

Данные были представлены на конференции молодых ученых
“Актуальные проблемы биологии развития”
12–14 октября 2021 г., Москва,
Институт биологии развития РАН

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА ГИСТОНОВОЙ ДЕАЦЕТИЛАЗЫ HDAC (БЕЛИНОСТАТА) НА ЭКСПРЕССИЮ АРИЛ-ГИДРОКАРБОНОВОГО РЕЦЕПТОРА И ЕГО ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© 2022 г. А. А. Акишина^а, Р. О. Черезов^а, Ю. Е. Воронцова^{а, *}, О. Б. Симонова^а

^аФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

*e-mail: vorontsova@idbras.ru

Поступила в редакцию 12.11.2021 г.

После доработки 22.11.2021 г.

Принята к публикации 30.11.2021 г.

Арил-гидрокарбонный рецептор (Aryl hydrocarbon receptor, AHR) является высококонсервативным лиганд-зависимым транскрипционным фактором, гены-мишени которого играют ключевую роль в детоксикации, регуляции процессов развития, поддержании гомеостаза эукариот и метаболизме лекарственных соединений. Наше исследование впервые демонстрирует увеличение экспрессии гена арил-гидрокарбонного рецептора и его генов-мишеней в культурах клеток человека после воздействия ингибитора гистоновой деацетилазы (белиностата), который рассматривают в настоящее время как возможное терапевтическое средство для лечения различных типов глиом, в том числе и глиобластом.

Ключевые слова: арил-гидрокарбонный рецептор AHR, гистоновая деацетилаза HDAC, белиностат, *Cyp1A1*, *Cyp1B*

DOI: 10.31857/S0475145022020021

ВВЕДЕНИЕ

Арил-гидрокарбонный рецептор (Aryl hydrocarbon receptor, AHR) является высококонсервативным лиганд-зависимым цитозольным транскрипционным фактором. Гены-мишени AHR играют ключевую роль в регуляции процессов развития, детоксикации и поддержания гомеостаза эукариот. Наиболее изученными генами-мишенями AHR являются гены, кодирующие ферменты системы цитохрома р450 (CYP), которые участвуют в метаболизме гормонов и лекарственных соединений. Известно, что для многих опухолевых клеток характерно изменение соотношения различных изоформ CYP и их индуцибельности по сравнению с неопухолевыми, что может сильно влиять на эффективность лечения противоопухолевыми препаратами.

Попадая в цитоплазму клетки, лиганд взаимодействует с AHR, который далее перемещается в ядро, где вместе с ARNT (AHR Nuclear Translocat-

or) формирует транскрипционный комплекс для активации генов-мишеней.

Ранее, в экспериментах *in vivo*, мы показали, что разнообразие уровней транскрипции генов-мишеней AHR обусловлено структурой хроматина каждого из них (Akishina et al., 2017). Нами был обнаружен механизм контроля индуцибельной экспрессии генов-мишеней AHR, который заключается в том, что внешний сигнал (лиганд), активирующий AHR как транскрипционный фактор, не всегда вызывает эффективный ответ его генов-мишеней. Этот ответ будет эффективным только в случае доступности ДНК регуляторных областей генов-мишеней для AHR, т.е. зависит от статуса хроматина этих областей, который может меняться в разных тканях и на разных стадиях развития организма (Akishina et al., 2017; Акишина и др., 2020).

Целью настоящей работы было проанализировать, существует ли механизм эпигенетического контроля индуцибельной экспрессии генов-мишеней AHR в клетках человека опухолевого и не-

опухолевого происхождения, поскольку ингибиторы гистоновых модификаторов и лиганды АНР часто используются при лечении разных типов рака (Howells et al., 2002; Wang et al., 2017; Gurbani et al., 2019). Белиностат, ингибитор гистоновой деацетилазы HDAC, не так давно начали рассматривать, как возможное терапевтическое средство для лечения различных типов глиом, в том числе и глиобластом (Kusaczuk et al., 2016; Gurbani et al., 2019). В данной работе мы исследовали влияние белиностата на индукцию лигандами АНР экспрессии его генов-мишеней семейства *CYP1* (*CYP1A1*, *CYP1B*), уровень экспрессии самого гена *AHR* и его партнера, *ARNT*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для анализа использовали клетки эмбриональных почек человека линии НЕК293 и опухолевые клетки глиобластомы человека Sus/fP2 (Pustogarov et al., 2017), любезно предоставленные сотрудниками лаборатории нейрогенетики и генетики развития Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. Для культивирования клеток использовали клеточную среду DMEM/F12, содержащую 10% FBS, с добавлением 2 мМ L-глутамин и 19.4 мМ D-глюкозы (ПанЭко, Россия) при 37°C и 5% CO₂.

Для проведения экспериментов клетки рассевали на 6-ти луночные планшеты и инкубировали 24 ч, после чего в клеточную среду добавляли лиганды, либо белиностат или лиганды плюс белиностат на 24 ч. Все эксперименты были проведены в трех повторностях. Лиганды и белиностат растворяли в ДМСО для получения стоковой концентрации: 10 мкМ для 2'Z-индирубина (Sigma-Aldrich, США), 100 мМ для индол-3-карбинола (Mirax Biopharma, Россия) и 2 мМ белиностата (PXD101, Sigma-Aldrich, США). Далее лиганды добавляли в среду в конечной концентрации: 10 нМ индирубин, 100 мкМ индол-3-карбинол и 2 мкМ белиностат. В качестве контроля в среду добавляли эквивалентное количество ДМСО.

Изменения экспрессии генов оценивали с помощью ПЦР в реальном времени. Протоколы выделения РНК, синтеза кДНК и проведения ПЦР в реальном времени описаны ранее (Воронцова и др., 2020).

В работе использовали следующие последовательности пар праймеров: для гена *GAPDH*: прямой – TGCACCACCAACTGCTTAGC, обратный – GGCATGGACTGTGGTTCATGAG; для гена *HPRT1*: прямой – TGAGGATTTGGAAAGGGTGT, обратный – GAGCACACAGAGGGC-TACAA; для гена *AHR*: прямой – GAACCATC-CCCATACCCAC, обратный – TGGCTGG-CACTGATACATCG; для гена *ARNT*: прямой – GAAACATTTGATCTTGGAGGCAGCAG, обрат-

ный – AGGAGTCACGGAGTCAGACACATA; для гена *CYP1A1*: прямой – GATTGAGCACTGT-CAGGAGAAGC, обратный – CCAAAGAGGGT-CAAGACGATGTTA; для гена *CYP1B*: прямой – CTCAACCGCAACTTCAGCAACTTC, обратный – AGAGAGGATAAAGGCGTCCATCAT. Гены *HPRT1* и *GAPDH* использовали в качестве референсных.

Все результаты представлены как среднее значение ±SEM. Различия считались значимыми при p-value менее 0.05. Статистическая значимость различий между образцами для экспериментов оценивалась с помощью программного обеспечения REST (Qiagen, США) (Pfaffl et al., 2002) с использованием парного теста рандомизации с фиксированным перераспределением с 2000 перестановок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Применение индирубина и индол-3-карбинола по-разному влияло на экспрессию исследуемых генов. Экспрессия гена *CYP1A1* при добавлении индирубина увеличивалась незначительно по сравнению с контролем (рис. 1в). После добавления индол-3-карбинола уровень экспрессии *CYP1A1* увеличивался значительно, в 4.5 и в 19 раз, в клетках линии неопухолевого происхождения НЕК293 и в клетках глиобластомы Sus/fP2 соответственно. Уровень экспрессии гена *CYP1B* повышался только при добавлении индол-3-карбинола в клетках Sus/fP2 (рис. 1г).

CYP1A1 и *CYP1B* являются генами-мишенями лиганд-зависимого транскрипционного фактора АНР. Повышение уровня экспрессии *CYP1A1* и *CYP1B* в ответ на действие лигандов АНР указывает на нормальное функционирование пути *AHR/CYP1* в исследуемых клеточных культурах.

Что интересно, воздействие лигандов также приводило к увеличению экспрессии самого *AHR* в клетках линии НЕК293 и к значительному снижению экспрессии в клетках линии Sus/fP2 (рис. 1а). Тогда как на экспрессию *ARNT* применение лигандов практически не оказывало эффекта (рис. 1б).

Добавление к культивируемым клеткам белиностата, который является ингибитором гистоновой деацетилазы HDAC, приводило к активации транскрипции *AHR* и усилению экспрессии всех исследуемых генов, кроме *ARNT*. Возможно, HDAC не участвует в регуляции активности промотора гена *ARNT* в клетках исследуемых культур. Для гена *AHR* было показано, что ингибиторы HDAC могут усиливать конститутивную активность его промотора, тем самым повышая уровень его экспрессии (Garrison et al., 2000), что подтверждается нашими данными.

Самое значительное (в 600 раз) повышение экспрессии было зафиксировано для гена *CYP1A1* в клетках глиобластомы. Интересно, что белино-

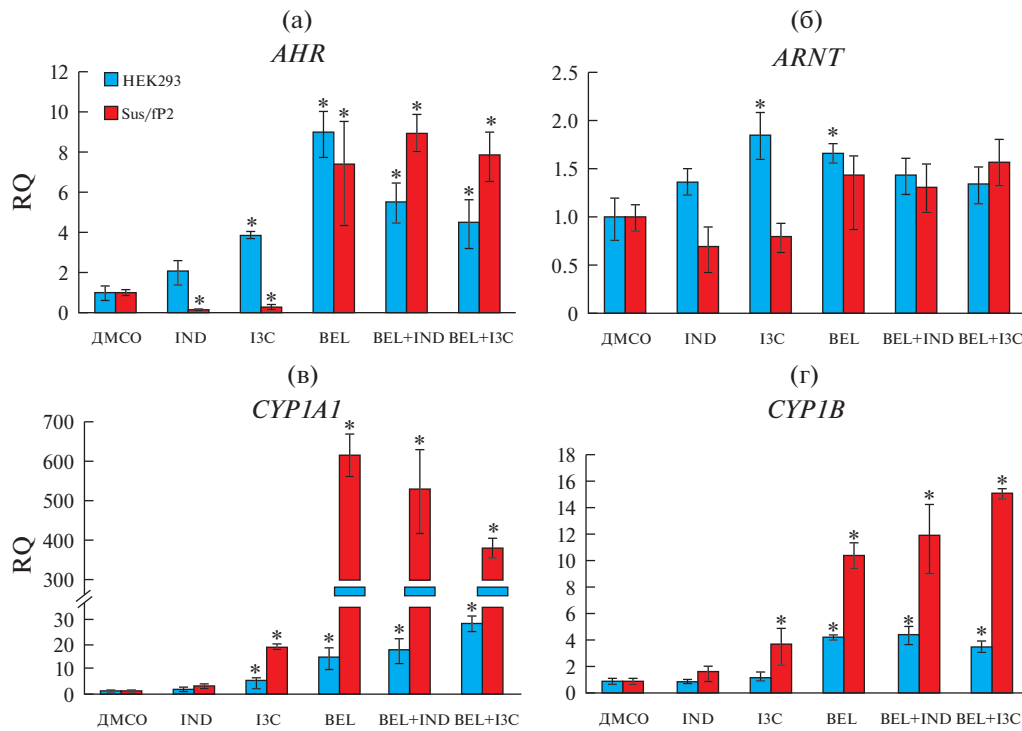


Рис. 1. Уровень экспрессии генов *CYP1A1*, *CYP1B*, *AHR* и *ARNT* в клетках линии неопухолевого происхождения HEK293 и глиобластомы Sus/fP2 до (контроль) и после добавления лигандов (индирубина, индол-3-карбинола) и белиностата, ингибитора гистоновой деацетилазы HDAC. Уровень экспрессии генов *AHR* (а), *ARNT* (б), *CYP1A1* (в), *CYP1B* (г). Звездочка указывает на значимое различие в экспрессии генов по сравнению с контролем ($* p \leq 0.05$). RQ – относительный уровень мРНК. DMCO – контроль, IND – индирубин, I3C – индол-3-карбинол, Bel – белиностат.

стат значительно сильнее влиял на уровень экспрессии генов-мишеней *AHR* в клетках глиобластомы Sus/fP2, чем в клетках неопухолевой культуры HEK293.

Менее выраженный рост уровня экспрессии *AHR* и его генов-мишеней в ответ на действие белиностата в культуре HEK293 по сравнению с культурой глиобластомы, можно объяснить особенностями клеток HEK293 и ткани, из которой они получены. Как было показано ранее, изменение паттерна экспрессии, инициированное во время воздействия белиностата, может сильно зависеть от типа опухолевых клеток (Kusaczuk et al., 2016).

Таким образом, в клетках опухолевого и неопухолевого происхождения, в которых работает путь *AHR/CYP1*, способность генов-мишеней реагировать на активацию *AHR* индирубином и индол-3-карбинолов зависит от статуса хроматина их регуляторных зон и активности эпигенетических факторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Механизм и принцип действия белиностата на данный момент понятен не до конца, хотя известно, что он является ингибитором гистоновой деа-

цетилазы HDAC, которая подавляет экспрессию генов на эпигенетическом уровне через модификацию гистонов промоторных областей. Однако, до сих пор не выявлен полный спектр генов, экспрессию которых белиностат может контролировать в опухолевых и неопухолевых клетках. Тем не менее известно его прямое влияние на экспрессию генов, чьи продукты ответственны за арест клеточного цикла и апоптоз, что важно для онкотерапии (Kusaczuk et al., 2016). В данной работе мы показали, что белиностат также активирует экспрессию гена *AHR* и двух его генов-мишеней в клетках глиобластомы, усиливая действие лигандов *AHR*. Так как лиганды *AHR* и эпигенетические ингибиторы используются в противоопухолевой терапии разных видов рака, в том числе глиобластом (Sherer et al., 2017), результаты нашей работы необходимо учитывать при разработке новых комбинаций терапевтических схем лечения онкологических заболеваний.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Дмитрию Юрьевичу Пантелееву, сотруднику Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, за помощь в проведении экспериментов и сотрудникам лаборато-

рии нейрогенетики и генетики развития Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН за предоставление клеточных линий. Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИБР им. Н.К. Кольцова РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данное исследование выполнено при финансовой поддержке раздела Государственного задания ИБР РАН № 0088-2024-0008.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования люди и животные не использовались в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Акишина А.А., Воронцова Ю.Е., Черезов Р.О. и др.* Эпигенетическая модуляция транскрипции генов-мишеней арил-гидрокарбонового рецептора человека в трансгенной линии *Drosophila melanogaster* // Биомика. 2020. Т. 12. № 4. С. 504–509.
- Воронцова Ю.Е., Акишина А.А., Черезов Р.О. и др.* Функциональная активность арил-гидрокарбонового рецептора в первичных культурах клеток остеогенной саркомы человека // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2020. Т. 75. № 4. С. 291–295.
- Akishina A., Vorontsova J., Cherezov R. et al.* Xenobiotic-induced activation of human Aryl hydrocarbon receptor target genes in *Drosophila* is mediated by the epigenetic chromatin modifiers // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 61. P. 102934–102947.
- Garrison P.M., Rogers J.M., Brackney W.R. et al.* Effects of histone deacetylase inhibitors on the Ah receptor gene promoter // *Arch. Biochem. Biophys.* 2000. V. 374. № 2. P. 161–171.
- Gurbani S.S., Yoon Y., Weinberg B.D. et al.* Assessing treatment response of glioblastoma to an HDAC inhibitor using whole-brain spectroscopic MRI // *Tomography*. 2019. V. 5. № 1. P. 53–60.
- Howells L.M., Gallacher-Horley B., Houghton C.E. et al.* Indole-3-carbinol inhibits protein kinase B/Akt and induces apoptosis in the human breast tumor cell line MDA MB468 but not in the nontumorigenic HBL100 line // *Mol. Cancer. Ther.* 2002. V. 1. № 13. P. 1161–1172.
- Kusaczuk M., Krętowski R., Stypułkowska A. et al.* Molecular and cellular effects of a novel hydroxamate-based HDAC inhibitor – belinostat – in glioblastoma cell lines: a preliminary report // *Invest. New Drugs*. 2016. V. 34. № 5. P. 552–564.
- Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L.* Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR // *Nucleic Acids Res.* 2002. V. 30. № 9. P. e39.
- Pustogarov N., Panteleev D., Goryaynov S. et al.* Hiding in the shadows: CPOX expression and 5-ALA induced fluorescence in human glioma cells // *Mol. Neurobiol.* 2017. V. 54. P. 5699–5708.
- Sherer C., Tolaymat I., Rowther F. et al.* Preliminary SAR on indole-3-carbinol and related fragments reveals a novel anticancer lead compound against resistant glioblastoma cells // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2017. V. 27. № 7. P. 1561–1565.
- Wang Y., Hoi P.M., Chan J.Y.-W. et al.* New perspective on the dual functions of indirubins in cancer therapy and neuroprotection // *Anticancer Agents Med. Chem.* 2014. V. 14. № 9. P. 1213–1219.

Effect of the Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor – Belinostat – on the Expression of the Aryl Hydrocarbon Receptor and Its Target Genes in Human Cell Cultures

A. A. Akishina¹, R. O. Cherezov¹, J. E. Vorontsova¹, *, and O. B. Simonova¹

¹ *Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*

*e-mail: vorontsova@idbras.ru

The aryl hydrocarbon receptor (AHR) is a ligand-dependent transcription factor. Its target genes play an important role in detoxification, developmental regulation, maintenance of eukaryotic homeostasis, and drug metabolism. The results of our study have shown for the first time the increase in the expression of the aryl hydrocarbon receptor and its target genes in human cell cultures after exposure to a histone deacetylase inhibitor (belinostat), which is currently considered a potential therapeutic agent for the treatment of various types of gliomas, including glioblastoma.

Keywords: aryl hydrocarbon receptor AHR, histone deacetylase HDAC, belinostat, *Cyp1A1*, *Cyp1B*