

## БІОІНФОРМАТИЧНИЙ ПОШУК ЕЛЕМЕНТІВ ВІДГУКУ НА ГОРМОНИ У ПРОМОТОРІ ГЕНА O<sup>6</sup>-МЕТИЛГУАНІН-ДНК МЕТИЛТРАНСФЕРАЗИ (MGMT)

Фермент O<sup>6</sup>-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза (MGMT; EC 2.1.1.63), видаляє алкільні групи з O<sup>6</sup>-позиції гуаніну в ДНК, захищаючи клітину від мутагенного та токсичного впливу алкілувальних сполук [1, 2]. Такі сполуки використовуються при хіміотерапії (ХТ) багатьох онкозахворювань [3]. Однак експресуючись у клітинах пухлини, MGMT спричиняє їхню стійкість до алкілувальної ХТ та обмежує ефективність даного методу лікування [4].

У схемах лікування багатьох типів раку, наприклад рак грудей, яєчників, яєчок, щитовидної залози, ендометрію та ін., практикують поєднання алкілувальної ХТ із гормонотерапією. Наприклад, глюкокортикоїди використовують для зменшення набряків та запалень, прогестагени та антиестрогенні засоби використовують у комбінованій терапії раку грудей та ендометрію, а антиандрогени та естрогени – при раку передміхурової залози (Накази МОЗ України № 554 від 17.09.2007, № 247 від 29.04.2011, № 514 від 05.09.2008, № 252 від 08.04.2014) [5]. Гормони та подібні їм біологічно активні речовини є відомими регуляторами експресії генів [5–7]. На сьогодні показано, що застосування синтетичного глюкокортикоїду дексаметазону активує експресію гена *MGMT* [8, 9] як *in vitro*, так й *in vivo*, що значно знижує ефективність паралельної алкілувальної ХТ при лікуванні гліом [10].

Вплив решти гормонів на транскрипцію гена *MGMT* і, відповідно, на ефективність паралельної із гормонотерапією алкілувальної ХТ не відомий. Питання щодо регуляції *MGMT* гормонами, які використовуються у супровідній гормонотерапії онкохворих є актуальним, зокрема, для моделювання ефективніших схем лікування із використанням алкілувальної ХТ. Тому метою даного дослідження було проаналізувати промоторну ділянку гена *MGMT* людини на наявність потенційних елементів відгуку на гормони.

### Матеріали і методи

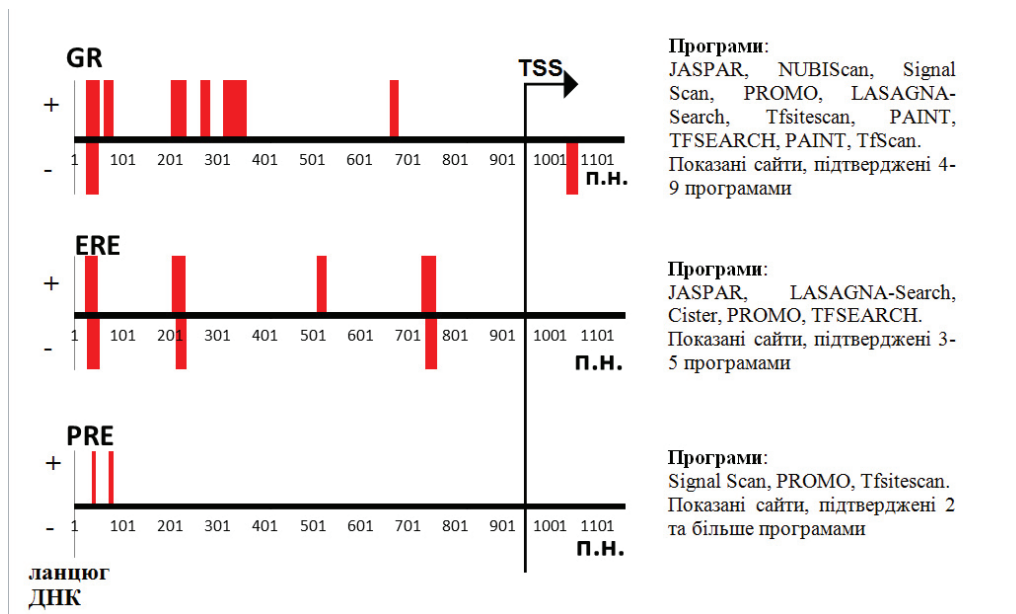
Нуклеотидну послідовність промотора гена *MGMT Homo sapiens* взяли із бази даних GenBank

серверу NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, номер доступу X61657.1, 1157 п.н.). 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/>), Mapper (<http://genome.ufl.edu/mapper/>), Tfsitescan (<http://www.ifti.org/>), LASAGNA-Search ([http://biogrid-head.engr.uconn.edu/lasagna\\_search/](http://biogrid-head.engr.uconn.edu/lasagna_search/)), Promoter Analysis and Interaction Network Toolset (PAINT, v 4.0-pre) [11], 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)), 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>), NUBIScan (<http://www.nubiscan.unibas.ch/cgi-bin/secure/NUBIScan/NUBIScan.cgi>), WWW Promoter Scan (<http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/>), Transcription Element Search System (TESS, <http://www.cbil.upenn.edu/tess>), WWW Signal Scan (<http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/signal/>), 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)), PROMO ([http://algggen.lsi.upc.es/recerca/menu\\_recerca.html](http://algggen.lsi.upc.es/recerca/menu_recerca.html)). Наведені програми використовують різні математичні моделі передбачення сайтів зв'язування транскрипційних факторів із певними ділянками ДНК і різні бази даних таких послідовностей.

### Результати та обговорення

У результаті проведеного біоінформатичного аналізу промоторної ділянки гена *MGMT* людини виявили потенційні елементи відгуку на стероїдні гормони та рецептороподібні фактори тиреоїдних гормонів (рис. 1, 2). Отримані різними програмами дані порівнювали між собою й для подальшого аналізу не враховували HREs, які передбачені лише однією програмою. Як результат, ми передбачили кілька нових HREs у межах досліджуваного промотора, локалізація яких підтверджується двома і більше програмами.

Аналізуючи промотор гена *MGMT* людини, детектували такі потенційні елементи відгуку на



**Рис. 1.** Локалізація сайтів зв'язування рецепторів стероїдних гормонів у промоторі гена *MGMT* людини. Програми, які передбачили відповідні елементи відгуку, зазначено праворуч. TSS – старт транскрипції. Вісь абсцис – промотор X61657.1, 1157 п.н. Вісь ординат – ланцюг ДНК

стероїдні гормони, які зв'язують гомо- та/або гетеродимери рецепторів глюкокортикоїдів, прогестерону та естрогену (рис. 1).

У межах даної промоторної ділянки передбачили численні елементи відгуку на глюкокортикоїди – glucocorticoid response elements, GREs. Окрім відомих із літератури функціональних сайтів у позиціях 26–40 та 63–77 [9], також виявили нові потенційні GREs. Сайти в позиціях 313–341 й 438–461 в «+» та 1037–1057 в «-» ланцюгу виявили чотирма програмами із десяти, сайт 265–283 в «+» – шістьма, 24–48 в «-» та 204–233 в «+» ланцюгу – п'ятьма, а 24–50 і 61–79 в «+» ланцюгу – дев'ятьма. На рис. 1 наведено GREs, детектовані щонайменше чотирма різними програмами. Варто також зазначити, що в ході біоінформатичного 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*, що мають важливе значення при лікуванні онкозахворювань [8–10].

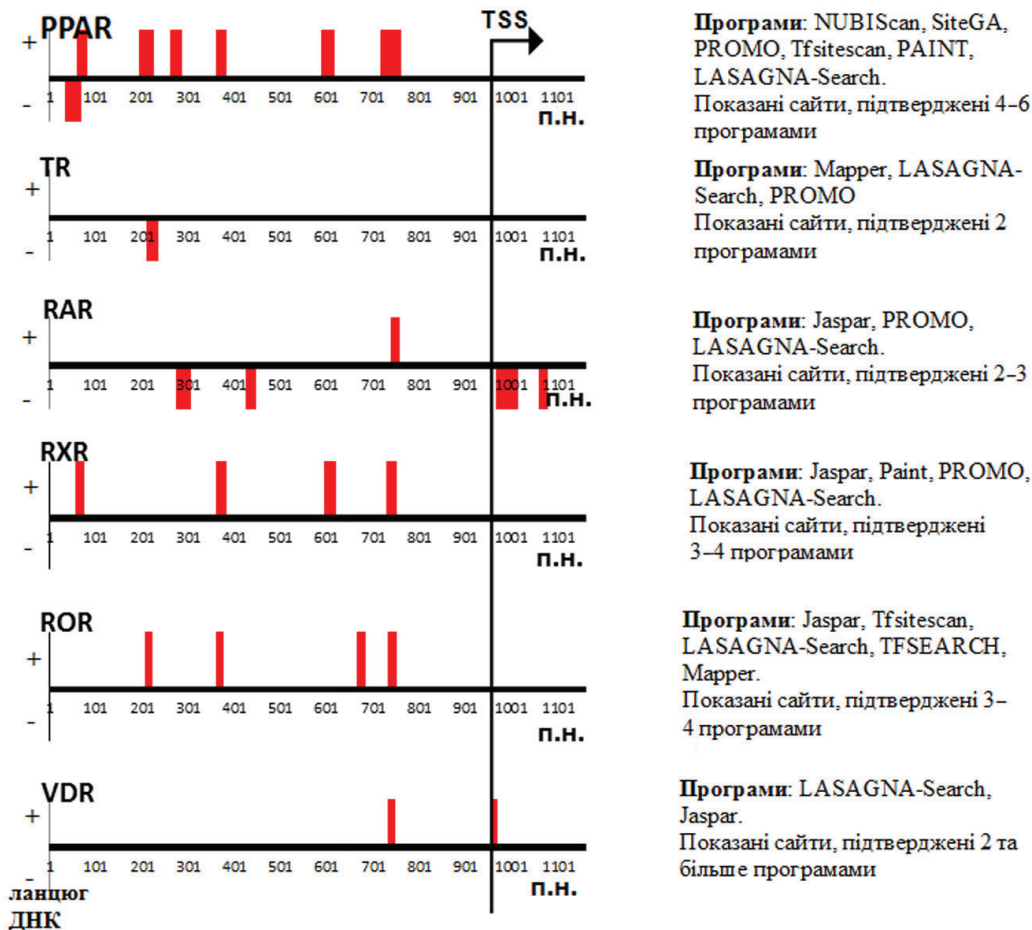
Чотири різних програми із зазначених в методах виявили елементи відгуку на прогестерон (progesterone response elements, PREs), однак лише два потенційні елементи відгуку в позиці-

ях 35–42 та 72–79 в «+» ланцюгу ДНК у межах промоторної ділянки X61657.1 підтвержені усіма програмами (рис. 1).

Сім різних програм передбачили елементи відгуку на естроген – estrogen response elements, EREs (рис. 1). Цікаво, що EREs у позиції 204–229 даного промотора підтверджено за допомогою шести різних програм, а в позиції 729–758 – п'яти (рис. 1). Обидва елементи відгуку знаходяться на «+» ланцюзі ДНК. Серед виявлених у досліджуваному промоторі PREs лише два потенційні елементи відгуку в позиціях 35–42 та 72–79 підтвержені усіма програмами (рис. 1). Навіть два елементи відгуку, передбачені значною кількістю програм, варті подальшого вивчення їхньої активності, оскільки естроген сприяє росту гормоночутливих пухлин, регулюючи експресію протоонкогенів *c-fos*, *c-myc* та ін. [12, 13].

Також, у промоторі гена *MGMT* людини виявили сайти зв'язування з рецептороподібними факторами тироїдних гормонів (рис. 2), такими як рецептор активації проліферації пероксидом, рецептор тироїдних гормонів, ретиноєвий орфанний рецептор, рецептор ретиноїду X, рецептор ретиноїдної кислоти та рецептор вітаміну Д.

Серед восьми програм, якими детектували елемент відгуку на рецептор активації проліферації пероксидом (peroxisome proliferator-activated receptor response elements, PPAREs), шістьма програмами визначено елемент відгу-



**Рис. 2.** Локалізація сайтів зв'язування рецептороподібних факторів тироїдних гормонів у промоторі гена *MGMT* людини. Програми, які передбачили відповідні елементи відгуку, зазначено праворуч. *TSS* – старт транскрипції. Вісь абсцис – промотор X61657.1, 1157 п.н. Вісь ординат – ланцюг ДНК

ку в позиції 360–389, п'ять – в позиції 193–221, обидва елемента в «+» ланцюгу (рис. 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. Зважаючи на отримані дані, припускаємо, що ген *MGMT* людини регулюється даним елементом відгуку *in vivo*. Рецептор активації проліферації пероксидом експресується в різних тканинах, а його ліганди регулюють експресію цілої низки генів, відповідальних за ріст та диференціацію клітин, відповідь на окисидативний стрес, запалення та багато інших біологічних функцій [14].

Елементи відгуку на тироїдні 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 в «–» ланцюгу. Інші дев'ять елементів відгуку виявлені лише однією програмою та не під-

тверджувалися 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. Показано, що тироїдні гормони відіграють важливу роль у проліферації певних пухлинних клітин, що ведуть походження з раку грудей [15], гліоми/гліобластоми [16] та раку щитовидної залози [17], а також нормальних клітин підшлункової залози та острівків Ларгенганса [18].

Елементи відгуку на рецептор ретиноїдної кислоти (retinoic acid receptor response elements, RAREs) детектували чотирма програмами, три із яких виявили один RARE в позиції 739–753 в «+» ланцюгу, два – шість елементів відгуку в позиціях 275–291, 286–302, 423–442, 739–753, 964–986, 992–1008 та 1057–1073 в «–» ланцюгу (рис.2). 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, 593–617, 360–379, 56–73 – трьома. Всі елементи відгуку детектували в «+» ланцюгу (рис. 2). Дані щодо потенційної ролі ретиноїдів в лікуванні онкозахворювань наразі суперечливі [19–23].

Наявність елементів відгуку на ретиноєвий орфанний рецептор (RAR-related orphan receptor response elements, ROREs) в промоторі *MGMT* передбачили чотирма програмами. На рис. 2 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. Перелічені ROREs детектовані в «+» ланцюгу ДНК. Є дуже цікаві дані щодо ролі даного рецептора при лікуванні раку грудей, оскільки він активує експресію ароматази, що призводить до підвищення концентрації естрогена в пухлині та її росту [24].

Лише дві програми передбачили наявність двох елементів відгуку на вітамін D (Vitamin D receptor-like response elements, VDREs) в позиціях 730–745, 951–966 в «+» ланцюгу (рис. 2). Показано, що VDR може захищати від раку, проте дане питання дискусійне через складний спосіб дії даного рецептора [25].

Варто зазначити, що ми виявили багато HREs, а також їхніх напівсайтів тільки однією із зазначених в методах програм (дані не наведено). Також, багато з виявлених нами HREs ма-

ють однакову локалізацію (рис. 1, 2), що пояснюється зв'язуванням рецепторів стероїдних гормонів зі схожими консенсусними послідовностями. Також, мотиви елементів розпізнаються монотамерами 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 HREs в промоторах *in vivo* можуть виконувати регуляторну роль [26, 27].

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

### Висновки

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

### ЛІТЕРАТУРА

1. 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. – N 6 (8) – P. 1079–1099.
2. Tubbs J.L., Pegg A.E., Tainer J.A. DNA binding, nucleotide flipping, and the helix-turn-helix motif in base repair by O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase and its implications for cancer chemotherapy // *NIH PA Author Manuscript* – 2007. – 6, N 8. – P. 1100–1115.
3. Iatsyshyna A.P. Current approaches to improve the anticancer chemotherapy with alkylating agents: state of the problem in world and Ukraine // *Biopolym. Cell*. – 2012. – 28, N 2. – P. 83–92.
4. Verbeek B., Southgate T.D., Gilham D.E., Margison G.P. O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy // *Br Med Bull*. – 2008. – N 85. – P. 17–33.
5. Schiavon G., Smith I.E. Status of adjuvant endocrine therapy for breast cancer // *Breast Cancer Res*. – 2014. – N 16 (2). – P. 206
6. Urvalek A., Laursen K.B., Gudas L.J. The roles of retinoic acid and retinoic acid receptors in inducing epigenetic changes // *Subcell Biochem*. – 2014. – N 70. – P. 129–149.
7. 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. – 87, N. 3. – P. 905–931.
8. 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, N 11. – P. 2329–2336.
9. Biswas T., Ramana C.V., Srinivasan G., Boldogh I., Hazra T.K., Chen Z., Tano K., Thompson E.B., Mitra S. Activation of human O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase gene by glucocorticoid hormone // *Oncogene*. – 1999. – 14, N 2. – P. 525–532.
10. Ueda S., Mineta T., Nakahara Y., Okamoto H., Shiraishi T., Tabuchi K. Induction of the DNA repair gene O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase by dexamethasone in glioblastomas // *J Neurosurg*. – 2004. – 101, N 4. – P. 659–663.

11. Gonye G.E., Chakravarthula P., Schwaber J.S., Vadigepalli R. From promoter analysis to transcriptional regulatory network prediction using PAINT // *Methods Mol Biol.* – 2007. – N 408. – P. 49–68
12. Mungenast F., Thalhammer T. Estrogen biosynthesis and action in ovarian cancer // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2014. – N 5. – P. 192.
13. Chang C., McDonnell D.P. Molecular pathways: the metabolic regulator estrogen-related receptor alpha as a therapeutic target in cancer // *Clin Cancer Res.* – 2012. – 18, N 22. – P. 6089–6095.
14. Chen L., Yang G. PPARs Integrate the Mammalian Clock and Energy Metabolism // *PPAR Res.* – 2014. – N 2014. – P. 653017.
15. Tang H.Y., Lin H.Y., Zhang S., Davis F.B., Davis P.J. Thyroid hormone causes mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of the nuclear estrogen receptor // *Endocrinology.* – 2004. – 145, N 7. – P. 3265–3272.
16. Davis F.B., Tang H.Y., Shih A., Keating T., Lansing L., Hercbegs A., Fenstermaker R.A., Mousa A., Mousa S.A., Davis P.J., Lin H.Y. Acting via a cell surface receptor, thyroid hormone is a growth factor for glioma cells // *Cancer Res.* – 2006. – 66, N 14. – P. 7270–7275
17. Lin H.Y., Tang H.Y., Shih A., Keating T., Cao G., Davis P.J., Davis F.B. Thyroid hormone is a MAPK-dependent growth factor for thyroid cancer cells and is anti-apoptotic // *Steroids.* – 2007. – 72, N 2. – P. 180–187.
18. Mastracci T.L., Evans-Molina C. Pancreatic and Islet Development and Function: The Role of Thyroid Hormone // *J Endocrinol Diabetes Obes.* – 2014. – 2, N 3. – P. 1044.
19. Lotan R. Suppression of squamous cell carcinoma growth and differentiation by retinoids // *Cancer Res.* – 1994. – N 54. – P. 1987s–1990s.
20. Moon T.E., Levine N., Cartmel B., Bangert J.L., Rodney S., Dong Q., Peng Y.M., Alberts D.S. 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, N 11. – P. 949–956.
21. Ahn E.H., Chang C.C., Talmage D.A. Loss of anti-proliferative effect of all-trans retinoic acid in advanced stage of breast carcinogenesis // *Anticancer Res.* – 2009. – 29, N 8. – P. 2899–2904.
22. Yan T.D., Wu H., Zhang H.P., Lu N., Ye P., Yu F.H., Zhou H., Li W.G., Cao X., Lin Y.Y., He J.Y., Gao W.W., Zhao Y., Xie L., Chen J.B., Zhang X.K., Zeng J.Z. Oncogenic potential of retinoic acid receptor-gamma in hepatocellular carcinoma // *Cancer Res.* – 2010. – 70, N 6. – P. 2285–2295.
23. Myga-Nowak M., Pacholska-Bogalska J., Kwańniewski W., Kwańniewska A., Gońdzicka-Jyzefiak 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, N 1. – P. 145–150.
24. 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, N 26. – P. 17711–17719.
25. Morand G.B., da Silva S.D., Hier M.P., Alaoui-Jamali M.A. Insights into genetic and epigenetic determinants with impact on vitamin d signaling and cancer association studies: the case of thyroid cancer // *Front Oncol.* – 2014. – N 4. – P. 309.
26. Khorasanizadeh S., Rastinejad F. Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements // *Trends Biochem Sci.* – 2001. – 26, N 6. – P. 384–390.
27. Claessens F., Gewirth D.T. DNA recognition by nuclear receptors *Biology* // *Essays Biochem.* – 2004. – N 40. – P. 59–72.

**NIDOIEVA Z.M., SAMOILENKO I.O., PIDPALA O.V., LUKASH L.L., IATSYSHYNA A.P.**

*Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Akademika Sci. of Ukraine,*

*Ukraine, 03680, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 150, e-mail: z.m.nidoieva@imbg.org.ua*

### **BIOINFORMATIC SEARCH OF HORMONE RESPONSE ELEMENTS WITHIN THE HUMAN O<sup>6</sup>-METHYLGUANINE-DNA METHYLTRANSFERASE (MGMT) GENE PROMOTER**

**Aims.** The human DNA repair enzyme O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) protects cells against mutations and cell death. On the other hand, it causes the resistance of cancer cells to alkylating chemotherapy. Combination of the chemotherapy and the hormone therapy is widely-used for the treatment of many types of cancer. However, a little is known about effects of hormones on the *MGMT* transcription. Therefore, the aim of this study was to search the hormone response elements within human *MGMT* promoter. **Methods.** We performed *in silico* analysis of the human *MGMT* promoter (X61657.1) to predict hormone response elements using different programs. **Results.** We predicted novel potential hormone response elements, including such for steroid hormones and thyroid hormone receptor-like factors. **Conclusions.** Question of a functional activity of the revealed potential elements and the regulation of the *MGMT* expression by hormones require further experimental studies.

**Keywords:** O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), hormone response elements, steroid hormone receptor, thyroid hormone receptor-like factors.