERα та ERβ, тоді як 293T експресують лише ERβ, що виявляє антагоністичну дію щодо ERα, 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.

Також дослідили вплив β-естрадіолу 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  $\beta$ -естрадіолу 0,5 нмоль/л, де спостерігається також і зростання у кількості мРНК (рис. 3.7). В клітинах 293Т найбільше білка MGMT виявляли при концентрації  $\beta$ -естрадіолу 2,5 нмоль/л (рис. 3.6.б).

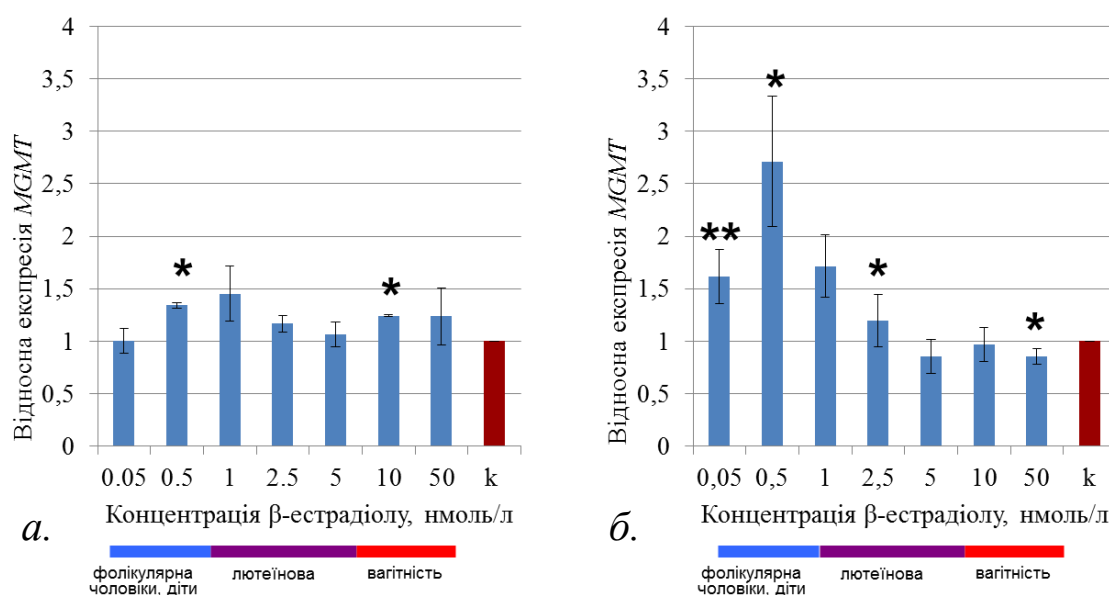


**Рис. 3.6.** Регуляція експресії гена *MGMT* людини естрогенами у клітинах 293Т з патерном експресії ядерних рецепторів: ERa - /ERb + / GPER1 +. Вплив  $\beta$ -естрадіолу на: **а** – кількість транскрипту *MGMT*/(*RPLPO*+*HMBS*); **б** – кількість білка MGMT. Кількість MGMT нормалізована відносно бета-актину та тубуліну, обраховане середнє геометричне. Різниця порівняно з контролем \*  $p < 0,05$

Ми також досліджували дію  $\beta$ -естрадіолу і в клітинах лінії 293 (експресують лише ERb/ ERa - /ERb + / GPER1 +.). У цих клітинах досліджуваний гормон при всіх концентраціях теж позитивно регулював експресію гена *MGMT* на рівні білка (дані не наведено).

З огляду на виразніший вплив  $\beta$ -естрадіолу 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  $\beta$ -естрадіолу на експресію *MGMT* людини

на рівнях мРНК та білка, залишається дискусивним та потребує подальшого дослідження.



**Рис. 3.7.** Регуляція експресії гена *MGMT* людини естрогенами у клітинах MCF7 з патерном експресії ядерних рецепторів: ERa + /ERb + / GPER1 +.. Вплив β-естрадіолу на: **а** – кількість транскрипту *MGMT*/(*RPLPO*+*HMBS*); **б** – кількість білку *MGMT*. Кількість *MGMT* нормалізована відносно бета-актину. Різниця порівняно з контролем \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$

Отже, виявили, що β-естрадіол здатен активувати експресію *MGMT* як на рівні мРНК, так і на рівні білка. Хоча в клітинах 293T та MCF7 рецептори естрогенів мають різний патерн експресії, ми не спостерігали значної різниці у впливі певних концентрацій β-естрадіолу на кількість транскриптів *MGMT* у цих клітинних лініях. Різницю у впливі естрогенів на експресію *MGMT* ми спостерігали на рівні білка. В клітинах 293T β-естрадіол спричиняв зростання білка в концентрації 2,5 нмоль/л у більш, ніж 3 рази порівняно з контролем, а у MCF7 – у більш, ніж удвічі в концентрації 0,5 нмоль/л, що репрезентує базальний рівень естрогенів в крові статевозрілих жінок до настання менопаузи.

Таким чином, отримані нами дані свідчать про позитивну регуляцію гена *MGMT*  $\beta$ -естрадіолом, проте не дають чіткої відповіді про механізм цієї дії – через ERE в промоторі чи через мембранний рецептор.

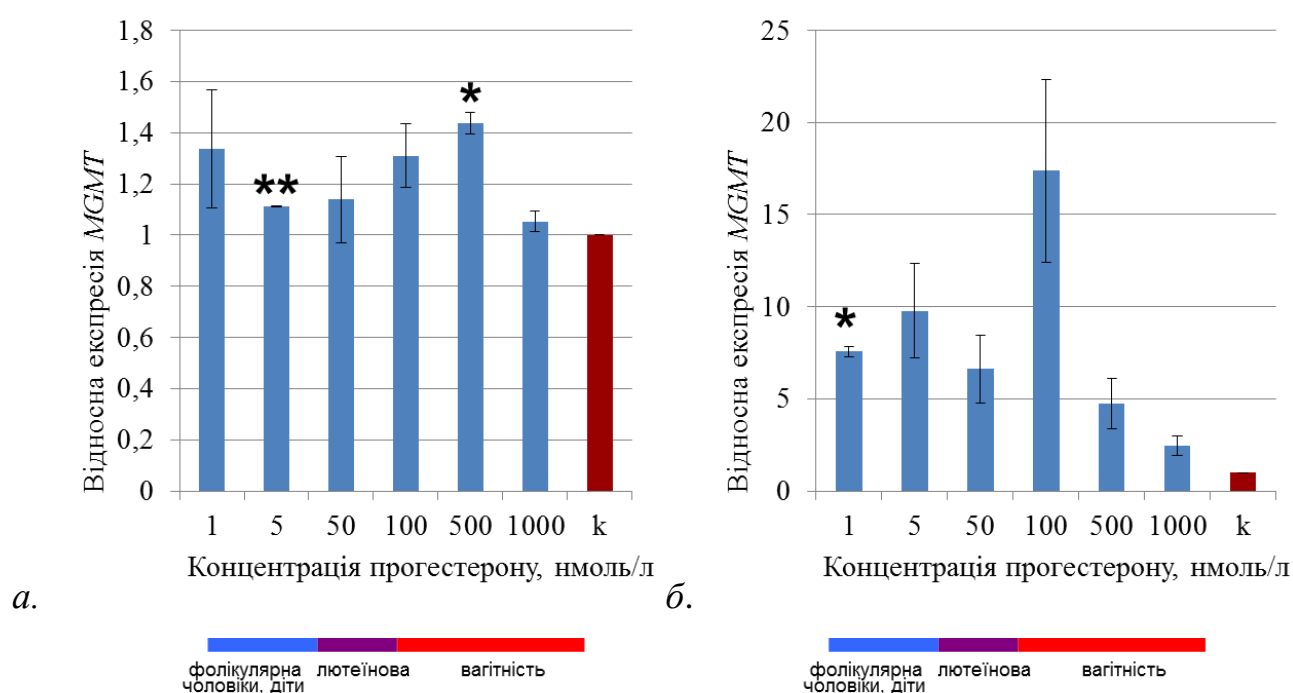
Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

**Нідоєва З.М., Яцишина А.П.** (2017) Регуляція експресії гена *MGMT* естрогеном у клітинах людини *in vitro* Фактори експериментальної еволюції організмів, 20, 79-83.

**Nidoieva Z., Lukash L.L., Iatsyshyna A.P.** (2015 July) Steroid hormones as regulators of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) transcription. EMBO Young Scientists Forum 2 - 3 July, Warsaw, Poland.

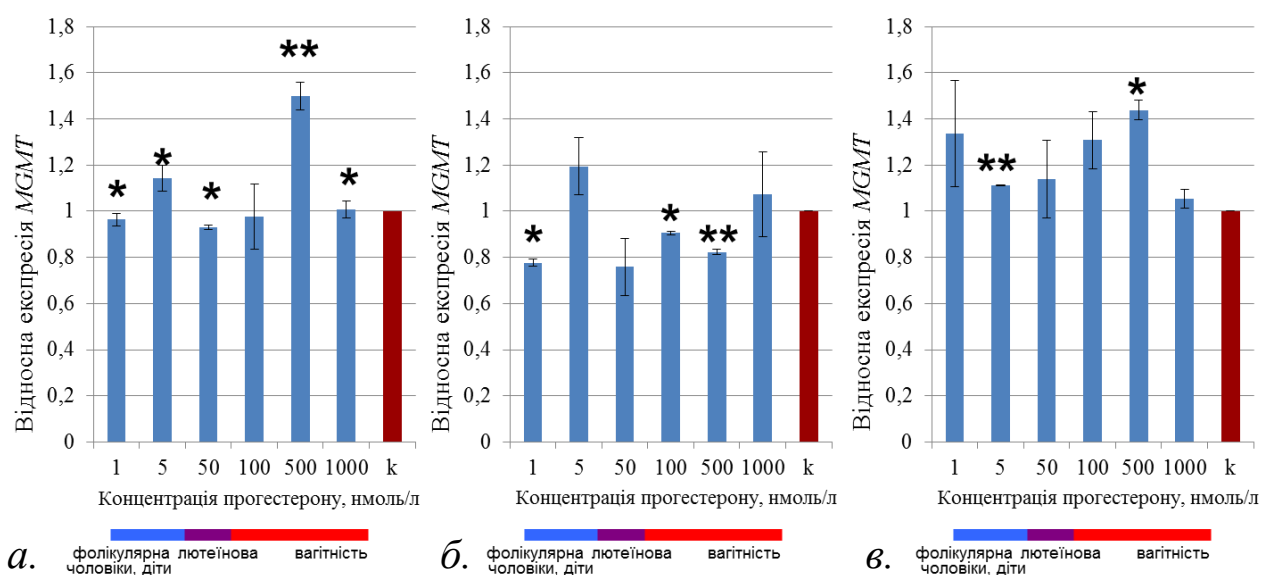
### 3. 4. Регуляція експресії гена *MGMT* прогестероном

У клітинах лінії MCF7, що експресують і ядерний, і мембранний рецептори прогестерону, ми спостерігали зростання кількості мРНК досліджуваного гена під впливом прогестерону при усіх досліджуваних концентраціях. Найбільше зростання кількості транскрипту спостерігали при концентрації прогестерону 500 нмоль/л, що відповідає концентрації прогестерону в крові вагітних (рис. 3.8.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 [126, 127]. 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. 3.8.б).



**Рис. 3.8.** Регуляція експресії гена *MGMT* людини прогестероном в клітинах MCF7. Вплив прогестерону на: **а** – кількість транскрипту *MGMT*/(*ACTB*+*YWHAZ*); **б** – кількість білка *MGMT*. Вміст білка *MGMT* нормалізовано відносно бета-актину. Різниця порівняно з контролем \*  $p < 0,06$ ; \*\*  $p < 0,003$

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.3.9.б), тоді як в клітинах 293 без ядерного рецептору прогестерону ми спостерігали більш значне зростання вмісту транскрипта гена *MGMT* людини при концентрації 500 нмоль/л (рис.3.9.в). Подібне збільшення кількості транскрипта при концентрації 500 нмоль/л ми спостерігали і в клітинах MCF7, що мають ядерний рецептор прогестерону (рис. 3.9.а), тож можна припускати, що це пов'язано із неklasичною регуляцією.



**Рис. 3.9.** Регуляція експресії гена *MGMT* людини прогестероном. Вплив прогестерону на кількість транскрипту: **а** –  $MGMT/(ACTB+YWHAZ)$  в клітинах 293, різниця порівняно з контролем \*  $p < 0,005$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; **б** –  $MGMT/(ACTB+YWHAZ)$  в клітинах HEp-2, різниця порівняно з контролем \*  $p < 0,02$ ; \*\*  $p < 0,01$  **в** –  $MGMT/(ACTB+YWHAZ)$  в клітинах MCF7, різниця порівняно з контролем \*  $p < 0,06$ ; \*\*  $p < 0,003$

Відомо, що в клітинах 293 прогестерон спричиняє значні зміни у статусі післятрансляційних модифікацій білка PGRMC1 [128, 129] та, отже, у його здатності взаємодіяти із білками-партнерами [128]. Також в клітинах 293 при наявності прогестерону PGRMC1 запускає сигнальні шляхи, що змінюють

базовий метаболізм клітини [128, 129], а також епігенетичний статус клітини [129], 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. 3.9).

Також варто зазначити, що хоча MCF7 та HEp-2 мають ядерний 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 впливом ядерного рецептору естрогенів. Показано, що PGRMC1 може фосфорилуватися естроген-регульованими кіназами [130], 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.

Отже, отримали дані щодо позитивної регуляції експресії гена *MGMT* прогестероном як у клітинах MCF7 та HEp-2, що експресують ядерний рецептор, так і у клітинах 293, які його не експресують. Оскільки усі досліджувані клітинні лінії експресують мембранний рецептор прогестерона й ми спостерігали позитивний вплив прогестерона на експресію *MGMT*, механізм такого впливу прогестерона складніший, ніж пряма регуляція через ядерний рецептор (класичний). Щодо значного збільшення кількості білка *MGMT* отримані дані нашою групою на думку, що прогестерон не лише призводить до збільшення кількості транскрипту *MGMT*, а й до активації синтезу білка або ж сповільнення його деградації.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

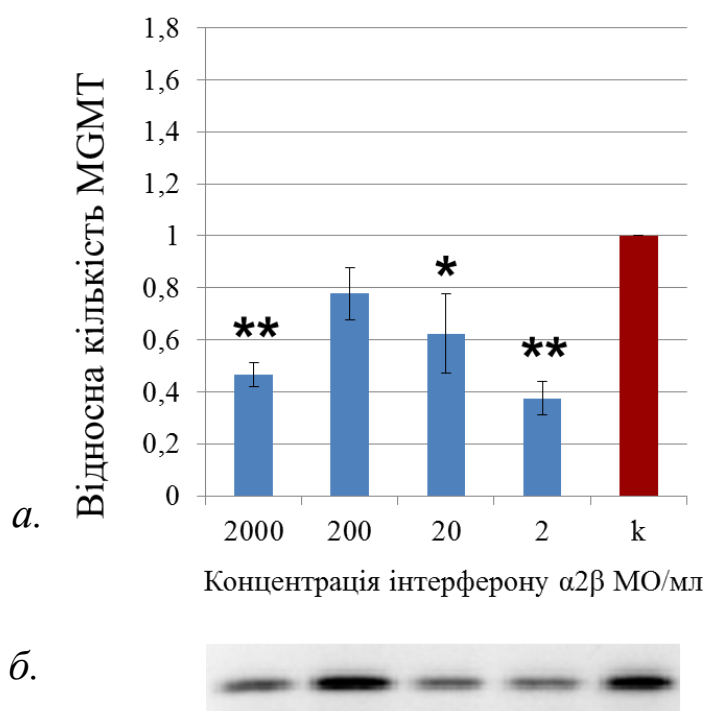
**Нідоєва З.М., Яцишина А.П. (2021)** Вплив прогестерону на експресію гена *MGMT* людини у клітинах MCF7, HEp-2 та 293. Вісник генетиків та селекціонерів, 18(1,2), 16-21.



### 3. 5. Вплив синтезованого в рослинах рекомбінантного інтерферону $\alpha 2\beta$ на експресію MGMT

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

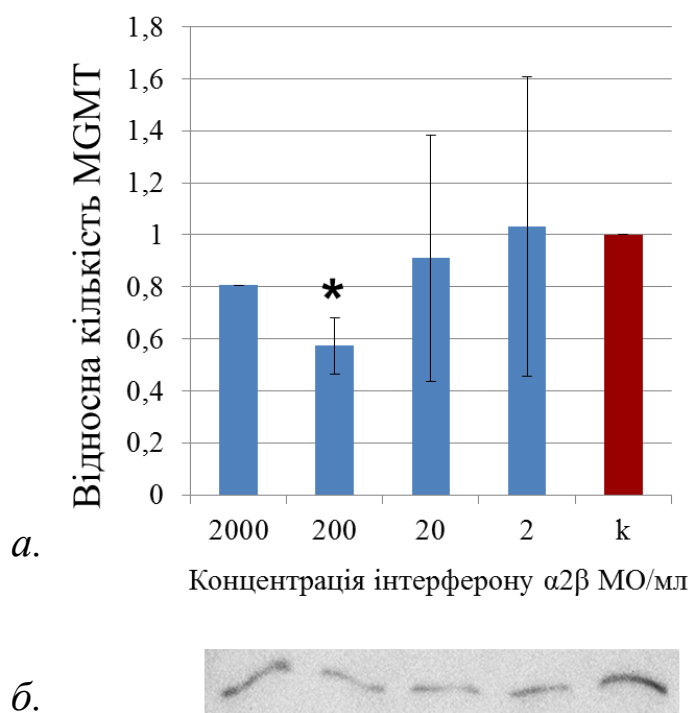
Усереднені дані експериментів з дослідження впливу синтезованого в рослинах INF  $\alpha 2\beta$  на експресію MGMT в клітинах лінії HEp-2 за допомогою Вестерн-блот аналізу представлено на рис. 3.10 та 3.11. Статистично достовірний ефект зниження кількості досліджуваного білку в пухлинних клітинах виявлено при усіх досліджених концентраціях інтерферону (2, 20, 200, 2000 МО/мл) відносно контролю.



**Рис. 3.10.** Вплив інтерферону  $\alpha 2\beta$  на кількість білка MGMT в клітинах HEp-2: *a* – діаграми результатів вестерн-блот аналізу. Різниця порівняно з контролем \*\*  $p < 0,0005$ , \*  $p < 0,05$ ; *б* – типова візуалізація хемілюмінесцентного сигналу вестерн-блотингу

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 [10].

Характер впливу рекомбінантного  $INF \alpha 2\beta$  на рівні експресії репаративного ензиму *MGMT* в клітинах лінії E8 непухлинного походження дещо різнився порівняно з його дією на пухлинні клітини HEP-2 (Рис.3.11.). 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. 3.11.** Вплив інтерферону  $\alpha 2\beta$  на кількість білка *MGMT* в клітинах E8: **a** – діаграми результатів вестерн-блот аналізу. Різниця порівняно з контролем, \*  $p < 0,05$ ; **б** – типова візуалізація хемілюмінесцентного сигналу вестерн-блотингу

Таким чином, нами вперше було виявлено інгібувальний ефект

рекомбінантного INF  $\alpha 2\beta$ , синтезованого в рослинах *N. benthamiana*, на експресію репаративного ензиму MGMT в клітинах людини. Встановили, що цей інгібувальний ефект був виразнішим у пухлинних клітинах порівняно з клітинами непухлинного походження.

Також, щоб виключити чи врахувати можливий токсичний вплив інтерферону на життєдіяльність клітин, колеги проводили МТТ-тест, за результатами їх статистичної обробки даних МТТ аналізу, рекомбінантний INF  $\alpha 2\beta$ , синтезований в рослинах *N. benthamiana* не чинив цитотоксичного впливу на життєдіяльність клітин (дані не наведено).

Оскільки на сьогодні про елементи відгуку на інтерферон в промоторі гена *MGMT* не відомо і ми не виявляли його біоінформатично [131] припускаємо, що INF  $\alpha 2\beta$  впливає опосередковано.

Отже, показали, що рекомбінантний INF  $\alpha 2\beta$ , синтезований в рослинах *N. benthamiana*, спричиняв статистично достовірне зниження кількості репаративного ензиму MGMT у клітинах лінії HEp-2 при усіх досліджених концентраціях (2-2000 МО/мл). При цьому спостерігали тенденцію до зворотної залежності ефекту інгібування експресії MGMT від концентрації рекомбінантного INF. В клітинах лінії E8 непухлинного походження виявили тенденцію до зниження кількості білка MGMT при використанні двох найбільших концентрацій INF  $\alpha 2\beta$ , хоча статистично достовірний ефект порівняно з контролем спостерігали лише за концентрації 200 МО/мл. Також ми виявили значно виразніший інгібувальний ефект INF  $\alpha 2\beta$  в пухлинних клітинах людини порівняно з клітинами непухлинного походження, що може бути пов'язано з різним рівнем активності певних регуляторних шляхів. Відповідно, ми висловили припущення стосовно одного із можливих механізмів цього впливу: інгібування NF- $\kappa$ B (відомого позитивного регулятора транскрипції гена *MGMT* [5] інтерфероном призводить до його «випадіння» з ланцюга регуляції транскрипції *MGMT*, а це, в свою чергу - до зниження кількості відповідного білкового продукту.

Таким чином рекомбінантний інтерферон  $\alpha 2\beta$  спричиняв зменшення кількості білка MGMT в клітинах *in vitro*. Виявлено, що його інгібувальний 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- $\kappa$ B.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

**Нідоєва З.М.,** Петерсон А.А., Рубан Т.П., Дзюба Г.В., Кучук М.В., Лукаш Л.Л. (2019) Вплив синтезованого в рослинах, рекомбінантного інтерферону  $\alpha 2\beta$  на експресію Об-метилгуанін-ДНК метилтрансферази в соматичних клітинах людини *in vitro*. Цитология и генетика, 53(6), 36-43.

### **3.6. Регуляція активності білка MGMT за рахунок післятрансляційних модифікацій та використання інгібіторів.**

**3.6.1. Відомі білкові партнери та сайти післятрансляційних модифікацій білка MGMT людини.** У результаті проведеного аналізу літератури та баз даних BioGRID, HPRD та інших відомо про 75 описаних білкових партнерів MGMT людини (Niture SK et al., 2005, Teo AK et al., 2001, Srivenugopal KS et al., 2000, Srivenugopal KS et al., 1996). Більшість цих білків (24) належить до класу нуклеїнзв'язувальних білків – DDX5, DDX24, EEF1B2, H2BFM, HIST1H2AM, HIST1H4A, HIST3H3, HNRNPA2B1, HNRNPC, MCM2, MCM3, MSH2, NCL, ORC1L, PABPC3, PCNA, POLD1, PRPF4, RPLP1, RPS15A, SMC1A, TOP1, UBB, XRCC6.

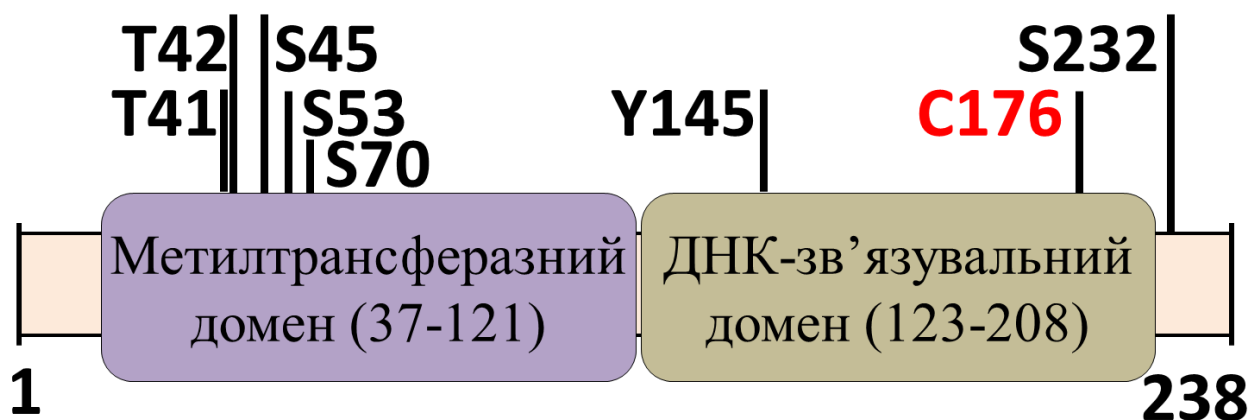
Також серед білків-партнерів MGMT людини зустрічається значна кількість (12) кіназ – CDK1, CDK2, CDK10, CDK12, CDKL5, CSNK2A1, CSNK2A2, PKM2, PRKACA, PRKCA, PRKCH, PRKDC, що наводить на думку про їхнє можливе залучення до взаємодії із MGMT і його фосфорилування.

На сьогодні відомо 8 сайтів післятрансляційної модифікації білка MGMT людини – T41, T42, S45, S53, S70, Y145, C176, S232 [34, 35, 36] (рис. 3.12.). Положення C176 алкілується, що пов'язано з репаративною функцією білка [3]. Інші положення фосфорилуються. Вважають, що воно знижує або інактивує ферментну активність білка та є одним з шляхів регулюції внутрішньоклітинних процесів.

В межах білка MGMT людини за допомогою програми SMART виявили 2 домени: метилтрансферазний (залишки амінокислот 37-121) та ДНК-зв'язувальний домен (залишки амінокислот 123-208). (рис. 3.12.). Виявлені домени пов'язані з виконанням цим ферментом своєї функції репарації ДНК.

Оскільки неструктуровані протеїни не мають чіткої енергетично стабільної третинної структури в нативному стані [108] та досягають стабілізації за рахунок взаємодії зі структурованим глобулярним партнером [109], власне в межах таких

неструктурованих ділянок протеїнів переважно відбувається фосфорилування [99].



**Рис. 3.12.** Відомі на сьогодні та підтвержені сайти післятрансляційної модифікації білка MGMT. Положення цистеїн 176 алкілується. Всі інші фосфорилуються. Доменна організація білка MGMT людини за даними програми SMART

Anchor також використовує цей підхід для передбачення неструктурованих ділянок і ділянок зв'язування з іншими протеїнами [109]. У білку MGMT людини сервер Anchor передбачив дві ділянки зв'язування з іншими протеїнами, зокрема у положеннях 22–29 та 221–223.

Передбачені ділянки зв'язування лежать поза межами метилтрансферазного та ДНК-зв'язувального доменів. Таким чином, MGMT є високоструктурним білком, адже модифікації в названих доменах призводили б до зміни просторової будови білка, а, отже, і функціональної активності. Найбільш доступними є N-кінець білка перед метилтрансферазним доменом (залишки амінокислот 22-29) та C-кінець білка після ДНК-зв'язувального домена (залишки амінокислот 221-223).

**3.6.2. Пошук нових сайтів ацетилювання та метилювання MGMT людини.** Післятрансляційні модифікації білків можуть змінювати їх роль в клітині та здатність взаємодіяти з іншими білками. Наприклад, ацетилювання залишків лізину в білковій молекулі може впливати на здатність цього білку зв'язуватися з ДНК [132], що для репаративного ферменту є важливим. Метилювання також впливає на біохімічні властивості модифікованих білків [133]. Зокрема показано, що метилювання відіграє важливу роль в регуляції активності репаративних ферментів відповідальних за гомологічну та негомологічну рекомбінацію [134].

Тож ми вирішили перевірити, чи має MGMT амінокислотні залишки, які потенційно можуть підлягати такій модифікації.

Програма NetAcet 1.0 визначила один сайт можливого ацетилювання – гліцин в позиції 3, з рахунком 0.471 в послідовності **MLGQPA**.

Програма Phosida виявила найбільш ймовірні сайти ацетилювання лізину в позиціях K132 та K135 з рахунком 91% та 92% відповідно. Проте отримали результати й з більш низьким рахунком (менше 90%) – K31 (86%), K34 (69%), K39 (67%), K49 (81%), K63 (84%), K67 (85%), K138 (85%), K156 (87%), K196 (62%), K209 (85%), K224 (87%).

За допомогою програми PAIIL виявили 11 потенційних сайтів модифікації, поданих в таблиці 3.3. Дана програма визначає ймовірність модифікації з різною точністю, залежно від вибору користувача: висока (поріг 0.5), середня (поріг 0.2) та низька (поріг 0.1). Найбільш ймовірними вважаються сайти з рахунком більше 0.5: K31, K39, K49, K67, K132, K135, K196, K209. Цікаво, що при виборі середнього та низького рівня точності аналізу, програма видавала однакові сайти.

Також проводили пошук потенційних сайтів метилювання MGMT з використанням програми MeMo 2.0. Дана програма не визначила жодного сайту потенційного метилювання білка MGMT людини.

Отже, в результаті аналізу виявлено 14 потенційних сайтів ацетилювання в амінокислотній послідовності білка MGMT людини. Як видно з результатів табл. 3.3, дані, отримані за допомогою програм PAIL і Phosida, перекриваються між собою. З іншого боку, результати, отримані за допомогою програми NetAcet 1.0 взагалі не співвідносяться з іншими. Тому, визначаючи найбільш ймовірні сайти ацетилювання, орієнтувалися на дані, отримані від PAIL і Phosida. Також інтригує той факт, що для двох сайтів – K209 та K39 програми PAIL і Phosida видали кардинально різні результати. Якщо PAIL дала їм максимальні рахунки з усіх, то Phosida обрахувала можливість їхньої модифікації як мінімальну.

Таблиця 3.3.

**Порівняння результатів, отриманих за допомогою програм PAIL, Phosida та NetAcet 1.0 щодо потенційного ацетилювання MGMT (фоном виділені найбільш ймовірні)**

№	Сайт	NetAcet 1.0	PAIL	Phosida	Спільні
1	G3	+			
2	K31		+	+*	
3	K34			+*	
4	K39		++	+*	+?
5	K49		+	+*	
6	K63		+*	+*	
7	K67		+	+*	
8	K132		+	+	+
9	K135		+	+	+
10	K138		+*	+*	
11	K156		+*	+*	
12	K196		+	+*	
13	K209		++	+*	+?
14	K224			+*	

Примітки: \* - низький рахунок, ++ - максимальний рахунок, ? – різний рахунок

Таким чином, передбачили найбільш ймовірні модифікації з найвищими рахунками для ацетилювання лізину в позиціях K132 та K135 (рис. 3.14).

Потенційних сайтів метилювання білка MGMT людини не виявили.



### 3.6.3. Аналіз білкової молекули MGMT на можливість SUMOїлування.

Відомо, що в клітині поширене SUMOїлування білків, зокрема ядерних, залучених до детекції пошкоджень ДНК та їх репарації [135]. Дана модифікація може впливати на функціонування білку та блокувати певні білок-білкові взаємодії [135]. Оскільки MGMT теж в основному локалізується в ядрі та є репаративним білком, ми аналізували його амінокислотну послідовність на наявність потенційних сайтів такої модифікації.

Із використанням програми Phosida виявлено лише один сайт модифікації білка в положенні K63 ([ED]XK[VILFP]).

Таблиця 3.4.

#### Порівняння результатів, отриманих з використанням програм SUMOsp та Phosida (фоном виділені найбільш ймовірні)

№	Сайт	SUMOsp	Phosida	Найбільш ймовірні сайти модифікації
1	K31	+		
2	K34	+		
3	K39	+		
4	K49	++		
5	K63	+	+	+
6	K67	+		
7	K132	+*		
8	K135	+		
9	K138	+		
10	K156	+*		
11	K196	+		
12	K209	+*		
13	K224	+*		

Примітки: \* - низький рахунок (>1), ++ - максимальний рахунок (<2)

Програма SUMOsp виявила 13 сайтів можливої взаємодії MGMT з SUMO (табл. 3.4.), причому деякі з досить високим рахунком – K31, K49, K135, K138, K196. Усі лізини, виявлені цією програмою, не консенсусні, тобто не були включені в послідовність  $\psi$ -K-X-E або  $\psi$ -K-X-E/D, де  $\psi$  – гідрофобна амінокислота. Хоча більшість лізинів, які сумоїлюються і знаходяться в таких консенсусних послідовностях, проте біля 23% лізинів білках клітин є

сумоїлованими поза такими мотивами [136], тож те, що виявлені потенційні сайти сумоїлування в білку MGMT не знаходяться в таких консенсусних послідовностях не виключає можливість такої модифікації.

Отже, в результаті біоінформатичного аналізу ми отримали дані щодо можливого SUMOїлування білка MGMT. З використанням програм SUMOsp отримали 13 залишків лізину, що потенційно можуть SUMOїлуватися, тоді як з використанням Phosida лише один лізин в позиції 63 (табл. 3.4.). Проте, аналізуючи рахунок, обчислений SUMOsp для лізину в кожному положенні, можна говорити про їхню нерівноцінність в даній реакції. Сайт K63 передбачений двома програмами, що не дивно, адже програма SUMOsp можливість модифікації усіх залишків лізину, що є в білку. Цікаво, що, якщо розмістити залишки лізину білка MGMT в послідовності зменшення рахунку, виданого програмою SUMOsp, сайт K63, передбачений двома програмами (рис. 3.14), займатиме 8 місце з 13, поступаючись K31, K39, K49, K67, K135, K138, K196.

**3.6.4. Детекція сайтів убіквітинування.** Показано, що алкільована форма білку MGMT після репарації ДНК убіквітинується, що є міткою для його подальшої протеасомної деградації. Це відбувається, оскільки приєднання алкільної групи до цистеїну в активному центрі білка призводить до його конформаційних змін, які й розпізнаються убіквітиною лігазою [39]. Проте, окрім мітки для протеасомної деградації, 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.

За результатами програми BDM-PUB передбачено 10 потенційних сайтів убіквітинування, поданих в зведеній табл. 3.5.

Згідно даних програми UbPred амінокислотна послідовність білка MGMT людини не містить сайтів зв'язування із убіквітином, оскільки виявлені програмою амінокислотні залишки лізину, наявні в білку, мають низький рахунок

(менше, ніж 0.62). Але слід відмітити рахунок K209 та K224 (по 0.59) близький до 0.62, що є пороговим значенням. Результати, отримані за допомогою програми UbPred, наведені в табл. 3.5.

Таблиця 3.5.

**Порівняння потенційних сайтів убіквітинування білка MGMT людини виявлених програмами UbPred та BDM-PUB (сірим виділені сайти, вірогідність убіквітинування яких найвища)**

№	Сайт	UbPred	BDM-PUB	Спільні
1	K31	+*	+	
2	K34	+*		
3	K39	+*	++	?
4	K49	+*	+	
5	K63	+*	+	
6	K67	+*	++	?
7	K132	+*	+	
8	K135	+*	+	
9	K138	+*		
10	K156	+*	++	?
11	K196	+*	+	
12	K209	+**	++	+
13	K224	+**		

Примітки: \* – низький рахунок, \*\* – низький рахунок, але наближений до мінімального значення порогу, ++ – рахунок <1.5; тоді як 0.3 – поріг; ? – різний рахунок

Отже, аналізуючи результати біоінформатичного аналізу можливості убіквітинування білка MGMT людини за допомогою програм UbPred та BDM-PUB, виявили 13 сайтів можливої модифікації (табл. 3.5.). Проте, порівнюючи результати, можна зробити висновок, що з найбільшою ймовірністю модифікується сайт K209 (рис. 3.14), для якого UbPred передбачила рахунок, наближений до порогового значення, а BDM-PUB рахунок, що є одним із найбільших, нею передбачених. Хоча не можна відкидати й інші результати – сайти K39, K67 та K156, для яких BDM-PUB видала найвищі рахунки, а UbPred обрахувала низькі.

**3.6.5. Пошук нових сайтів фосфорилювання.** Фосфорилювання білків є поширеним способом регуляції активності протеїнів та регуляції/зміни їхніх функцій [38]. Зараз точно встановлено та підтверджено лише три сайти фосфорилювання MGMT [35, 36]. Показано, що це зменшує репаративну активність білка [34]. Проте, можливе й фосфорилювання за іншими сайтами з іншим впливом на функціонування білку. Тож ми проаналізували амінокислотну послідовність MGMT щодо можливості фосфорилювання.

Використовуючи програму DISPHOS, у межах амінокислотної послідовності білка MGMT людини довжиною 238 аа виявили 4 потенційних сайтів фосфорилювання (табл. 3.7.). Згідно виданих результатів, серед 13 залишків серину в білку MGMT, програма визначила 4 з них як такі, що потенційно можуть фосфорилюватися – S13, S216, S 230, S232. Цікаво, що з відомих сайтів фосфорилювання програма DISPHOS 1.3 визначила лише один (S232), тоді як інші взагалі не були розпізнані.

У результаті пошуку сайтів фосфорилювання амінокислотних залишків у досліджуваному білку за допомогою програми GPS виявили 22 сайти такої взаємодії – S13, T23, T41, T42, S45, S53, T69, S70, T94, Y100, S124, S126, S144, Y145, S183, Y189, S190, S215, S216, T229, S230, S232 (табл. 3.7., Додаток Б).

За допомогою програми NetPhos 2.0 визначили такі сайти фосфорилювання: S13, S45, S53, S70, S230, S232, T23, T42 (табл. 3.7.). Порівнюючи отримані результати з відомими сайтами модифікації, дана програма визначила 5 з 7 відомих – S45, S53, S70, S232, T42. Інші підтвержені сайти (T41 та Y145) мають рахунок, менший порогового значення 0.5, проте якщо для T41 це значення складає 0.175, то для Y145 рахунок наближений до погору – 0.439.

Ідентифікацію нових потенційних сайтів фосфорилювання білка MGMT людини здійснювали також за допомогою програми Phosida. В результаті проведеного аналізу виявили такі сайти фосфорилювання з мінімальним пороговим значенням 50%: S13, T23, T41, T42, S45, S53, T69, S70, T94, S124, T126, S144, S182, S183, S190, S215, S216, T229, S230, S232; з порогом 95%: S13, **T41, S45, S53, S70**, S182, S183, S215, S216, S230, **S232**; з погором 100%: S230

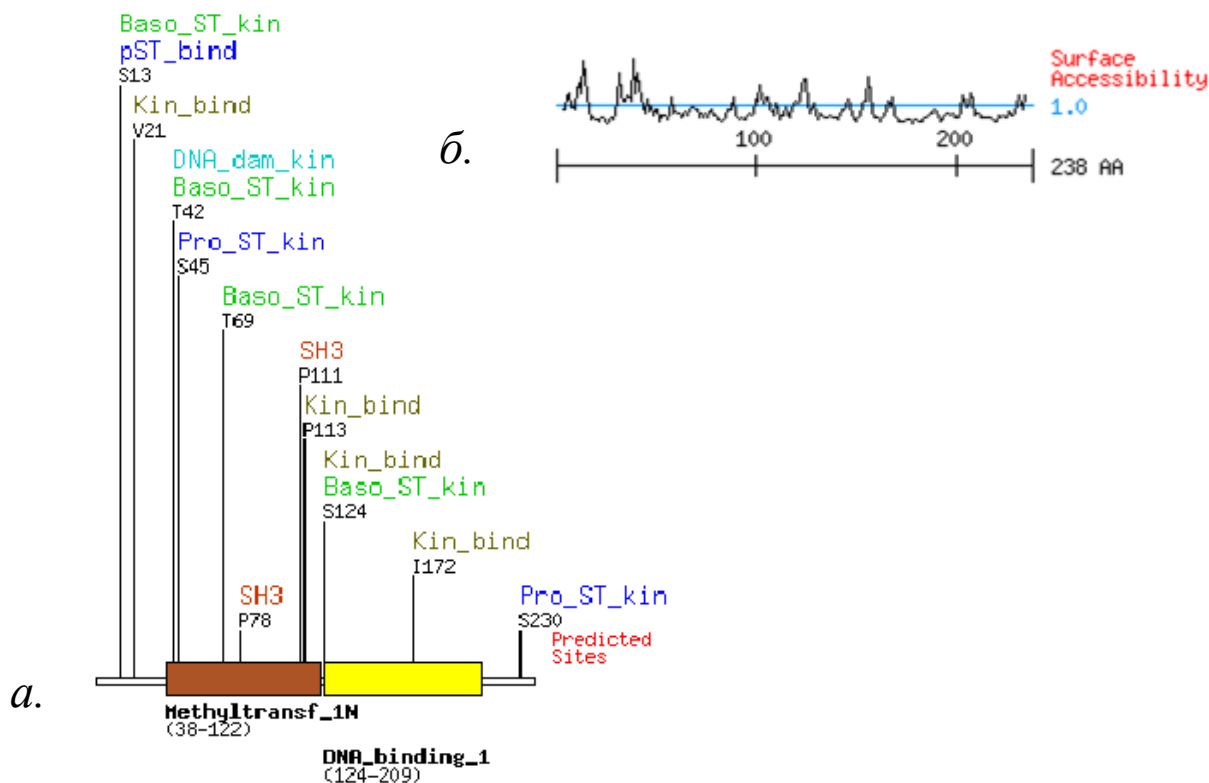
Цікавим є те, що програма передбачила 5 з 7 відомих сайтів фосфорилювання T41, S45, S53, S70 та S232 при рахунку більше 95%. Таким чином, сайт S230 можливо, теж фосфорилюється і підтвердження цього є експериментально доцільним.

Решта передбачених сайтів потребують експериментального дослідження. Чи дійсно вони фосфорилюються і як дана модифікація впливає на функції та активність білка MGMT?

Використовуючи програму SCANSITE, у межах білка MGMT людини виявили 11 сайтів фосфорилювання: S13, V21, T42, S45, T69, P78, P111, P113, S124, I172, S230. (рис. 3.13., табл. 3.7., додаток В.).

Цікаво, що сайти T42, S45, T69, P78, P111, P113 лежать в межах метилтрансферазного домена, а S124 і I172 – в межах ДНК-зв'язувального, тоді як S13, V21, S230 знаходяться за межами цих доменів. Серед виявлених сайтів післятрансляційної модифікації білка MGMT є два підтвержені – T42 та S45. Решта дев'ять не описані раніше сайти післятрансляційної модифікації білка MGMT – S13, V21, T69, P78, P111, P113, S124, I172 і S230, які потребують експериментального підтвердження.

Для п'яти сайтів передбачили можливість фосфорилювання за допомогою декількох кіназ (додаток В.). Серед них S13, T42, S45, T69, S124. Причому для трьох із них передбачена можливість фосфорилювання за допомогою трьох різних кіназ (сайти T42, S45, S124), а для решти двох – фосфорилювання за допомогою двох кіназ (сайти S13, T69). Функціональна активність і можливості фосфорилювання даних сайтів потребують експериментального підтвердження



**Рис. 3.13.** Результати пошуку сайтів фосфорилювання білка MGMT за допомогою програми SCANSITE: *a* – домени та виявлені сайти фосфорилювання даної алкілтрансферази; *б* – схематична діаграма коефіцієнтів доступу виявлених сайтів на поверхні білкової молекули

Використовуючи програму NetPhosK 1.0, у межах амінокислотної послідовності білка MGMT людини виявили 10 потенційних сайтів післятрансляційної модифікації (T41, T42, S45, S53, S182, S216, T229, S230, S232, S232), серед них 3 треоніни та 7 серинів. (табл. 3.7.). Дана програма виявила 5 сайтів, що потенційно фосфорилюються з 7 відомих сайтів фосфорилювання – T41, T42, S45, S53, S232. Цікаво, що і ця програма видала досить високий рахунок для S230.

Пошук можливих сайтів післятрансляційних модифікацій здійснювали також з використанням програми KinasePhos (табл. 3.6., табл. 3.7.).

**Передбачені сайти фосфорилювання білка MGMT та кінази, що їх фосфорилюють за результатами програми KinasePhos.**

Сайт	Послідовність	Кіназа	Рівень прогнозування
S13	ERFA <u>S</u> RRPQ	PKC	95%
		PKA	95%
		PKG	100%
		PKB	90%
T41	EMKR <u>T</u> TLDS	Other_MDD	90%
T42	MKRT <u>T</u> LDSP	PKC	95%
		PKA	100%
S45	TTLDS <u>S</u> PLGK	CaM-II	95%
		cdc2	100%
		MAPK	95%
		MAPK	90%
S53	KLEL <u>S</u> GCEQ	CKI	90%
		IKK	95%
T69	LGKG <u>T</u> SAAD	PKA	95%
S70	GKG <u>T</u> SAADA	PKC	95%
		PKB	90%
		Other_MDD	90%
		PKA	95%
S124	FQQE <u>S</u> FTRQ	PKA	95%
		IKK	95%
T126	QES <u>F</u> TRQVL	Other_MDD	90%
S144	GEV <u>I</u> SYQQL	CaM-II	90%
S216	LGG <u>S</u> SGLAG	ATM	90%
T229	GAGAT <u>S</u> SGSP	PKC	95%
		Other_MDD	90%
S230	AGAT <u>S</u> GSPP	PKG	90%
		cdc2	90%
		ATM	95%
		IKK	95%
S232	ATSG <u>S</u> PAG	cdc2	95%
		MAPK	95%
		ATM	100%
		IKK	95%
		Other_MDD	95%

Отже, провівши біоінформатичний аналіз можливого фосфорилювання білка MGMT, отримали 28 потенційних сайтів такої модифікації (табл. 3.7.).

**Порівняння результатів можливого фосфорилювання білка MGMT  
людини з використанням різних програм (жирним виділені відомі, фоном –  
передбачені всіма програмами)**

№	Сайт	Phosida	SCANSITE	GPS 2.1	DISPHOS	NetPhos 2.0	NetPhosK 1.0	Kinase Phos	Спільні
1	S13	+	+	+	+	+		+	V
2	V21		+						
3	T23	+*		+	+*	+			
<b>4</b>	<b>T41</b>	+		+	+*		+	+*	W
<b>5</b>	<b>T42</b>	+*	+	+	+*	+	++	+	+
<b>6</b>	<b>S45</b>	+	+	+	+*	+	+	+	+
7	S53	+		+	+*	+	+	+*	V
8	T69	+*	+	+	+*			+*	W
<b>9</b>	<b>S70</b>	+		+	+*	+		+*	W
10	P78		+						
11	T94	+*		+	+*				
12	Y100			+	+*				
13	P111		+						
14	P113		+						
15	S124	+*	+	+	+*			+*	W
16	T126	+*		+	+*			+*	W
17	S144	+*		+	+*			+*	
<b>18</b>	<b>Y145</b>			+	+*				
19	I172		+						
20	S182	+			+*		+		
21	S183			+	+*				
22	Y189			+	+*				
23	S190	+*		+	+*				
24	S215	+		+	+*				
25	S216	+		+	+		+	+*	W
26	T229	+*		+	+*		++	+*	W
27	S230	+	+	+	+	+	+	+*	+
<b>28</b>	<b>S232</b>	+		+	+	+	+	+	V

Примітки: + - передбачена модифікація; ++ - найбільший рахунок; \* - низький рахунок, V – модифікація передбачена більшістю програм (за виключенням однієї), W – модифікація передбачена більшістю програм (за виключенням двох)



Дана програма визначає можливість фосфорилювання білка з різним ступенем точності. Залежно від обраних параметрів і специфічності 90-95-100%, програма будує модель та визначає кінази, що потенційно здатні фосфорилювати амінокислотні залишки білка залежно від їхнього положення та оточення. Відбір потенційних білкових партнерів здійснювали, аналізуючи специфічність кожної кінази банку даних до даної амінокислотної послідовності білка.

Провівши біоінформатичний аналіз з використанням програми KinasePhos, виявили 14 сайтів потенційного фосфорилювання – S13, T41, T42, S45, S53, T69, S70, S124, T126, S144, S216, T229, S230, S232. Серед них 9 сайтів серину та 5 – треоніну. Проте 100% специфічність до фосфорилювання амінокислотних залишків MGMT виявили даною програмою лише у чотирьох кіназ, які, за її даними, здатні фосфорилювати сайти S13, T42, S45, S232.

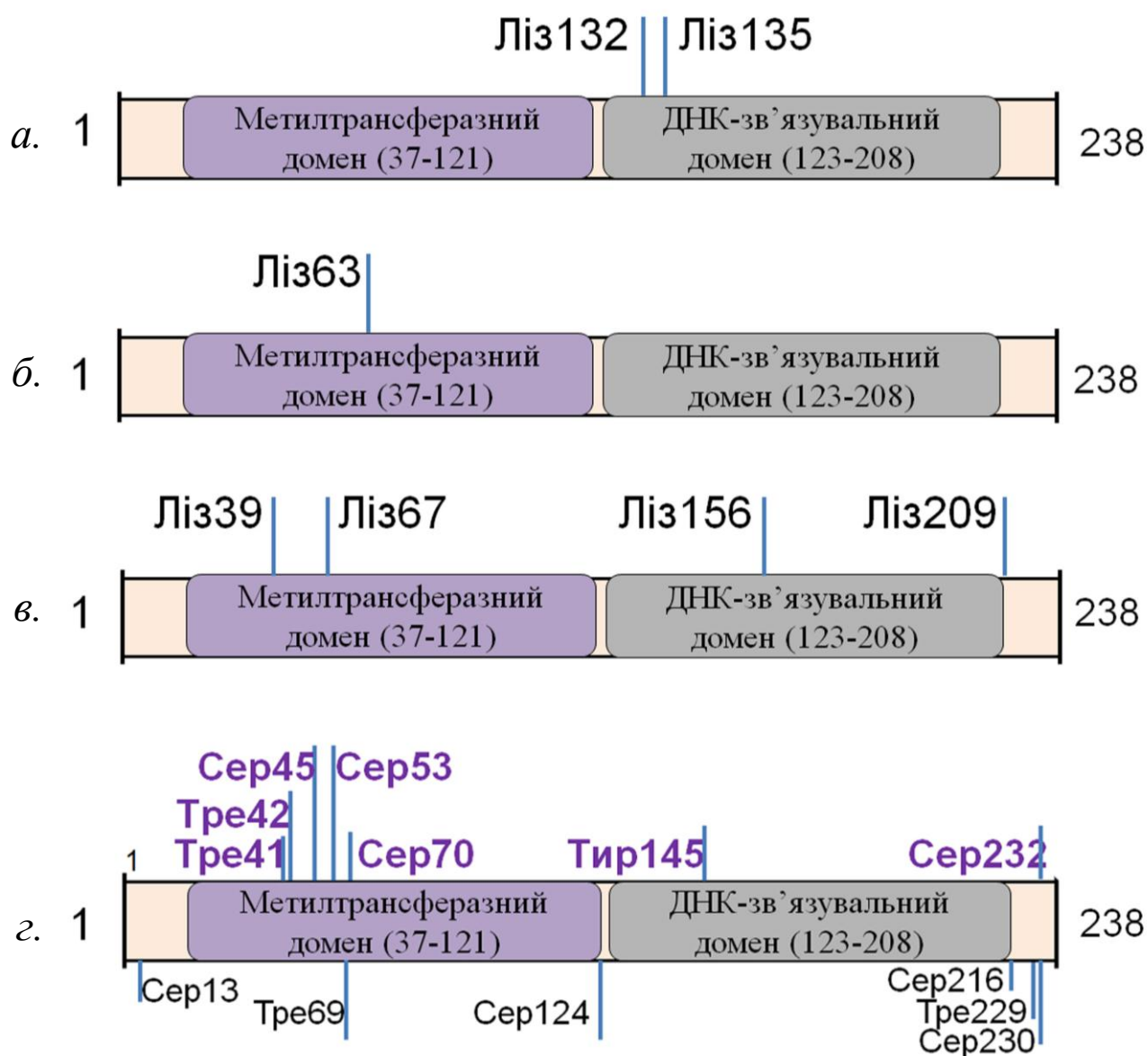
Всіма 7 програмами передбачили три сайти – T42, S45, S230, два з яких вже підтверджені (T42, S45). Також цікавими для дослідження є амінокислотні залишки білка в положеннях, що були визначені більшістю програм. Серед трьох потенційних сайтів фосфорилювання – S13, S53, S232, визначених з використанням 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. 3.14).

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.

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 [34].

У результаті проведеного нами аналізу експериментальних даних щодо відомих білкових партнерів, мотивів взаємодії та післятрансляційних модифікацій білка MGMT людини довжиною 238 аа виявлено 75 відомих білкових партнерів та 7 відомих сайтів післятрансляційної модифікації – T41, T42, S45, S53, S70, C176, S232 [34, 35, 36].

Положення С176 алкілується, що пов'язано з репаративною функцією білка [3]. Інші сайти фосфорилуються. Ми не виявили описаних альтернативних ізоформ білка MGMT людини.



**Рис. 3.14.** Потенційні сайти після трансляційної модифікації білка MGMT людини: **а** – ацетилювання, **б** – SUMOїлування, **в** – убіквітинування **г** – фосфорилування (вгорі фіолетовим кольором передбачені нами відомі з літератури, внизу чорним кольором потенційні передбачені нами) в межах білкової молекули NP\_002403.2, 238 амінокислотних залишків

Провівши біоінформатичний аналіз із використанням різних програм (SCANSITE, Phosida, Anchor, NetAcet 1.0, PAIL, MeMo 2.0, UbPred, BDM-PUB,

SUMOsp, DISPHOS 1.3, GPS 2.1, KinasePhos, NetPhos 2.0, NetPhosK 1.0), детектовано 43 можливі мотиви взаємодії (рис. 3.14, додаток Г.).

Із них 14 сайтів ацетилюються (G3, K31, K34, K39, K49, K63, K67, K132, K135, K138, K156, K196, K209, K224), 13 – SUMOїлюються (K31, K34, K39, K49, K63, K67, K132, K135, K138, K156, K196, K209, K224), 13 – убіквітинуються (K31, K34, K39, K49, K63, K67, K132, K135, K138, K156, K196, K209, K224), 28 – фосфорилюються (S13, V21, T23, T41, T42, S45, S53, T69, S70, P78, T94, Y100, P111, P113, S124, T126, S144, Y145, I172, S182, S183, Y189, S190, S215, S216, T229, S230, S232). Важливо відмітити, що потенційні сайти ацетилювання, убіквітинування та SUMOїлування однакові – наявні в молекулі MGMT лізини (за виключенням гліцину в положенні 3, передбаченого програмою NetAcet1.0), що вступають в реакцію за  $\epsilon$ -аміногрупою. Фосфорилювання відбувається в основному за OH-групою, отже до такої модифікації здатні серин, тирозин та треонін.

Найбільш вірогідні сайти модифікації, відповідно до отриманих нами результатів різних програм: K132 та K135 для ацетилювання, K63 для SUMOїлування, K209 для убіквітинування та T42, S45 й S230 для фосфорилювання (рис. 3.14). Модифікація саме цих сайтів потребує експериментального підтвердження у першу чергу (додаток Г.). Інтригує той факт, що в результаті біоінформатичного аналізу детектували всі відомі сайти післятрансляційної модифікації білка MGMT.

Усі результати біоінформатичного аналізу щодо можливих післятрансляційних модифікацій амінокислотної послідовності білка MGMT людини представлено в додатку 3.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. Iatsyshyna A.P., **Nidoieva Z.M.**, Pidpala O.V., Lukash L.L. (2012) Bioinformatic analysis of potential post -translational modification sites of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) protein. The Ukrainian

Biochemical Journal, 84(6), 74-85.

2. **Nidoieva Z.M.**, Iatsyshyna A.P. Bioinformatic search for potential posttranslational modifications of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase protein.(2011) II All-Ukrainian scientific-practical conference of students and young scientists "Actual problems and development prospects of natural sciences" Zaporizhzhia (published: Collection of scientific works, 2011. – p. 185-187

3. **Nidoieva Z.M.** (2011 May) Reparative enzyme O6-methylguanine-DNA methyltransferase. XIV All-Ukrainian scientific-practical conference "Youth, education, science, culture and national identity in the context of European integration"12-13 May 2011, Kyiv (published: Collection of scientific works, 2011. 3. p. 95-97)

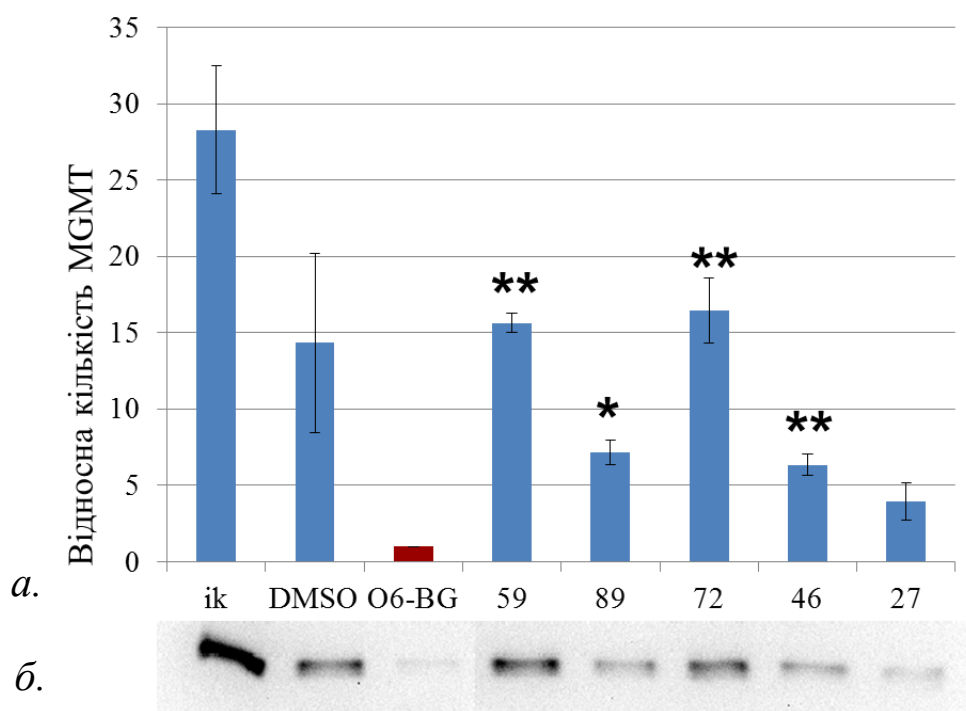
### **3.7. Дослідження здатності потенційних інгібіторів MGMT зменшувати його кількість.**

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 даного ферменту [8, 11, 146], що дає можливість зменшити дозу хіміопрепарата та підвищити ефективність лікування онкохворих. 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. Зокрема, вони є високотоксичними [6, 7, 8] 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, 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. Для подальшого пошуку менш токсичних та активних інгібіторів MGMT та подальших досліджень відібрали 83 сполуки на основі критеріїв наявності ключових контактів із амінокислотними залишками ензиму MGMT, значень енергії зв'язування з рецептором та візуальної оцінки положення ліганду в сайті зв'язування. 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 цього білку в клітині. У даному підрозділі

наведено результати дослідження даних сполук методом вестерн-блотингу. У даному підрозділі наведено результати дослідження декількох нових нуклеозидних, низькомолекулярних інгібіторів

Ми дослідили вплив декількох потенційних інгібіторів білку MGMT людини на його кількість в клітинах HEp-2 (рис. 3.15). Рівень деплеції білка MGMT його потенційними інгібіторами порівнювали із деплецією вже відомим інгібітором MGMT – Об-БГ.

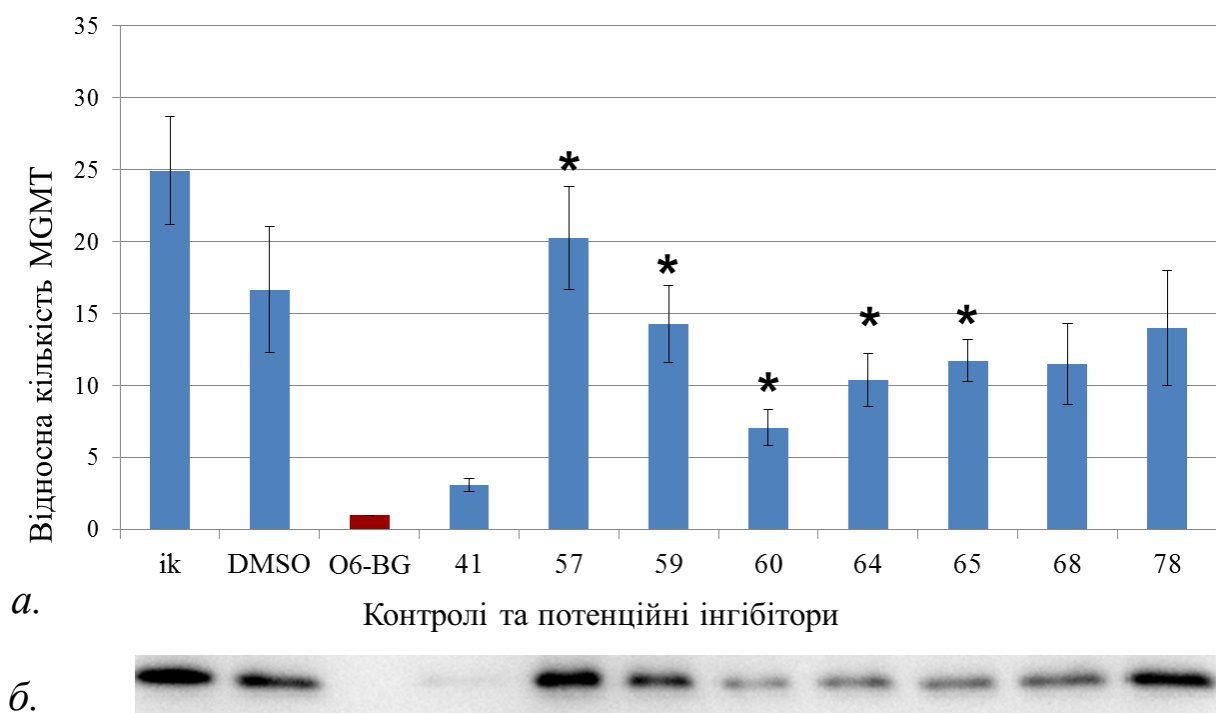


**Рис. 3.15.** Здатність низки нових потенційних нуклеозидних інгібіторів MGMT зменшувати кількість білку MGMT в клітинах HEp-2 *in vitro*: **а** – діаграма результатів вестерн блота аналізу; **б** – типова візуалізація хемілюмінесцентного сигналу вестерн-блотингу. Різниця порівняно з Об-БГ \*\*  $p < 0,005$ , \*  $p < 0,05$ . 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, Об-БГ – Об-бензилгуанін, позитивний контроль (відомий інгібітор MGMT). 27, 46, 59, 72, 89 – нові потенційні інгібітори

Тож, поки що жоден із досліджених інгібіторів не знижує кількість білку MGMT настільки ж ефективно, як і Об-БГ у клітинах HEp-2. Проте результати

сполук №89 та №46 досить обнадійливі; сполука №27 знижує кількість MGMT найкраще з усіх потенційних інгібіторів, проте, можливо, за рахунок її загальної токсичності (рис.3.15).

Також ми дослідили вплив потенційних інгібіторів MGMT на його вміст в клітинах непухлинного походження E8 методом Вестерн-блот аналізу (рис. 3.16). Серед протестованих інгібіторів найбільш перспективна сполука № 41, що спричиняє значне зниження кількості MGMT після обробки клітин (рис. 3.16).



**Рис. 3.16.** Здатність низки нових потенційних нуклеозидних інгібіторів MGMT зменшувати кількість білку MGMT в клітинах E8 *in vitro*: **а** – діаграма результатів вестерн блота аналізу; **б** – типова візуалізація хемілюмінесцентного сигналу вестерн-блотингу. Різниця порівняно з O6-BG \*\*  $p < 0,005$ , \*  $p < 0,05$ . DMSO - контороль, 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). 41, 57, 59, 60, 64, 65, 68, 78 – нові потенційні інгібітори

Ми припускаємо, що значне зниження кількості репаративного ензиму MGMT у присутності інгібітора №41 можна пояснити зв'язуванням потенційного інгібітора з подальшою інактивацією та деградацією молекул білка. Саме таким є відомий механізм взаємодії зі стандартним інгібітором О6-БГ [1]. На користь даного механізму свідчать дані попередніх досліджень у нашому відділі, зокрема при тестуванні здатності потенційних сполук інгібувати рекомбінантний MGMT (recMGMT) *in vitro* із використанням флуоресцентного методу у безклітинній системі, в основі якого лежить вимірювання флуоресценції залишкових поперечних зшивок в ДНК [137]. У результаті проведених досліджень виявили, що сполука № 41 інгібувала recMGMT на  $51,39 \pm 8,78$  %, відносно інгібувальної активності О6-БГ. При проведенні стоп-реакції сполука № 41 інгібувала recMGMT на  $54,66 \pm 0,64$  %, що вказує на досить стабільну взаємодію між молекулою рекомбінантного білка та цього потенційного інгібітора.

Окрім цього, у нашому відділі показали раніше, що інгібітор №41 може підсилювати цитотоксичний ефект метилувальної сполуки N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину в клітинах людини з використанням МТТ-тесту у порівнянні зі стандартним інгібітором О6-БГ. Зокрема, показано значно виразніший ефект підсилення цитотоксичної дії під впливом інгібітора №41 у концентрації 10 мкМ порівняно зі стандартним інгібітором О<sup>6</sup>-БГ у такій же концентрації. Тож отримані у відділі раніше дані з використанням МТТ-тесту вказують, що новий інгібітор №41 відрізняється дещо більшою інгібувальною активністю порівняно з О<sup>6</sup>-БГ.

Також, за отриманими раніше даними з використанням кількісного клоногенного тесту новий інгібітор №41 також спричиняв значне підвищення цитотоксичної дії нітрозогуанідину при трьох досліджених концентраціях (0,0005, 0,005, та 0,05 мкг/мл), маючи виразніший ефект, ніж О6-БГ.

Отримані дані щодо інгібувальної дії сполуки №41 нашою думкою, що для даного нового інгібітора можливі також й інші механізми впливу на ферментативну активність MGMT. Зокрема, в зазначених вище експериментах по сенсibiliзації пухлинних клітин *in vitro* сполука №41, ймовірно, впливає на



цитотоксичний ефект алкілувальної сполуки нітрозогуанідину через сигнально-регуляторні шляхи клітини, наприклад, через інгібування біосинтезу білків. Тож питання стосовно механізмів дії нового інгібітора MGMT потребує спеціальних досліджень.

Отже, нові низькомолекулярні інгібітори можуть 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 б направляли їх в клітини пухлин. При тестуванні виявлено кілька потенційних інгібіторів білка MGMT: сполуки №89, №41, №27. Сполука №41 виглядає найперспективнішою, проте потребує значних подальших досліджень.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

Волинець Г.П., Яцишина А.П., Рубан Т.П., Мацевич Л. Л., **Нідосва З.М.**, Баланда А.О., Бджола В. Г., Ярмолук С. М., Лукаш Л. Л. Застосування сполуки 5-(5-хлоро-2-гідроксибензиліден)-4-тіоксотіазолідин-2-ону як інгібітора MGMT: Патент на винахід № 122373; заявл. 31.01.2019, Опубл. 25.06.2019.

**Нідосва 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. (2019 вересень-жовтень) 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)

## РОЗДІЛ 4

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Протягом життя клітини її геном зазнає впливу багатьох як екзогенних, так і ендогенних стресових чинників. Різноманітні ендогенні продукти метаболізму та токсичні речовини навколишнього середовища (тютюновий дим, їжа, іонізуюче випромінювання, препарати хіміотерапії та ін..) призводять до пошкоджень ДНК [1, 3]. Алкілування атома Об-гуаніну є мутагенним та цитотоксичним для клітин [3]. Дане пошкодження репарує фермент MGMT в ході стехіометричної та необоротної реакції перенесення Об-алкільного адукту на активний сайт цистеїну, не спричиняючи при цьому розриву ланцюга ДНК. Ця реакція є суїцидальною.

Варіація експресії *MGMT* досить значна як між тканинами одного організму, так і міжіндивідуальна. Рівень експресії *MGMT* в клітинах пухлин теж варіює, що важливо при виборі стратегії лікування, оскільки MGMT є одним з визначальних факторів резистентності до алкілувальної хіміотерапії. Молекулярні механізми такої варіації точно не встановлені. Є кілька рівнів на яких здійснюється така регуляція. Наприклад, генетична регуляція через наявність цис-регуляторних елементів в промоторі гена або ж епігенетична регуляція через доступ цих цис-регуляторних елементів для транскрипційних факторів, а також регуляції трансляції білка або ж різні модифікації самої білкової молекули.

На сьогодні в промоторі *MGMT* відомі декілька цис-регуляторних елементів. Серед них є елементи відгуку на глюкокортикоїди (в позиціях 26-40 та 63-77 в межах промоторної ділянки X61657.1, 1157 п.н.) [63], які відносяться до стероїдних гормонів. Показано, що синтетичний глюкокортикоїд дексаметазон виступає в ролі транскрипційного фактора та спричиняє зростання експресії *MGMT*, зв'язуючись в комплексі з ядерним рецептором з елементом відгуку на глюкокортикоїди в промоторній ділянці *MGMT*. Тому одночасне використання глюкокортикоїдів, які застосовують для зняття набряків та запалень, зокрема післяопераційних, із алкілувальною хіміотерапією значно зменшує ефективність останньої як *in vitro*, так і *in vivo* [4, 63, 65].

Оскільки при лікуванні пухлин хіміотерапію часто поєднують із гормонотерапією та імунотерапією, постає питання щодо регуляції транскрипції гена *MGMT* іншими біологічно активними речовинами, в тому числі гормональної природи та інтерферонами.

Щоб визначити, які ж інші біологічно активні речовини можуть прямо регулювати транскрипцію гена *MGMT* людини через зв'язування своїх рецепторів з відповідними елементами відгуку в промоторі, ми провели біоінформатичний аналіз промоторної ділянки досліджуваного гена.

Ми детектували потенційні елементи відгуку на гормони у промоторі гена *MGMT* людини. Нами виявлено елементи відгуку на стероїдні гормони, які зв'язують гомо- та/або гетеродимери рецепторів глюкокортикоїдів, прогестерону та естрогенів, а також потенційні сайти зв'язування з іншими рецепторами (рецептор активації проліферації пероксисом, рецептор тиреоїдних гормонів, ретиноевий орфановий рецептор, рецептор ретиноїду X, рецептор ретиноевої кислоти та рецептор вітаміну D). Отримані від різних програм дані ми порівнювали між собою й для подальшого аналізу враховували лише ті елементи відгуку, які передбачені більшістю програм.

Елементи відгуку на прогестерон, які виявлені усіма програмами, топологічно співпадають із виявленими усіма програмами елементами відгуку на естрогени і знаходяться в позиціях 35-42 та 72-79 в межах промоторної ділянки X61657.1 «+» ланцюзі ДНК. Також ці сайти частково співпадають із вже відомими елементами відгуку на глюкокортикоїди в позиціях 24-50 та 61-79 в межах дослідженої промоторної ділянки, які ми теж передбачили більшістю програм при нашому аналізі. Тож ці дані дають надію на функціональну активність і інших виявлених нами елементів відгуку в промоторі гена.

На наступному етапі нашої роботи ми вирішили перевірити, чи ж дійсно  $\beta$ -естрадіол і прогестерон впливають на експресію гена *MGMT* людини через виявлені нами потенційні елементи відгуку. Оскільки стероїдні гормони можуть діяти як через відповідний ядерний рецептор, що проникає в ядро та зв'язується зі своїм елементом відгуку у промоторі, так і через рецептор на мембрані [66, 67,

68], ми обрали для експериментів клітинні моделі, що містили або лише мембранний рецептор, або і мембранний, і ядерний рецептори до кожного гормону (рис 3.4). Також ми виключили можливий вплив  $\beta$ -естрадіолу та прогестерону на функціональну життєздатність клітини використовуючи МТТ тест.

Ми виявили, що  $\beta$ -естрадіол позитивно регулює експресію *MGMT* на усіх рівнях та у всіх досліджених клітинних лініях. Збільшення вмісту білкового продукту *MGMT* може бути важливим для клітин, оскільки у жінок після менопаузи естрогени в концентраціях вище базальних ( $\sim 0,5$  нМ) може бути пов'язаний із ризиком захворювання на рак молочної залози [138] як внаслідок активації проліферації клітин із накопиченням мутацій при постійному поділі, так і за рахунок власного токсичного ефекту гормону, оскільки продукти його метаболізму призводять до депуринізації ДНК [69, 139]. Проте концентрації  $\beta$ -естрадіолу, що призводили до максимального збільшення кількості білку *MGMT* у досліджених клітинних лініях, різнилися. В клітинах 293Т  $\beta$ -естрадіол спричиняв зростання білка в концентрації 2,5 нмоль/л у більш, ніж 3 рази порівняно з контролем, а у MCF7 - у більш, ніж удвічі в концентрації 0,5 нмоль/л, що якраз і репрезентує базальний рівень  $\beta$ -естрадіолу в крові статевозрілих жінок до настання менопаузи. У наших експериментах кількість транскрипту *MGMT* теж однаково зростала як у клітинах 293Т, що експресують лише ядерний рецептор ER $\beta$ , що зазвичай негативно регулює експресію генів [74, 75], так і в клітинах MCF7, що експресують обидві ізоформи ядерного рецептору естрогенів – ER $\alpha$  (позитивного регулятора) і ER $\beta$  (негативного регулятора). Спільним для обох клітинних ліній є експресія мембранного рецептору естрогенів – GPER1 [77, 78]. Тому ми припускаємо, що спостережений ефект збільшення кількості транскриптів *MGMT* пояснюється саме впливом естрогенів через свій мембранний рецептор. Для точного підтвердження функціональної активності передбачених нами біоінформатично елементів відгуку в промоторі та молекулярні механізми впливу естрогенів на *MGMT* потрібні подальші експериментальні дослідження.

Також, ми дослідили вплив прогестерону на експресію гена *MGMT* у клітинах з ядерним рецептором прогестерону MCF7 та HEp-2 й у клітинах 293 без нього. Усі клітинні лінії експресують мембранний рецептор прогестерону. Подібно до  $\beta$ -естрадіолу, у клітинах MCF7 та 293 прогестерон теж позитивно регулює експресію *MGMT* на рівні РНК та білка. Але якщо кількість транскрипту зростала незначно (до 1,48 у клітинах MCF7 та 1,49 у 293 при 500 нмоль/л прогестерону порівняно з контролем), то на рівні білка у клітинах MCF7 кількість *MGMT* зростала більше ніж у 10 разів, порівняно з контролем (100 нмоль/л). Проте у клітинах HEp-2 ми не спостерігаємо схожої дії прогестерону. Однак, теоретично за схожості експресії ядерних та мембранних рецепторів подібна дія прогестерону мала б спостерігатися в клітинах MCF7 і HEp-2, та різнитися від 293. Тож, механізм такого впливу прогестерона складніший, ніж пряма регуляція через ядерний рецептор (класичний). Щодо значного збільшення кількості білка *MGMT* отримані дані нашою групою на думку, що прогестерон не лише призводить до збільшення кількості транскрипту *MGMT*, а й до активації синтезу білка або ж сповільнення його деградації.

Ще одним із методів комплексного лікування онкозахворювань також є поєднання хіміотерапії та імунотерапії, зокрема із використанням інтерферонів – сигнальних білків, об'єднаних у три групи –  $\alpha$ ,  $\beta$  і  $\gamma$ . Історично їх пов'язують з противірусною дією, але зараз відомо, що вони через сигнальні каскади регулюють експресію не лише генів, пов'язаних з противірусною, але й імуномодуючою та антипроліферативною активністю [53].

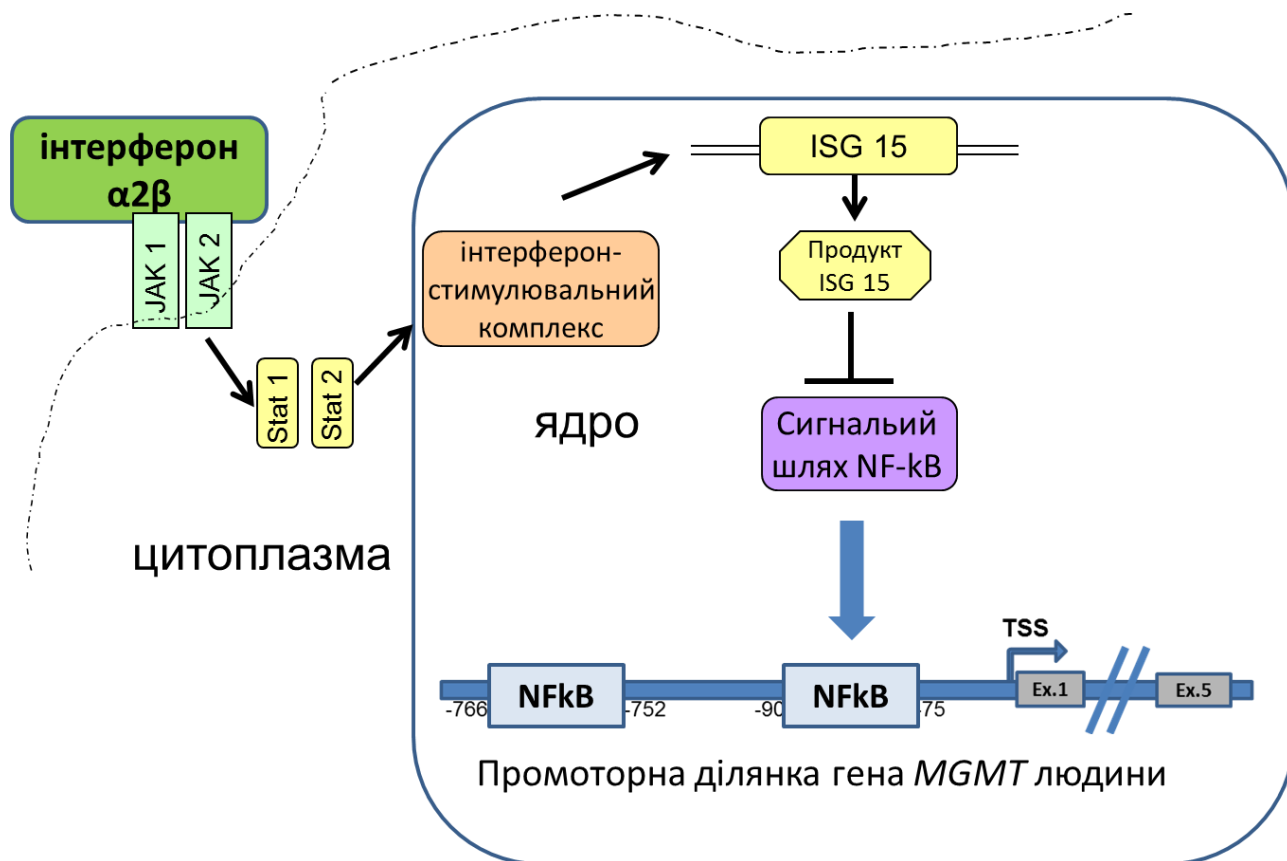
На наступному етапі роботи ми дослідили регуляцію *MGMT* на рівні білку, зокрема нами вперше було досліджено вплив рекомбінантного інтерферону  $\alpha 2\beta$ , синтезованого в рослинах *N. benthamiana*, на кількість білку *MGMT* та порівняння його дії в клітинах лінії E8 непухлинного походження та у клітинах лінії HEp-2 пухлинного походження. Ми виявили, що 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, ніж у клітинах пухлинного походження HEp-2. Таким чином, вперше нами

виявлено інгібувальний ефект рекомбінантного інтерферону  $\alpha 2\beta$ , 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 рекомбінантний *INF*  $\alpha 2\beta$  може інгібувати експресію гена *MGMT* і чому різниться 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 [131] 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 зазначити фактори NF- $\kappa$ B [5], Sp1 [23] та СЕВР [22].

Відомо, що інтерферони можуть регулювати експресію більш, ніж 300 генів [140]. Основною функцією інтерферонів є противірусний 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 [140]. Тож, в загальному вигляді регуляція експресії *MGMT*, найімовірніше, відбувається за наступним молекулярним каскадом: інтерферон активує протеїнкінази JAK1 і JAK2, що фосфорилують білки STAT1 та STAT2, в результаті чого останні димеризуються та переносяться в ядро, де формують інтерферон-стимульований комплекс, який індукує експресію низки інтерферон-залежних генів. Зокрема, продукт як мінімум одного з цих генів ISG15 (Interferon-stimulated gene) негативно регулює сигнальний шлях NF- $\kappa$ B, однією з функцій якого є активація експресії гена *MGMT*. На рис. 4.1. представлена запропонована нами схема. Оскільки NF- $\kappa$ B здатен активувати експресію *MGMT*, інгібування NF- $\kappa$ B інтерфероном призводить до зниження кількості досліджуваного репаративного ензиму, і в

результаті – до підвищення чутливості пухлинних клітин до алкілувальних сполук [141], що ми і спостерігали в наших експериментах. Можливо, цей регуляторний шлях менш активний в клітинах людини непухлинного походження.



**Рис. 4.1.** Запропонована нами схема можливого молекулярного каскаду інгібування експресії гена *MGMT* інтерфероном  $\alpha 2\beta$  із залученням NF- $\kappa$ B. інтерферон активує протеїнкінази JAK1 і JAK2, що фосфорилують STAT1 та STAT2. В результаті фосфорилування STAT1 та STAT2 димеризуються та переносяться в ядро, формуючи інтерферон-стимулювальний комплекс, який індукує експресію гена *ISG15* (Interferon-stimulated gene 15). ISG15 негативно регулює сигнальний шлях NF- $\kappa$ B, який є підтвердженим позитивним регулятором *MGMT*.

Очевидно, існують також інші механізми впливу зовнішніх факторів на експресію гена *MGMT*. Як зазначено вище, раніше ми показали, що препарати різного виробництва, які містили рекомбінантний інтерферон  $\alpha 2\beta$ , 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.

При хіміотерапії важливо активувати *MGMT* в нормальних клітинах, що швидко діляться (для зменшення токсичної дії хіміотерапії), а в клітинах пухлини репресувати *MGMT* або деплетувати функціональний білок чи знизити його активність. Одним із способів регулювання активності, функцій, розташування білків в клітині, а також один із основних молекулярних механізмів передачі позаклітинних стимулів від рецепторів клітинної мембрани через компоненти сигнальних шляхів до відповідних компартментів клітини є модифікації білкових молекул, наприклад, фосфорилювання [38].

Тому на наступному етапі наших досліджень ми провели біоінформатичний аналіз потенційних сайтів післятрансляційних модифікацій білку *MGMT*. Експериментально показано, що білок *MGMT* людини фосфорилюється за певними амінокислотними залишками [34, 35, 36.] й убіквітинується [37], проте сайти останньої модифікації не визначено. Показано, що фосфорилований рекомбінантний *MGMT* людини втрачає до 30–65% своєї репаративної активності, тоді як дефосфорилювання лужними фосфатазами відновлює його активність [34]. Припускають, що втрата ензиматичної активності модифікованого протеїну пов'язана з тим, що він убіквітинується та деградує [34]. Однак на сьогодні відомо, що протеасомна убіквітинозалежна деградація *MGMT* відбувається після репарації ДНК. Зокрема, приєднання алкільної групи до цистеїну в активному центрі ензиму призводить до конформаційних змін, які розпізнаються убіквітиновою лігазою та завершуються деградацією протеїну [39]. На відміну від нього, фосфорилований *MGMT* щура виявляє підвищену стійкість до протеїназ [40]. Проте спостерігається брак даних щодо функціонального значення фосфорилювання *MGMT*. Беручи до уваги те, що післятрансляційні модифікації протеїнів здатні не лише змінювати їхню активність, надавати інших



функцій в клітині, а й регулювати білок-білкові взаємодії, ідентифікація нових сайтів модифікації та протеїнів-партнерів MGMT людини є актуальною. Це дасть змогу виявити нові неканонічні функції цього протеїну та нові функціональні зв'язки в різних процесах клітини.

Результати досліджень [34, 35, 36, 143] підтверджують імовірність модифікації передбачених нами сайтів. Наприклад, показано, що протеїн кіназа А, протеїн кіназа С і казеїн кіназа II фосфорилують MGMT [34], а серед передбачених нами сайтів і кіназ, що їх модифікують, щонайменше два використані біоінформативні інструменти детектували залучення їх до модифікації передбачених нами сайтів Ser13 (протеїн кіназа С; GPS і Phosida), Thr42 (протеїн кіназа А; GPS, NetPhosK, Phosida і SCANSITE), Ser53 (казеїн кіназа II ; NetPhosK і Phosida), Ser124 (протеїн кіназа С; GPS і SCANSITE). Фосфорилування залишку Thr42 показано експериментально [34, 36]. За даними іншого дослідження MGMT людини зв'язується і з іншими кіназами, крім вже зазначеної протеїн кінази С. Серед тих із них, які виявлено і нами біоінформативно, є ДНК залежна протеїн кіназа, циклінзалежна кіназа 2 (Ser45; GPS і SCANSITE), мітогенактивована протеїн кіназа (Ser45; GPS, NetPhosK і SCANSITE) та циклінзалежна кіназа 5 (сайт Ser45; GPS і SCANSITE). Варто зазначити також, що виявлені серед партнерів MGMT тирозинова протеїн фосфатаза та інгібітор фосфатаз SET [142] підтверджують зворотний процес фосфорилування цього протеїну в клітинах.

Для білка MGMT людини показано, що його фосфорилування зменшує ензиматичну активність, а дефосфорилування, навпаки, збільшує, на основі чого припущено роль фосфорилування в контролі активності репаративної функції ензиму в нормальних і ракових клітинах [34]. Показано, що фосфорилований MGMT щура має підвищену стійкість до протеолітичної деградації протеазами печінки порівняно з немодифікованим протеїном [40], тоді як фосфорилувана метилтрансфераза людини втрачає активність, що спекулятивно пов'язують з убіквітинуванням модифікованого протеїну та його протеолізом [34]. Це припущення необхідно підтвердити експериментально, однак воно цілком

заслугове на увагу, оскільки відомо, що від фосфорилювання протеїнів залежить їхнє убіквітинування та сумоїлування [143]. Отже, функціональну роль фосфорилювання MGMT на сьогодні вивчено недостатньо. В експериментах *in vitro* та в живих клітинах показано фосфорилювання MGMT людини та втрату ним репаративної функції, тоді як під час вивчення динаміки фосфорилювання протеома ядра у відповідь на пошкодження ДНК іонізуючим випромінюванням виявлено, що цей протеїн зазнає раннього фосфорилювання, ймовірно, кіназою АТМ [144]. На жаль, регуляторний вплив цієї модифікації MGMT невідомий та потребує подальших експериментальних досліджень. Нез'ясованим лишається також, чи впливає фосфорилювання цього протеїну на його подальші регуляторні післятрансляційні модифікації, наприклад, ацетилювання, убіквітинування, сумоїлування, а якщо так, то як саме.

Ще одним із підходів до підвищення чутливості пухлинних клітин до алкілувальних сполук хіміотерапії є зменшення активності та інактивація фермента MGMT, зокрема за допомогою дозонасичених схем хіміотерапії та використання низькомолекулярних інгібіторів. На сьогодні відомі два інгібітори MGMT - Об-БГ та Об-(4-бромотієніл)гуанін, які проходять клінічні випробування та не зважаючи на ефективність інгібування білка MGMT, мають низку побічних ефектів. Тому ми досліджували нові інгібітори MGMT, розроблені і синтезовані у відділі біомедичної хімії нашого інституту. Дані інгібітори принципово відрізняються від усіх описаних на сьогодні – вони є низькомолекулярними нуклеозидними органічними сполуками, які можна надалі модифікувати для досягнення бажаних ефектів. Раніше у нашому відділі досліджено здатність цих нуклеозидних низькомолекулярних інгібіторів MGMT чинити цитотоксичний ефект на клітини *in vitro* методом МТТ та відібрано декілька потенційних сполук. Тому на наступному етапі роботи ми досліджували, здатність цих відібраних найменш токсичних сполук інгібувати та знижувати кількість білка MGMT *in vitro*.

Ми вперше показали, що сполука № 41 спричиняє значне зниження кількості MGMT в клітинах *in vitro*. Ми припускаємо, що це зниження можна

пояснити зв'язуванням потенційного інгібітора із MGMT з подальшою інактивацією та деградацією молекул білка. Саме таким є відомий механізм взаємодії зі стандартним інгібітором Об -БГ [1]. Однак для нового інгібітора можливі також інші механізми впливу на ферментативну активність MGMT, оскільки зв'язок між активним центром і сполукою не є ковалентним.

У експериментах із виснаженням активності MGMT та сенсibiliзацією ракових пухлин *in vitro* до алкілувальної сполуки (нітрозогунідин), ймовірно, сполука № 41 також впливає і на цитотоксичний ефект. Тож питання стосовно механізмів дії нового інгібітора MGMT потребує спеціальних 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  $\beta$ -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,  $\beta$ -естрадіол і глюкокортикоїди), в тому числі і два вже відомі елементи відгуку на глюкокортикоїди.
2. Показано, що  $\beta$ -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- $\kappa$ B.

5. За результатами біоінформатичного аналізу виявлено найвірогідніші сайти модифікації у амінокислотній послідовності MGMT: K132 та K135 для ацетилювання, K63 для SUMOїлування, K209 для убіквітинування 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 HEr-2 і E8 *in vitro*. Із застосуванням вестерн-блот аналізу виявлено декілька перспективних сполук, що здатні знижувати кількість ферменту.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)*. 2007. 6(8): 1079-1099.
2. Hansen WK and Kelley MR. Review of Mammalian DNA Repair and Translational Implications. *JPET*. 2000. 295: 1–9.
3. Tubbs JL, Pegg AE, Tainer JA DNA binding, nucleotide flipping, and the helix-turn-helix motif in base repair by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and its implications for cancer chemotherapy. NIH PA Author Manuscript. 2007. 6(8): 1100–1115.
4. Grombacher T, Mitra S, Kaina B. Induction of the alkyltransferase (MGMT) gene by DNA damaging agents and the glucocorticoid dexamethasone and comparison with the response of base excision repair genes. *Carcinogenesis*. 1996. 17(11): 2329–2336.
5. Lavon I, Fuchs D, Zrihan D, Efroni G, Zelikovitch B, Fellig Y, Siegal T. Novel mechanism whereby nuclear factor kappaB mediates DNA damage repair through regulation of O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase. *Cancer Res*. 2007. 15: 34-45
6. Naumann SC, Roos WP, Jöst E, Belohlavek C, Lennerz V, Schmidt CW, Christmann M, Kaina B. Temozolomide- and fotemustine-induced apoptosis in human malignant melanoma cells: response related to MGMT, MMR, DSBs, and p53. *Br J Cancer*.. 2009. 100(2):322-33. doi: 10.1038/sj.bjc.6604856.
7. Dolan ME, Mitchell RB, Mummert C, Moschel RC, Pegg AE. Effect of O6-benzylguanine analogues on sensitivity of human tumor cells to the cytotoxic effects of alkylating agents. *Cancer Research*. 1991. 51(13): 3367–3373.
8. Pegg AE, Dolan ME, Moschel RC. Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 1995. 51: 167-223.

9. Natsume A, Ishii D, Wakabayashi T, Tsuno T, Hatano H, Mizuno M, Yoshida J. IFN-beta downregulates the expression of DNA repair gene MGMT and sensitizes resistant glioma cells to temozolomide. *Cancer Res.* 2005. 65(17):7573-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0036.
10. Kotsarenko KV, Lylo VV, Macewicz LL, Ruban TP, Luchakivska YuS, Kuchuk MV, Lukash LL. Influence of some biologically active substances on amount of MGMT and MARP proteins in human cells in vitro. *Biopolymers and Cell.* 2014. 30(3): 203-208.
11. Lukash LL, Lylo VV, Man'ko VG, Terent'ev AG. Strengthening of mutagenic effect of nitrosoguanidine under the influence of the modified bases at MGMT repair enzyme inhibition in somatic mammalian cells. *Cytology and Genetics.* 2002. 36(3): 41-50
12. Lukash LL, Boldt J, Pegg AE, Dolan ME, Maher VM, McCormick JJ. Effect of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase on the frequency and spectrum of mutations induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the HPRT gene of diploid human fibroblasts. *Mutat Res.* 1991. 250(12):397-409. doi: 10.1016/0027-5107(91)90196-U
13. Teo AK, Oh HK, Ali RB, Li BF The modified human DNA repair enzyme O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is a negative regulator of estrogen receptor-mediated transcription upon alkylation DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 2001. 21(20): 7105-7114
14. Лукаш ЛЛ, Манько ВГ, Лыло ВВ Роль O6-алкилгуанин-ДНК алкилтрансферазы в репарации повреждений, индуцированных алкилирующими соединениями. *Біополімери і клітина.* 2001. 17(4): 265 – 277
15. Tano K, Shiota S, Colliner J, Foote RS and Mitra S. Isolation structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O6 – alkylguanine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990. 87: 686-690
16. Fang Q, Kanugula S, Pegg AE. Function of domains of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Biochemistry.* 2005. 44: 15396-15405.

17. Margison GP, Butt A, Pearson SJ, Wharton S, Watson AJ, Marriott A, Caetano CM, Hollins JJ, Rukazenkova N, Begum G, Santibáñez-Koref MF Alkyltransferase-like proteins. *DNA Repair (Amst)*. 2007. 6(8):1222-1228.
18. Aramini JM, Tubbs JL, Kanugula S, Rossi P, Ertekin A, Maglaqui M, Hamilton K, Ciccocanti CT, Jiang M, Xiao R, Soong TT, Rost B, Acton TB, Everett JK, Pegg AE, Tainer JA, Montelione GT. Structural basis of O6-alkylguanine recognition by a bacterial alkyltransferase-like DNA repair protein. *J Biol Chem*. 2010. 285(18): 13736-13741
19. Daniels DS, Woo TT, Luu KX, Noll DM, Clarke ND, Pegg AE, Tainer JA. DNA binding and nucleotide flipping by the human DNA repair protein AGT. *Nat Struct Mol Biol*. 2004. 11: 714–720.
20. Daniels DS, Tainer JA. Conserved structural motifs governing the stoichiometric repair of alkylated DNA by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Mutat Res*. 2000. 460: 151–163.
21. Margison GP, Povey AC, Kaina B, Koref MFS. Variability and regulation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis*. 2003. 24(4): 625-635.
22. Bhakat KK, Mitra S. Regulation of the Human O6-Methylguanine-DNA methyltransferase gene by transcriptional coactivators cAMP response element-binding protein-binding protein and p300. *J Biol Chem*. 2000. 75(44): 34197-34204
23. Costello JF, Futscher BW, Kroes RA, Pieper RO. Methylation-Related Chromatin Structure Is Associated with Exclusion of Transcription Factors from and Suppressed Expression of the O6-Methylguanine DNA Methyltransferase Gene in Human Glioma Cell Lines. *Mol Cell Biol*. 1994. 14(10): 6515-6521.
24. Patel SA, Graunke DM, Pieper RO. Aberrant Silencing of the CpG Island-Containing Human O6-Methylguanine DNA Methyltransferase Gene Is Associated with the Loss of Nucleosome-Like Positioning. *Mol Cell Biol*. 1997. 17(10): 5813–5822
25. Pieper RO, Patel S, Ting SA, Futscher BW, Costello JF. Methylation of CpG Island Transcription Factor Binding Sites Is Unnecessary for Aberrant Silencing of the Human MGMT Gene. *J Biol Chem*. 1996. 271(23): 13916-13924.



26. Xllin CQ, Brent TP. Methylation Hot Spots in the 5' Flanking Region Denote Silencing of the O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Gene. *Cancer Res.* 1997. 57: 3672-3677
27. Danam RP, Qian XC, Howell SR, Brent TP. Methylation of selected CpGs in the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter region as a marker of gene silencing. *Mol Carcinog.* 1999. 24(2): 85-89
28. Qian X, von Wronski MA, Brent TP. Localization of methylation sites in the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter: correlation with gene suppression. *Carcinogenesis.* 1995. 16(6):1385-90
29. Danam RP, Howell SR, Brent TP, Harris LC. Epigenetic regulation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene expression by histone acetylation and methyl-CpG binding proteins. *Mol Cancer Ther.* 2005. 4(1): 61-69
30. Christmann M, Pick M, Lage H, Schadendorf D, Kaina B. Acquired resistance of melanoma cells to the antineoplastic agent fotemustine is caused by reactivation of the DNA repair gene MGMT. *Int J Cancer.* 2001. 92(1): 123-129
31. Kuo C-C, Liu J-F, Chang J-Y. DNA repair enzyme, O6-methylguanine DNA methyltransferase, modulates cytotoxicity of camptothecin-derived topoisomerase I inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 316(2):946-54. doi: 10.1124/jpet.105.095919
32. Iatsyshyna AP. Current approaches to improve the anticancer chemotherapy with alkylating agents: state of the problem in world and Ukraine. *Biopolymers and Cell.* 2012. 28(2):83–92
33. Verbeek B, Southgate TD, Gilham DE, Margison GP. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy. *Br. Med. Bull.* 2008. 85(1):17-33.
34. Srivenugopal KS, MullapudiRS, Shou J, Hazra TK, Ali-Osman F. Protein Phosphorylation Is a Regulatory Mechanism for O6-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase in Human Brain Tumor Cells. *Cancer Res.* 2000. 60: 282-287.
35. Beausoleil SA, Jedrychowski M, Schwartz D, Elias JE, Villén J, Li J, Cohn MA, Cantley LC, Gygi SP. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. 101(33): 12130–12135.

36. Imami K, Sugiyama N, Kyono Y, Tomita M and Ishihama Y. Automated Phosphoproteome Analysis for Cultured Cancer Cells by Two-Dimensional NanoLC-MS Using a Calcined Titania/C18 Biphasic Column. *ANALYTICAL SCIENCES*. 2008. 24: 161-166
37. Srivenugopal KS, Yuan XH, Friedman HS, Ali-Osman F. Ubiquitination-dependent proteolysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following inactivation with O6-benzylguanine or 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Biochemistry*. 1996. 35(4): 1328-1334
38. Ciesla J, Fraczyk T, Rode W. Phosphorylation of basic amino acid residues in proteins: important but easily missed. *Acta Biochim. Pol.* 2011. 58(2): 137-148.
39. Xu-Welliver M, Pegg AE. Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis*. 2002. 23(5): 823-830
40. Lim IK, Park TJ, Paik WK. Phosphorylation of methylated-DNA-protein-cysteine S-methyltransferase at serine-204 significantly increases its resistance to proteolytic digestion. *Biochem.J.* 2000. 352(3): 801-808.
41. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.*1998. 67: 425-79.
42. Ciechanover A, Iwai K. The ubiquitin system: from basic mechanisms to the patient bed. *IUBMB Life*. 2004. 56(4): 193-201
43. Dohmen RJ. SUMO protein modification. *Biochim Biophys Acta*. 2004. 1695(1-3): 113-31. doi: 10.1016/j.bbamcr.2004.09.021.
44. Harris LC, Potter PM, Tano K, Shiota S, Mitra S, Brent TP. Characterization of the promoter region of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Nucleic Acids Research*. 1991. 19(22): 6163-6167
45. Harris LC, Remack JS, Brent TP Identification of a 59 bp enhancer located at the first exon/intron boundary of the human O6-methylguanine DNA methyltransferase gene. *Nucleic Acids Research*. 1994. 22: 4614-4619

46. Schwarzl SM, Smith JC, Kaina B, Efferth T. Molecular modeling of O6-methylguanine-DNA methyltransferase mutant proteins encoded by single nucleotide polymorphisms. *Int J Mol Med*. 2005. 16(4): 553-7
47. Pegg AE, Fang Q, Loktionova NA. Human variants of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *DNA Repair (Amst)*. 2007. 6(8): 1071-1078.
48. Xu-Welliver M, Leitao J, Kanugula S, Meehan WJ, Pegg AE. Role of codon 160 in the sensitivity of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase to O6-benzylguanine. *Biochem Pharmacol*. 1999. 58: 1279–1285.
49. Wang L, Zhu D, Zhang C, Mao X, Wang G, Mitra S, Li BF, Wang X, Wu M. Mutations of O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene in esophageal cancer tissues from Northern China. *Int J Cancer*. 1997. 71(5): 719-723.
50. Hu Q, Sun W, Wang C, Gu Z. Recent Advances of Cocktail Chemotherapy by Combination Drug Delivery Systems. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016. 98: 19-34. doi: 10.1016/j.addr.2015.10.022.
51. Minn A.J. Interferons and the Immunogenic Effects of Cancer Therapy. *Trends Immunol*. 2015. 36: 725–737.
52. Legha SS, Ring S, Bedikian A, Plager C, Eton O, Buzaid A C, Papadopoulos N. Treatment of metastatic melanoma with combined chemotherapy containing cisplatin, vinblastine and dacarbazine (CVD) and biotherapy using interleukin-2 and interferon-alpha. *Ann Oncol*. 1996 8: 827-35.
53. De Andrea M, Ravera R, Gioia D, Gariglio M, Landolfo S. The interferon system: an overview. *Eur J Paediatr Neurol*. 2002;6 Suppl A:A41-6; discussion A55-8. doi: 10.1053/ejpn.2002.0573.
54. Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu Y-F, Williams BR, Sen GC, Silverman RH, Borden EC. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis*. 2003. 8(3):237-49. doi: 10.1023/a:1023668705040.
55. 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, Chen Z-P. Interferon- $\alpha/\beta$  enhances temozolomide activity against MGMT-positive glioma stem-like cells. *Oncol Rep*. 2015. 34: 2715-21

56. Natsume A, Wakabayashi T, Ishii D, Maruta H, Fujii M, Shimato S, Ito M, Yoshida J. A combination of IFN-beta and temozolomide in human glioma xenograft models: Implication of p53-mediated MGMT downregulation. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008 61(4):653-9. doi: 10.1007/s00280-007-0520-x.
57. Hapold C, Roth P, Silgner M, Florea A-M, Lamszus K, Frei K, Deenen R, Reifenberger G, Weller M. Interferon- $\beta$  Induces Loss of Spherogenicity and Overcomes Therapy Resistance of Glioblastoma Stem Cells. *Mol Cancer Ther.* 2014. 13(4):948-61. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0772.
58. Motomura K, Natsume A, Kishida Y, Higashi H, Kondo Y, Nakasu Y, Abe T, Namba H, Wakai K, Wakabayashi T. Benefits of interferon- $\beta$  and temozolomide combination therapy for newly diagnosed primary glioblastoma with the unmethylated MGMT promoter: A multicenter study. *Cancer.* 2011. 117(8):1721-30. doi: 10.1002/cncr.25637
59. Schiavon G, Smith IE. Status of adjuvant endocrine therapy for breast cancer. *Breast Cancer Research.* 2014. 16(2): 206-222.
60. Наказ МОЗ України № 554 від 17.09.2007
61. Urvalek A, Laursen KB, Gudas LJ. The roles of retinoic acid and retinoic acid receptors in inducing epigenetic changes. *Subcellular Biochemistry.* 2014. 70: 129–149.
62. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol. Rev.* 2007. 87(3): 905–31.
63. Biswas T, Ramana CV, Srinivasan G, Boldogh I, Hazra TK, Chen Z, Tano K, Thompson EB, Mitra S. Activation of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene by glucocorticoid hormone. *Oncogene.* 1999 18(2):525-32.
64. Horiguchi M, Kim J, Matsunaga N, Kaji H, Egawa T, Makino K, Koyanagi S, Ohdo S. Glucocorticoid-dependent expression of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase gene modulates dacarbazine-induced hepatotoxicity in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010. 333(3):782-7.

65. Ueda S, Mineta T, Nakahara Y, Okamoto H, Shiraishi T, Tabuchi K. Induction of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by dexamethasone in glioblastomas. *J Neurosurg.* 2004. 101(4):659-63. doi: 10.3171/jns.2004.101.4.0659.
66. Boonyaratanakornkit V, Edwards DP. Receptor mechanisms mediating non-genomic actions of sex steroids. *Semin. Reprod. Med.* 2007. 25(3): 139-53. doi: 10.1055/s-2007-973427
67. Garg D, Ng SSM, Baig KM, Driggers P, Segars J. Progesterone-Mediated Non-Classical Signaling. *Trends Endocrinol Metab.* 2017. 28(9): 656-668. doi: 10.1016/j.tem.2017.05.006
68. Gellersen B, Fernandes MS, Brosens JJ. Non-genomic Progesterone Actions in Female Reproduction. *Hum Reprod Update.* 2009. 15(1): 119-38. doi: 10.1093/humupd/dmn044.
69. Santen R, Cavalieri E, Rogan E, Russo J, Guttenplan J, Ingle J, Yue W. Estrogen mediation of breast tumor formation involves estrogen receptor-dependent, as well as independent, genotoxic effects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009. 1155: 132–40. doi: 10.1111/j.1749-6632.2008.03685.x
70. Vrtačnik P, Ostanek B, Mencej-Bedrač S, Marc J. The many faces of estrogen signaling. *Biochem. medica.* 2014. 24(3): 329–42. doi: 10.11613/BM.2014.035
71. Grimm SL, Hartig SM, Edwards DP. Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. *J Mol Biol.* 2016. 428(19): 3831–49. doi: 10.1016/j.jmb. 2016.06.020.
72. Faus H, Haendler B. Post-translational modifications of steroid receptors. *Biomed. Pharmacother.* 2006. 60(9): 520–528. doi:10.1016/j.biopha.2006.07.082.
73. Chang C, McDonnell DP. Molecular pathways: the metabolic regulator estrogen-related receptor  $\alpha$  as a therapeutic target in cancer. *Clin. Cancer Res.* 2012. 18(22): 6089–95. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3221.
74. Nakajima Y, Osakabe A, Waku T, Suzuki T, Akaogi K, Fujimura T, Homma Y, Inoue S, Yanagisawa J. Estrogen exhibits a biphasic effect on prostate tumor growth through the ER $\beta$ -KLF5 pathway. *Mol. Cell. Biol.* 2015. 19(36): 144-56. doi: 10.1128/MCB.00625-15

75. Mak P, Li J, Samanta S, Mercurio AM. ER $\beta$  regulation of NF- $\kappa$ B activation in prostate cancer is mediated by HIF-1. *Oncotarget*. 2015. 6(37): 40247–40254. doi: 10.18632/oncotarget.5377.
76. Mungenast F, Thalhammer T. Estrogen biosynthesis and action in ovarian cancer. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2014. 5: 192. doi: 10.3389/fendo.2014.00192
77. Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol. Endocrinol.* 2000. 14(10): 1649–60. doi: 10.1210/mend.14.10.0532
78. Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR, Bland KI. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol. Endocrinol.* 2002. 16(1): 70–84. doi: 10.1210/mend.16.1.0758
79. Obr AE, Edwards DP. The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer *Mol Cell Endocrinol.* 2012. 357(1-2): 4-17.
80. Cahill MA. Progesterone receptor membrane component 1: an integrative review *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007. 105(1-5): 16-36. doi: 10.1016/j.jsbmb.2007.02.002
81. Cahill MA, Jazayeri JA, Catalano SM, Toyokuni S, Kovacevic Z, Richardson DR. The emerging role of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) in cancer biology *Biochim Biophys Acta.* 2016. 1866(2): 339-349. doi:10.1016/j.bbcan.2016.07.004
82. Thomas P, Pang Y, Dong J. Enhancement of Cell Surface Expression and Receptor Functions of Membrane Progesterone Receptor  $\alpha$  (mPR $\alpha$ ) by Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1): Evidence for a Role of PGRMC1 as an Adaptor Protein for Steroid Receptors *Endocrinology.* 2014. 155(3): 1107–1119. doi: 10.1210/en.2013-1991

83. Sharma S, Salehi F, Scheithauer BW, Rotondo F, Syro LV, Kovacs K Role of MGMT in tumor development, progression, diagnosis, treatment and prognosis. *Anticancer Research*. 2009. 29(10): 3759–3768.
84. McMurry TB. MGMT inhibitors - The Trinity College–Paterson Institute experience, a chemist's perception. *DNA Repair*. 2007. 6(8): 1161–1169.
85. Middleton MR, Kelly J, Thatcher N, Donnelly DJ, McElhinney RS, McMurry TB, McCormick JE, Margison GP. O(6)-(4-bromothienyl)guanine improves the therapeutic index of temozolomide against A375M melanoma xenografts. *International Journal of Cancer*. 2000. 85(2): 248-252
86. Marsoner T, Schmidt OP, Triemer T, Luedtke NW. DNA-targeted inhibition of MGMT. *ChemBioChem*. 2017. 18(10): 894-898.
87. Schilsky RL, Dolan ME, Bertucci D, Ewesuedo RB, Vogelzang NJ, Mani S, Wilson LR, Ratain MJ. Phase I clinical and pharmacological study of O6-benzylguanine followed by carmustine in patients with advanced cancer. *Clinical Cancer Research*. 2000. 6(8): 3025-3031.
88. Quinn JA, Desjardins A, Weingart J, Brem H, Dolan ME, Delaney SM, Vredenburgh J, Rich J, Friedman AH, Reardon DA, Sampson JH, Pegg AE, Moschel RC, Birch R, McLendon RE, Provenzale JM, Gururangan S, Dancey JE, Maxwell J, Tourt-Uhlig S, Herndon JE 2nd, Bigner DD, Friedman HS. Phase I trial of temozolomide plus O6-benzylguanine for patients with recurrent or progressive malignant glioma. *Journal of Clinical Oncology*. 2005. 23(28): 7178-7187.
89. Turriziani M, Caporaso P, Bonmassar L, Buccisano F, Amadori S, Venditti A, Cantonetti M, D'Atri S, Bonmassar E O6-(4-bromothienyl)guanine (PaTrin-2), a novel inhibitor of O6-alkylguanine DNA alkyl-transferase, increases the inhibitory activity of temozolomide against human acute leukaemia cells in vitro. *Pharmacological Research*. 2006. 53(4): 317-323.
90. Clemons M, Kelly J, Watson AJ, Howell A, McElhinney RS, McMurry TBH, Margison GP O6-(4-bromothienyl)guanine reverses temozolomide resistance in human breast tumour MCF-7 cells and xenografts. *British Journal of Cancer*. 2005. 93(10): 1152-1156

91. Ranson M, Middleton MR, Bridgewater J, Lee SM, Dawson M, Jowle D, Halbert G, Waller S, McGrath H, Gumbrell L, McElhinney RS, Donnelly D, McMurry TBH, Margison GP. Lomeguatrib, a potent inhibitor of O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase: phase I safety, pharmacodynamic, and pharmacokinetic trial and evaluation in combination with temozolomide in patients with advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research*. 2006. 12(5): 1577-1584.
92. Khan OA, Ranson M, Michael M, Olver I, Levitt NC, Mortimer P, Watson AJ, Margison GP, Midgley R, Middleton MR. A phase II trial of lomeguatrib and temozolomide in metastatic colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. 2008. 98(10): 1614-1618.
93. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*. 2004. 64 (15):5245–50. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496
94. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002. 3(7): RESEARCH0034
- Kiemer L, Bendtsen JD, Blom N. NetAcet: prediction of N-terminal acetylation sites. *Bioinformatics*. 2005. 21(7): 1269–1270.
95. Kiemer L, Bendtsen JD, Blom N. NetAcet: prediction of N-terminal acetylation sites. *Bioinformatics*. 2005. 21(7): 1269–1270.
96. Li A, Xue Y, Jin C, Wang M, Yao X. Prediction of N-epsilon-acetylation on internal lysines implemented in Bayesian Discriminant Method. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2006. 350(4): 818–824.
97. Gnad F, Gunawardena J, Mann M. PHOSIDA 2011: the posttranslational modification database. *Nucleic Acids Res*. 2011. 39(Database issue):D253-60. doi: 10.1093/nar/gkq1159.
98. Ren J, Gao X, Jin CJ, Zhu M, Wang X, Shaw A, Wen L, Yao X, Xue Y. Systematic study of protein sumoylation: Development of a site-specific predictor of SUMOsp 2.0. *Proteomics*. 2009. 9(12):3409-3412. doi: 10.1002/pmic.200800646.



99. Radivojac P, Vacic V, Haynes C, Cocklin RR, Mohan A, Heyen JW, Goebel MG, Iakoucheva LM. Identification, analysis, and prediction of protein ubiquitination sites. *Proteins*. 2010. 78(2): 365–380. doi: 10.1002/prot.22555.
100. Chen H, Xue Y, Huang N, Yao X, Sun Z MeMo: a web tool for prediction of protein methylation modifications. *Nucleic Acids Res*. 2006. 34 Web Server issue. W249–253.
101. Uversky VN, Radivojac P, Iakoucheva LM, Obradovic Z, Dunker AK. Prediction of intrinsic disorder and its use in functional proteomics. *Methods Mol. Biol*. 2007 408:69-92. doi: 10.1007/978-1-59745-547-3\_5.
102. Xue Y, Ren J, Gao X, Jin C, Wen L, Yao X. GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Mol. Cell Proteomics*. 2008. 7(9):1598-608. doi: 10.1074/mcp.M700574-MCP200.
103. Huang HD, Lee TY, Tzeng SW, Horng JT. KinasePhos: a web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites. *Nucleic Acids Research*, 01 Jul 2005, 33(Web Server issue):W226-9. doi: 10.1093/nar/gki471.
104. Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol*. 1999. 294(5): 1351–1362. doi: 10.1006/jmbi.1999.3310.
105. Blom N, Sicheritz-Pontén T, Gupta R., Gammeltoft S, Brunak S. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*. 2004. 4(6): 1633–1649. doi: 10.1002/pmic.200300771.
106. Obenauer JC, Cantley LC, Yaffe MB. Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs *Nucleic Acids Res*. 2003. 31(13): 3635–3641. doi: 10.1093/nar/gkg584.
107. Ponting CP, Schultz Ponting CP, Schultz J, Milpetz F. Bork. P SMART: identification and annotation of domains from signalling and extracellular protein sequences. *Nucleic Acids Res*. 1999 Jan 1;27(1):229-32. doi: 10.1093/nar/27.1.229.
108. Dosztányi Z, Csizmók V, Tompa P, Simon I. The pairwise energy content estimated from amino acid composition discriminates between folded and

- intrinsically unstructured proteins. *J.Mol. Biol.* 2005. 347(4): 827–839. doi: 10.1016/j.jmb.2005.01.071.
109. Dosztányi Z, Mészáros B, Simon I. ANCHOR: web server for predicting protein binding regions in disordered proteins. *Bioinformatics.* 2009. 25(20): 2745–2746. doi: 10.1093/bioinformatics/btp518.
110. Fuentes N, Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2019. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2019;116:135-170. doi: 10.1016/bs.apcsb.2019.01.001.
111. Dily FL, Beato M. Signaling by Steroid Hormones in the 3D Nuclear Space. *Int J Mol Sci.* 2018. 19(2):306. doi: 10.3390/ijms19020306.
112. Chen L, Yang G. PPARs Integrate the Mammalian Clock and Energy Metabolism. *PPAR Res.* 2014. 2014:653017. doi: 10.1155/2014/653017.
113. Tang HY, Lin HY, Zhang S, Davis FB, Davis PJ. Thyroid hormone causes mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of the nuclear estrogen receptor. *Endocrinology.* 2004. 145(7):3265-72. doi: 10.1210/en.2004-0308.
114. Davis FB, Tang H-Y, Shih A, Keating T, Lansing L, Hercbergs A, Fenstermaker RA, Mousa A, Mousa SA, Davis PJ, Lin H-Y. Acting via a cell surface receptor, thyroid hormone is a growth factor for glioma cells. *Cancer Res.* 2006. 66(14):7270-5. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4365.
115. Lin HY, Tang HY, Shih A, Keating T, Cao G, Davis PJ, Davis FB. Thyroid hormone is a MAPK-dependent growth factor for thyroid cancer cells and is anti-apoptotic. *Steroids.* 2007. 72(2):180-7. doi: 10.1016/j.steroids.2006.11.014.
116. Mastracci TL, Evans-Molina C. Pancreatic and Islet Development and Function: The Role of Thyroid Hormone. *J Endocrinol Diabetes Obes.* 2014. 2(3): 1044.
117. Lotan R. Suppression of squamous cell carcinoma growth and differentiation by retinoids. *Cancer Res.* 1994. 54: 1987s-1990s.
118. Moon TE, Levine N, Cartmel B, Bangert JL, Rodney S, Dong Q, Peng YM, Alberts DS. Effect of retinol in preventing squamous cell skin cancer in moderate-risk subjects: a randomized, double-blind, controlled trial. Southwest Skin Cancer Prevention Study Group. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997. 6(11): 949-956.

119. Myga-Nowak M, Pacholska-Bogalska J, Kwaśniewski W, Kwaśniewska A, Goździcka-Józefiak A. Proliferation of cells and expression of RARs, RXRs and HPV viral E6 and E7 proteins in cervical cancer cell lines after treatment with ATRA. *Ann Agric Environ Med*. 2011. 18(1): 145-150.
120. Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ, Gronemeyer H. International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors *Pharmacol Rev*. 2006. 58(4):760-72. doi: 10.1124/pr.58.4.7.
121. Odawara H, Iwasaki T, Horiguchi J, Rokutanda N, Hirooka K, Miyazaki W, Koibuchi Y, Shimokawa N, Iino Y, Takeyoshi I, Koibuchi N. Activation of aromatase expression by retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR) alpha in breast cancer cells: identification of a novel ROR response element. *J Biol Chem*. 2009. 284(26): 17711-17719.
122. Morand GB, da Silva SD, Hier MP, Alaoui-Jamali MA. Insights into genetic and epigenetic determinants with impact on vitamin d signaling and cancer association studies: the case of thyroid cancer. *Front Oncol*. 2014. 4: 309. doi: 10.3389/fonc.2014.00309.
123. Khorasanizadeh S, Rastinejad F. Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends Biochem Sci*. 2001. 26(6): 384-390.
124. Claessens F, Gewirth DT. DNA recognition by nuclear receptors *Biology*. *Essays Biochem*. 2004. 40: 59-72.
125. Hammond GL. Diverse roles for sex hormone-binding globulin in reproduction. *Biol. Reprod*. 2011. 85(3):431–41. doi: 10.1095/biolreprod.111.092593.
126. Marnett LJ, Burcham PC. Endogenous DNA adducts: potential and paradox. *Chem Res Toxicol*. 1993. 6(6): 771-85. doi: 10.1021/tx00036a005
127. Georgiadis P, Samoli E, Kaila S, Katsouyanni K, Kyrtopoulos SA. Ubiquitous presence of O6-methylguanine in human peripheral and cord blood DNA. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000. 9(3): 299-305.
128. Sabbir MG. Progesterone induced Warburg effect in HEK293 cells is associated with post-translational modifications and proteasomal degradation of progesterone

- receptor membrane component 1. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2019. 191: 105376. doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.105376.
129. Thejer BM, Adhikary PP, Teakel SL, Fang J, Weston PA, Gurusinghe S, Anwer AG, Gosnell M, Jazayeri JA, Ludescher M, Gray L-A, Pawlak M, Wallace RH, Pant SD, Wong M, Fischer T, New EJ, Fehm TN, Neubauer H, Goldys EM, Quinn JC, Weston LA, Cahill MA. PGRMC1 effects on metabolism, genomic mutation and CpG methylation imply crucial roles in animal biology and disease. *BMC Mol Cell Biol*. 2020. 21(1): 26. doi: 10.1186/s12860-020-00268-z.
130. Neubauer H, Clare SE, Wozny W, Schwall GP, Poznanović S, Stegmann W, Vogel U, Sotlar K, Wallwiener D, Kurek R, Fehm T, Cahill MA. Breast cancer proteomics reveals correlation between estrogen receptor status and differential phosphorylation of PGRMC1. *Breast Cancer Res*. 2008. 10(5): R85. doi: 10.1186/bcr2155
131. Nidoieva ZM, Samoilenko IO, Pidpala OV, Lukash LL, Iatsyshyna AP. Bioinformatic search of hormone response elements within the human O6-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene promoter. 2015. *Factors in Experimental Evolution of Organisms*. 17: 74-78.
132. Drazic A, Myklebust LM, Ree R, Arnesen Th. The world of protein acetylation *Review Biochim Biophys Acta*. 2016. 1864(10):1372-401. doi: 10.1016/j.bbapap.2016.06.007.
133. Fulton MD, Brown T, Zheng GY. The Biological Axis of Protein Arginine Methylation and Asymmetric Dimethylarginine. *Int J Mol Sci* . 2019. 20(13):3322. doi: 10.3390/ijms20133322.
134. Bedford MT, Clarke SG. Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Review Mol Cell*. 2009 33(1):1-13. doi: 10.1016/j.molcel.2008.12.013.
135. Han Z-J, Feng Y-H, Gu B-H, Li Y-M, Chen H. The post-translational modification, SUMOylation, and cancer (Review) *Int J Oncol* . 2018. 52(4):1081-1094. doi: 10.3892/ijo.2018.4280.
136. Xue Y, Zhou F, Fu C, Xu Y, Yao X. SUMOsp: a web server for sumoylation site prediction. *Nucleic Acids Research* 2006. 34(Web Server issue): 254–257

137. Penketh PG, Shyam K, Sartorelli AC. Fluorometric assay for the determination of DNA-DNA cross-links utilizing Hoechst 33258 at neutral pH values. *Analytical Biochemistry*. 1997. 252(1): 210-213.
138. Santoro N, Worsley R, Miller KK, Parish SJ, Davis SR. Role of Estrogens and Estrogen-Like Compounds in Female Sexual Function and Dysfunction. *J. Sex. Med.* 2016. 13(3): 305–316. doi: 10.1016/j.jsxm.2015.11.015
139. Cavalieri EL., Rogan EG. Depurinating estrogen-DNA adducts in the etiology and prevention of breast and other human cancers. *Future Oncol.* 2010. 6(1): 75-91. doi: 10.2217/fon.09.137
140. de Veer MJ, Holko M, Frevel M, Walker E, Der S, Paranjape JM, Silverman RH, Williams B.R. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays, *J Leukoc Biol.* 2001, 69(6): 912-20.
141. Weaver KD, Yeyeodu S, Cusack JC Jr, Baldwin AS Jr, Ewend MG. Potentiation of chemotherapeutic agents following antagonism of nuclear factor  $\kappa$ B in human gliomas, *J Neurooncol.* 2003. 61: 187–196
142. Niture SK, Doneanu CE, Velu CS, Bailey NI, Srivenugopal KS. Proteomic analysis of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase by affinity chromatography and tandem mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005. 337(4): 1176-1184.
143. Wilkinson KA, Henley JM Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation *Biochem J* 2010 428(2):133-45. doi: 10.1042/BJ20100158
144. Bennetzen MV, Larsen DH, Bunkenborg J, Bartek J, Lukas J, Andersen JS Site-specific phosphorylation dynamics of the nuclear proteome during the DNA damage response. *Mol Cell Proteomics.* 2010. 9(6):1314-23. doi: 10.1074/mcp.M900616-MCP200. Epub 2010 Feb 16
145. Lukash LL, Boldt J, Pegg AE, Dolan ME, Maher VM, McCormick JJ. Effect of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase on the frequency and spectrum of mutations induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the HPRT gene of diploid human fibroblasts. *Mutat Res.* 1991. 250(12):397–409. doi: 10.1016/0027-5107(91)90196-U

ДОДАТОК А  
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.

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  $\alpha 2b$  на експресію Об-метилгуанін-ДНК метилтрансферази в соматичних клітинах людини *in vitro*. Цитология и генетика. 2019. 53(6): 36-43.

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.

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.

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.

6. Волинець Г.П., Яцишина А.П., Рубан Т.П., Мацевич Л. Л., **Нідоєва З.М.**, Баланда А.О., Бджола В. Г., Ярмолюк С. М., Лукаш Л. Л. Застосування сполуки 5-(5-хлоро-2-гідроксибензиліден)-4-тіоксотіазолідин-2-ону як інгібітора MGMT: Патент на винахід № 122373; заявл. 31.01.2019, Опубл. 25.06.2019.

7. **Нідоєва З.М.**, Яцишина А.П., Волинець Г.П., Рубан Т.П., Мацевич Л.Л., Баланда А.О., Бджола В.Г., Ярмолюк 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 післятрансляційних 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. – с. 185-187

**14. Нідоєва З.М., Яцишина А.П., Підпала О.В., Лукаш Л.Л.** Білок O<sup>6</sup>-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)



## ДОДАТОК Б.

**Результати аналізу потенційної взаємодії серин-треонінових та тирозинових кіназ із білком MGMT людини та сайти їхньої взаємодії, отримані за допомогою програми GPS**

Position	Code	Kinase	Peptide	Score	Cutoff
13	S	CAMK	APLERFASRRPQVLA	2,315	1,953
232	S	CMGC	GAGATSGSPAGRN*	5,913	5,352
232	S	TKL	GAGATSGSPAGRN*	0,972	0,944
42	T	AGC/PKA	DCEMKRTTLDSPGK	3,186	2,77
13	S	AGC/PKC	APLERFASRRPQVLA	2,409	2,201
42	T	CAMK/DAPK	DCEMKRTTLDSPGK	3,542	2,917
13	S	CAMK/MAPKAPK	APLERFASRRPQVLA	4	3,639
232	S	CK1/CK1	GAGATSGSPAGRN*	1,973	1,959
45	S	CK1/VRK	MKRTTLDSPGKLEL	7,75	5,75
232	S	CMGC/CDK	GAGATSGSPAGRN*	3,994	2,856
232	S	CMGC/DYRK	GAGATSGSPAGRN*	6,25	5,083
232	S	CMGC/GSK	GAGATSGSPAGRN*	4,247	3,605
232	S	CMGC/MAPK	GAGATSGSPAGRN*	4,127	3,757
42	T	TKL/IRAK	DCEMKRTTLDSPGK	5,5	4,5
69	T	TKL/IRAK	IKLLGKGTSAADAVE	6	4,5
69	T	TKL/MLK	IKLLGKGTSAADAVE	2,625	1,938
229	T	TKL/MLK	WLKGAGATSGSPAG	2,938	1,938
230	S	TKL/MLK	LKGAGATSGSPAGR	2,875	1,938
232	S	TKL/MLK	GAGATSGSPAGRN*	3,812	1,938
41	T	Other/PEK	KDCEMKRTTLDSPG	3,812	2,5
70	S	Other/PLK	KLLGKGTSAADAVEV	1,812	1,812
42	T	Other/Wnk	DCEMKRTTLDSPGK	4,333	4,167
216	S	Other/Wnk	KPGLGGSSGLAGAWL	6	4,167
229	T	AGC/GRK/BARK	WLKGAGATSGSPAG	2,333	1,788
232	S	AGC/GRK/BARK	GAGATSGSPAGRN*	2,424	1,788
229	T	AGC/GRK/GRK	WLKGAGATSGSPAG	2	2
230	S	AGC/GRK/GRK	LKGAGATSGSPAGR	2,458	2
232	S	AGC/GRK/GRK	GAGATSGSPAGRN*	3,083	2
13	S	AGC/PKC/Alpha	APLERFASRRPQVLA	5,104	4,59
13	S	AGC/PKC/Delta	APLERFASRRPQVLA	4,903	3,806
124	S	AGC/PKC/Iota	HPVFQQESFTRQVLW	3,846	3,692
13	S	AGC/PKG/PKG1	APLERFASRRPQVLA	5,188	4,062
232	S	AGC/RSK/RSK	GAGATSGSPAGRN*	1,342	1,289
23	T	CAMK/CAMK1/CAMK1a	PQVLAVRTVCDLVLG	10	5
70	S	CAMK/CAMK1/CAMK4	KLLGKGTSAADAVEV	6,6	6,5
42	T	CAMK/DAPK/DAPK3	DCEMKRTTLDSPGK	7,389	4,222
13	S	CAMK/MAPKAPK/MAPKAPK	APLERFASRRPQVLA	6,121	6,03
70	S	CAMK/PKD/PKD1	KLLGKGTSAADAVEV	4,111	3,333
232	S	CMGC/CDK/CDC2	GAGATSGSPAGRN*	5,271	2,512
232	S	CMGC/CDK/CDK4	GAGATSGSPAGRN*	7,308	5,077
126	T	CMGC/CDK/CDK7	VFQQESFTRQVLWKL	2,778	2,278
232	S	CMGC/DYRK/Dyrk1	GAGATSGSPAGRN*	5,857	3

Position	Code	Kinase	Peptide	Score	Cutoff
45	S	CMGC/GSK/GSK3A	MKRTTLDSP LGKLEL	4,667	4
232	S	CMGC/GSK/GSK3A	GAGATSGSP PAGR N*	4	4
232	S	CMGC/GSK/GSK3B	GAGATSGSP PAGR N*	4,612	4,102
232	S	CMGC/MAPK/p38	GAGATSGSP PAGR N*	5,259	4,776
124	S	STE/STE-Unique/COT	HPVFQQESFTRQVLW	6,4	6,4
69	T	TKL/MLK/TAK1	IKLLGKGTSAADAVE	6,5	5
70	S	TKL/MLK/TAK1	KLLGKGTSAADAVEV	5	5
215	S	TKL/MLK/TAK1	GKPGLGGSSGLAGAW	5,5	5
45	S	Atypical/PIKK/FRAP	MKRTTLDSP LGKLEL	7,6	5,8
42	T	Other/AUR/IPL1-yeast	DCEMKRTTLDSP LGK	7,211	6,211
45	S	Other/NEK/NEK6	MKRTTLDSP LGKLEL	4,857	4,857
232	S	Other/Other-Unique/KIS	GAGATSGSP PAGR N*	12,6	5,2
41	T	Other/PEK/PKR	KDCMKRTTLDSP LG	3,875	2,562
229	T	AGC/GRK/BARK/GRK-2	WLKGAGATSGSP PAG	2,379	1,621
232	S	AGC/GRK/BARK/GRK-2	GAGATSGSP PAGR N*	2,483	1,621
229	T	AGC/GRK/GRK/GRK-1	WLKGAGATSGSP PAG	4	3,75
230	S	AGC/GRK/GRK/GRK-1	LKGAGATSGSP PAGR	5,5	3,75
232	S	AGC/GRK/GRK/GRK-1	GAGATSGSP PAGR N*	3,875	3,75
13	S	AGC/PKC/Alpha/PKCb	APLERFASRRPQVLA	6,438	5,938
183	S	AGC/PKC/Alpha/PKcg	CHRVVCSGAVGNYS	2,8	2,6
190	S	AGC/PKC/Alpha/PKcg	SGAVGNYSGGLAVKE	3,4	2,6
124	S	AGC/PKC/Delta/PKcd	HPVFQQESFTRQVLW	3,826	3,478
13	S	AGC/PKC/Delta/PKct	APLERFASRRPQVLA	4,5	4,125
13	S	AGC/PKC/Eta/PKce	APLERFASRRPQVLA	8,889	7,111
13	S	AGC/PKC/Eta/PKch	APLERFASRRPQVLA	5	4,75
124	S	AGC/PKC/Eta/PKch	HPVFQQESFTRQVLW	6,25	4,75
124	S	AGC/PKC/Iota/PKcz	HPVFQQESFTRQVLW	3,769	3,615
232	S	CMGC/CDK/CDC2/CDC2	GAGATSGSP PAGR N*	7,439	4,072
232	S	CMGC/CDK/CDC2/CDK2	GAGATSGSP PAGR N*	7,797	3,095
232	S	CMGC/CDK/CDK4/CDK4	GAGATSGSP PAGR N*	7,308	5
232	S	CMGC/CDK/CDK4/CDK6	GAGATSGSP PAGR N*	5,75	5,25
232	S	CMGC/MAPK/ERK/MAPK1	GAGATSGSP PAGR N*	8,757	6,557
45	S	CMGC/MAPK/JNK/MAPK9	MKRTTLDSP LGKLEL	5,947	4,947
232	S	CMGC/MAPK/JNK/MAPK9	GAGATSGSP PAGR N*	6,526	4,947
232	S	CMGC/MAPK/JNK/MAPK10	GAGATSGSP PAGR N*	11	8,857
45	S	CMGC/MAPK/p38/MAPK11	MKRTTLDSP LGKLEL	9,333	8
232	S	CMGC/MAPK/p38/MAPK11	GAGATSGSP PAGR N*	8	8
232	S	CMGC/MAPK/p38/MAPK12	GAGATSGSP PAGR N*	11	10,667
232	S	CMGC/MAPK/p38/MAPK13	GAGATSGSP PAGR N*	9,333	8,333
42	T	STE/STE20/PAKA/PAK1	DCEMKRTTLDSP LGK	6,393	5,5
42	T	STE/STE20/PAKA/PAK2	DCEMKRTTLDSP LGK	3,235	3,118
41	T	TKL/MLK/MLK/MAP3K11	KDCMKRTTLDSP LG	6	4,667
189	Y	TK/Axl	SSGAVGNYSGGLAVK	7	6,286
145	Y	TK/Csk	KFGEVISYQQLAALA	12	11
189	Y	TK/Ret	SSGAVGNYSGGLAVK	1,429	1,214
100	Y	TK/EGFR/ErbB2	CTAWLNAYFHQPEAI	4,4	2,2
145	Y	TK/Src/BLK	KFGEVISYQQLAALA	8,25	8,25
145	Y	TK/Tec/ITK	KFGEVISYQQLAALA	3,714	3,571

## ДОДАТОК В.

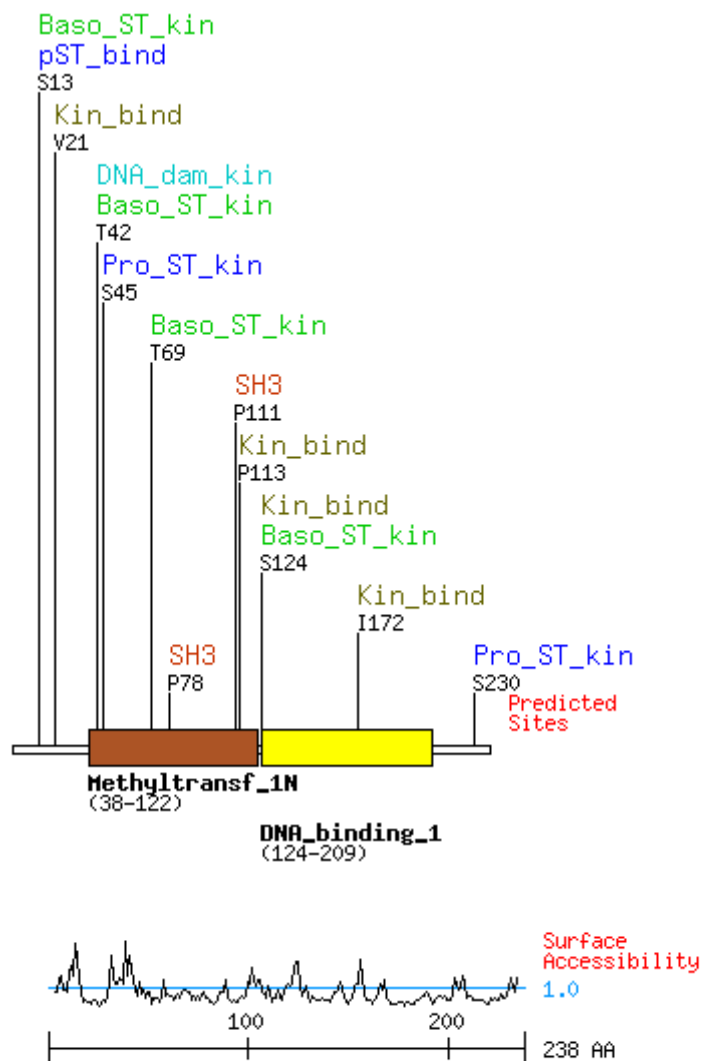
Результати аналізу амінокислотної послідовності білка MGMT за  
допомогою програми SCANSITE

Motif Scan Graphic Results: **MGMT**

**Description:** User-entered sequence

**Motifs scanned:** All

**Stringency:** Low



<b>Phosphoserine/threonine binding group (pST_bind)</b>				
<b>14-3-3 Mode 1</b>			Gene Card <a href="#">YWHAZ</a>	
<u>Site</u>	<u>Score</u>	<u>Percentile</u>	<u>Sequence</u>	<u>SA</u>
S13	<a href="#">0.5745</a>	2.738 %	<a href="#">APLERFASRRPQVLA</a>	1.594
<b>Src homology 3 group (SH3)</b>				
<b>Amphiphysin SH3</b>			Gene Card <a href="#">AMPH</a>	
<u>Site</u>	<u>Score</u>	<u>Percentile</u>	<u>Sequence</u>	<u>SA</u>
P111	<a href="#">0.6827</a>	4.679 %	<a href="#">PEAIEEFPVPALHHP</a>	0.616
<b>Cortactin SH3</b>			Gene Card <a href="#">HCLS1</a>	
<u>Site</u>	<u>Score</u>	<u>Percentile</u>	<u>Sequence</u>	<u>SA</u>
P78	<a href="#">0.7088</a>	3.733 %	<a href="#">AADAVEVPAPAAVLG</a>	0.719
<b>Basophilic serine/threonine kinase group (Baso_ST_kin)</b>				
<b>Protein Kinase A</b>			Gene Card <a href="#">PRKACG</a>	
<u>Site</u>	<u>Score</u>	<u>Percentile</u>	<u>Sequence</u>	<u>SA</u>
T42	<a href="#">0.3469</a>	0.209 %	<a href="#">DCEMKRTTLDSPGK</a>	1.725
<b>PKC mu</b>			Gene Card <a href="#">PRKCM</a>	
<u>Site</u>	<u>Score</u>	<u>Percentile</u>	<u>Sequence</u>	<u>SA</u>
T69	<a href="#">0.4964</a>	1.097 %	<a href="#">IKLLGKGTSAADAVE</a>	0.895
<b>Calmodulin dependent Kinase 2</b>			Gene Card <a href="#">CAMK2G</a>	
<u>Site</u>	<u>Score</u>	<u>Percentile</u>	<u>Sequence</u>	<u>SA</u>
S124	<a href="#">0.5268</a>	1.046 %	<a href="#">HPVFQQESFTRQVLW</a>	2.255
<b>Calmodulin dependent Kinase 2</b>			Gene Card <a href="#">CAMK2G</a>	
<u>Site</u>	<u>Score</u>	<u>Percentile</u>	<u>Sequence</u>	<u>SA</u>
T42	<a href="#">0.5961</a>	3.561 %	<a href="#">DCEMKRTTLDSPGK</a>	1.725
<b>PKC zeta</b>			Gene Card <a href="#">PRKCZ</a>	
<u>Site</u>	<u>Score</u>	<u>Percentile</u>	<u>Sequence</u>	<u>SA</u>
T69	<a href="#">0.6198</a>	4.643 %	<a href="#">IKLLGKGTSAADAVE</a>	0.895
<b>PKC zeta</b>			Gene Card <a href="#">PRKCZ</a>	
<u>Site</u>	<u>Score</u>	<u>Percentile</u>	<u>Sequence</u>	<u>SA</u>
S124	<a href="#">0.6198</a>	4.643 %	<a href="#">HPVFQQESFTRQVLW</a>	2.255
<b>Clk2 Kinase</b>			Gene Card <a href="#">CLK2</a>	
<u>Site</u>	<u>Score</u>	<u>Percentile</u>	<u>Sequence</u>	<u>SA</u>
S13	<a href="#">0.7811</a>	1.967 %	<a href="#">APLERFASRRPQVLA</a>	1.594
<b>DNA damage kinase group (DNA_dam_kin)</b>				
<b>DNA PK</b>			Gene Card <a href="#">PRKDC</a>	
<u>Site</u>	<u>Score</u>	<u>Percentile</u>	<u>Sequence</u>	<u>SA</u>
T42	<a href="#">0.6429</a>	4.570 %	<a href="#">DCEMKRTTLDSPGK</a>	1.725
<b>Proline-dependent serine/threonine kinase group (Pro_ST_kin)</b>				
<b>Erk1 Kinase</b>			Gene Card <a href="#">MAPK3</a>	
<u>Site</u>	<u>Score</u>	<u>Percentile</u>	<u>Sequence</u>	<u>SA</u>
S45	<a href="#">0.5606</a>	1.224 %	<a href="#">MKRTTLDSPGKLEL</a>	0.534
<b>Cdk5 Kinase</b>			Gene Card <a href="#">CDK5</a>	

<u>Site</u>	<u>Score</u>	<u>Percentile</u>	<u>Sequence</u>	<u>SA</u>
S45	<a href="#">0.5986</a>	2.887 %	<a href="#">MKRTTLDSPLGKLEL</a>	0.534
<b>Cdc2 Kinase</b>			Gene Card <a href="#">CDC2</a>	
<u>Site</u>	<u>Score</u>	<u>Percentile</u>	<u>Sequence</u>	<u>SA</u>
S45	<a href="#">0.6353</a>	3.080 %	<a href="#">MKRTTLDSPLGKLEL</a>	0.534
<b>Erk1 Kinase</b>			Gene Card <a href="#">MAPK3</a>	
<u>Site</u>	<u>Score</u>	<u>Percentile</u>	<u>Sequence</u>	<u>SA</u>
S230	<a href="#">0.6464</a>	3.634 %	<a href="#">LKGAGATSGSPAGR</a>	0.918
<b>Kinase binding site group (Kin_bind)</b>				
<b>Erk D-domain</b>			Gene Card <a href="#">MAPK1</a>	
<u>Site</u>	<u>Score</u>	<u>Percentile</u>	<u>Sequence</u>	<u>SA</u>
V21	<a href="#">0.5538</a>	0.121 %	<a href="#">RRPQVLAVRTVCDLV</a>	0.297
<b>PDK1 Binding</b>			Gene Card <a href="#">PDPK1</a>	
<u>Site</u>	<u>Score</u>	<u>Percentile</u>	<u>Sequence</u>	<u>SA</u>
S124	<a href="#">0.6483</a>	1.249 %	<a href="#">HPVFQQESFTRQVLW</a>	2.255
<b>Erk1 Binding</b>			Gene Card <a href="#">MAPK3</a>	
<u>Site</u>	<u>Score</u>	<u>Percentile</u>	<u>Sequence</u>	<u>SA</u>
P113	<a href="#">0.7820</a>	4.207 %	<a href="#">AIEEFPVPALHHPVF</a>	0.461
<b>Erk D-domain</b>			Gene Card <a href="#">MAPK1</a>	
<u>Site</u>	<u>Score</u>	<u>Percentile</u>	<u>Sequence</u>	<u>SA</u>
I172	<a href="#">0.6542</a>	0.608 %	<a href="#">MRGNPVPILIPCHR</a>	0.165

## ДОДАТОК Г

**Результати біоінформатичного дослідження з використанням 14 програм. Фоном виділені найбільш ймовірні сайти відповідних модифікацій**

№	Сайт	Фосфорилування							Ацетилювання			SUMO-їлування		Убіквітінування		Відомі
		Phosida	SCANSITE	GPS 2.1	DISPHOS	NetPhos 2.0	NetPhosK 1.0	KinasePhos	NetAcet1.0	PAIL	Phosida	SUMOsp	Phosida	UbPred	BDM-PUB	
1	G3								A+							
2	S13	Φ+	Φ+*	Φ+	Φ+	Φ+		Φ+								
3	V21		Φ+													
4	T23	Φ+*		Φ+	Φ+*	Φ+										
5	K31								A+	A+*	S+		U*	U+*		
6	K34									A+*	S+		U*			
7	K39								A+	A+*	S+		U*	U+		
8	T41	Φ+		Φ+	Φ+*		Φ+	Φ+*								Φ+
9	T42	Φ+*	Φ+	Φ+	Φ+*	Φ+	Φ+	Φ+								Φ+
10	S 45	Φ+	Φ+*	Φ+	Φ+*	Φ+	Φ+	Φ+								Φ+
11	K49								A+	A+*	S++		U*	U+		
12	S53	Φ+		Φ+	Φ+*	Φ+	Φ+	Φ+*								Φ+
13	K63								A+*	A+*	S+	S+	U*	U+*		
14	K67								A+	A+*	S+		U*	U++		
15	T69	Φ+*	Φ+*	Φ+	Φ+*			Φ+*								
16	S70	Φ+		Φ+	Φ+*	Φ+		Φ+*								Φ+
17	P78		Φ+*													
18	T94	Φ+*		Φ+	Φ+*											
19	Y100			Φ+	Φ+*											
20	P111		Φ+*													
21	P113		Φ+*													
22	S124	Φ+*	Φ+*	Φ+	Φ+*			Φ+*								
23	T126	Φ+*		Φ+	Φ+*			Φ+*								
24	K132								A+	A+			U*	U+*		
25	K135								A+	A+			U*	U+		
26	K138								A+*	A+*			U*			
27	S144	Φ+*		Φ+	Φ+*			Φ+*								
28	Y145			Φ+	Φ+*	Φ+*										Φ+
29	K156								A+*	A+*	S+*		U*	U+		
30	I172		Φ+													
31	C176															Alk+
32	S182	Φ+			Φ+*		Φ+									
33	S183	Φ+		Φ+	Φ+*											
34	Y189			Φ+	Φ+*											
35	S190	Φ+*		Φ+	Φ+*											
36	K196								A+	A+*	S+		U*	U+		
37	K209								A+	A+*	S+*		U*?	U+		
38	S215	Φ+		Φ+	Φ+*											
39	S216	Φ+		Φ+	Φ+		Φ+	Φ+*								
40	K224									A+*	S+*		U*?			
41	T229	Φ+*		Φ+	Φ+*		Φ++	Φ+*								
42	S230	Φ++	Φ+*	Φ+	Φ+	Φ+	Φ+	Φ+*								
43	S232	Φ+		Φ+	Φ++	Φ+	Φ+	Φ+								Φ+

+ - передбачена модифікація; \* - низький рахунок; ++ - найбільший рахунок; \*? – рахунок, наблизений до порогового  
 U – убіквітінування Φ - фосфорилування A - ацетилювання S - SUMOїлування Alk - алкілювання