

НІДОЄВА З.М.[✉], ЯЦИШИНА А.П.*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,**Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: z.m.nidoieva@imbg.org.ua*[✉]*z.m.nidoieva@imbg.org.ua***РЕГУЛЯЦІЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА *MGMT* ЕСТРОГЕНОМ У КЛІТИНАХ ЛЮДИНИ *IN VITRO***

Кожна клітина організму постійно зазнає впливів внутрішніх та зовнішніх чинників, що здатні спричиняти алкілювання ДНК, яке, в свою чергу, може призводити до мутацій, загибелі клітини або до її онкогенного переродження. Репаративний ензим O(6)-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза (*MGMT*; EC 2.1.1.63) відіграє важливу роль у підтриманні стабільності клітинного геному, видаляючи алкільну групу з позиції O(6)-гуаніну – одне з найнебезпечніших мутагенних та цитотоксичних алкільних пошкоджень [1, 2]. Тож, експресія цього ензиму є необхідною для клітин організму, серед яких можна особливо виокремити клітини легень, печінки, кишечника та ін., які постійно зазнають дії пошкоджувальних чинників. З іншого боку, *MGMT* є одним із визначальних факторів резистентності до алкілювальної хіміотерапії, яка широко застосовується при лікуванні онкозахворювань [3, 4]. Отже, постає питання щодо пошуку шляхів диференційованого впливу на експресію гена *MGMT* людини: зниження його транскрипції в клітинах пухлин із метою підвищення їхньої чутливості до хіміотерапії та активації транскрипції в нормальних клітинах для зменшення токсичного впливу хіміотерапевтичних сполук на організм пацієнта. Відомо, що в схемах лікування багатьох типів раку, зокрема, таких як рак грудей, ендометрію та ін. практикують поєднанням алкілювальної хіміотерапії з гормонотерапією [2, 3]. Оскільки гормони та подібні їм біологічно активні речовини є відомими регуляторами експресії генів [4], пошук потенційних індукторів та/або репресорів транскрипції гена *MGMT* людини серед цих речовин є актуальним завданням. Тому метою роботи було дослідження здатності естрогену впливати на рівень експресії гена *MGMT* в клітинах людини *in vitro*.

Матеріали і методи

У роботі використовували клітинну лінію 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).

Клітини висівали у чашки Петрі діаметром 9 см ($0,8 \cdot 10^6$ клітин/чашка) та інкубували в ростовому середовищі при 37°C та 5 % CO₂. Через 24 год середовище змінювали на DMEM без сироватки та проводили обробку клітин в-естрадіолом (Sigma Aldrich, Cat #E2758). Експозиція клітин із гормоном тривала 24 год. Клітини знімали механічним методом, без використання протеолітичних ензимів, осад клітин зберігали при -80°C для подальшого виділення РНК та білка.

Виділення РНК та синтез кДНК. Тотальну клітинну РНК виділяли з використанням QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN, Cat #79306) згідно протоколу виробника [5]. Для синтезу комплементарної ДНК (кДНК) використовували тотальну РНК, оброблену DNaseI (щоб уникнути забруднення зразків геномною ДНК), зворотну транскриптазу RevertAid (Thermo Scientific, Cat #EP0441), олігонуклеотидні праймери Оліго(dT)₁₈ та рандомні праймери в загальному об'ємі 20 мкл. Реакцію проводили за рекомендованими виробником параметрами. Синтезовану кДНК зберігали при -20°C. Для проведення geNorm аналізу кДНК розводили в 10 разів, для кількісної ПЛР в реальному часі (РТ-кПЛР) – у 5 разів.

ПЛР. РТ-кПЛР проводили на термоциклері CFX96 (Bio-Rad, США). До складу реакційної суміші входили: Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, 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). Криві плавлення кінцевих продуктів ПЛР вимірюва-

лися в діапазоні температур 55–95°C через кожні 0,5°C. Дані РТ-кПЛР аналізували методом $\Delta\Delta C_t$, використовуючи програмне забезпечення приладу.

Експресію ядерних рецепторів естрогену *ERa* та *ERb* визначали також методом РТ-кПЛР з подальшим розділенням продуктів у поліакриламідному гелі та візуалізували забарвленням сріблом [6].

Підбір референсних генів. Для дослідження рівня експресії гена *MGMT* людини в умовах обробки естрогеном здійснили підбір референсних генів. Проаналізовано вплив естрогену на експресію 9 генів домашнього господарювання – *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *18S*, *TBP*, *TOP*, *HMBS*, *YWHAZ*, *RPLPO*. geNorm аналіз цих РТ-кПЛР даних здійснили програмами Norm Finder [7] й geNorm v3 [8], що працюють як макрос до програми Excel Microsoft Office, а також qBase+ (Biogazelle, free demo liscence) [9]. Як найстабільніші референсні гени при обробках естрогеном обрано *RPLPO* та *HMBS*.

Виділення білків та Вестерн-блот аналіз. Виділення білків проводили в неденатурувальних умовах за стандартними методиками [6]. 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 (Cleaver Scientific). Розділені білки переносили на полівінілдіфлюоридну (PVDF) мембрану (Millipore, США) за допомогою напівсухого переносу на приладі Semi Dry Blotter фірми CleaverScientific (Велика Британія) згідно з протоколом виробника. Вестерн-блот аналіз проводили використовуючи моноклональні антитіла проти *MGMT* в розведенні 1/1000 (cat #NB100-168, *MGMT* Antibody MT 23.2,

Novus Biologicals, США) або проти бета-актину та видоспецифічні вторинні антитіла (Sigma-Aldrich, cat #A9044). Хемілюмінісцентний сигнал отримували за допомогою приладу ChemiDoc™ Imaging Systems (Bio-Rad) та аналізували, використовуючи відповідне програмне забезпечення. Як контроль нанесення використовували бета-актин.

Результати та обговорення

Підібрано фізіологічні концентрації естрогену (табл. 1), що відповідають таким у плазмі крові жінок на різних етапах менструального циклу, після менопаузи, а також у дітей і чоловіків [10]. Варто зазначити, що ці дані є усередненими, оскільки концентрації гормону можуть дуже варіювати як від циклу до циклу в однієї жінки, так і міжіндивідуально. Також естрогени, що циркулюють у крові, зв'язуються з білками сироватки крові, в основному з SHBG (Sex hormone-binding globulin), та, знаходячись у зв'язаному стані, є біологічно недоступними. Лише 1–2 % гормону, що залишається у вільному стані, виявляє свою фізіологічну дію [11], проникаючи в клітину та зв'язуючись зі своїм рецептором. Тож, щоб точно визначити, яка концентрація гормону виявляє той чи інший ефект, обробку клітин естрогеном проводили в безсироватковому середовищі. Досить ймовірним є те, що естроген безпосередньо регулює транскрипцію гена *MGMT*, оскільки раніше нами було передбачено наявність сайту відгуку на естроген у промоторі цього гена [12]. Клітинну лінію 293 перевірили на експресію ядерних рецепторів естрогену – *ERa* та *ERb* – посередників передачі сигналу гормону (рис. 1).

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

Гормон	Жінки (стадія циклу)				Чоловіки/Діти/ Жінки (менопауза)
	фолікулярна	передовуляційний пік*	лютеїнова	вагітність	
Естроген	0,07–0,22 нмоль/л	0,7–1,4 нмоль/л	0,07–0,22 нмоль/л	36–73 нмоль/л	<0,18 нмоль/л
Репрезентативні концентрації	0,05 нмоль/л 0,5 нмоль/л	1 нмоль/л 5 нмоль/л	0,05 нмоль/л 0,5 нмоль/л	10 нмоль/л 50 нмоль/л	0,05 нмоль/л 0,5 нмоль/л

Примітка. *При супровідній гормонотерапії концентрація естрогену 1–1,4 нмоль/л.

ERa NTC ERb NTC

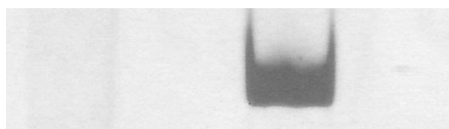


Рис. 1. Статус експресії ядерних рецепторів естрогену *ERa* та *ERb* в клітинах 293. Продукти РТ-кПЛР розділені в поліакриламідному гелі та забарвлені сріблом, NTC – контроль, суміш реактивів без матриці кДНК.

Така клітинна лінія експресує лише одну ізоформу ядерного рецептора естрогену – *ERb*, який, за даними літератури в основному є негативним регулятором експресії генів [13, 14], тоді як *ERa* зазвичай є позитивним регулятором [13, 15–17].

За результатами РТ-кПЛР, естроген виявляє тенденцію до негативної регуляції транскрипції гена *MGMT* людини. Проте при концентраціях 0,5 та 1 нмоль/л спостерігається значне підвищення кількості транскрипту порівняно з контролем (рис. 2 а). Цікаво, що такі концентрації естрогену визначаються в жінок перед овуляцією і, отже, перед потенційним заплідненням. Схожа тенденція до активації транскрипції гена *MGMT* спостерігається й при концентрації естрогену 50 нмоль/л, що репрезентує таку в плазмі крові при вагітності. На основі цих результатів можна припустити, що це має значення для захисту організму жінки перед та під час вагітності.

З іншого боку, естроген при всіх концентраціях виявляє активувальну дію на експресію гена *MGMT* на рівні білка, збільшуючи кількість білка порівняно з контролем. Значне збільшення білкового продукту гена *MGMT*, у 3–4 рази порівняно із контролем, спостерігається при концентраціях 0,5–2,5 нмоль/л (рис. 2 б). Цей ефект виявляється саме в тому діапазоні концентрацій естрогену, що активує й транскрипцію досліджуваного гена. Слід відзначити, що естроген у концентрації 50 нмоль/л, що репрезентує концентрацію естрогену при вагітності, не спричиняв такого ж значного зростання експресії досліджуваного гена на рівні білка (рис. 2 б)

Ці дані особливо цікаві з огляду на те, що у жінок після менопаузи естроген у концентраціях вище базальних (<~0,5 нМ) може бути пов'язаний із ризиком захворювання на

рак молочної залози [18] 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 [19, 20].

Відомо, що естроген впливає на експресію різних регуляторів клітинного циклу, зокрема таких, як *c-fos*, *c-myc*, *HER2/neu*, ростові фактори, цикліни [15], які впливають як на проліферацію, так і на диференціацію клітин. Окрім цього, виокремлюють так звані класичні та не-класичні механізми впливу естрогену на клітину [20, 21]. В першому варіанті естроген регулює експресію генів, зв'язуючись через рецептори *ERb* та *ERa* із своїм елементом відгуку в промоторі [4], впливаючи на транскрипцію. При не-класичному впливі естроген може діяти значно швидше, обходячи етап регуляції транскрипції, через свій мембранний рецептор *GPER1*, одразу вмикати активацію вторинних посередників [22, 23]. З огляду на різний тип впливу естрогену на експресію *MGMT* на рівні мРНК та білка, можна припустити, що естроген активує синтез білка або ж сповільнює його деградацію. Тому питання стосовно механізмів, що призводять до різних тенденцій впливу естрогену на експресію гена *MGMT* людини на рівнях мРНК та білка, залишається дискусійним та потребує подальшого дослідження.

Висновки

Отримано попередні дані щодо регуляції експресії гена *MGMT* естрогеном у клітинах 293 на рівні мРНК та білка. Експериментом виявлено, що естроген зменшує кількість відповідних транскриптів при майже всіх фізіологічних концентраціях і навпаки – призводить до збільшення їхньої кількості при концентраціях 0,5 та 1 нмоль/л, що детектуються у жінок перед овуляцією та під час вагітності, а також при супровідній гормонотерапії. Водночас, естроген є позитивним регулятором експресії гена *MGMT* на рівні білка при всіх досліджуваних концентраціях, а при концентраціях 0,5–2,5 нМ спричиняв значне (в 4–5 разів) зростання кількості відповідного білкового продукту.

Висловлюємо подяку за надану підтримку завідувачу відділу генетики людини ІМБіГ НАНУ д.б.н., проф. Лукаш Любові Леонідівні. Робота виконана за фінансової підтримки НДР за відомчою тематикою НАНУ (номер держ. реєстрації 0112U002107)

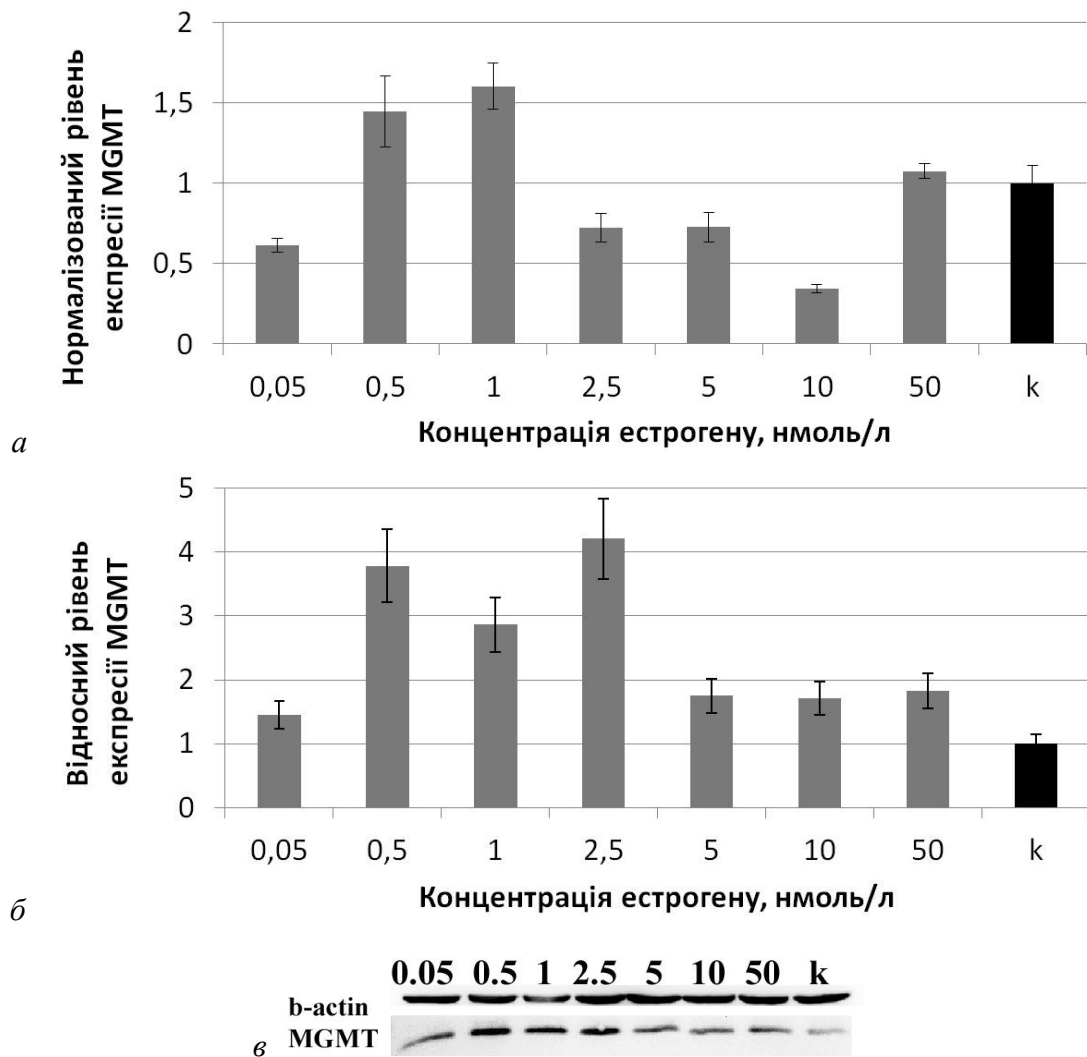


Рис. 2. Експресія гена *MGMT* людини на рівні мРНК (а) та білка (б, в) в клітинах 293: а – графік даних РТ-кПЛР – вплив естрогену на рівень транскрипту гена *MGMT* людини, один експеримент у трьох технічних повторях; б – графік впливу естрогену на кількість білка *MGMT* відносно бета-актину; в – типовий вестерн-блот аналіз, *MGMT* та бета-актин, концентрації естрогену наведені в нмоль/л.

Література

1. Verbeek B., Southgate T.D., Gilham D.E., Margison G.P. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy // *Br Med Bull.* – 2008. – № 85. – p. 17–33. doi: 10.1093/bmb/ldm036.
2. Накази МОЗ України № 554 від 17.09.2007, № 247 від 29.04.2011, № 514 від 05.09.2008, № 252 від 08.04.2014.
3. Schiavon G., Smith I.E. Status of adjuvant endocrine therapy for breast cancer // *Breast Cancer Res.* – 2014. – V. 16. – № 2. – P. 206–222.
4. Heldring N., Pike A., Andersson S., Matthews J., Cheng G., Hartman J., Tujague M., Ström A., Treuter E., Warner M., Gustafsson J.A. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets // *Physiol. Rev.* – 2007. – V. 87, № 3. – P. 905–931. doi: 10.1152/physrev.00026.2006.
5. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Anal. Biochem.* – 1987. – V. 162, № 1. – P. 156–159. doi: 10.1006/abio.1987.9999.
6. S.J. Green Michael R. Molecular cloning. NY. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. – 1885 p.
7. Andersen C.L., Jensen J.L., Illrnsoft 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. 5245–5250. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.
8. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paere 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.
9. Biogazelle: Deploying the transcriptome [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.biogazelle.com/qbaseplus>.

10. Roseff S.J., Bangah M.L., Kettel L.M., Vale W., Rivier J., Burger H.G., Yen S.S. Dynamic changes in circulating inhibin levels during the luteal-follicular transition of the human menstrual cycle // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1989. – V. 69, № 5. – P. 1033–1039. doi: 10.1210/jcem-69-5-1033.
11. Hammond G.L. Diverse roles for sex hormone-binding globulin in reproduction // *Biol. Reprod.* – 2011. – V. 85, № 3. – P. 431–441. doi: 10.1095/biolreprod.111.092593.
12. Нідоева 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 метилтрансферази (MGMT) // *Фактори експериментальної еволюції організмів.* – К.: Логос, 2015. – Т. 17. – P. 74–78.
13. 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 β -KLF5 pathway // *Mol. Cell. Biol.* – 2015. – V. 19, № 36. – P. 144–156. doi: 10.1128/MCB.00625-15.
14. Mak P., Li J., Samanta S., Mercurio A. M. ER β regulation of NF- κ B activation in prostate cancer is mediated by HIF-1 // *Oncotarget.* – 2015. – V. 6, № 37. – P. 40247–40254. doi: 10.18632/oncotarget.5377.
15. Chang C., McDonnell D.P. Molecular pathways: the metabolic regulator estrogen-related receptor β as a therapeutic target in cancer // *Clin. Cancer Res.* – 2012. – V. 18, № 22. – P. 6089–6095. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3221.
16. Mungenast F., Thalhammer T. Estrogen biosynthesis and action in ovarian cancer // *Front. Endocrinol. (Lausanne).* – 2014. – № 5. – P. 192. doi: 10.3389/fendo.2014.00192.
17. 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.
18. Santoro N., Worsley R., Miller K.K., Parish S.J., Davis S.R. Role of Estrogens and Estrogen-Like Compounds in Female Sexual Function and Dysfunction // *J. Sex. Med.* – 2016. – V. 13, № 3. – P. 305–316. doi: 10.1016/j.jsxm.2015.11.015.
19. Cavalieri E.L., Rogan E.G. Depurinating estrogen-DNA adducts in the etiology and prevention of breast and other human cancers // *Future Oncol.* – 2010. – V. 6, № 1. – P. 75–91. doi: 10.2217/fon.09.137.
20. 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. – P. 132–140. doi: 10.1111/j.1749-6632.2008.03685.x.
21. Угалай П., Останек В., Мєнєєв-Вєдєн С., Марс Ж. The many faces of estrogen signaling // *Biochem. medica.* – 2014. – V. 24, № 3. – P. 329–342. doi: 10.11613/BM.2014.035.
22. Filardo E.J., Quinn J.A., Frackelton A.R., Bland K.I. 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. – V. 16, № 1. – P. 70–84. doi: 10.1210/mend.16.1.0758.
23. Filardo E.J., Quinn J.A., Bland K.I., Frackelton A.R. 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. – V. 14, № 10. – P. 1649–1660. doi: 10.1210/mend.14.10.0532.

NIDOIEVA Z.M., IATSYSHYNA A.P.

*Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine,
Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150, e-mail: z.m.nidoieva@imbg.org.ua*

HUMAN MGMT EXPRESSION IS REGULATED BY ESTROGEN *IN VITRO*

Aim. The repair enzyme O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) plays a dual role. It protects cell against DNA's alkylation and cell death. But in the case of cancer treatment it provides the cancer cells' resistance to alkylating chemotherapy. So it is important to regulate MGMT activity to inhibit it in cancer cells and to activate in normal cells. To treat some type of cancers used combination of the chemotherapy and the hormone therapy. So, we tried to investigate the role of estrogen on the MGMT transcription. **Methods.** We performed western-blot and RT-qPCR to analyse the human MGMT expression on mRNA and protein level. **Results.** We observe MGMT upregulation on both mRNA and protein level at the 0.5–1 nM estrogen concentration relative to untreated control. **Conclusions.** Estrogen is one of the potential hormonal MGMT regulators.

Keywords: O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), estrogen, steroid hormones.