

ВПЛИВ ПРОГЕСТЕРОНУ НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНА MGMT ЛЮДИНИ У КЛІТИНАХ MCF7, HEP-2 ТА 293

З. М. НІДОЄВА, А. П. ЯЦИШИНА

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Україна, 03143, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150
e-mail: z.m.nidoieva@imbg.org.ua

Мета: дослідити вплив стероїдного гормону прогестерону на експресію гена MGMT людини на рівні мРНК та білка в клітинних лініях із різним патерном експресії ядерного та мембранного рецепторів прогестерону. **Методи:** культивування клітин, виділення РНК та білків, синтез кДНК, полімеразно-ланцюгова реакція в реальному часі, вестерн-блот аналіз. **Результати:** виявили позитивну регуляцію експресії гена MGMT людини прогестероном як на рівні мРНК, так і білка. Чітку позитивну регуляцію даного гена на рівні мРНК спостерігали як у клітинах без ядерного рецептора прогестерона 293, так і у клітинах MCF7, що його експресують. **Висновки.** Вплив прогестерону на експресію MGMT складніший, ніж пряма регуляція транскрипції через класичний ядерний рецептор.

Ключові слова: O⁶-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза (MGMT), прогестерон, ядерний рецептор прогестерону (nPR), мембранний рецептор прогестерону (PGRMC1), регуляція експресії гена.

Вступ. O⁶-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза (MGMT; EC 2.1.1.63) це важливий репаративний ензим, що підтримує стабільність геному клітини шляхом видалення алкільних груп з O⁶ позиції гуаніну (Verbeek et al., 2008). Наявність цього ферменту особливо важлива в клітинах, що контактують із зовнішнім середовищем та ушкоджуючими чинниками, наприклад клітини легень, печінки, кишечника та ін. (Kaina et al., 2007). Проте, активність цього ферменту в клітинах пухлин може мати негативний ефект при лікуванні з використанням алкілувальної хіміотерапії (Verbeek et al., 2008). Отже, постає питання щодо пошуку шляхів диференційованого впливу на експресію гена MGMT людини: зниження його транскрипції в клітинах пухлин для підвищення їхньої чутливості до хіміотерапії та активації транскрипції в нормальних клітинах, що інтенсивно діляться, для зменшення токсичного впливу хіміотерапевтичних сполук на організм пацієнта. В схемах лікування багатьох типів раку, таких як рак грудей, ендометрію та ін. практикують поєднання алкілувальної хіміотерапії з гормонотерапією (Наказ МОЗ України № 554 від 17.09.2007; Schiavon, Smith 2014). Оскільки гормони та подібні їм біологічно активні речовини є відомими регуляторами експресії генів (Boonyaratanakornkit, Edwards 2007), пошук потенційних індукторів та/або репресорів транскрипції гена MGMT людини серед цих речовин є актуальним завданням. Тому метою роботи було дослідити, чи впливає прогестерон на кількість транскрипту або білка MGMT в клітинах людини *in vitro*.

Матеріали і методи

Клітинні лінії та умови їх культивування. У роботі використовували клітинні лінії MCF7 (аденокарцинома молочної залози), HEP-2 (карцинома гортані) та 293 (HEK293, нирка ембріона людини) із Російської колекції клітинних культур хребетних.

Клітини культивували у середовищі DMEM з додаванням 10 % інактивованої ембріональної сироватки теляти й антибіотиків: стрептоміцину (200 мкг/мл) та бензилпеніциліну (200 Од/мл). Розсів клітин здійснювали на чашки Петрі та інкубували в ростовому середовищі при 37 °C та 5 % CO₂.

Через 24 год середовище змінювали на DMEM без сироватки та проводили обробку клітин прогестероном (SigmaAldrich, Cat #P8783) протягом 24 год. Надалі клітини знімали механічним методом, не використовуючи протеолітичні ферменти, осад клітин зберігали при -80°C для подальшого виділення РНК та білка.

Виділення РНК та синтез кДНК. Тотальну клітинну РНК виділяли з використанням QIAzolLysisReagent (QIAGEN, Cat #79306) згідно протоколу виробника. Для синтезу комплементарної ДНК (кДНК) використовували тотальну РНК, оброблену DNaseI (щоб уникнути забруднення зразків геномною ДНК), зворотну транскриптазу RevertAid (ThermoScientific, Cat #EP0441), олігонуклеотидні праймери Оліго (dT)18 та рандомні праймери. Реакцію проводили в загальному об'ємі 15 мкл за рекомендаціями виробником параметрами. Синтезовану кДНК зберігали при -20°C . Для підбору найкращих референсних генів в даних умовах обробки клітин провели geNorm аналіз, для якого кДНК розбавляли в 10 разів, для кількісної ПЛР в реальному часі (РТ-кПЛР) — у 5 разів.

ПЛР та підбір референсних генів. РТ-кПЛР проводили на термоциклері CFX96 (Bio-Rad, США). До складу реакційної суміші входили: Maxima SYBR Green/Fluorescein PCR MasterMix (2X) (ThermoScientific, Cat #K0241), олігонуклеотидні праймери, кДНК та стерильна деіонізована вода (до загального об'єму 15 мкл). Ампліфікацію здійснювали за температурних умов: 95°C для початкової денатурації протягом 3 хв та 40 двостадійних циклів ампліфікації — денатурація при 95°C (10 с) та гібридизація специфічних праймерів і їхня елонгація при 60°C (30 с) в 15 мкл реакційної суміші. Криві плавлення кінцевих продуктів ПЛР вимірювалися в діапазоні температур $55-95^{\circ}\text{C}$ через кожні $0,5^{\circ}\text{C}$. Дані РТ-кПЛР аналізували методом $\Delta\Delta\text{Ct}$, використовуючи програмне забезпечення приладу.

Праймери для ампліфікації генів *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *TB*, та *RPLPO* отримані від НК1 (Real Time Primers, LLC, PA, USA), для генів *YWHAZ* та *HMBS* — RTPPrimerDB: the Real-Time PCR primer and probe database. Праймери для ампліфікації *MGMT* та ядерних рецепторів прогестерону синтезовані на замовлення. geNorm аналіз даних здійснили програмами Norm Finder (Andersen et al., 2004) й geNorm v3 (Vandesompele et al., 2002), що працюють як макрос до програми Excel Microsoft Office, а також qBase+ (Biogazelle, free demolisence).

Виділення білків та Вестерн-блот аналіз. Виділення білків проводили в неденатурувальних умовах за стандартними методиками (Green M R. Sambrook J. Molecular cloning. NY). Для аналізу експресії білка *MGMT* лізати клітин розділяли вертикальним електрофорезом у 12 % поліакриламідному гелі з використанням камери FisherBiotech FB-VE10-1 і джерела струму OmniPAC MIDI (Clever Scientific). Розділені білки переносили на полівінілдіфлюоридну мембрану («Millipore», США) за допомогою напівсухого переносу на приладі Semi Dry Blotter (Clever Scientific) згідно протоколу виробника. Вестерн-блот аналіз проводили використовуючи моноклональні антитіла проти *MGMT* в розведенні 1/1000 (cat #NB100-168, *MGMT* Antibody MT 23.2, NovusBiologicals, США) або проти бета-актину та видоспецифічні вторинні антитіла (cat #A9044, Sigma-Aldrich, США). Хемілюмінесцентний сигнал отримували за допомогою приладу ChemiDoc XRS + System (Bio-Rad) та аналізували, використовуючи відповідне програмне забезпечення. Як контроль нанесення використовували бета-актин.

Результати та обговорення

Для дослідження рівня експресії мРНК гена *MGMT* людини в умовах обробки прогестероном здійснили підбір референсних генів. Проаналізували вплив гормону на експресію 7 генів домашнього господарювання: *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *TBP*, *HMBS*, *YWHAZ*, *RPLPO*. Найстабільніші референтні гени обрали, порівнюючи результати трьох різних програм. Серед проаналізованих генів програма geNorm V3 (Vandesompele et al., 2002) виявила 2 найстабільніших референтних гени — *ACTB* та *YWHAZ*. Програма NormFinder (Andersen et al., 2004) визначила ген *ACTB* як найстабільніший для всіх зразків. Програма qBase + (Biogazelle, free demolisence), аналізуючи експортовані з приладу-ампліфікатора дані, визначила гени *ACTB* та *YWHAZ* як найстабільніші та обрахувала оптимальну кількість референсних генів в експерименті для отримання найбільш достовірних результатів — 2 гена. Тож референсними генами для обробки прогестероном обрали *ACTB* та *YWHAZ*. Окрім цього визначили оптимальну температуру гібридизації праймерів для ампліфікації *MGMT* та ядерних рецепторів прогестерону (нРР) із матрицею — 60°C ; аналіз здійснювали в діапазоні температур від 55 до 62°C . Також проаналізували ефективність ампліфікації праймерів методом стандартних кривих, в

результаті чого обрали оптимальне розбавлення матриці кДНК в 5–10 разів.

Для роботи підібрали фізіологічні концентрації прогестерона (табл 1), що відповідають таким в 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 гормону можуть сильно варіювати. Відомо, що прогестерон, як й інші стероїдні гормони, циркулюють у крові здебільшого зв'язаними з білками сироватки крові. Найбільшу спорідненість до цього гормону має SHBG (Sex hormone-binding globulin), що й зв'язує основну кількість прогестерона, тоді як лише незначна

його кількість є зв'язаною із іншими альбумінами. Гормон, зв'язаний із білками, є біологічно недоступним. Лише 1–2 % гормону, що залишається у вільному стані, виявляє свою фізіологічну дію (Hammond 2011). Тож, щоб точно визначити, яка концентрація гормону чинить той чи інший ефект, клітини обробляли гормоном в безсироватковому середовищі. Досить ймовірним є те, що прогестерон безпосередньо регулює транскрипцію гена MGMT, оскільки ми передбачили наявність елемента відгуку на досліджуваний гормон в промоторі даного гена (Нідосєва та ін., 2015).

Таблиця 1. Фізіологічні концентрації гормонів в організмі і відповідні концентрації, обрані для проведення обробок клітин людини *in vitro*.

Гормон	Жінки (стадія циклу)			Чоловіки / Діти / Жінки (менопауза)
	фолікулярна	лютеїнова	вагітність	
Прогестерон	< 5 моль/л	~ 50 моль/л	~ 500 моль/л	< 5 моль/л
Репрезентативні концентрації	1 моль/л 5 моль/л	50 моль/л	100 моль/л 500 моль/л 1000 моль/л	1 моль/л 5 моль/л

Прогестерон, як і інші стероїдні гормони, може впливати на клітину різними шляхами. Розрізняють класичний, або генетичний шлях дії гормону — через відповідний nPR, 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 (Boonyaratanakornkit et al., 2007; Garg et al., 2017; Gellersen et al., 2009).

Прогестерон через nPR регулює експресію цілого пулу генів, що контролюють як розвиток, диференціювання та проліферацію тканин-мішеней, так і патологічні процеси при гормоночутливих формах раку (Obr et al., 2012). Варіабельність біологічної дії прогестерону залежить від багатьох чинників: типу тканини чи клітини; етапу розвитку організму; наявності специфічних білків-корегуляторів чи інших факторів транскрипції, що взаємодіють із nPR; доступність цільових генів у межах хроматину; специфічності для кожного типу клітин сигнальні шляхи, які або самі впливають на активність nPR, або ж є посередниками дії nPR на цільові гени (Grimm et al., 2016; Faus et al., 2006).

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 прогестерону (Gellersen et al., 2009). На сьогодні тривають дослідження та дискусії щодо можливих кандидатів на роль мембранних рецепторів прогестерону. Серед декількох потенційних претендентів Progesterone Receptor Membrane Component 1 — PGRMC1 (Garg et al., 2017; Gellersen et al., 2009) є найвірогіднішим. Проте ще досі є питання, чи дійсно саме PGRMC1 при певних пост-трансляційних модифікаціях зв'язує прогестерон та запускає сигнальний каскад, чи є партнером білка, що зв'язує гормон (Cahill 2007; Cahill et al., 2016; Thomas et al., 2014).

Експресію ядерних рецепторів прогестерону PRa та PRb, що експресуються із одного гена, але з різних промоторів, ми виявляли методом РТ-кПЛР з подальшою візуалізацією продуктів в поліакриламідному гелі за допомогою забарвлення сріблом (рис. 1). Експресію MGMT визначали методом РТ-ПЛР, розділяючи продукти в 3 % агарозному гелі та візуалізуючи з використанням етидид броміду. Для роботи ми обрали наступні клітинні лінії: MCF7, що експресує як nPR — посередник в передачі сигналу гормону, так і PGRMC1 (Szczesna-Skorupa et al., 2011), HEp-2, що експресують nPR, а також клітини 293, в яких не виявили mPHK ядерного рецептору, проте є PGRMC1 (Szczesna-Skorupa et al., 2011) (рис. 1).

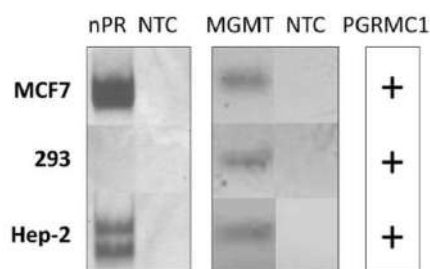


Рис. 1. Статус експресії мРНК ядерного рецептора прогестерона nPR в клітинах 293, MCF7 та HEp-2. Продукти РТ-кПЛР розділені в поліакриламідному гелі (забарвлені сріблом) та в 1,5 % агарозному гелі (візуалізовано етидид бромідом); NTC — контроль, суміш реактивів без матриці кДНК.

У клітинах лінії MCF7 (nPR+/PGRMC1+) 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. 2а). На основі цих результатів можна припустити, що це має значення для захисту організму жінки під час вагітності, оскільки кількість ендогенно індукованих алкільних ушкоджень може зростати (Marnett et al., 1993; Georgiadis et al., 2000). Також ми спостерігали значне збільшення кількості білка MGMT в клітинах при усіх досліджуваних концентраціях, і аж до 17 разів порівняно із контролем при концентрації 100 нмоль/л (рис. 2б).

Також ми порівняли вплив прогестерону на кількість транскрипту *MGMT* людини в клітинах HEp-2 (nPR+/PGRMC1+) та 293 (nPR-/PGRMC1+). У клітинах HEp-2, що мають ядерний рецептор прогестерону, ми не спостерігали значного збільшення чи зменшення кількості транскрипту (рис.3а), тоді як в клітинах без ядерного рецептору прогестерону 293 (nPR-/ PGRMC1+) ми спостерігали більш значне збільшення транскрипта гена *MGMT* людини при концентрації 500 нмоль/л (ttest * < 0,005; ** < 0,001; рис. 3б). Відповідно, схоже збільшення кількості транскрипта при концентрації 500 нмоль/л ми спостерігали і в клітинах MCF7 (nPR+/ PGRMC1+) (рис. 2а), тож можна спекулювати, що це пов'язане із неklasичною регуляцією.

Також в клітинах 293 при наявності прогестерону PGRMC1 запускає сигнальні шляхи, що змінюють базовий метаболізм клітини (Sabbir 2019; Thejer et al., 2020), а також епігенетичний статус клітини (Thejer et al., 2020), що веде до подальших змін в експресії генів.

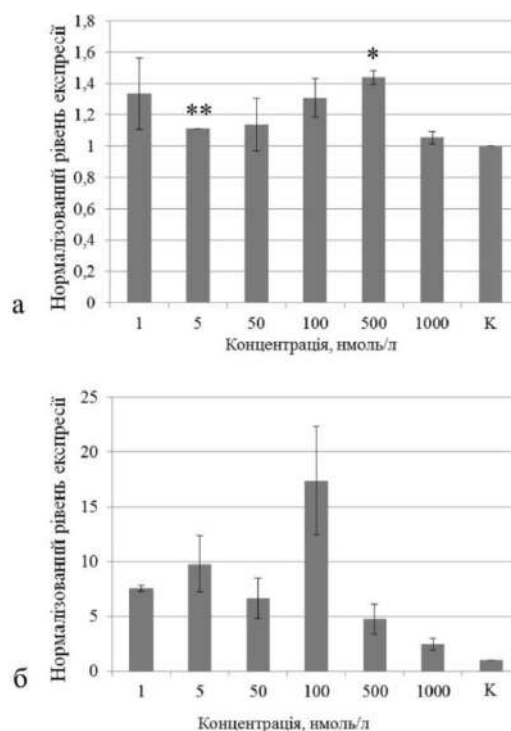


Рис. 2. Експресія гена *MGMT* людини на рівні мРНК (а) та білка (б) в клітинах MCF7 (ttest * < 0,06; ** < 0,0027).

Таким чином, прогестерон здатний опосередковано через даний мембранний рецептор впливати на експресію генів, й на експресію *MGMT* в тому числі (рис. 3б).

Також варто зазначити, що хоча MCF7 та HEp-2 мають nPR, 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 nPR та роллю мембранного рецептора PGRMC1 в даній регуляції, а також впливом ядерного рецептору естрогену. Показано, що PGRMC1 може фосфорилуватися естроген-регульованими кіназами (Neubauer et al., 2008), що може впливати на його активність та сигнальні каскади, які він може запускати.

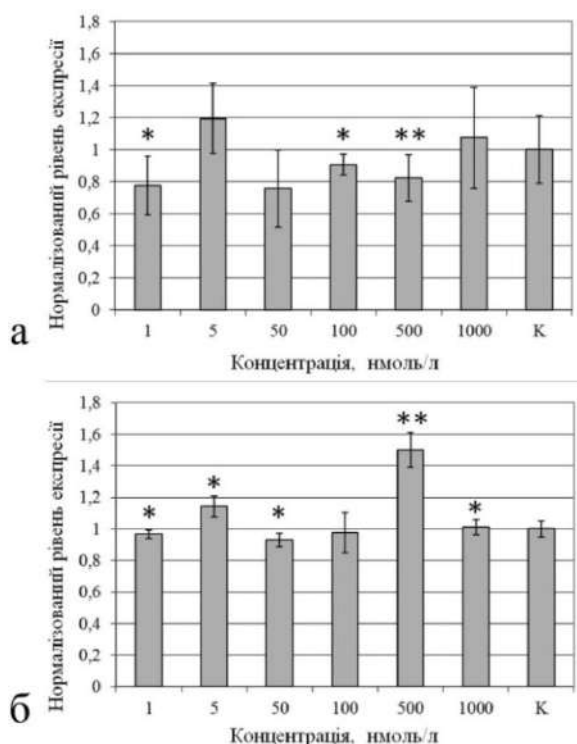


Рис. 3. Графік даних РТ-кПЛР впливу прогестерону на рівень транскрипта гена *MGMT* людини в клітинах (а) HEp-2 (ttest * < 0,02; ** < 0,01) та (б) 293 (ttest * < 0,005; ** < 0,001).

Тож питання стосовно механізмів, що призводять до різного впливу прогестерону на експресію гена *MGMT* людини на рівнях мРНК та білка, залишається дискусивним та потребує подальшого дослідження.

Висновки

Отримано дані щодо 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 нашої думку, що прогестерон не лише призводить до збільшення кількості транскрипту *MGMT*, а й до активації синтезу білка або ж сповільнення його деградації.

Висловлюємо подяку за надану підтримку завідділу генетики людини ІМБІГ НАНУ дбн,

проф. Лукаш Любов Леонідівні. Робота виконана за фінансової підтримки НДР за відомчою тематикою НАНУ (номер держ. реєстрації 0112U002107).

Перелік літератури:

1. Andersen C. L., Jensen J. L., Orntoft T. F. 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. V. 64(15). P. 5245–50. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.
2. Boonyaratanakornkit V., Edwards D. P. Receptor mechanisms mediating non-genomic actions of sex steroids. *Semin. Reprod. Med.* 2007. V. 25(3). P. 139–53. doi: 10.1055/s-2007-973427.
3. Cahill M. A. Progesterone receptor membrane component 1: an integrative review *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007. V. 105(1-5). P. 16–36. doi: 10.1016/j.jsbmb.2007.02.002.
4. Cahill M. A., Jazayeri J. A., Catalano S. M., Toyokuni S., Kovacevic Z., Richardson D. R. The emerging role of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) in cancer biology *Biochim Biophys Acta.* 2016. V. 1866(2). P. 339–349. doi:10.1016/j.bbcan.2016.07.004.
5. Faus H., Haendler B. Post-translational modifications of steroid receptors. *Biomed. Pharmacother.* 2006. V. 60(9). P. 520–528. doi: 10.1016/j.biopha.2006.07.082.
6. Garg D., Ng S. S. M., Baig K. M., Driggers P., Segars J. Progesterone-Mediated Non-Classical Signaling. *Trends Endocrinol Metab.* 2017. V. 28(9). P. 656–668. doi: 10.1016/j.tem.2017.05.006.
7. Gellersen B., Fernandes M. S., Brosens J. J. Non-genomic Progesterone Actions in Female Reproduction. *Hum Reprod Update.* 2009. V. 15(1). P. 119–38. doi: 10.1093/humupd/dmn044.
8. Georgiadis P., Samoli E., Kaila S., Katsouyanni K., Kyrtopoulos S. A. Ubiquitous presence of O6-methylguanine in human peripheral and cord blood DNA. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000. V. 9(3). P. 299–305. PMID: 10750669.
9. Green M. R. Sambrook J. Molecular cloning. NY (USA): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. 1885 p.
10. Grimm S. L., Hartig S. M., Edwards D. P. Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. *J Mol Biol.* 2016. V. 428(19). P. 3831–49. doi: 10.1016/j.jmb.2016.06.020.
11. Hammond G. L. Diverse roles for sex hormone-binding globulin in reproduction. *Biol. Reprod.* 2011. V. 85(3). P. 431–41. doi: 10.1095/biolreprod.111.092593.
12. Kaina B., Christmann M., Naumann S., Roos W. P. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst).* 2007. V. 6(8). P. 1079–99. doi: 10.1016/j.dnarep.2007.03.008.

13. Marnett L. J., Burcham P. C. Endogenous DNA adducts: potential and paradox. *Chem Res Toxicol*. 1993. V. 6(6). P. 771–85. doi: 10.1021/tx00036a005.
14. Nakaz MOZ Ukrainy pro zatverdzhennia protokoliv nadannia medychnoi dopomohy za spetsial'nistiu «onkolohiia» № 554 vid 17.09.2007 [in Ukrainian] / Наказ МОЗ України про затвердження протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю «онкологія» № 554 від 17.09.2007 URL: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0554282-07#Text> (дата звернення: 15.10.2020).
15. Neubauer H., Clare S. E., Wozny W., Schwall G. P., Poznanović S., Stegmann W., Vogel U., Sotlar K., Wallwiener D., Kurek R., Fehm T., Cahill M. A. Breast cancer proteomics reveals correlation between estrogen receptor status and differential phosphorylation of PGRMC1. *Breast Cancer Res*. 2008. V. 10(5). P. R85. doi: 10.1186/bcr2155.
16. 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. Vol. 17. P. 74–78 [in Ukrainian] / Нідоева З. М., Самоїленко І. О., Підпала О. В., Лукаш Л. Л., Яцишина А. П. Біоінформатичний пошук елементів відгуку на гормони у промоторі гена O⁶-метилгуанін-ДНК метилтрансферази (MGMT). *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2015. Том 17. P. 74–78
17. Obr A. E., Edwards D. P. The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer *Mol Cell Endocrinol*. 2012. V. 357(1–2). P. 4–17. PMID: 22193050 PMCID: PMC3318965 doi: 10.1016/j.mce.2011.10.030.
18. qBase + by Biogazelle, free demolisence. URL: <https://www.biogazelle.com/qbaseplus> (дата звернення: 15.10.2020).
19. Sabbir M. G. 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. V. 191. P. 105376. doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.105376.
20. Schiavon G., Smith I. E. Status of adjuvant endocrine therapy for breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2014. V. 16(2). P. 206.
21. Szczesna-Skorupa E., Kempercorresponding B. Progesterone Receptor Membrane Component 1 Inhibits the Activity of Drug-Metabolizing Cytochromes P450 and Binds to Cytochrome P450 Reductase *Mol Pharmacol*. 2011 V. 79(3). P. 340–350. doi: 10.1124/mol.110.068478.
22. Thejer B. M., Adhikary P. P., Teakel S. L., Fang J., Weston P. A., Gurusinghe S., Anwer A. G., Gosnell M., Jazayeri J. A., Ludescher M., Gray L. A., Pawlak M., Wallace R. H., Pant S. D., Wong M., Fischer T., New E. J., Fehm T. N., Neubauer H., Goldys E. M., Quinn J. C., Weston L. A., Cahill M. A. PGRMC1 effects on metabolism, genomic mutation and CpG methylation imply crucial roles in animal biology and disease. *BMC Mol Cell Biol*. 2020. V. 21(1). P. 26. doi: 10.1186/s12860-020-00268-z.
23. Thomas P., Pang Y., Dong J. Enhancement of Cell Surface Expression and Receptor Functions of Membrane Progesterin Receptor α (mPR α) by Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1): Evidence for a Role of PGRMC1 as an Adaptor Protein for Steroid Receptors *Endocrinology*. 2014. V. 155(3). P. 1107–1119. doi: 10.1210/en.2013-1991.
24. 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. V. 3, № 7. P. RESEARCH0034. doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
25. Verbeek B., Southgate T. D., Gilham D. E., Margison G. P. O⁶-Methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy. *Br Med Bull*. 2008. V. 85. P. 17-33. doi: 10.1093/bmb/ldm036.

Стаття надійшла до редакції 08.10.2020.
Прийнята до друку 30.10.2020

EFFECT OF PROGESTERONE ON THE MGMT GENE EXPRESSION IN MCF7, HEp-2 AND 293 CELLS

Z. M. Nidoieva, A. P. Iatsyshyna

Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine
Ukraine, 03143, Kyiv, 150 Zabolotnogo str.
e-mail: z.m.nidoieva@imbg.org.ua

Aims: to investigate the steroid hormone progesterone effect on the human *MGMT* gene expression at the mRNA and protein levels in cell lines with different expression patterns of the nuclear progesterone receptors and membrane receptor PGRMC1. **Methods:** cell culture, RNA / protein isolation, cDNA synthesis, real-time polymerase chain reaction, Western blot analysis. **Results:** We observe the *MGMT* gene upregulation by progesterone at both mRNA and protein levels. **Conclusions** the effect of progesterone on *MGMT* expression is more complex than direct regulation through the classical nuclear receptor.

Keywords: O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), progesterone, nuclear progesterone receptors (nPR), progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1), gene expression regulation.