УДК 577.113:577.218 https://doi.org/10.7124/FEEO.v31.1496

НІДОЄВА З.М.✉, ЛУКАШ Л.Л., ЯЦИШИНА А.П.
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, ORCID: 0000-0001-5364-7527, 0000-0003-4522-1600, 0000-0002-8175-6955
✉ *zarinanidoieva@edu.imbg.org.ua*

ВПЛИВ β-ЕСТРАДІОЛУ НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНА *MGMT* ЛЮДИНИ У КЛІТИНАХ *IN VITRO*

Мета. Визначити, чи впливає стероїдний гормон β-естрадіол на транскрипцію гена *MGMT* людини. Статус експресії репаративного ензиму О(6)-метилгуанін-ДНК метилтрансферази (MGMT) важливий під час планування лікування пацієнтів з онкологією, оскільки його наявність у клітинах пухлини може зменшувати ефективність хіміотерапії з використанням алкілувальних сполук. У процесі лікування пухлин поєднують алкілувальну хіміотерапію із гормонотерапією, тому дослідження впливу β-естрадіолу на кількість транскриптів гена *MGMT* людини у клітинах *in vitro* має не тільки теоретичне, але й практичне значення. ***Методи***. Ми використали різноманітні методи, зокрема культуральні, молекулярно-генетичні та біохімічні, зокрема такі, як виділення РНК, синтез кДНК, зворотно-транскриптазну ПЛР, електрофорез в агарозному та поліакриламідному гелях, а також статистичну обробку результатів. ***Результати***. Виявили тенденцію негативної регуляції експресії гена *MGMT* людини β-естрадіолом у певному діапазоні концентрацій на рівні мРНК у клітинах ліній HEp-2 та 293, за винятком концентацій β-естрадіолу 1 та 5 нмоль/л у клітинах лінії 293. ***Висновки.*** Отримані нами дані свідчать на користь припущення, що β-естрадіол є одним із гормональних регуляторів гена *MGMT*.

Ключові слова: О(6)-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза (MGMT), стероїдні гормони, β-естрадіол, алкілувальна хіміотерапія.

Репаративний ензим О(6)-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза (MGMT; ЕС 2.1.1.63) відіграє важливу роль у підтриманні стабільності клітинного геному. Його основна функція – видаляти алкільну групу з позиції О(6)-гуаніну, одного з найнебезпечніших мутагенних та цитотоксичних алкільних пошкоджень [1; 2]. Наявність цього ферменту є необхідною, особливо для клітин, які контактують із ушкоджувальними факторами зовнішнього середовища (наприклад, клітини легень, печінки, кишечника та ін.). З іншого боку, цей білок є одним із визначальних факторів резистентності до алкілувальної хіміотерапії під час лікування онкозахворювань [3; 4]. Високий рівень експресії цього білка в клітинах пухлин призводить до необхідності збільшення дози алкілувальних хіміопрепаратів для досягнення терапевтичного ефекту. Тож одним із важливих напрямків підвищення ефективності алкілувальної хіміотерапії є пошук шляхів впливу на експресію гена *MGMT* людини: зниження кількості відповідного білка в клітинах пухлин із метою підвищення їхньої чутливості до алкілувальної хіміотерапії та збільшення кількості MGMT в нормальних клітинах для зменшення токсичного впливу алкілувальних сполук на організм пацієнта. Серед сучасних підходів підвищення ефективності лікування пацієнтів у клініці практикують поєднання алкілувальної хіміотерапії з гормонотерапією [2; 3] (зокрема, в схемах лікування таких онкологічних захворювань, як рак грудей, рак ендометрію та ін.). Відомо, що гормони та інші біологічно активні речовини, які використовуються під час лікування, є регуляторами експресії генів [4]. Отже, на нашу думку, визначити, чи впливають ці речовини на транскрипцію гена *MGMT* людини (і потенційно – на ефективність алкілувальної хіміотерапії), є актуальним завданням.

Матеріали і методи

У роботі використовували клітини лінії 293 або HEK293 (ембріональна нирка людини) та лінії HEp-2 (карцинома гортані людини). Клітини культивували у середовищі DMEM з додаванням 10 % інактивованої ембріональної сироватки теляти й антибіотиків: стрептоміцину (200 мкг/мл) та бензилпеніциліну (200 Од/мл).

© **НІДОЄВА З.М., ЛУКАШ Л.Л., ЯЦИШИНА А.П.**

Клітини висівали у чашки Петрі та інкубували в ростовому середовищі за 37°С та 5 % CO_2. Через 24 год середовище змінювали на DMEM без сироватки та додавали β-естрадіол (Sigma Aldrich, Cat #E2758) у певних концентраціях. Експозиція клітин з гормоном тривала 24 год. Клітини знімали механічним методом, без використання протеолітичних ензимів, осад клітин зберігали за – 80°С для подальшого виділення РНК.

Виділення РНК та синтез кДНК. Тотальну клітинну РНК виділяли з використанням QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN, Cat #79306) згідно з протоколом виробника. 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 за –20°С. Для geNorm аналізу кДНК розводили в 10 разів, для зворотно-транскриптазної ПЛР (ЗТ-ПЛР) – у 5 разів.

Дизайн праймерів та підбір референсних генів (geNorm аналіз). Дизайн праймерів гена *MGMT* людини здійснювали за допомогою програми Primer.3, ver 0.4.0 та Primer-BLAST. Праймери для генів домашнього господарювання – комерційні. Праймери для ампліфікації генів *ACTB, B2M, GAPDH, 18S, TBP, TOP* та *RPLPO* отримані від HHK1 (Real Time Primers, LLC, PA, USA), для генів *YWHAZ* та *HMBS* – RTPrimerDB: the Real-Time PCR primer and probe database. Для відбору найкращих референсних генів в умовах обробки β-естрадіолом аналізували 9 генів домашнього господарювання – *ACTB, B2M, GAPDH, 18S, TBP, TOP, HMBS, YWHAZ, RPLPO*. Дані кількісної ПЛР в реальному часі аналізували за допомогою онлайн програми AlgoritmgeNorm (qbase+, Biogazelle), а також NormFinder й geNorm v3, що працюють як макрос до програми Excel Microsoft Office. Для нормалізації рівня експресії гена *MGMT* людини обрали гени *RPLPO* та *HMBS*.

ЗТ-ПЛР проводили в 96-лунковому ампліфікаторі «Т-СУ» фірми «CleaCom» (США). Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила буфер 0,05 М КС1; 0,1 М трис-HCI, pH 8.8; 0,8 % NP40; 1,5 мМ MgCl2; по 0,2 мМ кожного dATP, dCTP, dTTP, dGTP; по 0,02 мкМ праймерів; 30 нг ДНК; 1 одиницю ДНК-полімерази (ThermoScientific, Taq DNA Polymerase recombinant, Cat #EP0405). Кількість циклів ампліфікації – 30 (94°С – 30 с; 60°С – 20 с; 72°С – 60 с; початкова стадія денатурації 2 хв, кінцева стадія елонгації –10 хв). Експресію ядерних рецепторів естрогену ERa та ERb визначали методом ПЛР в реальному часі з подальшим розділенням продуктів у поліакриламідному гелі та візуалізували забарвленням сріблом.

Електрофоретичне розділення та детекція фрагментів ДНК в агарозному гелі. Детекцію продуктів ампліфікації проводили методом електрофорезу в 3 % агарозному гелі, забарвленому бромистим етидієм (0,5 мкл/мл). Для нанесення зразків у лунки гелю використовували 6х буфер (ThermoScientific, 6X MassRuler DNA LoadingDye, Cat#R0621). Електрофорез проводили в міні-камері для горизонтального електрофорезу фірми «BioRad» (США) з використанням трис-ацетатного буфера (1×TAE). Подальшу візуалізацію здійснювали на ChemiDoc (Bio-Rad). Напівкількісну оцінку продуктів проводили за допомогою програм ImageLab (ImageLab™ Software, Bio-Rad).

Статистичний аналіз. Результати опрацьовували статистично, використовуючи пакет програми Microsoft Excel. Експеримент повторено двічі. Розраховували стандартне відхилення (SD) та стандартну помилку середнього (SEM). Відносний рівень експресії гена *MGMT* розраховували, нормалізуючи до середнього геометричного експресії двох референсних генів – HMBS та RPLPO. Статистично значущу різницю рівнів експресії між дослідними групами визначали методом Т-тесту. Для графічної ілюстрації рівнів експресії гена *MGMT* середнє значення ± SEM.

Результати та обговорення

Як відзначалося, варіація експресії *MGMT* досить значна як між тканинами одного організму, так і міжіндивідуальна. Рівень експресії *MGMT* у клітинах пухлин теж варіює, що важливо у ході вибору стратегії лікування, оскільки MGMT є одним із визначальних факторів резистентності до алкілувальної хіміотерапії. Молекулярні механізми такої варіації точно не встановлені. Проте є кілька рівнів, на яких вона може здійснюватися. Наприклад, генетична регуляція через наявність цис-регуляторних елементів у промоторі гена або епігенетична регу-

ляція через доступ таких цис-регуляторних елементів для транскрипційних факторів, а також регуляції трансляції білка чи різні модифікації самої білкової молекули.

На сьогодні є відомості про декілька цис-регуляторних елементів у промоторі *MGMT*. Серед них – елементи відгуку на глюкокортикоїди (в позиціях 26–40 та 63–77 у межах промоторної ділянки X61657.1, 1157 п. н.) [5], які відносяться до стероїдних гормонів. З'ясовано, що синтетичний глюкокортикоїд дексаметазон виступає в ролі транскрипційного фактора та спричиняє зростання рівня експресії гена *MGMT*, зв'язуючись при цьому з комплексом ядерного рецептора із відповідним елементом відгуку в промоторній ділянці гена *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* [5; 6]. Оскільки під час лікування пухлин хіміотерапію часто поєднують із гормонотерапією, постає питання щодо регуляції транскрипції гена *MGMT* іншими речовинами гормональної природи, зокрема β-естрадіолом.

У нашій попередній роботі ми виявили елементи відгуку на стероїдні гормони, які зв'язують гомо- та/або гетеродимери рецепторів естрогенів у позиціях 35–42 та 72–79 у межах промоторної ділянки X61657.1 «+» ланцюзі ДНК [7]. Також ці сайти частково збігаються із вже відомими елементами відгуку на глюкокортикоїди [5]. Тож функціональна активність виявлених нами елементів відгуку на есторогени є вірогідною.

Відомо, що естрогени впливають на експресію різних регуляторів клітинного циклу (c-fos, c-myc, HER2/neu, ростові фактори, цикліни), які діють як на проліферацію, так і на диференціацію клітин [8]. β-Естрадіол, як і інші стероїдні гормони, може впливати на клітину різними шляхами. Розрізняють класичний (генетичний) шлях дії гормону – через відповідний ядерний рецептор, що проникає в ядро та зв'язується зі своїм елементом відгуку у промоторі, та некласичний (негенетичний) швидкий шлях – через рецептор на мембрані [9; 10]. 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 у різних клітинах сприяє тканино- та клітиноспецифічній дії гормону [11]. За даними наукової літератури, обрані нами клітинні лінії експресують мембранний рецептор естрогенів – G protein-coupled estrogen receptor 1 – GPER [9; 10].

Відомо, що стероїдні гормони циркулюють у крові здебільшого зв'язаними з білками сироватки крові. Основну кількість стероїдних гормонів зв'язує Sex hormone-binding globulin, незначна кількість стероїдних гормонів є зв'язаною з іншими альбумінами. Лише незначна частка гормонів (1-2 %), що залишається у вільному стані, не зв'язана з білками, виявляє свою фізіологічну дію [11]. Щоб точно визначити, яка концентрація гормону чинить той чи інший ефект, клітини обробляли гормоном у безсироватковому середовищі. Також ми підібрали фізіологічні концентрації β-естрадіолу (табл.) [12], 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 дуже варіювати.

Таблиця. 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. * – за супровідної гормонотерапії концентрація естрогену 1–1,4 нмоль/л.

Ми перевірили експресію ядерних рецепторів естрогену – ERa та ERb – посередників передачі сигналу гормону (рис. 1) у клітинних лініях HEp-2 та 293. Клітини цих клітинних ліній експресують лише одну ізоформу ядерного рецептора естрогену – ERb, який, за даними наукової літератури, в основному є негативним регулятором експресії генів [13; 14], тоді як ERa зазвичай є позитивним регулятором [8; 15]. Обидві клітинні лінії експресують мембранний рецептор естрогенів.

За результатами ЗТ-ПЛР, β-естрадіол виявляє тенденцію до негативної регуляції транскрипції гена *MGMT* людини (рис. 2). Проте у клітинах 293 за концентрацій 1 та 5 нмоль/л спостерігається незначне підвищення кількості транскрипту порівняно з контролем (рис. 2 Б). Цікаво, що такі концентрації естрогену визначаються в жінок перед овуляцією і, отже, перед потенційним запліднennям. На основі цих результатів можна припустити, що це має значення для захисту організму жінки перед та під час вагітності.

З огляду на різний тип впливу естрогену на експресію *MGMT* на рівні мРНК у клітинах з однаковим патерном експресії ядерних та мембранних рецепторів можна припустити, що така регуляція складніша, ніж через дію гормону як транскрипційного фактора. Однак питання стосовно механізмів, що призводять до різних тенденцій впливу естрогену на кількість транскрипту гена *MGMT* людини, залишається дискутивним та потребує подальшого дослідження.

Висновки

Отримано дані щодо регуляції експресії гена *MGMT* β-естрадіолом у клітинах людини ліній HEp-2 та 293 на рівні мРНК. В експерименті виявлено, що у клітинах лінії HEp-2 пухлинного походження естроген зменшує кількість відповідних транскриптів за всіх фізіологічних концентрацій, а в клітинах лінії 293 теж наявна тенденція негативної регуляції, окрім концентрацій 1 та 5 нмоль/л, що детектуються у жінок перед овуляцією, а також використовуються під час супровідної гормонотерапії (табл.). Отже, отримані нами дані свідчать на користь припущення, що β-естрадіол є одним із гормональних регуляторів гена *MGMT*, і вказують на те, що використання β-естрадіолу одночасно з алкілувальною хіміотерапією може зменшувати ефективність останньої.

Робота виконана за фінансової підтримки НДР за відомчою тематикою НАНУ (номер держ. реєстрації 0115U000355).

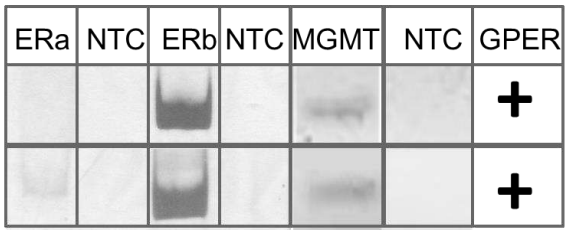

Рис. 1. Статус експресії ядерних рецепторів естрогену ERa та ERb у клітинах 293 та HEp-2. Продукти ПЛР розділені в ПААГ й забарвлені сріблом та в 1,5 % агарозному гелі й візуалізовано етидій бромідом; NTC – контроль, суміш реактивів без матриці кДНК. GPER1 - G protein-coupled estrogen receptor 1.

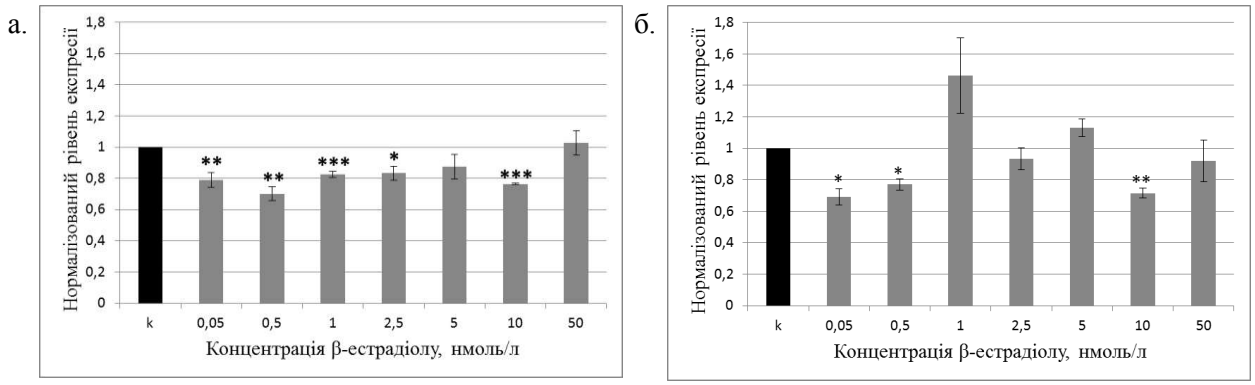

Рис. 2. Експресія гена *MGMT* людини на рівні мРНК за дії β-естрадіолу в клітинах: а – HEp-2; б – HEK 293 (Т-тест *<0,05; **<0,005;***<0,0005).

References

1. Verbeek B., Southgate T.D., Gilham D.E., Margison G.P. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy. *Br Med Bull*. 2008. Vol. 85 (1). P. 17–33. doi: 10.1093/bmb/ldm036.
2. Nakaz MOZ Ukrainy pro zatverdzhennia protokoliv nadannia medychnoi dopomohy za spetsial'nistiu «onkolohiia» № 554 vid 17.09.2007. URL: https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0554282-07#Text (дата звернення: 15.10.2020).
3. Schiavon G., Smith I.E. Status of adjuvant endocrine therapy for breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2014. Vol. 16 (2). P. 206–222. doi: 10.1186/bcr3636.
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. Vol. 87 (3). P. 905–931. doi: 10.1152/physrev.00026.2006.
5. Biswas T., Ramana C.V., Srinivasan G., Boldogh I., Hazra T.K., Chen Z., Tano K., Thompson E.B., Mitra S. Activation of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene by glucocorticoid hormone. *Oncogene*. 1999. Vol. 18 (2). P. 525–532.
6. 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. Vol. 101 (4). P. 659–663. doi: 10.3171/jns.2004.101.4.0659.
7. 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]
8. Chang C., McDonnell D. P. Molecular pathways: the metabolic regulator estrogen-related receptor α as a therapeutic target in cancer. *Clin. Cancer Res*. 2012. Vol. 18 (22). P. 6089–6095. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3221.
9. Vrtačnik P., Ostanek B., Mencej-Bedrač S., Marc J. The many faces of estrogen signaling. *Biochem. medica*. 2014. Vol. 24 (3). P. 329–42. doi: 10.11613/BM.2014.035.
10. 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. Vol. 1155. P. 132–140. doi: 10.1111/j.1749-6632.2008.03685.x18.
11. Hammond G. L. Diverse roles for sex hormone-binding globulin in reproduction. *Biol. Reprod.* 2011. Vol. 85 (3). P. 431–41. doi: 10.1095/biolreprod.111.092593.
12. 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. Vol. 69 (5). P. 1033–1039. doi: 10.1210/jcem-69-5-1033.
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 ERβ-KLF5 pathway. *Ml. Cell. Biol*. 2015. Vol. 19 (36). P. 144–156. doi: 10.1128/MCB.00625-15.
14. Mak P., Li J., Samanta S., Mercurio A. M. ERβ regulation of NF-kB activation in prostate cancer is mediated by HIF-1. *Oncotarget.* 2015. Vol. 6 (37). P. 40247–40254. doi: 10.18632/oncotarget.5377.
15. Mungenast F., Thalhammer T. Estrogen biosynthesis and action in ovarian cancer. Front. *Endocrinol. (Lausanne)*. 2014. Vol. 5. P. 192. doi: 10.3389/fendo.2014.00192.

NIDOIEVA Z.M., LUKASH L.L., YATSYSHYNA A.P.
Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine,
Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150

EFFECT OF β-ESTRADIOL ON THE EXPRESSION OF HUMAN *MGMT* GENE IN CELLS *IN VITRO*

Aim. To determine whether the steroid hormone β-estradiol affects the transcription of the human MGMT gene. The expression status of the DNA repair enzyme O (6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) is important when planning the treatment of patients with oncology, because its presence in tumor cells may reduce the effectiveness of alkylating chemotherapy. Alkylating chemotherapy is combined with hormone therapy in the treatment of tumors, so the study of the effect of β-estradiol on the number of transcripts of the human *MGMT* gene in cells *in vitro* has not only theoretical and also practical significance. ***Methods.*** We used a variety of methods, including culture, molecular genetic and biochemical, such as RNA isolation, cDNA synthesis, reverse transcriptase PCR, agarose and polyacrylamide gel electrophoresis, and statistical processing of the results. ***Results.*** We found a tendency of β-estradiol to downregulate the *MGMT* gene at mRNA level in both HEp-2 and 293 cells in a range of concentrations, except concentrations 1 and 5 nmol/L of β-estradiol in 293 cells. ***Conclusions.*** Our data support the hypothesis that β-estradiol is one of the hormonal regulators of the *MGMT* gene.

Keywords: O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), steroid hormones, β-estradiol, alkylating chemotherapy.